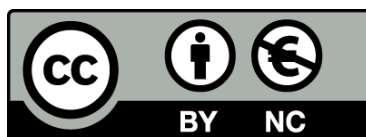




# **Estudi en mostres humanes i en cultius neuronals d'indicadors del sistema glutamatèrgic i dopaminèrgic en relació a l'exposició prolongada a contaminants orgànics tòxics persistents**

Aina Palou Serra



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**ESTUDI EN MOSTRES HUMANES I EN CULTIUS  
NEURONALS D'INDICADORS DEL SISTEMA  
GLUTAMATÈRGIC I DOPAMINÈRGIC EN RELACIÓ A  
L'EXPOSICIÓ PROLONGADA A CONTAMINANTS  
ORGÀNICS TÒXICS PERSISTENTS.**

Tesi doctoral presentada per,

**Aina Palou Serra,**

**Barcelona, 2012.**



**Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia  
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)  
Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC)  
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)  
Consorci d'Investigació Biomèdica en xarxa especialitzat en epidemiologia i salut  
pública (CIBERESP)**

**Memòria Presentada per optar el grau de Doctora per la Universitat de Barcelona,  
Programa de Doctorat de Biomedicina.**

**Els directors:**

**Cristina Suñol Esquirol**

**Investigadora Científica  
IIBB (CSIC-IDIBAPS)**

**Eduard Rodríguez-Farré**

**Professor Investigador  
IIBB (CSIC-IDIBAPS)**

**Signat: Aina Palou Serra  
Barcelona, setembre 2012**



**Aquesta tesi ha estat possible gràcies a una beca predoctoral IDIBAPS otorgada de gener del 2008 a desembre 2011.**

**Aquest treball ha estat finançat pels següents projectes:**

“Estudio de mecanismos de neurotoxicidad crónica de contaminantes tóxicos: papel de los receptores GABA-A, de glutamato y de estrógenos. Posibles intervenciones terapéuticas” (PI10/00453)

“Identificación de dianas moleculares y funcionales alteradas en procesos de neurotoxicidad inducida por contaminantes ambientales y biocidas en cultivos neuronales” (PI 06/1212).

“Determinación de niveles de glutamato y dopamina y de sus transportadores plasmáticos en muestras de sangre y de placenta. Búsqueda de posibles biomarcadores de exposición y efecto para el metilmercurio y otros contaminantes ambientales.” (AA07\_012)

“Proyecto CIBER Epidemiología y Salud Pública. Neurotoxicidad de agentes ambientales, exposición de la población y salud pública.” (CB06/02/0024)

Grupo de Investigación consolidado “Farmacología y Toxicología.” (2009/SGR/214)

Grupo de Investigación consolidado “Farmacología y Toxicología.” (2005/SGR/00826)



A les meves *famílies* .





*“Cada encuentro es un encuentro contigo mismo”*

## **AGRAÏMENTS**

Aquesta tesi és fruit de nombroses vivències en els darrers 5 anys: de moltes emocions, d'aprenentatges, de remogudes, d'exploracions, d'iniciatives, de naixements, de trencaments, de cicles i canvis... i en aquest procés, moltes, moltíssimes persones hi han estat presents de maneres diferents, contribuint a que arribés a aquesta etapa del camí. Moltes estan molt a dintre meu i formen part del que sóc ara. Altres han format part d'aquest cicle vital, i han ajudat a que aquesta tesi, de part difícil, tirés endavant.

*... i començaré a passejar-me pels passadissos d'aquest centre en que hi he passat tantes hores... GRÀCIES...*

\* Als director\*s, la Cristina i l'Eduard, per haver-me donat l'oportunitat d'iniciar aquesta tesi. Pels moments de suport; pels moments d'ajudar-me, Cristina, a llegir els números i extreure'n una figura del caos inicial. I Eduard, per la mirada detallada en moments de correccions, i per compartir moments d'ecoactivismes. Per la llibertat que m'heu deixat en perdrem i traçar els meus propis camins.

\* Als tutor\*s (Joan i Rosa) per la proximitat, escolta, empena i consells que m'heu donat en els moments d'avaluació i alhora de resoldre'm certs dubtes.

\* A tota la gent que ha passat en algun moment o altre pel 631, un lloc on el companyerisme, el carinyo, la simpatia, la música i els riures mai han faltat. Un per un....;) Mireia! gràcies per totes les converses, pel suport incondicional, per la complicitat, i pels dos primers anys, en que erets com el meu diari personal amb qui vaig compartir el meu estat permanent de caos continu...St. Cugat s'agermana amb Gràcia! Buscarem nous espais per seguir-nos trobant ;) Victor! Gracias por los apoyos en tantas ocasiones, por resolverme dudas incluso desde EEUU, por los momentos de risas, hermano mayor del labo! Sarillaaa!!!! Mil gracias por ser como eres! Sin duda hiciste del laboratorio un lugar de muchas risas! Porque he aprendido mucho de ti, y de tu fuerza vital y tu autenticidad! Sobre todo en posicionarme en determinadas situaciones ;)! Al Fran, al Marcelo, a la Bea, al Raul, la Rita, la Gabriela i la Fanny... por todo lo que aprendí de y con vosotros, por los momentos de risas, por los momentos de poyata...Fran, por los momentos iniciales de paciencia con impaciencia a ayudarme a desarrollarme por este espacio...Marcelo, por aceptarme a venir a Florionapolis! Jorge! Gracias por todos los favores, y por la buena onda que llevas, lástima que hayamos coincidido en este momento final! Luana! O mesmo! Grandes las conversaciones en Granada! Eres una fighter! Espero que volvamos a coincidir...! Nair i Matt! El mateix! Em feia por aquest moment transitori en que tants companys marxaven, i m'hagués agradat ser més acollidora en la vostra entrada a aquest nou espai, però ja sento que entre vosaltres tot flueix...! Amb aquests post-docs al labo res no pot anar malament!;) Ara salto a l'altre grup, que també és meu! Ya sabéis, siempre lo he dicho, en el fondo, Pons de corazón! Toniiii!!!! Pisha, decirte que tu llegada en el labo fue muy importante pa mi! Has sido un hermano en todo momento y te he sentido cerquísima siempre, tú saes!...Gracias por todos los momentos, momentos de risas y los tantos momentos de lagrimilla suelta en que siempre has estado allí! por todo el amor, cariño y humor que

desprendes! Te quiero un montón! Aprovecho también pa saludar a la Ali...soys un amor los dos! Hary (*Potter*)! Gracias por los tantos momentos de ayuda...tienes una energía increíble y admirable! (Me pasas un poco?) Me encantó conocerte un poco más de cerca en Graná!;) Laura Vuolo y Blanca! Que soys unas majísimas y es maravilloso compartir labo con vosotras! Mercedes! por las conversaciones en la fleca o donde se terciase, por empatizarnos tanto, jeje...Jordi! sembla ahir que estiguessis per aquí! quines grans discussions a les hores de dinar al clínic, jajaja... Rubén, poco tiempo pero se te cogió cariño! Sebastià, of course, uns especials agraiments, per tots els moments de suport i d'escolta, per la paciència amb els westerns, pels materials que m'has deixat del teu labo ;), per tots els moments de consulta mèdica (oh no! me estoy quedando sin médico?), i per les nostres enganxades, siempre con humor!

\* A la Leticia.... Mil gracias por ser como eres, presencia importante en el CSIC. Gracias por tus consejos en momentos clave; por todos los momentos de charlas, por estar allí apoyando siempre, y por supuesto, por ser la reina del HPLC...sobretudo por los dos primeros años de tesis, acompañándome emocionalmente y científicamente, fuiste muy importante! He aprendido mucho de ti!

\* Guido! Amor! Em va fer molta il·lusió la teva arribada aquí, amb qui sentia tanta proximitat per compartir visions, enfocos polítics, i afinitats de la vida dins del centre! M'ha encantat compartir moments de cafès, de festetes, de salses, de blablabla...I apart, mil gràcies pels favorazos de poyata...sense tu no acabo aquesta tesi!;) T'estimu molt!

\* A tota la gent del centre amb qui hem compartit estones de cantina, de passadissos, de *bruixes*, de sopars, de ballaruques, de vins, d'estressos, de moments vitals, d'assessins i excursions....Eva, que bé poder tenir converses "místiques" amb una investigadora profunda en neurociències! Anna! Grans els moments de batalla per reclamar la estància desitjada! Giuseppe!! Sabes que he tenido conversaciones contigo en momentos claves para seguir avanti? venga, ánimos, queda menos! Susana! Jajaja, muchas risillas vistiéndome de ti! Chica de colores! Carlos, qué bueno encontrarte por Lugo! siempre un placer charlar contigo, del Sahara o lo q seal! Roci, guapa, se te echa de menos! Maria Jaramillo, increíble tu energia también! Mercè, Laia, Albert, Xavi, Silvia, Ro, Pacos, Lupes, Xevi, Leo, Patri, Marco, Marina, Crisa, Vero, Anna...i em deixo a moltes, pos eso, gràcies per tots aquests moments! Peter! Gracias por resolverme ciertas dudas, y por prestarme algunas cosillas!;

\*Carme i Matilde, gràcies per haver atès i resolt moltes de les meves necessitats, radioactives o de cultius!

\*Montse! Merci por la alegría y buena onda, importante tu presencia pa dar color en el labo! También por tu valentía en reclamar tus derechos! Salima! Qué bonito fue tenerte por aquí, y compartir historias de luchas tan personales! Loli! jeje, lo mismo! Que soys unas salàs las tres!

\*Al Marc Guaita, perquè definitivament, ets el meu acompanyant científic-intel·lectual de frikismes que em posa les piles... JaJajajaja, per tots els riures a carcajada limpia en les bruixes o la bohem parlant de ... (rellénalo tú), per ser tu, autèntic, extrem, elegant, loc\*, intel·ligent i guapo! Per trucar-me casi cada dia per anar a dinar, insistir, i estar tant present.. Ai loviu!

\*A **la gent de Berlin**.... Catrin, thanks thanks a lot for all the support you give in Wildhau. First to accept me there; for having a plan to take the maxim profit in two month. For all the patient in teach me the PCR technic, and for taking care of the whole stuff of the university. Thanks to the Prof. Frohme to accept me in the group. Also many thanks for all the partners of the center for teach me each think of the lab: Oliver, Jens, Phillipp, Desiree, Markus, Diana, Lars, Katja, Jascha, Ulrich, Nicole, Nadine, Stephanie, Sandra. ...**seguint a Berlin**.... A la Trunxi! Oohh, gràcies per acollir-me en aquesta ciutat i fer que em sentís ràpidament com a casa! per tots els moments de halloumis i mercats, i sobretot sobretot, per aquesta portada tan meravellosa!... Ronan, gracias por los momentos compartidos, por mostrarme otros mundos. Ares, guapa, està clar que la vida ens va juntar, fue un desdoblamiento del tiempo? Gràcies per les jams pirates amb ukeleles i acordeons! I a la Mireja,Till, Eva, Octavi, Elia, Guillem, Noah, Cinthia... gentecilla maravillosa!

***I ara surto d'aquest centre per dirigir-me a aquests espais tan meus i tan vius....***

\* A les Ajilles, per acompanyar-me en la fascinant ruta de la vida, pel calor diari que despreneu, perquè viure amb vosaltres és meravellós, bonic, i un no parar de riure, un plaer! També gràcies per suportar-me ens moments d'estrès, i de bajons...i fer-me costat always.

\* A les Arpies, perquè juntes vam fer créixer les ales i les garres necessàries per a poder volar pels móns (vallcarquins) somiats.

\* A les teatrapuces (Mariana, Sara, Joana, Julia, Bibi, Aita, Inés, Ele, Caty, Txexe, Acán, Blanca, Lily...), per tot el que he après amb vosaltres, per tots els moments de jugar a reconstruir el guió de la vida, per qüestionar-nos lo inqüestionable, pel creixement juntes, pels riures, pels udols, pels abrazos caracols, per la FORÇA, per ser tan grans. Porque me teatrasesais....

\* Al Vallès (patates, moritos, moritas, voltors, petxines, exclèxes...Kevin, Gomi, Xola, Marc H, Caste, Taka, Neus, Juju, Pau, Alba, Aita, Eva, Isaac, Ninyin, Txuru, Txepo,Martí, Florestans...) perquè cada dia aquesta comunitat és més maca, propera, càlida, sentida, entonada i jabata.

\* A l'Ari.... sister! t'estimu molt i estic contentíssima d'haver confiat en aquell primer moment que vam decidir anar a buscar casa juntes, just ara quan començava aquesta tesi, sense encara coneixe'ns gaire! Quant hem après i compartit! Ens hem metamorfosejat en Ajilles, i encara seguim aquí juntes, mano a mano (o pies a pies)! A la Tona (ara Marta)!...per obrirme nous mons, pels acompanyaments en processos vitals importants per a mi, com aquesta tesi!;), per compartir tant, per ser tan germana. A l'Alexias, per tots els moments viscuts en la intensa Vallcarca i per l'afinitat en tantíssimes coses. A l'Adri, per tot el que hem "ballat juntes", per ensenyar-me tant, per la complicitat alhora de llegir i dibuixar els "esquemes" de la vida!;) A la Yaix, per la teva arribada revolucionadora, per la teva força i energia, per tot el que aprenem compartint. Al Carlos, por tus chistes y tus cantares en la cocina, por aflorar me mis risas más profundas;). Al Oscar, por transmitirme esa calma que tanto se agradece. Al Taino! Pel teu entusiasme i afinitat doctoril, per confiar tant en mi...ok, Bernat & Palou 2013, *Green Criminology*...està venint, ho veig! A l'Ernest! Per ensenyar-nos tantes coses, perquè haver descobert Barcelona al teu costat ha estat un no parar d'aprendre curiositats majares invisibles a la majoria de ciutadans.

\* A l'Aitana...por estar desde hace mucho rato en mi vida, encontrando las maneras de encontrarnos! A l'Eva, per tots *els viatges* compartits mi amol, en aquest oceà d'emocions ;)

\* Als bioquímics, Virgi, Adri i Laura...per *l'estat estacionari* creat amb un toque d'antropia i dimonieses d'en Maxwell (jajajaja), per tots els moments de qüestionar i divagar, amb una birra (artesana si pot ser) o davant del mar, la ciència i la vida. Per estar aquí.

\* Al Pablo... por ser tan amigo y tan hermano desde hace ya un buen rato...porque viajar por la vida contigo es un placer... te quiero mucho amore!

\* Al Jordi....per tot el que vam compartir, que va ser molt intens i ple de moments bonics.

\* Al Guillem, per totes les converses de bar profundes després dels viatges intravenosos del Francesc ;) i que encara segueixen; per sentir-te tan a prop sempre, per aquesta relació tan especial ;).

\* Al Caste, perquè has aparegut al principi i al final d'aquest *cicle* ;) ...per aquestes distraccions tan necessàries, per l'ho compartit, i perquè encara hem costa trobar la frase ;).

\*A la Joanings, per totes les converses imparables que ens han fet viatjar a galàxies ben llunyanes...i per compartir de tant a prop el teu altre procés de part.

\* Als qui fan d'utopies realitats, i les han compartit de ben a prop (sobretot, canmasdeuencs i teixidorencs). Al Nat, pels moments de somiar desperts.

\*También a Gabriel,Damian y Carmen por acogerme y ofrecerme un espacio crítico en que me muy a gusto en el foro de la Habana, y por compartirme lo que pasa *en aquel lado de allá..;*) y al Juan P, por la confianza, por hacerme sentir que mi trabajo es necesario, y por inspirarme con el suyo. I a la Lordins, l'Uli, la Marion, el Ruben, Jose, Kiko, Jude, Diego, Valldures, Horteras, Andrés, Miren, Christian, Rosa, doctors varis (Pep, Laia C, Mireia B, Guille P...)... A totes les persones que han passat per el meu camí durant aquests anys, a totes aquelles que m'inspiren amb la seva manera de ser, a totes aquelles amb qui he compartit dubtes, emocions, incerteses sobre rums o sobre la locura tesi. Sé que me'n deixo a moltes perquè són masses, però cada una de les converses (en una festa, una trobada, un moment desesperat) han tingut el seu lloc aquí.

\* A la meva família. Tiets i tietes, cosins i cosines, per ser cada una i un de vosaltres tant diferent i a la vegada tenir tanta essència comú, per la vostra força. Avis i àvies, per ser-hi d'alguna manera. A la meva germana, per tanta vida compartida, per tots els moments de complicitat, de riure, i aprenentatges juntes. I al meu pare i la meva mare... Gràcies per haver fet l'esforç de llegir-vos la tesi i corregir les faltes i altres cosetes! I gràcies als dos, per haver-me transmès amor, respecte i curiositat cap a la natura i la vida, per tot el que m'heu ensenyat, per tot el que hem compartit, i per tot el suport que m'heu donat en aquesta tesi.

\* I finalment, gràcies a la vida.....*que m'he ha dado tanto.*

**No tot és desar somnis pels calaixos  
rodejats d'enemics o bé d'objectes  
que subtilment i astuta ens empresonen.**

**Perquè viure és combatre la peresa  
de cada instant i restablir la fonda  
dimensió de tota cosa dita,  
podem amb cada gest guanyar nous àmbits  
i amb cada mot acréixer l'esperança.**

**Serem allò que vulguem ser.**

**Pels vidres  
del ponent encrespat, la llum esclata.**

Miquel Martí i Pol

*“Ahora se hace más visible el metabolismo e interdependencia que existe entre la vida de los humanos y la vida en la naturaleza; hecho magníficamente descrito por la economía política desde el siglo XIX y enunciado por el saber ancestral desde varias culturas. Comprendemos por tanto que la lucha por la vida humana y por la justicia sanitaria en el acceso a los servicios que curan la salud de las personas no es suficiente, no es sustentable, y ni siquiera posible, si a la par no derrotamos la civilización de la muerte que deteriora cotidianamente la salud de la gente y ahoga la Madre Tierra como fuente de la vida”.*

Jaime Breilh (tercera asamblea mundial por la salud de los pueblos) “Más allá de la crisis actual: movilización por la salud para todas y todos” (Julio 10, 2012)

**“La tesi és un estat d'ànim.”**

Andy amic Taino

*Els COPs (Contaminants Orgànics Persistents) són una metàfora i molt més que una metàfora: són un dels problemes més característics i rellevants de les nostres societats postmodernes. La contaminació per COP a la terra – i com a part indissociable d'ella, dels aliments, les aigües, l'aire, els organismes vius, nosaltres- es un conflicte socioecològic i sanitari consubstancial als nostres models d'economia, cultura i societat. Els contaminants tòxics persistents són “sistèmics” en diversos sentits, i certament en el sentit nuclear: son una de les principals causes del sistema. La contaminació generalitzada per els COPs és el resultat de les nostres polítiques públiques i privades: polítiques sobre pinsos, ramaderia, sanitat animal, polítiques sobre (i de) la indústria alimentaria i la seguretat alimentaria, sobre riscos químics, energia, medi ambient, residus, reciclatge, educació, indústria, transport, salut pública, sanitat...La contaminació per COPs és el resultat de les components més actives i agressives d'aquestes polítiques. També de les més passives i negligents (algunes molt pensades, per a no “cremar-se”, no “ser un incordi” als clients polítics); és a dir, inaccions i omissions, de les rutines tòxiques, aliades de qui prefereixen mirar a una altre banda y no veure els morts, el sofriment, i el gasto que els COP ocasionen.*

**Porta, Puigdomenech & Ballester 2009**



# INDEX

<b>ABREVIACIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Els contaminants orgànics tòxics persistents .....</b>	<b>11</b>
<b>Definició i característiques .....</b>	<b>11</b>
<b>Principals contaminants estudiats .....</b>	<b>12</b>
A) El metilmercuri .....	12
B) L'hexaclorociclohexà .....	20
C) Els policlorobifenils.....	23
<b>Infància .....</b>	<b>28</b>
<b>2. El sistema glutamatèrgic .....</b>	<b>32</b>
<b>El glutamat .....</b>	<b>32</b>
Concentracions de glutamat.....	33
<b>El sistema glutamatèrgic al sistema nerviós central .....</b>	<b>35</b>
Els transportadors de glutamat .....	36
Els receptors de glutamat .....	38
La senyal excitatòria .....	43
Model in vitro de cultius primaris de neurones corticals .....	44
<b>El sistema glutamatèrgic a la placenta .....</b>	<b>45</b>
Formació anatomia i funció de la placenta .....	45
Síntesi, metabolisme i transport de glutamat a la placenta .....	47
<b>3. El sistema dopaminèrgic .....</b>	<b>50</b>
Emmagatzematge de dopamina .....	51
El Transportador de dopamina .....	52
Els receptors de dopamina .....	53
Línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y .....	54
<b>4. Efectes neuroquímics dels contaminants.....</b>	<b>56</b>
<b>El metilmercuri .....</b>	<b>56</b>
<b>L'hexaclorociclohexà.....</b>	<b>59</b>
<b>Els policlorobifenils.....</b>	<b>60</b>
<b>Cocktail de contaminants.....</b>	<b>62</b>
<b>2.OBJECTIUS.....</b>	<b>65</b>
<b>Objectius generals .....</b>	<b>67</b>



Objectius concrets .....	67
--------------------------	----

### **3. MATERIALS I MÈTODES ..... 69**

#### **Part 1. Estudi d'indicadors del sistema glutamatèrgic en mostres humanes en relació als seus nivells de mercuri i contaminants organoclorats ..... 71**

Població .....	71
Mostres de sang de cordó umbilical i placenta .....	72
Compostos químics .....	73
Preparació d'homogenats de membrana plasmàtica de placenta.....	73
Expressió del transportador de glutamat en placenta .....	74
Unió al transportador de glutamat en placenta.....	74
Determinació dels aminoàcids glutamat i aspartat en plasma de cordó umbilical.....	74
Expressió del transportador de glutamat en placenta .....	75
Activitat del enzim glutamat deshidrogenasa.....	76
Anàlisi estadístic de les dades .....	76

#### **Part 2. Estudi *in vitro* dels efectes de l'exposició prolongada (> 96h) i a concentracions subtòxiques de PCB 138 i HCH ( $\gamma/\beta$ ) en els transportadors i receptors glutamatèrgics de cultius primaris de neurones corticals..... 77**

Materials .....	77
Cultius primaris de neurones corticals.....	77
Tractament amb $\beta$ -HCH, $\gamma$ -HCH i PCB 138 .....	78
Assaig de viabilitat cel·lular pel mètode d'MTT .....	78
Captació d' $[H^3]$ -aspartat .....	78
Funció dels receptors glutamatèrgics per determinació del $[Ca^{2+}]$ intracel·lular .....	79
Expressió proteica de NR1 per western blot.....	79
Anàlisi estadístic de les dades .....	80

#### **Part 3. Estudi *in vitro* dels efectes de l'exposició prolongada (>96h) i a concentracions subtòxiques de PCB 138 i $\gamma$ -HCH a transportadors i receptors dopaminèrgics en cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y ..... 82**

Materials .....	82
Cultius d'SH-SY5Y .....	82
Tractament amb $\gamma$ -HCH i PCB 138.....	83
Assaig de viabilitat cel·lular pel mètode d'MTT .....	83

Expressió de DRD2L i S, VMAT2 i DAT per RT-PCR .....	83
Determinació de dopamina (DA) i DOPAC .....	84
Expressió proteica de DRD2 i VMAT2 per western blot .....	84
Anàlisi estadístic de les dades .....	85

#### **4. RESULTATS.....87**

##### **Part 1. Estudi d'indicadors del sistema glutamatèrgic en mostres humanes de placenta i sang de cordó umbilical en relació als seus nivells de mercuri i contaminants organoclorats ..... 89**

1.1. Quantificació dels nivells de glutamat i aspartat en mostres humanes de plasma de cordó umbilical i la relació amb els nivells de T-Hg i contaminants OCs.....	89
1.2. Inhibició de la unió d' <sup>3</sup> H-aspartat/glutamat al transportador de glutamat en homogenats de placenta humana en funció pel MeHg i altres contaminants OCs .....	98
1.3. Quantificació de la expressió proteica de EAAT2 i la Bmax en nou mostres de placenta humana de la cohort de València i relació amb els nivells de T-Hg i OCs. ....	102
1.4. Estudi de la activitat de l'enzim glutamat deshidrogenasa (GDH) in vitro en relació el MeHg, el PCB 138 i el β-HCH. ....	103

##### **Part 2. Estudi *in vitro* dels efectes de l'exposició prolongada (> 96h) i a concentracions subtòxiques de PCB 138 i HCH (γ/β) en els transportadors i receptors glutamatèrgics de cultius primaris de neurones corticals..... 105**

2.1. Viabilitat cel·lular dels cultius primaris de neurones corticals exposades durant 6 div a concentracions creixents de PCB 138 i isòmers d'γ i β-HCH .....	105
2.2. Estudi del transport de glutamat in vitro en cultius primaris de neurones corticals exposats durant 6 div a concentracions creixents de PCB 138 i β-HCH .....	107
2.3. Estudi in vitro de l'increment de calci intracel·lular induït per NMDA i àcid Kaïníc davant l'exposició aguda del PCB 138 i el γ-HCH en cultius primaris de neurones corticals .....	107
2.4. Estudi in vitro de l'increment de calci induït per NMDA, Kainat i DHPG davant la exposició prolongada (6 div) a concentracions subtòxiques de PCB 138 i γ-HCH en cultius primaris de neurones corticals .....	109
2.4.1. Calci basal .....	109
2.4.2. Receptors glutamatèrgics .....	110

2.4.3. Receptors d’NMDA .....	111
2.4.4. Receptors de Kainat .....	112
2.4.5. Receptors metabotròpics de glutamat tipus I .....	113
2.5. Estudi in vitro de l’expressió de NR1 davant l’exposició prolongada (6 DIV) a concentracions sub tòxiques de PCB 138 i $\gamma$ -HCH en cultius primaris de neurones corticals. ....	114
2.6. Estudi de la mort per excitotoxicitat induïda per glutamat i NMDA en cultius de CTX exposats durant 6DIV a concentracions sub tòxiques de PCB 138 i $\gamma$ -HCH .....	115
<b>Part 3. Estudi in vitro dels efectes de l’exposició prolongada (&gt;96h) a concentracions sub tòxiques de PCB 138 i <math>\gamma</math>-HCH a transportadors i receptors dopaminèrgics en cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y .....</b>	<b>117</b>
3.1. Viabilitat de les cel·lules de neuroblastoma SH-SY5Y exposades la seva diferenciació neuronal a concentracions creixents de PCB 138 i $\gamma$ -HCH .....	117
3.2. Estudi de la expressió gènica dels receptors dopaminèrgic DRD2 (S I L) i el transport vesicular de monoamines (VMAT2) davant l’exposició de PCB 138 i $\gamma$ -HCH durant 6 div .....	118
3.3. Estudi de l’expressió proteica dels receptors de dopamina DRD2 i VMAT2 qualitativament davant l’exposició a concentracions creixents de $\gamma$ -HCH durant 6 div. ....	123
3.4. Determinació de la concentració de dopamina (DA) i DOPAC en el medi extracel·lular durant al exposició a concentracions creixents de PCB 138 i $\gamma$ -HCH durant 6 div.....	124
<b>5. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>127</b>
<b>6. CONCLUSIONS .....</b>	<b>151</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>155</b>

## ABREVIACIONS

<b>A1254</b>	aroclor 1254
<b>AMPA</b>	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propanoïc àcid
<b>AR</b>	àcid retinoïc
<b>ASP</b>	aspartat
<b>ATP</b>	adenosina trifosfat
<b>ATSDR</b>	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
<b>BHE</b>	barrera hematoencefàlica
<b>CGC</b>	cèl·lules granulars de cerebel
<b>Cit.</b>	citat per
<b>Coef.</b>	coeficient
<b>COPs</b>	Contaminants Orgànics Persistents
<b>CTX</b>	neurones corticals de ratolí
<b>CV</b>	coeficient de variació
<b>DA</b>	dopamina
<b>DAT</b>	transportador de dopamina (dopamine transporter)
<b>DDE</b>	diclorodifenildicloroetilè
<b>DDT</b>	diclorodifenildicloroetà
<b>DHPG</b>	(R,S)-3,5-dihidroxifenilglicina
<b>DIV</b>	dies in vitro
<b>DMSO</b>	dimetil sulfòxid
<b>DOPAC</b>	àcid 3,4-dihidrofenilacètic
<b>DRD2</b>	receptor de dopamina subtipus D2 ( <i>dopamine receptor D2</i> )
<b>EAAC1</b>	<i>excitatory amino acid carrier</i>
<b>EAAT</b>	transportador d'aminoàcids excitadors ( <i>excitatory amino-acid transport</i> )
<b>EC50</b>	concentració per assolir el 50% del efecte màxim
<b>Emax</b>	efecte màxim assolit
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FKBP12</b>	FK506 binding protein 12 kDa
<b>GABA</b>	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
<b>GDH</b>	glutamat deshidrogenasa
<b>GLAST</b>	<i>glutamate-aspartate transporter</i>
<b>GLN</b>	glutamina
<b>GLT1</b>	<i>glutamate transporter</i>
<b>GLUT</b>	glutamat
<b>GSH</b>	Glutatió
<b>HCB</b>	hexaclorobenzè
<b>HPRT</b>	<i>hipoxanthinephosphoribosyltransferase</i>
<b>IC50</b>	concentració per assolir el 50% de la dosi màxima
<b>INMA</b>	infància i medi ambient
<b>IPEN</b>	<i>International POPs Elimination Network</i>
<b>IQ</b>	coeficient d'intel·ligència
<b>LC50</b>	concentració per assolir el 50% de la mort màxima

<b>L-DOPA</b>	3,4-dihidroxifenilalanina
<b>LTP</b>	<i>long-term potentiation</i> (potenciació a llarg termini)
<b>MeHg</b>	metilmercuri
<b>mGluR I</b>	receptor metabotròpic de glutamat
<b>MP</b>	malaltia de Parkinson
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli
<b>NA</b>	noradrenalina
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartat
<b>NMDAR</b>	receptor d'NMDA (N-metil-D-aspartat)
<b>OCs</b>	organoclorats
<b>PBDG</b>	<i>Porphobilinogen deaminase</i>
<b>PCB 138</b>	policlorobifenil congènere 138
<b>PCBs</b>	policlorobifenils
<b>RfD</b>	dosi de referència
<b>RT-qPCR</b>	<i>Real Time- quantitative Polimerase Chain reaction</i>
<b>RyR</b>	receptors de rianodina
<b>SC</b>	stockholm Convention
<b>SCB</b>	sinciciotrofoblast
<b>SD</b>	desviació estàndard (standard deviation)
<b>SNC</b>	sistema nerviós central
<b>SOCC</b>	canals de calci de compartiments interns (storage-operated calcium channels)
<b>t½</b>	vida mitjana
<b>TH</b>	tirosina hidroxilasa
<b>T-Hg</b>	mercuri total
<b>tPDC</b>	<i>L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate</i>
<b>UNEP</b>	United Nations Environment Programme
<b>VDCC</b>	canals de calci dependents de voltatge
<b>VGLUT</b>	transportador vesicular de glutamat
<b>VMAT2</b>	transport vesiculars de monoamines 2
<b>β-HCH</b>	hexaclorociclohexà isòmer beta
<b>γ-HCH</b>	hexaclorociclohexà isòmer gamma o lindà

# 1. INTRODUCCIÓ



# 1 ELS CONTAMINANTS ORGÀNICS TÒXICS PERSISTENTS

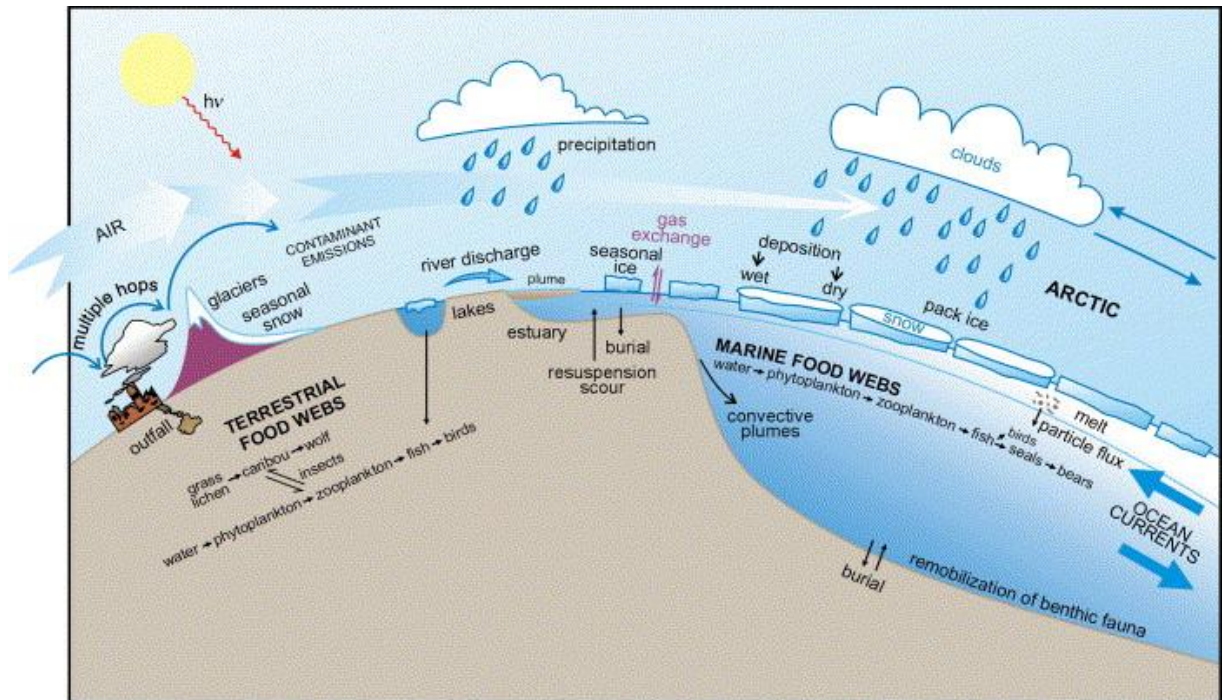
## DEFINICIÓ I CARACTERÍSTIQUES

Els *contaminants orgànics persistents* (COPs) —un tipus de *contaminants tòxics persistents* (CTP)— són compostos que han demostrat ser nocius tant per a la salut com pel medi ambient, i que es caracteritzen per contenir àtoms de carboni i hidrogen a la seva estructura i, la majoria de vegades, àtoms halogenats. També, en diversos casos, incorporen oxigen o d'altres àtoms. Aquests compostos, presenten una sèrie de característiques que són les que fan adoptar el seu caràcter peculiar com a tòxics, fent-los més preocupants a nivell de medi ambient i salut (Porta et al. 2009, El-Shahawi et al. 2010, Stockholm Convention (SC) (2001) <http://chm.pops.int>). Aquestes característiques són :

- **Persistència:** Els COPs són altament resistents a la degradació, i per això poden restar durant llargs períodes de temps, tant en el medi ambient com en organismes vius. La vida mitjana dels COPs pot durar de mesos a dècades. Aquests compostos reaccionen lentament o no del tot, a processos com la biodegradació, la fotòlisi, l'oxidació i/o la hidròlisi. Un criteri típic per a catalogar-los com a COPs és si superen el temps mitjà de degradació de 2-5 dies a l'aire, 2-6 mesos a l'aigua, i 6-12 mesos en sòls i sediments, ja que es considera que es poden acumular en l'ambient i ser transportats a llargues distàncies. Molts COPs persisteixen molt més temps que els establerts per aquests criteris, com és el cas dels policlorobifenils (PCBs), les dioxines i d'altres organoclorats (Wania & Mackay 1999).
- **Capacitat de bioacumulació:** Els COPs, com indica el seu nom, contenen grups orgànics (formats per àtoms de carboni i hidrogen) que aporten el caràcter lipòfil del contaminant. Això fa que els COPs s'acumulin en els teixits grassos dels organismes, en especial el teixit adipós i el cervell, però també en òrgans com el fetge, la melsa, els pulmons, el pàncrees, i els ronyons (Iida et al. 2007). Al mateix temps aquestes molècules són difícilment o nul·lament metabolitzables i, per tant, no excretables o només molt lentament. La capacitat de bioacumulació dels COPs és doncs la propietat que tenen els organismes en absorbir i retenir aquests contaminants del medi i no eliminar-los (Porta et al. 2009).



- **Capacitat de biomagnificació:** La capacitat de bioacumulació dels COPs pot comportar també la capacitat de biomagnificació, que consisteix en la característica d'anar augmentant de concentració en un organisme quan més elevat és el seu nivell tròfic a la cadena tròfica en que es troba. Dit d'altre manera, els organismes de la cadena tròfica que es troben en nivells més elevats, i que solen ser més grans, al haver ingerit organismes més petits, que a la vegada han menjat altres organismes més petits, i així successivament, retenen tots els COPs que han estat acumulats en els diferents organismes (Vasseur & Cossu-Leguille 2006). És per això que la concentració d'aquests contaminants pot ser molt major en certs organismes que en els medis que aquests habiten, podent arribar a augmentar la seva concentració a 70.000 vegades (ATSDR 2000, Stockholm Convention (2001)). És l'últim esglaó de la cadena tròfica, moltes vegades els humans, els que es veuen/ens veiem més perjudicats, doncs absorbeixen/bim els COPs acumulats per tots aquests organismes.
- **Presència global:** Una altra propietat de molts d'aquests contaminants és la seva alta volatilitat; aquests s'evaporen a l'atmosfera, i tornen a dipositar-se a la Terra a través de precipitacions. Aquesta propietat, junt a la persistència, provoca que els COPs viatgin llargues distàncies, adquirint una presència global; viatgen a llocs més freds a través de l'aire, on allà es condensen (Stockholm Convention 2001). La manera de viatjar varia segons les propietats físico-químiques dels COPs, i fins i tot varia entre isòmers (Li & Macdonald 2005). Els COPs poden ser qualificats segons la forma que utilitzen per a viatjar com a "voladors", "nedadors", o "single-multiple hoppers" (Lohmann et al. 2007) (figura 1). Els compostos amb major pressió de vapor i temps de vida viatjaran més llargues distàncies, mentre que els que tenen una pressió de vapor baixa es dipositaran de manera local. Els que tenen la capacitat de fer el procés d'emissió-transport-dipòsit diverses vegades són els anomenats múltiples *hoppers* (saltadors), com és el cas del mercuri (UNEP Chemical Branch 2008). En llocs mancats d'indústria com els casquets polars, on mai ha estat utilitzat cap d'aquest compostos, se'n poden trobar, i a concentracions més elevades que a llocs industrialitzats, sent l'Antàrtica considerada un receptor de COPs (Li & Macdonald 2005). S'estima que les poblacions indígenes de l'Àrtic són les que presenten més altes concentracions de COPs, fet que ha comportat l'aparició de noves malalties (IPEN 2009). A més a més, actualment es suma una nova preocupació, i és l'efecte del canvi climàtic en les rutes i distribucions d'aquests contaminants en la Terra (Macdonald et al. 2005).



**Figura 1.** Il·lustració esquemàtica de les possibles vies de distribució dels COPs de regions industrialitzades fins l'àrtic (Macdonald et al. 2005)

- **Toxicitat:** Els contaminants orgànics persistents són, per sobre de tot, tòxics. Els efectes tòxics dels COPs varien en funció del compost, de les quantitats d'aquest i del temps que ha estat exposat el subjecte així com la via d'exposició (inhalat, ingerit o per contacte). També afectaran de diferent manera en funció de l'edat, el sexe, la dieta, l'estil de vida, determinants socials, característiques familiars i estats de salut (ATSDR 2000, ATSDR 2005). Per les propietats anteriorment dites aquests compostos són més preocupants, doncs un cop alliberats al medi ambient són capaços d'estar-s'hi dècades causant problemes com ara càncers, al·lèrgies i hipersensibilitat, defectes al naixement, inhabilitats en l'aprenentatge, alteracions immunològiques, del comportament, neurològiques i reproductives, en persones i animals. Alguns COPs són a més considerats disruptors endocrins (El-Shahawi et al. 2010).

## PRINCIPALS CONTAMINANTS ESTUDIATS

En aquesta tesi són tres els contaminants que han estat principalment estudiats: el metilmercuri (MeHg), els policlorobifenils (PCB), i els hexaclorociclohexans (HCH). Tots tres, junt amb altres, formen part d'una llista de contaminants que han estat determinats en les mostres de treball de la primera part d'aquesta tesi (realitzada amb mostra poblacional de placenta i sang de cordó umbilical).

### A) METILMERCURI

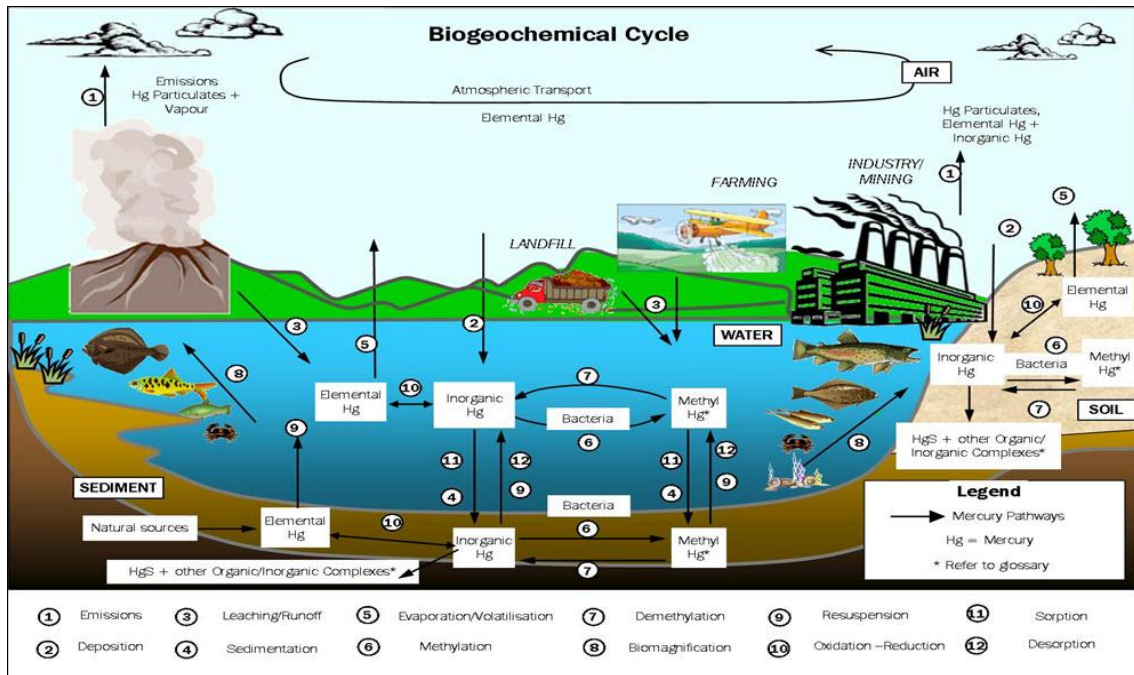
El metilmercuri (MeHg) tot i no ser considerat encara un COP pel conveni d'Estocolm<sup>1</sup> —si bé es troba a la llista de candidats a incloure pròximament—, compleix les característiques anteriorment esmentades per les seves propietats orgàniques, a part de contenir un metall pesant. És la tercera substància catalogada com “tòxica” (després de l'arsènic i el plom) en funció de la seva freqüència, toxicitat i potencial per a l'exposició humana (ATSDR 2011).

El mercuri el podem trobar al medi ambient de 3 formes: mercuri vapor elemental ( $\text{Hg}^0$ ), sals inorgàniques de mercuri ( $\text{Hg}^{1+}$  : mercuri I, mercuriós;  $\text{Hg}^{2+}$  : mercuri II, mercúric), i mercuri orgànic. Les diferents formes presenten propietats físico-químiques específiques que determinen la seva distribució a la biosfera (ex., el Hg elemental té una solubilitat en aigua molt baixa (de  $5.6 \cdot 10^{-5}$  g/L a 25°C), mentre que el clorur de mercuri ( $\text{HgCl}_2$ ) té una solubilitat alta (de 69 g/L a 20°C)). El mercuri elemental o inorgànic, un cop alliberat a l'ambient no és degradat, i entra a un cicle on pot ser inter-convertit a les diferents formes (figura 2). Degut a la seva elevada volatilitat, aquest entra a l'atmosfera on hi pot restar de 0.4 a 3 anys. A l'atmosfera, el  $\text{Hg}^0$  pot ser oxidat a  $\text{Hg}^{2+}$ , que degut a la seva elevada solubilitat es dissolt en l'aigua de la pluja, penetrant de nou a la terra i als sistemes aquàtics. El Hg pot ser aleshores convertit a través de microorganismes anaeròbics a mercuri orgànic (metilmercuri, MeHg; etilmercuri, dimetilmercuri, etc). El metilmercuri és un catió organometàl·lic -  $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$  - que s'acumula en organismes marins, duent-se a terme el procés de bioacumulació i biomagnificació comentat anteriorment. Així doncs, el MeHg és la forma més perillosa de Hg,

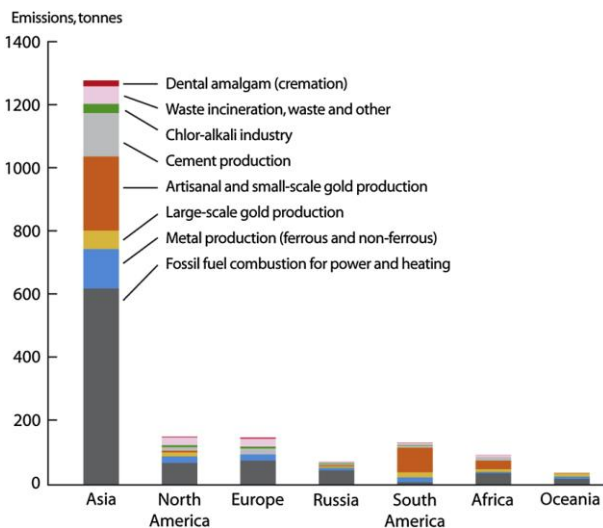
---

<sup>1</sup> El Conveni d'Estocolm de Contaminants Orgànics Persistents és un tractat global per a protegir la salut humana i el medi ambient d'aquesta mena de compostos químics, que són un problema global. Aquest s'inicià l'any 2001 i entra en vigor al 2004; hi formen part diversos països i és administrat per la UNEP (*United Nations Environment Programme*) i té com a objectiu l'eliminació o reducció de l'alliberació d'aquests contaminants a la Terra.

ja que adquireix les característiques dels COPs (National Research Council 2000, Trasande et al. 2005).



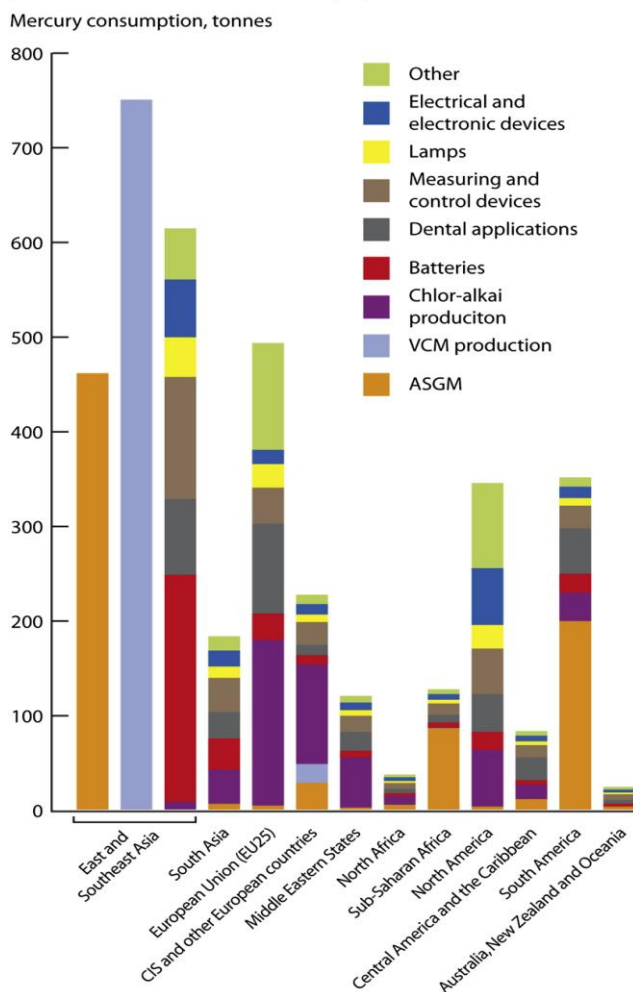
**Figura 2.** Esquema del cicle del mercuri i les seves diferents formes la biosfera (Ministry for the Environment 2008).



**Figura 3.** Emissions globals de Hg a l'aire al 2005 segons els diferents sectors i/o continents per tones. (Pacyna et al. 2010).

El mercuri elemental (que origina el MeHg) pot venir tant de fonts naturals com antropogèniques. Es pot trobar de manera natural a l'escorça terrestre, a matèries primeres com el carbó, el petroli, els combustibles fòssils, així com a minerals com el cinabri; el mercuri elemental pot ser alliberat també al medi ambient per processos naturals com l'activitat volcànica o incendis forestals. Però un 70% aproximadament de les emissions anuals de mercuri provenen de fonts antropogèniques (Trasande et al. 2006, AMAP/UNEP Chemicals Branch 2008).

Global mercury consumption by application and by region in 2005 (note: East and Southeast Asia bar is split)



AMAP/IVL, 2008

**Figura 4.** Consum de Hg en tones, per aplicació i regió (Pacyna et al. 2010).

Les fonts antropogèniques del mercuri (figura 3) es poden catalogar com a primàries (on el Hg és d'origen geològic, però aquest és mobilitzat i alliberat al medi ambient) o secundàries (on l'emissió és deguda a un ús intencionat del mercuri). Dins les fonts primàries trobem la mineria de certs minerals o del propi mercuri, l'extracció i combustió de combustibles fòssils, la combustió de carbó o petroli, producció d'acer o ferro, producció de ciment... en aquests processos, el mercuri es troba com a traça i és alliberat. La combustió de carbó estacionària (i d'altres combustibles fòssils) per a la producció de calor i energia en les centrals elèctriques és la major font d'emissió de Hg vapor a l'atmosfera. La tercera font d'alliberació de mercuri, que també es troba dins d'aquesta categoria és la producció de ciment (AMAP/UNEP Chemicals Branch 2008, Pacyna et al. 2010). S'estima que 1,5 milions de persones pateixen intoxicació pel mercuri degut a la mineria i

processament de minerals que contenen mercuri<sup>2</sup> (*worlds worst toxic pollution problem 2011*).

Dins les fonts secundàries (figura 4) es troba l'ús del mercuri en processos industrials (com el de la indústria del clor o de l'acetaldehid), en aplicacions mèdiques o dentals, i en la mineria artesanal d'or a petita escala (Pacyna et al. 2010). Aquesta última és la font més gran d'alliberació de mercuri intencionadament, i és aquesta activitat la que requereix major ús de

<sup>2</sup> Per tal de separar el mineral del mercuri, es sol trossejar el mineral i després escalfar-lo per evaporar el mercuri. Si no hi han els sistemes industrials adequats, el vapor de mercuri d'aquests processos va a parar a l'atmosfera. De la mateixa manera, si els residus de la mineria no són processats adequadament, o són abandonats, són una font de mercuri a la Terra (*worlds worst toxic pollution problem 2011*).

mercuri a nivell global. La intoxicació per mercuri degut a la mineria d'or artesanal<sup>3</sup> afecta a uns 3,5 milions de persones<sup>4</sup> i ha estat catalogada com la major causa d'intoxicació per a contaminants del món (*worlds worst toxic pollution problem 2011*). Finalment, destaca l'ús de mercuri en la indústria cloro-alcalina, i en la producció de monòmers de clorur de vinil (VCM) a Xina. Altres usos, com en les bateries, o en les amalgames dentals, tot i estar vigents encara, estan disminuint (Pacyna et al. 2010).

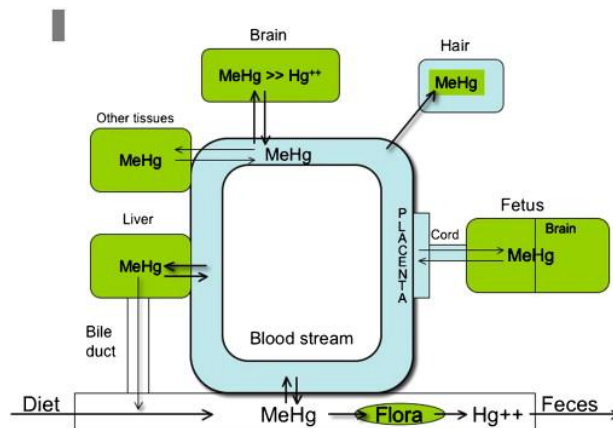
## **DISTRIBUCIÓ DEL METILMERCURI A L'ORGANISME**

El 95% del metilmercuri ingerit a través del peix/dieta és absorbit pel tracte gastrointestinal i va a parar a la sang. En 30-40h és distribuït a tots els òrgans i la vida mitjana ( $t_{1/2}$ ) a la sang humana és d'entre 40 i 105 dies (la mitjana és de 70 dies), amb una taxa d'excreció de l'1% en 24h. A la sang s'acumula als glòbuls vermells, amb un índex respecte al plasma de 20:1. L'índex cervell/plasma és entre 5:1 i 10:1 (sent la concentració de mercuri al cervell matern molt menor que al fetal). L'índex cabell/sang total és de 250:1 (Clarkson 2002, Sanfeliu et al. 2003, Cernichiari et al. 2007). Un cop el MeHg arriba al cabell es manté estable allà, sent per això una bona matriu de biomonitorització humana molt utilitzada en estudis epidemiològics, ja que permet veure les quantitats a les que havia estat exposada la persona en el passat (Malm et al. 1995, Cernichiari et al. 2007). El MeHg té elevada afinitat pels grups tiols que es troben a molècules com ara el glutatió reduït (GSH) o la cisteïna; el complex MeHg-cys format imita l'estructura de l'aminoàcid metionina, i té la propietat de ser transportat a través de transportadors d'aminoàcids neutres i traspasar així la membrana plasmàtica. També mimetitza al seu anàleg, l'homocysteïna, i és a través d'aquest complex que el metilmercuri travessa la barrera hematoencefàlica o la placenta.

---

<sup>3</sup> Extracció i processament del metall manualment i mitjançant substàncies com el mercuri. El procés d'amalgamació artesanal per mercuri en mineria d'or consisteix en la mescla del mercuri elemental amb la pols de mineral que conté tracs d'or. El mercuri s'uneix a l'or, formant un sòlid or-mercuri anomenat amalgama. Després aquesta amalgama s'extreu dels sediments mitjançant un rentat d'aigua i finalment s'escalfa, de manera que el mercuri s'evapora, i queda l'or sol. Les condicions en que es sol realitzar aquest procés solen ser inadequades, així com la seva gestió de residus (*worlds worst toxic pollution problem 2011*).

<sup>4</sup> S'estima que per cada Kg d'or, 1,32 Kg de mercuri són requerits, i que del mercuri requerit en el procés d'amalgamació un 60% és alliberat a l'atmosfera en forma de mercuri vapor (Hilson 2006). A l'any 2003 es comptabilitzen 13 milions de miners artesanals en 55 països, i 80-100 milions de persones depenent de l'activitat econòmica generada d'aquest, principalment a Àsia, Llatinoamèrica (sobretot a Brasil) , i Àfrica (Tanzània i Ghana). Aquesta pràctica es troba incondicionalment lligada a temes de pobresa, desigualtat social i salut humana (Malm 1998, Hinton 2003).



**Figura 5.** Esquema de la distribució del MeHg a l'organisme (Cernichiari et al. 2007).

Un cop a l'interior de la cèl·lula el MeHg s'uneix al lligand tiol del glutatió reduït (GSH), i és a través d'aquesta molècula que es realitza l'excreció fecal del metilmercuri (90%); només un 10% és eliminat a través de l'orina (Cernichiari et al. 2007). La figura 5 mostra un esquema il·lustratiu de la distribució del metilmercuri a l'organisme.

## EFFECTES NEUROLÒGICS

La primera intoxicació letal coneguda per mercuri orgànic va ser a un laboratori, on el van sintetitzar per primera vegada al 1860 (Edwards 1865 cit. Grandjean et al. 2010). La simptomatologia de la intoxicació per metilmercuri va ser descrita per Hunter i Russell al 1940 arrel d'aquest cas; els signes i símptomes eren disàrtria, parestèsia, dèficit sensorial, atàxia cerebel·lar i constricció del camp visual (Hunter et al. 1940 cit. Sanfeliu et al. 2003). Al 1914 es va començar la seva comercialització com a fungicida estenent-se el seu ús en "països en desenvolupament" en el marc de l'anomenada "revolució verda", sense fer-se una monitorització de la seva dispersió en el medi ambient i els efectes en la salut associats a aquest fet. No va tardar massa en aparèixer casos d'enverinament per mercuri com a fungicida en diferents països: Iraq (en 1955-56, 1959-60 i en 1970-71), a Pakistan (1961) i a Guatemala (1965) (Bakir et al. 1973, Clarkson 2002, Grandjean et al. 2010).

Però el cas més descrit i catastròfic per intoxicació de metilmercuri és el cas de la badia de Minamata<sup>5</sup> (figura 6). Aquest cas és molt important en la història de la toxicologia del mercuri,

<sup>5</sup> Aquest fet ocorre al poble pesquer de la badia de Japó Minamata; al 1910 s'instal·là la indústria de *Nippon Chisso* (indústria química) que manufacturava acetaldehid (producte usat per la síntesi d'acètic, plàstics, material de fotografia i impremta...) el qual usava mercuri inorgànic com a catalitzador. Els residus de mercuri eren llençats al mar, i entre aquests hi havia metilmercuri. A finals del 1940 van començar a morir peixos sense causa coneguda. Al

doncs apart de la magnitud del problema, per primera vegada es relaciona metilmercuri, consum de peix i alteracions en el sistema nerviós, sobretot al neurodesenvolupament.



**Figura 6.** Fotografies del cas de la *Badía de Minamata* realitzades pel fotògraf *W.Eugene Smith* com a denúncia dels fets ocorreguts. D'esquerra a dreta: mà característica d'una persona amb la malaltia de Minamata/manifestants contra la indústria de Nippon Chisso portant fotografies dels seus familiars morts/ una mare sana banyant la seva filla de 16 anys mal-formada per intoxicació fetal (*W.Eugene Smith 1971-7) Mercury Poisoning report*).

Al 1965, a una altre badia de Japó, a Niigata es va produir exactament el mateix fenomen d'enverinament d'aigües per mercuri usat com a catalitzador en la producció d'acetaldehid (Grandjean et al. 2010). Arrel de tots aquests episodis, i d'evidenciar els efectes d'aquest organometall com a neurotòxic, es van començar a establir regulacions<sup>6</sup>. Aquests casos, també van evidenciar un altre fenomen, que era l'aparició de símptomes en generacions posteriors a l'exposada, indicant el seus efectes en el neurodesenvolupament (Harada 1978 cit. Grandjean et al. 2010).

---

1950, l'empresa va augmentar la producció d'acetaldehid i també els corresponents residus de mercuri marins. Els gats de l'illa van començar a "embogir" i morir. Al 1953 es van detectar els primers danys cerebrals a infants, i símptomes del que s'anomenaria "la malaltia de Minamata". Al 1 de Maig del 1956 els metges locals descrivien 4 casos estranys de malaltia neurològica no coneguda, on a les 2 setmanes ja eren 30 casos. Al 1956 es va fer el primer informe descrivint la malaltia, on es va sospitar que les aigües estaven contaminades amb metalls. Després de l'informe les autoritats van anunciar sobre la perillositat de consumir peix, però el ministeri de salut i benestar de Tokio no va prohibir el consum de peix. No va ser fins el 1968 que *Chisso* va parar la producció d'acetaldehid i el govern va concloure sobre les causes de la malaltia. Des del 1959 que les víctimes de la malaltia i els pescadors es van començar a organitzar, i van demandar la companyia i van reclamar indemnitzacions. De les 17000 persones que van reclamar ser reconegudes com a víctimes, 2264 ho van ser pel govern (al 2001)(de les quals 1408 van morir) i 10353 van ser declarades com elegibles per a rebre compensació per l'empresa de *Chisso*. Apart, s'estima que unes 200.000 persones van ser exposades al MeHg en diferents graus, patint altres símptomes als reconeguts com a malaltia de Minamata (Timothy 2001, Minamata Disease Municipal Museum 2001, Ekino et al. 2007, Grandjean et al. 2010).

<sup>6</sup> Al 1966 a Suècia és va prohibir l'ús del MeHg com a fungicida i més endavant a EEUU. Cap als 70, diferents organismes, com la US. EPA varen fixar diferents dosis de referència del consum de Hg màxim (Grandjean et al. 2010). Actualment, les emissions de mercuri intenten ser registrades per organismes tipus l'AMAP (Artic Monitoring and Assessment Program) i la UNEP (United Nations Environment Programme)(AMAP/UNEP 2008). Tot i això, segueixen havent manques de coordinació en la presa de decisions entre institucions reguladores (Grandjean et al. 2010).



Els signes o símptomes que produeix el MeHg a dosis agudes en adults (observades en exposicions com les de Minamata) són: parestèsia (sensació de formigueig i pèrdua de sensibilitat) i sensació d'agulles, atàxia cerebel·lar (descoordinació de moviments), disàrtria (trastorn de la parla), constricció del camp visual, pèrdua d'oïda, i alteració en el gust i l'olfacte. A nivell psiquiàtric també han estat descrites alteracions de la personalitat i intel·lectuals-emocionals (ATSDR 1999, Castoldi et al. 2001, Ekino et al. 2007). L'exposició aguda a nivell fetal en casos com el de Minamata va posar de manifest alteracions en el desenvolupament mental i motor: alteracions de la personalitat, psicomotores, de la capacitat intel·lectual, així com atacs epilèptics, a més d'alteracions significatives (i de manera bilateral) en la parla, la deglució, la coordinació, etc. (Harada 1978, Ekino et al. 2007). En casos més greus, mutisme, igual que en adults. A nivell crònic, Yorifuji et al. (2010) va demostrar en un estudi epidemiològic (n=900 aprox.) en àrees afectades de Japó per contaminació de MeHg a diferents graus (alt, mig i baix), com existia una correlació entre les diverses disfuncions neurològiques i psiquiàtriques registrades i els diferents nivells d'exposició crònica al MeHg (disminució del coeficient d'intel·ligència, alteració en l'humor i el comportament, demència, depressió, tendència neuròtica, trastorn bipolar i altres alteracions emocionals). Un altre estudi realitzat en una comunitat de Matto Grosso, Brasil, exposada a aquest organometal·lic degut a la ingesta de peix de rius contaminats per la mineria d'or va demostrar l'efecte negatiu del MeHg en la funció motora, l'aprenentatge i la memòria (Yokoo et al. 2003). Existeixen evidències, encara molt debatudes, de que l'exposició crònica a mercuri pot estar implicada o contribuir al desenvolupament de diverses malalties mentals o desordres neuronals com ara l'autisme (Palmer et al. 2006, Landrigan 2010), la malaltia de Parkinson (Barlow et al. 2007), l'Alzheimer (Coppede & Migliore 2010) o l'esclerosi lateral amiotròfica (Johnson & Atchison 2009).

Actualment, existeix una preocupació creixent pels possibles efectes neurològics post-natals de l'exposició *in utero* al MeHg a través de la dieta (baixes dosis i llargs períodes de temps) i també durant el període d'al·letament materna (Castoldi et al. 2001, Castoldi et al. 2008). Diferents estudis epidemiològics a gran escala en infants de comunitats consumidores de peixos i cetacis com les Illes Feroes (Grandjean et al. 1997,1998), el Riu Amazones (Grandjean et al. 1999), Canadà (Saint-Amour et al. 2006) etc. s'han dut a terme, i han demostrat una evident associació entre els nivells de metilmercuri (quan aquests són més elevats) i el normal funcionament del sistema nerviós: observen una disminució en la funció motora, en la funció cognitiva, en l'atenció, en la funció visual i auditiva (per revisió Castoldi et al. 2008). No obstant, no tots els estudis realitzats en infants presenten associació entre els nivells de MeHg i dèficits en el neurodesenvolupament, com el de les Illes Seychelles (Myers et al. 1995).

Actualment els nivells d'ingesta diaris establerts per la US. EPA (*US Environmental Protection Agency*) que es suposa que no comporten riscos apreciables al llarg de la vida de la persona són 0,1 µg/kg/dia. La taula 1 mostra les dosis de referència establertes per diferents organismes reguladors i la taula 2 mostra les concentracions de MeHg a una selecció de peixos consumits a EEUU.

**Taula 1. Taula dels nivells acceptables d'ingesta de MeHg per diferents agències reguladores.\***

Agència (any)	Localització de l'estudi	Dosi Crítica (µg/kg PC/dia)	Factor d'incertesa	Nivell acceptable (µg/kg PC/dia)
EPA (2001)	Illes Feroes	1.08	10	0.1
ATSDR (1999)	Illes Seychelles Illes Feroe	1.3	4.5	0.3
FDA (1970s)	Japó i/o Iraq	4.3	10	0.4
JECFA (2003)	Illes Seychelles Illes Feroe	1.5	6.4	0.23
FSC, Japó(2005)	Illes Seychelles Illes Feroe	1.17	4	0.29

\* A l'esquerra la dosi crítica (on hi ha efecte detectable), al centre el factor d'incertesa aplicat i a la dreta el nivell marcat com a acceptable. PC=Pes Corporal (de Castoldi et al. 2008).

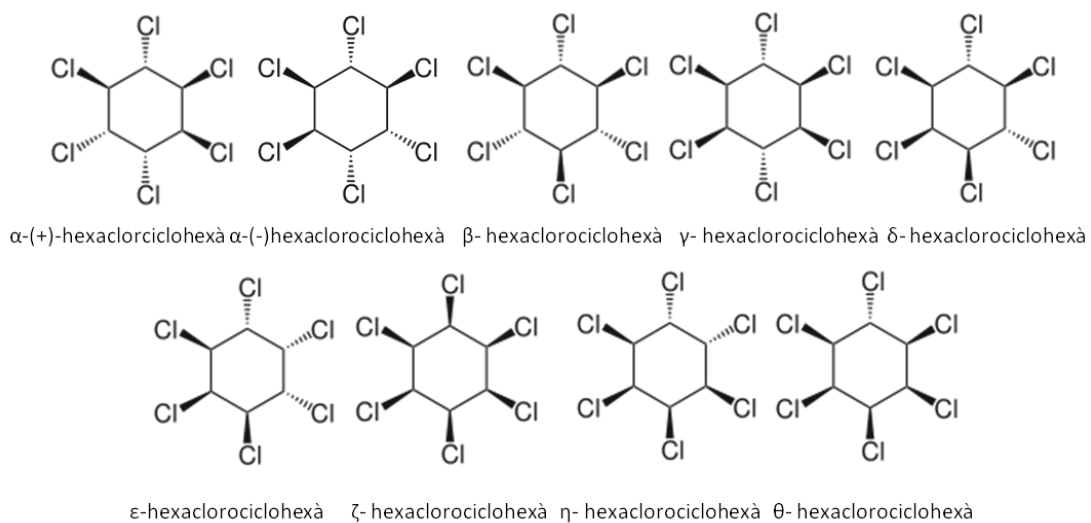
**Taula 2. Concentracions de MeHg (mg/kg) en peixos\***

	mitjana	mínim	Màxim	N
<b>Tilapa</b>	1.450	0.650	3.730	60
<b>peix espasa</b>	0.995	ND	3.22	636
<b>tauró</b>	0.979	ND	4.54	356
<b>verat</b>	0.73	0.23	1.6	213
<b>Tonyina fresca</b>	0.391	ND	1.816	420
<b>Tonyina en llauna</b>	0.128	ND	0.889	551
<b>bacallà</b>	0.111	ND	0.989	115
<b>lluç</b>	0.079	ND	0.378	49
<b>truita de riu</b>	0.071	ND	0.678	35
<b>salmó</b>	0.022	ND	0.190	94

\* Taula elaborada a partir de dades de la FDA Monitoring Program 2010.  
ND=no detectables.

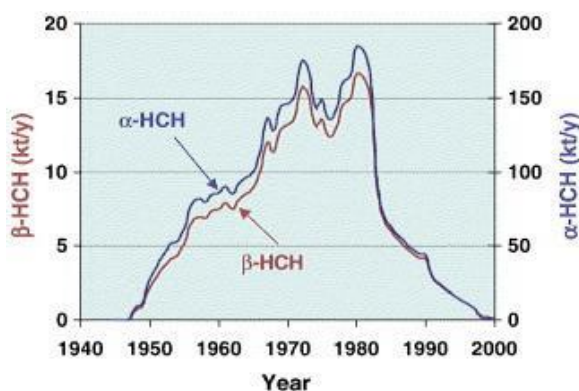
## B) HEXACLOROCICLOHEXÀ

L'hexaclorociclohexà (HCH) és un compost policlorat del ciclohexà que té 8 isòmers diferents (i l' $\alpha$ -HCH té dos enantiòmers) (figura 7) el qual és principalment conegut per ser utilitzat extensament com a plaguicida en la segona meitat del segle XX. La seva fórmula química és  $C_6H_6Cl_6$  i el seu pes molecular és de 290,83 g/mol. El compost tècnic d'hexaclorociclohexà (HCH) cru conté principalment 5 isòmers, que són produïts mitjançant la cloració fotoquímica del benzè i en proporció són el:  $\alpha$ -HCH (55-80%), el  $\beta$ -HCH (5-14%), el  $\gamma$ -HCH (8-15%), el  $\delta$ -HCH (2-16%) i el  $\epsilon$ -HCH (3-5%), que varien en percentatge segons el procés de producció. Tant el  $\alpha$ -HCH, el  $\beta$ -HCH, com el  $\gamma$ -HCH (més comunament anomenat lindà o lindane) estan actualment inclosos en la llista de contaminants orgànics persistents del Conveni d'Estocolm, ja que són els més abundants (UNEP 2007a, UNEP2007b, UNEP2007c, Vijgen et al. 2011). Els diferents isòmers del HCH tenen diferents propietats físico-químiques les quals tenen conseqüències a nivell global, ja que la seva forma de distribuir-se en la biosfera varia<sup>7</sup>.



**Figura 7.** Estructura dels 8 isòmers (i 2 enantiòmers) d'hexaclorociclohexà (imatge de wikipedia modificada).

<sup>7</sup> Li & Macdonald (2005) descriuen la relació existent entre les emissions i les concentracions dels isòmers alfa i beta a l'Àrtic, demostrant que existeix una diferència en la manera de distribuir-se d'aquests dos isòmers. Mentre que les concentracions de  $\alpha$ -HCH a l'Àrtic correlacionen amb una  $r^2=0.9$  al seu patró d'emissió històric, les de  $\beta$ -HCH no. L'estudi de Li & Macdonald (2005) alerta de la perillositat d'usar compostos mesclats de diferents isòmers, com també passa en el cas dels PCB, ja que la regulació i el control de les concentracions d'aquests a al planeta es fa més complexa.



**Figura 8.** Emissions globals anuals de alfa i beta HCH entre el 1945 i el 2000 (Li & MacDonald 2005).

Les principals emissions d'HCH es deuen a la producció de l'HCH de qualitat tècnica (mescla d'isòmers d'HCH), que han estat utilitzats principalment com a plaguicides i s'han començat a produir entre finals del 1940 i el 1950. La figura 8 mostra un gràfic on és contemplan les emissions globals dels isòmers de l'HCH alfa i beta en Kilotones/any, corresponents bàsicament a la producció d'HCH de qualitat tècnica. Més endavant es va parar la producció d'aquest

producte, ja que només l'isòmer  $\gamma$ -HCH presentava propietats insecticides; la disminució de les emissions d'isòmers  $\alpha$  i  $\beta$  d'HCH a partir dels 70 (figura 8) es va deure a la prohibició de l'ús de l'HCH de qualitat tècnica a Canadà (1971), Japó (1972), USA (1976) i molts països europeus. Moltes companyies van començar a aïllar l'isòmer  $\gamma$ -HCH, anomenat lindà. Aquest canvi no es va produir a tot arreu, però. El segon pic de creixement es deu a l'inici de l'ús de l'HCH de qualitat tècnica en molts països asiàtics: Xina (que el va utilitzar fins al 1983), Índia (fins a finals dels 90) i altres. Els patrons d'emissió històrics d'alfa i beta HCH són similars, però el beta està reduït un factor de 10 aproximadament. Uns 10 milions de tones de producte tècnic d'HCH s'estimen haver estat produïdes i alliberades a la biosfera entre el 1948 i el 1997 (Li & MacDonald 2005, Vijgen et al. 2011).

El lindà va ser un dels pesticides organoclorats més utilitzats entre la segona guerra Mundial i el 1990. La producció de lindà globalment pel seu ús en agricultura entre el 1950 i el 2000 assoleix una quantitat de 450.000 tones aproximadament.<sup>8</sup> L'ús del lindà per a altres propòsits, com l'ús a medicina humana i veterinària (com a ectoparasitocida) o per aplicacions forestals, sumen una producció d'unes 150.000 Tm, donant un total d'unes 600.000 Tm de lindà alliberat. Per cada tona de lindà unes 8-12 tones d'altres isòmers d'HCH són produïdes. Per tant, s'estimen que uns 4,8 i 7,2 milions de Tm d'altres isòmers d'HCH han estat produïts globalment a través del lindà. D'altra banda, hi han molts buits d'informació i regulació, i això

<sup>8</sup> S'estima que el 63,3% del lindà global utilitzat en agricultura ha estat produït a Europa (287.000 Tm), seguit d'un 16,1% a Àsia (73.200 Tm), el 14% a Amèrica (63.570 Tm) i un 6,2% a Àfrica (28.540 Tm) (Vijgen et al. 2011).

produeix discrepàncies entre les concentracions existents d'aquests contaminants a la biosfera (Vijgen et al. 2011).

Actualment, tant el lindà com els seus isòmers principals (alfa i beta), es troben dins la llista de contaminants orgànics persistents del Conveni d'Estocolm<sup>9,10,11</sup>. L'HCH de qualitat tècnica estava ja regulat per altres convenis i regulacions<sup>12</sup>, que van aconseguir que es substituís el producte tècnic d'HCH pel lindà. Actualment, la producció de lindà com a pesticida és prohibida pel conveni d'Estocolm, però és permès el seu ús com a tractament de segona línia per a malalties com la pediculosi o la sarna, sota certes condicions (d'etiquetatge, mida, recipient...).

### **DISTRIBUCIÓ DE L'HCH A L'ORGANISME**

Els isòmers d'HCH s'acumulen en humans i en animals principalment en el teixit adipòs però també en el cervell, el ronyó, el múscul, la sang i altres teixits. El  $\beta$ -HCH s'acumula més que el  $\gamma$ -HCH (ja que es metabolitza de manera més lenta). L'excreció dels diferents metabolits d'HCH (generats per enzims hepàtics del sistema del citocrom P-450 —CYP— del reticle endoplàsmic) és a través de l'orina (Baumann et al. 1980, ATSDR 2005). La correlació entre sang i cervell va ser determinada en rates, sent l' $EC_{50}$  (concentració a la qual s'assoleix el 50% de l'efecte màxim) per a l'obtenció de convulsions de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en cervell i 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en sang (Tusell et al. 1987). Per tant, la relació sang/cervell en rates és 1:5 aproximadament. Al cervell la seva distribució és majoritària en el tàlem, el mesencèfal i la protuberància del bulb, i en la substància blanca i altres estructures mielíniques (Sanfeliu et al. 1988).

---

<sup>9</sup> Proposat per Mèxic, i acceptat al maig de 2009, degut a la seva propietat de viatjar llargues distàncies, de bioacumulació i persistència i els seus efectes nocius en la salut i el medi ambient (Stockholm Convention 2001).

<sup>10</sup> Les mesures de control pels isòmers beta i alfa d'HCH aplicades a diferents països són la prohibició de la producció, l'ús, la venda, la importació/exportació, prohibició de la producció de lindà, fer inventaris, descontaminació de zones contaminades, accés a instal·lacions de residus peril·losos i gestió de les existències caducades. L'accés a instal·lacions idònies d'eliminació de restes, deixalles i els recursos financers per a la rehabilitació dels llocs contaminats, són limitats en alguns països (UNEP 2007a i b).

<sup>11</sup> Les mesures que s'estan adoptant pel lindà són: la prohibició de la seva producció, ús, venda, i importacions/exportacions, cancel·lacions dels registres, descontaminació, i advertència de perill publicades per a usos farmacèutics (UNEP 2007c).

<sup>12</sup> Com ara: El conveni sobre la contaminació atmosfèrica a gran distància i el Conveni de Rotterdam. Apart, diferents acords i legislacions nacionals i regionals estableixen mesures de control per a regular les emissions de lindà i els seus isòmers (ex: l'acció regional de Amèrica del Nord sobre el lindà i els seus isòmers, la comissió per a protecció del medi ambient marí del Atlàntic Nord-est, el reglament (CE) EU POP No. 850/2004 i la Directiva Europea Marc de l'Aigua 2000/60/EC) (UNEP2007a i b).

## **EFFECTES NEUROLÒGICS**

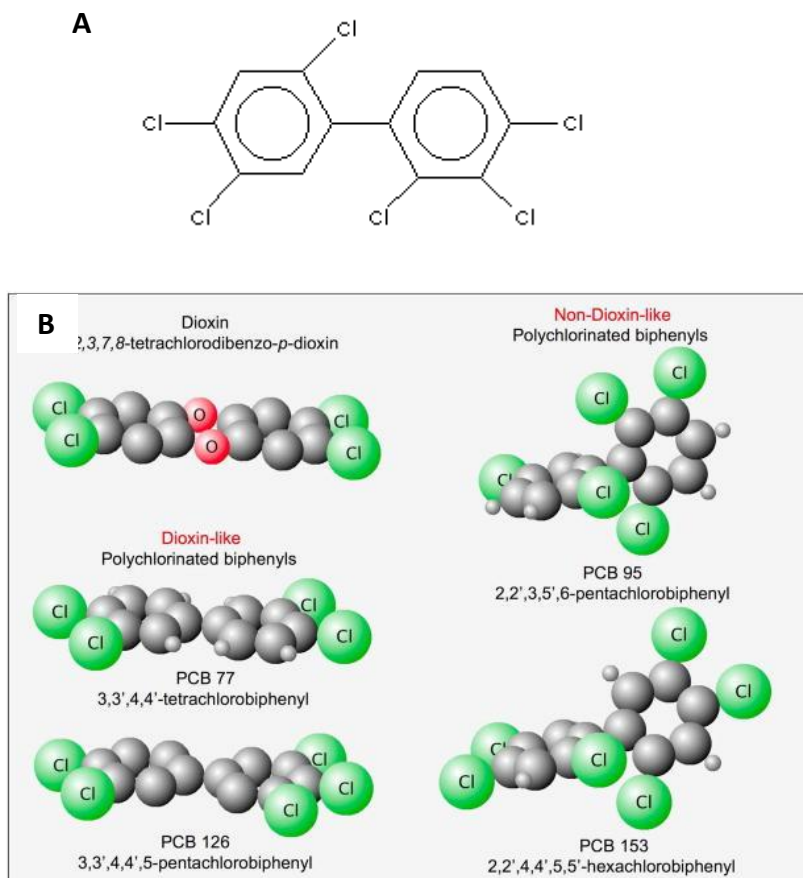
Dels diferents isòmers de l'HCH, el lindà ( $\gamma$ -HCH) és el que ha estat catalogat com el més tòxic. L'evidència de la seva absorció cutània fa que el tractament contra la sarna i la pediculosis amb lindà sigui una font de dany cerebral (Pramanik & Hansen 1979). L'intoxicació d'infants i persones adultes amb xampús i locions contra la pediculosi (com *lindane 0,1%* (que conté 10 mg/ml de lindà)) ha ocasionat diferents casos d'intoxicació aguda (Davies et al. 1983, Nordt & Chew 2000, Sudakin 2007); convulsions, atàxia, debilitat, discordinació i parestèsies han estat observades en casos d'intoxicació amb locions contra la pediculosi (Daud et al. 2010).

El lindà, junt a altres organoclorats, ha estat assenyalat com un dels agents causants de la malaltia de Parkinson, actuant en la neurodegeneració nigroestriatal de les vies dopaminèrgiques (Corrigan et al. 2000, Brown et al. 2006, Pedro-Cuesta et al. 2009, Sharma et al. 2010). Ha demostrat ser un potent neuroestimulant induint convulsions i hiperexcitabilitat als mamífers (Tusell et al. 1987, Suñol et al. 1988, Rivera et al. 1998). L'administració de dosis convulsionants i sub-convulsionants a rates adultes provoca una disfunció en l'aprenentatge, en la capacitat d'aquestes d'adquirir i utilitzar informació, la capacitat de resposta (Tilson et al. 1987, Mariussen & Fonnum 2006) i la funció motora (Llorens et al. 1989, 1992). L'estudi de Rivera et al. (1998) va mostrar que l'exposició a una única dosi de lindà (20 mg/Kg, dia 15) en rates recent nascudes provocava una disminució de l'activitat motora, mentre que les exposades a varies dosis (10 mg/Kg durant 7 dies, del dia 8 al 14) l'augmentaven.

## **C) POLICLOROBIFENILS**

Els policlorobifenils (PCBs) o bifenils policlorats són compostos sintètics que contenen de 2 a 10 àtoms de clor units al grup bifenil. La seva fórmula és  $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$  on n pot ser de 1 a 10 (UNEP 1999).

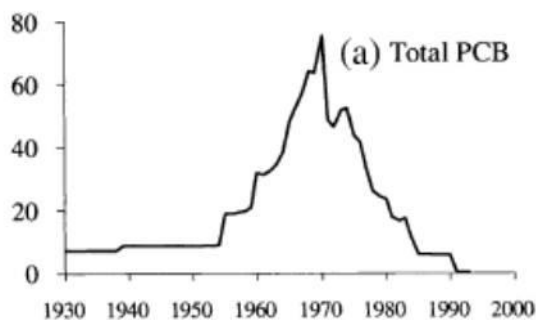
Cent trenta dels 209 congèneres de PCB existents són actualment usats en la indústria. La majoria dels estudis toxicològics sobre els efectes dels PCB s'han fet amb els set congèneres de PCB més utilitzats comercialment, que representen el 35% dels PCB comercialitzats, i el 98% dels venuts a EEUU des del 1970 (ATSDR 2000); aquests són el PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180 (Breivik et al. 2002).



**Figura 9.** A) Estructura general del PCB 138 no-coplanar. B) A l'esquerra, estructura dels PCB coplanars semblants a les dioxines (ex. PCB 77 i PCB 126); A la dreta, estructura dels PCB no coplanars (ex. PCB 95 i PCB 153). El PCB 138 és un PCB no-coplanar (imatge de Pessah et al. 2010).

Els compostos comercials, com ara l'Aroclor, contenen una mescla de congèneres de PCB; aquests productes tenen associat un número de 4 dígit, on els dos primers fan referència al nombre d'àtoms de carboni, i els altres 2, al tant per cent d'àtoms de clor. Per exemple, el compost Aroclor 1254 conté 12 àtoms de carboni, i un 54% de clor. Els diferents congèneres de PCB es poden catalogar en 3 formes diferents: A) els co-planars, també anomenats de tipus dioxines, amb clors a les posicions meta- i para- i no en la posició orto; B) Els mono-orto-substituts, els quals són també co-planars; i C) els congèneres de PCB amb dos o més orto-substitucions, els quals són sempre no-coplanars (figura 9) (ATSDR 2000). El congènere PCB 138 (2,2',3,4,4'-HeCB) forma part d'aquest grup, i és el que s'estudia en aquesta tesi. Aquest és el més abundant congènere no-coplanar de la barreja A1254, es troba present en el medi ambient i a poblacions humanes, i ha estat demostrada la seva acumulació en el cervell d'animals exposats a A1254 (Kodavanti et al. 1998, 1999).

Els PCB són extremadament persistents: no combustibles, termoestables, i no es descomponen ni per la biota ni abiòticament. Poden trobar-se en aire, aigua i terra. Com altres COPs, poden viatjar llargues distàncies a través de l'aire, arribant a llocs freds com l'Àrtic i es troben dispersats arreu del món. Els diferents congèneres tenen diferents propietats físico-químiques, que confereixen diferents patrons de distribució. Els més densos tenen més tendència a sedimentar-se al sòl, mentre que els més lleugers a evaporar-se a l'aire. Com la resta de COPs, s'acumulen en mamífers marins i peixos. Petites quantitats de PCB poden ser trobades a quasi totes les mostres d'aire d'interiors i exteriors, sòl, sediments, superfície de l'aigua i animals (ATSDR 2000).



**Figura 10.** Estimació del patró de producció històrica en centenars de tones des del 1930 al 2000 (Breivik et al. 2002).

Al 1865 es va descobrir el primer producte semblant al PCB com a subproducte del quitrà. Al 1881 es va sintetitzar el primer PCB, i al 1929 la companyia Monsanto va començar la comercialització de mesclades d'isòmers de PCBs. Aquestes mesclades s'utilitzaven com a fluids de refrigeració i d'aïllament de transformadors i condensadors, fluids hidràulics, i additius per a diferents tipus de pintures, coles i ciment, així com material d'aïllament de

finestres. S'ha estimat que més d'1.2 milions de tones de PCB han estat produïdes al món fins al 1984. La figura 10 mostra l'estimació del patró d'emissió històrica dels PCB totals, i la taula 3 l'emissió realitzada per cada indústria. Com el MeHg, es pot catalogar segons el tipus d'emissions en producte intencionat o inintencionat (subproducte de processos de combustió). El 30% dels PCB han estat alliberats al medi ambient a través de processos de combustió, evaporació, fugues i abocaments. Al 1977 va ser prohibida la seva manufactura a EEUU degut a l'evidència de la seva existència cada cop més creixent al medi ambient i els efectes perjudicials per la salut que podia causar (ATSDR 2000, Breivik et al. 2002). Actualment, encara es poden alliberar PCBs degut a un mal manteniment de llocs amb residus perillosos, abocaments il·legals o inapropiats de fluids que contenen PCB (com el dels transformadors), o la cremació de residus municipals i incineracions industrials (ATSDR 2000). Els PCBs, igual que el lindà, han estat inclosos en la llista de COPs del Conveni d'Estocolm (Stockholm Convention 2001), l'objectiu del qual és l'eliminació dels PCB de tots els olis i equips que continguin PCB en ús abans del 2025, i gestionar aquests adequadament abans del 2028.



**Taula 3. Producció del PCB total global en tones emesa per diferents indústries (taula modificada de Breivik et al. 2007).**

Producer	Country	Start	Stop	Amount	%
Monsanto	USA	1930	1977	641,246	48.4
Bayer AG	West Germany	1930	1983	159,062	12.0
Orgsteklo	U.S.S.R. (Russia)	1939	1990	141,800	10.7
Prodelec	France	1930	1984	134,654	10.2
Monsanto	U.K.	1954	1977	66,542	5.0
Kanegafuchi	Japan	1954	1972	56,326	4.2
Orgsintez	U.S.S.R. (Russia)	1972	1993	32,000	2.4
Caffaro	Italy	1958	1983	31,092	2.3
S.A. Cros	Spain	1955	1984	29,012	2.2
Chemko	Czechoslovakia	1959	1984	21,482	1.6
Xi'an	China	1960	1979	8,000	0.6
Mitsubishi	Japan	1969	1972	2,461	0.2
Electrochemical Company	Poland	1966	1970	1,000	<0.1
Zakłady Azotowe	Poland	1974	1977	679	<0.1
Geneva Industries	USA	1971	1973	454	<0.1
<b>Total</b>	<b>Global</b>	<b>1930</b>	<b>1993</b>	<b>1,325,810</b>	<b>100</b>

## DISTRIBUCIÓ DELS PCB A L'ORGANISME

La principal via d'exposició laboral als PCB és aèria mentre que en la població general és la dieta. Un estudi en població general a Regne Unit (Duarte-Davidson & Jones 1994), mostra com el 97% dels PCB presents a la població és degut a la dieta: a la ingesta de peix (32%), llet i derivats de la llet (26%), vegetals (18%), carn i greixos animals (16%). Els PCB amb més àtoms de clor en l'estructura es troben en aliments més grassos, mentre que els que tenen menys clors (ex. PCB 28) es troben majoritàriament en vegetals (ATSDR 2000). Els PCBs, tant inhalats com absorbits pel tracte gastrointestinal, passen al torrent sanguini. Poden ser metabolitzats al fetge pel citocrom P-450 on es formen metabòlits polars que poden conjuguar amb el glutatió o l'àcid glucurònic. Alguns metabòlits poden ser igual o més perillosos que els PCB. Els PCB no metabolitzats s'acumulen en teixits grassos (bàsicament fetge i teixit adipós). A més clors, més temps de persistència a l'organisme, on poden arribar a estar-s'hi anys. L'eliminació del PCB és per excreció fecal majoritàriament, i els metabòlits per orina. Els PCB acumulats són mobilitzats durant l'embaràs, i són transmesos al fetus, a través de la placenta, o al nadó a través de la llet materna. Un infant alletat durant 6 mesos pot acumular el 6-12% dels PCB que acumularà al llarg de la seva vida (ATSDR 2000).

## EFECTES NEUROLÒGICS

Els PCB, de manera semblant al MeHg, també han mostrat afectar el neurodesenvolupament, havent-t'hi preocupació des de l'evidència que dosis baixes de PCB poden traspasar la placenta i afectar al normal desenvolupament del fetus (ATSDR 2000) (Revisió: Mariussen & Fonnum 2006).

Al 1968 i al 1979 a Japó i Taiwan respectivament, 4000 persones van consumir oli contaminat amb PCB (Kuratsune et al. 1972, Hsu et al. 1985). En els dos casos, els infants exposats als PCB prenatalment o a través de l'alletament matern (Jacobson et al. 1984) van patir un retard en el desenvolupament motor i defectes en la memòria a curt termini (tot i que l'oli també estava contaminat amb furans i no es sap del cert que el PCB sigui el causant de tals disfuncions). Estudis en humans que van consumir peix contaminat del Gran Llac de Michigan van demostrar que els PCB contribuïen a l'aparició d'alteracions en el neurocomportament com ara immaduresa en la tasca motora, hiporreflèxia, i una disminució de la puntuació psicomotora entre 6 mesos i 2 anys d'edat, així com una disminució en l'escala de McCarthy en les habilitats verbals i de memòria als 4 anys (Fein et al. 1984, Jacobson et al. 1990, Seegal 1996). Un altre estudi, realitzat en una cohort de 156 infants de 9 anys d'edat les mares dels quals havien consumit peix d'aquest mateix llac va examinar la relació entre l'exposició prenatal a PCB i el seu IQ ("*coeficient d'intel·ligència*") i va determinar que per cada 1 ng/g (pes humit) de PCB en placenta hi havia una disminució de tres punts en l'escala completa d'IQ ( $p=0.02$ ) i de quatre punts en l'escala verbal IQ ( $p=0.003$ ) (Stewart et al. 2008)<sup>13</sup>. Altres estudis en les illes Feroe, Alemanya, North Carolina han mostrat resultats semblants, amb una clara disminució de la cognició en relació als PCB (Seegal 1996, Schantz et al. 2003, Mariussen & Fonnum 2006).

Els símptomes més comuns que s'han observat davant l'exposició als PCB en animals (ocells, rosegadors i primats) durant el desenvolupament han estat hiperactivitat i efectes en la cognició (com en l'aprenentatge i la memòria). En canvi, en l'edat adulta ha estat una disminució en l'activitat motora (Seegal 1996, Mariussen & Fonnum 2006, Fonnum & Mariussen 2009). L'acció de cada congènere de PCB és diferent i per això existeix la demanda

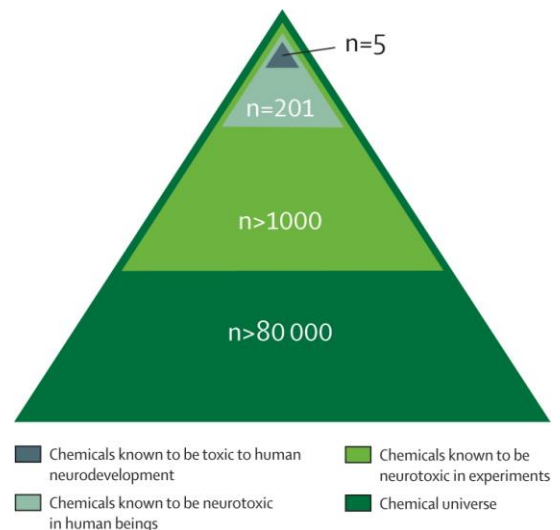
---

<sup>13</sup> En un posterior estudi, però, s'assenyala que és molt difícil l'estudi adequat d'aquesta relació (PCB vs IQ) doncs existeixen molts factors de confusió, del tipus potenciadors (presència d'altres contaminants) o supressors (com l'estatus econòmic familiar) (Stewart et al. 2012).

d'una major recerca en els efectes neuroquímics de cada congènere individual durant el neurodesenvolupament (Schantz et al. 2003).

## INFÀNCIA

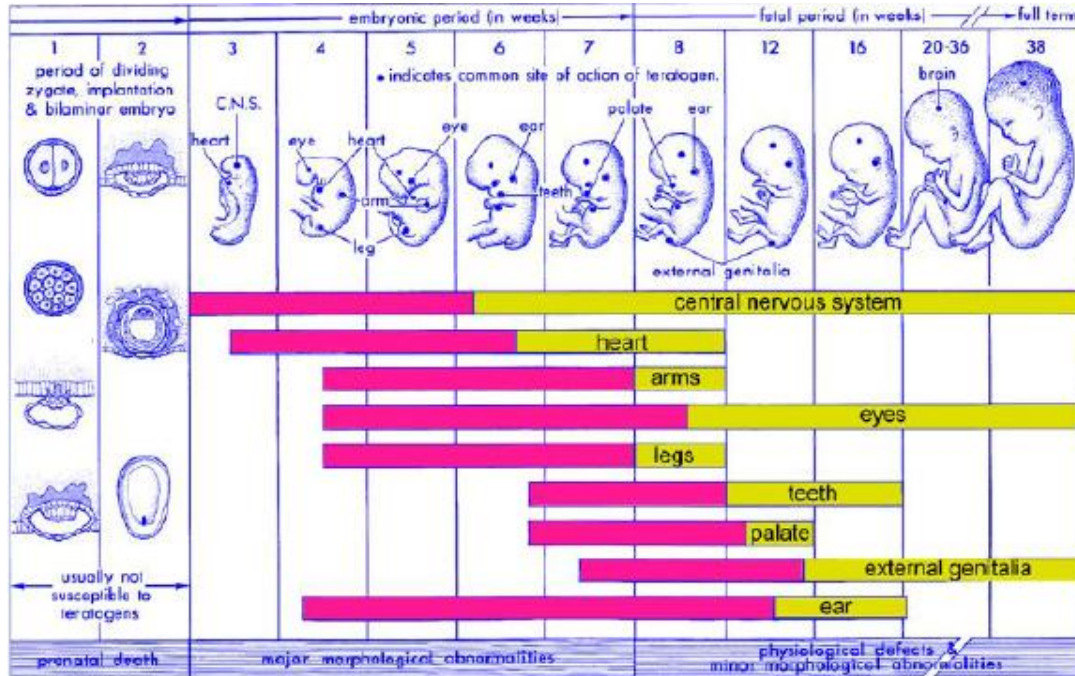
A causa d'intoxicacions com la de Minamata (Harada 1978) o la d'Iraq (Bakir et al. 1973) es va observar que els infants eren més susceptibles que els adults, i mentre que algunes mares no presentaven símptomes els/les seus/ves fills/es sí (Grandjean et al. 2010). Amb el PCB succeí el mateix: les intoxicacions amb oli d'arròs contaminat amb PCB al 1968 al Japó, i al 1979 a Taiwan, van afectar als fills recentment nascuts de mares asimptomàtiques, presentant retards en el desenvolupament que es van detectar cap els 7 anys d'edat. Aquests fenòmens van posar de manifest la incidència d'aquests contaminants en el neurodesenvolupament (ATSDR 2000, Grandjean et al. 2010). Dels més de 80.000 compostos químics en ús registrats, només cinc han estat descrits i catalogats com a tòxics pel neurodesenvolupament humà: aquests són el metilmercuri, els policlorobifenils (PCB), el plom, l'arsènic i el toluè (figura 11) (Grandjean & Landrigan 2006).



**Figura 11.** Dels compostos químics en ús, uns 1000 han demostrat ser neurotòxics a nivell experimental, 201 han demostrat ser neurotòxics en humans, i només 5 són reconeguts com a tòxics en el neurodesenvolupament humà (de Grandjean & Landrigan 2006).

La propietat dels COPs a acumular-se a teixits grassos, té com a conseqüència que durant l'embaràs es genera una mobilització lipídica que indueix a l'alliberament al torrent sanguini d'aquests contaminants acumulats, de manera que la mare traspasa part de la seva càrrega de contaminants al fetus, ja que molts d'ells tenen la capacitat de creuar la barrera placentària (ATSDR 2000). Diversos estudis en cohorts mare-fill/a mostren com els infants neixen amb una càrrega de contaminants degut a l'exposició prèvia de la mare (Sala et al. 2001, Ramon et al. 2008, Herrero-Mercado et al. 2010, Woodruff et al. 2011).

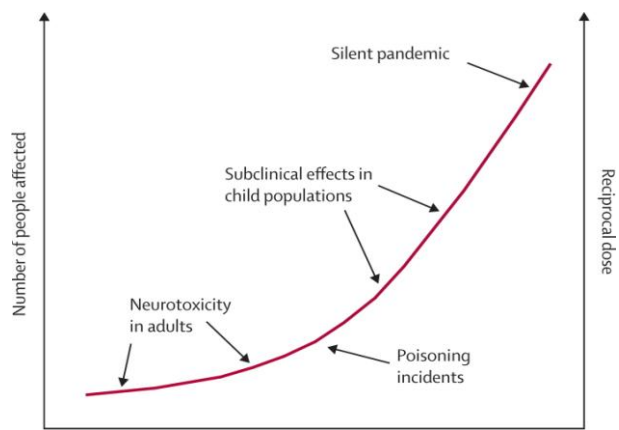
El fetus és molt més vulnerable a patir els efectes dels compostos tòxics que l'adult (Perera et al. 1999, Grandjean & Landrigan 2006)); Per una banda, la manca o la immaduresa dels sistemes de protecció fetal (barrera hematoencefàlica, sistemes de desintoxicació, el sistema immunitari, etc.) és un factor que els fa ser més susceptibles. Per altre banda, l'efecte d'alguns COPs durant el període prenatal és més profund, doncs els diferents òrgans s'estan formant. La barrera hematoencefàlica (BHE) encara no està del tot funcional fins els 6 mesos després del naixement, deixant entrar els contaminants, o altres productes generats arrel d'aquests, que podrien ser perjudicials (Adinolfi 1985). El cervell en desenvolupament és més susceptible a l'impacte ambiental que el d'un adult (Smart et al. 1973 cit. Grandjean & Landrigan 2006). El desenvolupament del sistema nerviós compren la major part del període prenatal (desde la setmana 3 fins el naixement, figura 12) i es segueix desenvolupant post-natalment fins l'edat adulta (Insel 2010). Es per aquest motiu que s'ha especulat que la gran prevalença de disfuncions en el neurodesenvolupament de molts infants (trastorn d'hiperactivitat, dèficit d'atenció, autisme...) pot tenir una relació directa amb l'exposició a contaminants orgànics persistents durant l'etapa prenatal, anomenant-se aquest fenomen com a *pandèmia silenciosa* (Grandjean & Landrigan 2006) (figura 13).



**Figura 12.** Il·lustració esquemàtica setmanal dels període crítics en el desenvolupament prenatal, i les etapes de major vulnerabilitat a compostos teratògens (en vermell) (Moore 1973).

Un cop han nascut, els infants continuen sent un col·lectiu de risc en patir els efectes dels contaminants. Per una banda, per la proporcionalitat: els infants consumeixen més aliment i aigua que un adult per unitat de massa corporal. Per altre banda, la ingesta de llet materna, és una font de grans quantitats de contaminants orgànics persistents, si bé segueix sent preferible alletar al nadó per als seus demostrats beneficis (ATSDR 2000, Weiss 2000, Ribas-Fitó et al. 2003, Grandjean & Landrigan 2006, Ribas-Fitó et al. 2007). Finalment, el posar-se objectes a la boca, el fer activitats arran de terra (i respirant i estant més en contacte amb la pols), el caràcter explorador... els fa estar més en contacte amb els contaminants, sobretot en famílies que estan exposades laboralment a aquests (Weiss 2000).

**Figura 13.** Gràfic dels efectes neurotòxics dels contaminants en una població. Grandjean & Landrigan (2006) defineixen els efectes subtils en el neurodesenvolupament degut a l'exposició a tòxics com a *pandèmia silenciosa*, degut al elevat nombre de persones que poden estar afectades i no es coneix.



Com a conseqüència de qüestionar els possibles danys que podien estar ocasionant aquests contaminants als infants, es van iniciar arreu del món estudis epidemiològics que relacionaven els nivells de certs contaminants en mostres humanes de fàcil obtenció i vinculades a l'embaràs (com la sang de cordó umbilical, la placenta o la llet materna) amb alteracions del neurocomportament en infants (ATSDR 2000, Grandjean et al. 2001, Llop et al. 2012). La dosi de referència pel mercuri (T-Hg) de la US.EPA catalogada com a no perjudicial és de 5.8 µg/L en sang de cordó umbilical (Ramón et al. 2008).

El projecte INMA (Infància i Medi Ambient) és un estudi epidemiològic prospectiu i multicèntric a nivell espanyol que neix d'aquesta mateixa necessitat. Aquest projecte inclou 7 cohorts de naixement que es troben a València, Sabadell, Ribera d'Ebre, Astúries, Guipúzcoa, Menorca i Granada que sumen un total de 3768 infants. Cada parella mare-fill/a va ser analitzada per diferents contaminants ambientals, i un seguiment a diferents nivells se'ls hi va fer, des de el període prenatal fins als 4 anys d'edat (des d'ecografies fins a proves per avaluar el normal desenvolupament neuroconductual: test Dubowitz, test de Bayley, test de McCarthy..., el

desenvolupament sexual, hormonal...) (Guxens et al. 2011). De la cohort de València (N=855) es van obtenir les mostres que es van utilitzar per la primera part d'aquesta tesi. Un estudi en 253 participants d'aquesta cohort mostrava com el 75% superava els valors de mercuri total en sang de cordó umbilical establerts com a segurs per la US EPA (5.8 µg/L); la mitjana del mercuri total en aquesta cohort era de 9.9 µg/L (sent uns valors comparables als trobats a Japó, on hi ha un elevat consum de peix). A la vegada, l'estudi realitzat en aquesta mateixa cohort confirmava que el consum de peix gras està directament relacionat amb els nivells del mercuri total (Ramón et al. 2008).

Els efectes del metilmercuri, el HCH i els PCB sobre la neurotransmissió seran descrits posteriorment en l'apartat 4: efectes neuroquímics dels contaminants.

## 2 EL SISTEMA GLUTAMATÈRGIC

### EL GLUTAMAT

El glutamat, o àcid L-glutàmic<sup>14</sup>, és un *aminoàcid no essencial*<sup>15</sup> que té un rol molt important en el nostre organisme, participant en nombrosos processos vitals. És conegut com el major aminoàcid excitador del sistema nerviós central dels mamífers, tenint un rol clau en processos fonamentals com la cognició, la memòria i l'aprenentatge (Fonnum 1984; Danbolt 2001). Participa en el desenvolupament del SNC, incloent la inducció sinàptica, la migració cel·lular, la diferenciació i la mort neural (McDonald & Johnston 1990, Komuro & Rakic, 1993, Danbolt 2001). El 90 % de les neurones del cervell contenen glutamat (Hassel & Dingledine 2006)).

Apart del seu rol en el sistema nerviós, també juga un paper important en nombroses vies metabòliques, participant en la síntesi de proteïnes, en el metabolisme energètic o la fixació d'urea al fetge, entre d'altres (Kelly & Stanley 2001, Nedergaard et al. 2002)

Cada cop més estudis demostren que els receptors i els transportadors glutamatèrgics es troben àmpliament distribuïts en cèl·lules no-excitables (que tradicionalment no havien estat associades a una senyal regulada pel glutamat) (revisió, Nedergaard et al. 2002). Per exemple, trobem diferents subtipus de transportadors glutamatèrgics EAAT (*excitatory amino-acid transporter*) a la majoria dels òrgans: ronyó (regulen l'equilibri àcid-base) (Gill & Pulido 2001), l'intestí (Kanai & Hediger 1992), pulmó, músculs (Mukanaika et al. 1995), fetge (Howell et al. 2001) i placenta (Novak et al. 2001, Noorlander et al. 2004,) (ampliat a l'apartat: sistema glutamatèrgic a la placenta). També es troben receptors ionotròpics glutamatèrgics de NMDA (N-metil-D-aspartat), AMPA (2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propanoic àcid) i kainat, i receptors metabotròpics de glutamat a: cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques (la secreció d'insulina a aquestes cèl·lules és estimulada a través de receptors AMPA i kainat) (Weaver et al. 1996), al cor (Gill et al. 1999), melsa, ovaris, ós i moll de l'ós (els receptors de NMDA es troben a osteoblasts i osteoclasts, participant en la formació i destrucció de l'ós)(Patton et al. 1998), hepatòcits (Sureda et al. 1997), pulmó, queratinòcits i limfòcits (l'entrada de calci regulada per receptors ionotròpics als limfòcits provoca una resposta del sistema immunitari) (Lombardi et

---

<sup>14</sup> A pH fisiològic es troba en forma aniónica, i per això s'anomena més comunament glutamat.

<sup>15</sup> Pot ser sintetitzat per el propi organisme.

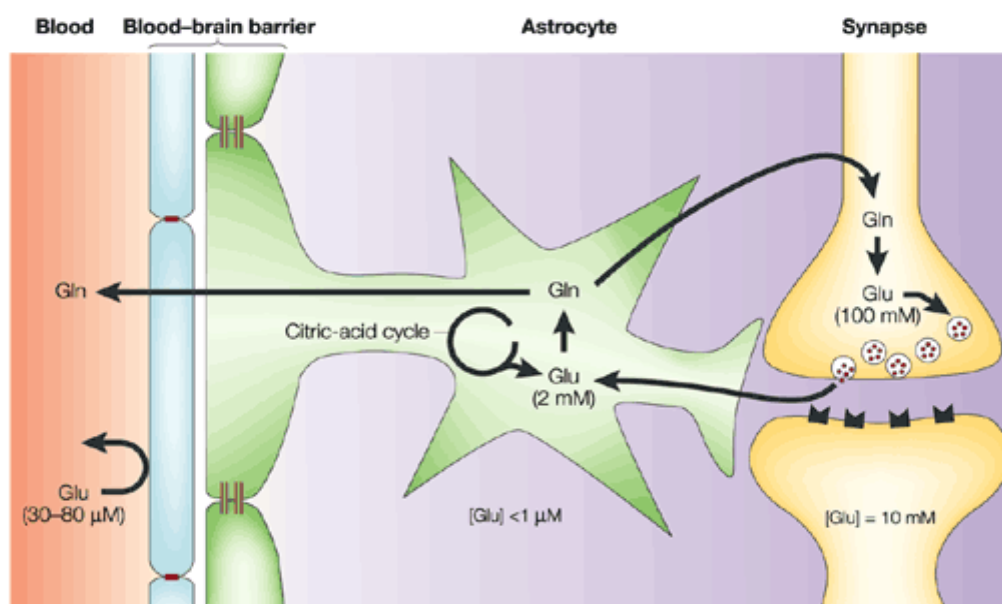
al. 2001). També la proliferació de tumors és altament sensible a antagonistes glutamatèrgics (Rzeski et al. 2001).

Aquests transportadors i receptors han estat caracteritzats i s'ha corroborat que són idèntics als trobats en cèl·lules del sistema nerviós (Purcell 1996). Nedergaard et al. (2002) destaquen que la principal diferència entre el sistema glutamatèrgic al sistema nerviós i el sistema glutamatèrgic en cèl·lules no excitable és el mecanisme d'acció: els corrents ràpids excitadors són menys importants en aquestes últimes, mentre que hi guanyen importància els efectes a llarg termini del potencial de membrana, els nivells de calci citosòlics i els sistemes de segons missatgers.

## **CONCENTRACIONS DE GLUTAMAT**

El cervell conté una gran quantitat de glutamat (5-15 mmol/kg cervell), però només una petita part es troba al medi extracel·lular (~1-4  $\mu\text{M}$ ) (Danbolt 2001, Nedergaard et al. 2002)). En canvi, les concentracions en el citoplasma neuronal solen ser d'uns 5 mM, i d'uns 2-3 mM als astròcits (figura 14). A l'interior de les vesícules emmagatzemadores de glutamat, però, la concentració és d'uns 100 mM (Meldrum 2000). La concentració en el fluid cerebro-spinal sol ser d'~1  $\mu\text{M}$ , però pot augmentar fins a 20  $\mu\text{M}$  sota condicions fisiopatològiques caracteritzades per defectes en la barrera hemato-encefàlica i/o danys cel·lular com ara la isquèmia, el trauma o la meningitis (Auger & Attwell 2000, Nedergaard et al. 2002). Hi ha un gradient d'unes 100 vegades entre interior i exterior de la cèl·lula (i on la major concentració de glutamat es troba a les terminals nervioses). Aquestes concentracions de glutamat no són estàtiques però, sinó que es troben en un constant equilibri dinàmic, entrant i sortint de la cèl·lula per complexos mecanismes de regulació i compartimentació, de manera que es mantenen les concentracions adequades de glutamat constantment (Danbolt 2001). La senyal glutamatèrgica és d'elevada importància, ja que tant una sobre-estimulació com una estimulació baixa dels receptors glutamatèrgics és perjudicial pel cervell en desenvolupament. Elevats nivells extracel·lulars de glutamat en l'espai intersinàptic poden donar a lloc a un procés anomenat excitotoxicitat (explicat més endavant).





**Figura 14.** Il·lustració representativa de la relació del glutamat i la seva concentració a la neurona glutamatèrgica, els astròcits i la sang (Glu=glutamat i Gln=glutamina) (Nedergaard et al. 2002).

La barrera hemato-encefàlica té molt poca permeabilitat al glutamat i prevé l'entrada d'aquest aminoàcid al sistema nerviós central; així doncs, la major part del glutamat en el cervell és sintetitzat de nou als astròcits. La barrera hemato-encefàlica no està completament formada fins als 6 mesos després del naixement en humans (i 7 dies després del naixement en ratolins), sent més permeable al glutamat, així com a altres substàncies que poden ser tòxiques (Adinolfi 1985, Vina et al. 1997). És per això que una alteració dels nivells de glutamat en la sang de cordó umbilical durant el període prenatal podria afectar el normal desenvolupament del sistema nerviós fetal.

El glutamat al plasma oscil·la entre 30 i 80 µM. Quan hi ha concentracions molt elevades de glutamat al cervell en condicions fisiopatològiques, els transportadors de glutamat situats en la barrera hematoencefàlica poden actuar alliberant l'excés de glutamat del SNC a la sang (O'Kane et al. 1999). Diferents estudis (Plaitakis 1982, Castillo et al. 1997, Tomiya et al. 2006, 2007) plantegen i/o demostren que elevats nivells de glutamat sistèmics es troben en condicions fisiopatològiques com l'ictus, malalties neurodegeneratives, o l'esquizofrènia. De la mateixa manera que en plasma, diversos estudis miren els nivells d'aminoàcids en sang de cordó umbilical, com a mesura indirecta de patologies o alteracions associades al període prenatal. Cetin et al. (2005) observa que els nivells de diferents aminoàcids (entre ells el glutamat) es veuen alterats en sang de cordó umbilical (tant de vena com arterial) en

embarassos amb diabetis gestacional. Un altre estudi realitzat amb dones fumadores i no fumadores durant l'embaràs demostra diferents nivells d'aminoàcids entre unes i altres (Jauniaux et al. 1999). Tots dos estudis plantegen que el motiu d'aquestes diferències és un canvi en els mecanismes de regulació de la placenta, des d'una alteració en el transports d'aminoàcids com una alteració en el metabolisme d'aquests.

Aquest treball estudia el sistema glutamatèrgic en dos escenaris diferents: en cèl·lules corticals del sistema nerviós central, i a la placenta i sang de cordó umbilical.

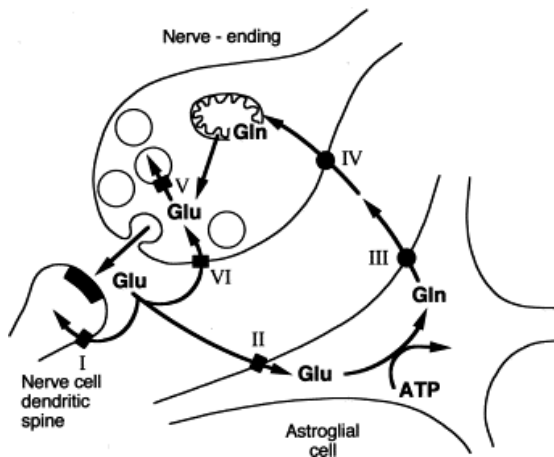
## **EL SISTEMA GLUTAMATÈRGIC AL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL**

El glutamat és conegut com el major aminoàcid excitador del sistema nerviós central. No obstant, el L-aspartat també té una funció excitadora semblant a la del glutamat, tot i que el seu paper com a neurotransmissor encara és qüestionat. El glutamat té un paper clau en el neurodesenvolupament, participant en la diferenciació, la migració i la supervivència de les neurones. Un bloqueig en els receptors d'NMDA durant el període prenatal (amb MK-801, etanol...) pot induir apoptosi en el vulnerable cervell en desenvolupament, que dependrà de l'estadi en que es trobi. La sinapsi glutamatèrgica participa en el procés d'aprenentatge (motora, sensorial, emocional i cognitiva) a través la LTP (*long-term potentiation*, potenciació a llarg termini) i la LTD (*long-term depression*, depressió a llarg termini) (Meldrum 2000, Danbolt 2001).

El glutamat al sistema nerviós central pot ser sintetitzat per dos vies diferents: o bé per la transaminació de l' $\alpha$ -cetoglutarat (producte intermediari del cicle de Krebs) o bé a partir de la glutamina (a través la glutaminasa); el seu esquelet de carboni prové principalment de la glucosa del sèrum mentre que el grup amino s'obté principalment de certs aminoàcids que travessen la barrera hematoencefàlica (BHE) com ara la leucina, la valina i la isoleucina. Ja que la captació d'aminoàcids a través la BHE és menor que la de glucosa, el grup amino del glutamat ha de ser reutilitzat en el cervell, mentre que l'esquelet de carboni és degradat a  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . L'aspartat també és una reserva del grup amino important per a la síntesi de glutamat (on l'enzim aspartat aminotransferasa transporta el grup amino a oxaloacetat, un intermediari del cicle de Krebs) (Hassel & Dingledine 2006).

El glutamat alliberat de les terminals sinàptiques és recaptat del fluid extracel·lular per les neurones i per la glia; en els astròcits pot reaccionar amb  $\text{NH}_4^+$  per convertir-se en glutamina a través l'enzim glutamina sintetasa (un enzim ATP-dependent que es troba en astròcits i oligodendròcits, però no en la neurona). Aquesta reacció també és important per la desintoxicació de l'amoni lliure. Aleshores la glutamina és captada per neurones, on és de nou convertida en glutamat per l'acció de l'enzim glutaminasa en la mitocòndria. Aquest procés entre neurones i astròcits s'anomena "cicle glutamat- glutamina" (figura 15) (Laake et al. 1995, Danbolt 2001, Chaudhry et al. 2002). També pot convertir-se en  $\alpha$ -cetoglutarat a través de l'enzim glutamat deshidrogenasa i entrar al cicle de Krebs, on pot ser metabolitzat a malat, succinat o fumarat (McKenna et al. 1996).

El glutamat intracel·lular pot ser utilitzat per fins metabòlics o com a neurotransmissor. En aquest cas és emmagatzemat en vesícules neuronals a través dels transportadors vesiculars de glutamat 1, 2 i 3 (VGLUT1-2-3, dependents de  $\text{H}^+$ ) que alliberaran el glutamat per un procés anomenat exocitosi. Aquest s'allibera en les terminals sinàptiques per un mecanisme  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, que implica els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  dependents de voltatge del tipus N i P/Q, i diferents mecanismes de regulació (Meldrum 2000, Hassel & Dingledine 2006, Artigas & Suñol 2009).



**Figura 15.** Il·lustració simplificada del cicle del glutamat-glutamina. El glutamat alliberat per exocitosi de la terminal presinàptica és recaptat per transportadors de glutamat presents a la terminal presinàptica (VI), postsinàptica (I) o en cèl·lules astrocitàries (II). En l'astroglia el glutamat es converteix en glutamina, alliberat pels transportadors de glutamina i recaptat a la neurona de nou per altres transportadors de glutamina (IV) on és reconverteix a glutamat i recaptat pels transportadors vesiculars de glutamat a les vesícules (V) (Danbolt 2001).

## ELS TRANSPORTADORS DE GLUTAMAT

Per tal de poder mantenir les concentracions adequades de glutamat, tant extracel·lularment com intracel·lularment, així com per tal de poder realitzar el cicle glutamat-glutamina, existeixen diferents tipus de transportadors (revisió Danbolt 2001).

Els **transportadors de glutamat dependents de sodi**, més habitualment anomenats **EAAT** (*excitatory amino-acid transporter*<sup>16</sup>), són els principals recaptadors del glutamat en excés de l'espai extracel·lular, mantenint els nivells fisiològics de glutamat adequats en l'espai sinàptic. Són transportadors d'alta afinitat ( $K_m=1-100 \mu\text{M}$ ) i requereixen per a l'entrada d'una molècula de glutamat a la cèl·lula, l'entrada de 3 ions de  $\text{Na}^+$  i un  $\text{H}^+$ , i la sortida d'un ió de potassi. La sortida de l'ió potassi  $\text{K}^+$  és necessària per a que el transportador recuperi la seva conformació per a poder recaptar una altra molècula de glutamat. Els cations necessaris pel transport de glutamat depenen de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa; per cada molècula de glutamat una d'ATP és requerida (Zerangue & Kavanaugh 1996, Kanner 2007, Bunch et al. 2009).

Astròcits i neurones expressen un total de 5 isoformes del transportador d'alta afinitat sodi-dependent. Cada isoforma ha estat caracteritzada i localitzada a diferents zones, adoptant així diferents papers en la regulació de les concentracions de glutamat. Aquestes són: EAAT1 (o GLAST, "*glutamate-aspartate transporter*"), EAAT2 (o GLT, "*glutamate transporter*"), EAAT3 (o EAAC, "*Excitatory amino acid carrier*"), EAAT4 i EAAT5. Els transportadors anomenats en el parèntesi es van clonar originàriament en cervell de ratolí i els EAAT són els seus homòlegs en humans; els significats dels noms dels transportadors de glutamat en ratolins no reflecteixen les diferències funcionals entre ells. Comparteixen un 50-60% d'homologia entre ells, i un 30-40% amb altres tipus de transportadors (Danbolt 2001).

EAAT2 és el principal transportador de glutamat, responsable del 90% de la captació en el sistema nerviós i predominant en cèl·lules astroglials. Aquesta isoforma és la majoritària en el prosencèfal; l'EAAT1 només es troba en astròcits i és abundant al cerebel, amb menor expressió en l'hipocamp i en el prosencèfal. Aquests dos subtipus són reconeguts com els transportadors dels astròcits, localitzats en la membrana de l'astroglia i de la glia de Bergmann i associades amb la sinapsi excitadora. Sembla ser que són aquests transportadors els més implicats en l'eliminació de l'excés de glutamat de la sinapsi. L'EAAT3 es troba en neurones del còrtex, l'hipocamp, el caudat i el putamen i també en les terminals presinàptiques GABAèrgiques. L'EAAT4 només s'expressa en cèl·lules de Purkinje del cerebel, i l'EAAT5 només es troba en la retina (Danbolt 2001, Hassel & Dingledine 2006). També existeixen transportadors independents de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de més baixa afinitat,  $K_m > 500 \mu\text{M}$ ) i sensibles a la inhibició de D-glutamat i L-homocysteasa que han estat menys caracteritzats (Danbolt 2001).

---

<sup>16</sup> S'anomenen "*excitoyi amino-acid transporter*" perquè apart de glutamat també poden transportar a l'altre aminoàcid excitador, l'aspartat.

## ELS RECEPTORS DE GLUTAMAT

El glutamat alliberat actua sobre receptors glutamatèrgics, que poden ser pre-sinàptics o post-sinàptics (o fins i tot es poden localitzar en astròcits, oligodendròcits o micròglia); bàsicament es classifiquen en dos tipus: els receptors ionotròpics, canals permeables a cations, i els receptors metabotròpics, receptors acoblats a proteïna G que originen un procés de transducció de senyal intracel·lular (taula 4) (Meldrum 2000, Hassel & Dingledine 2006).

**Taula 4. Classificació dels diferents tipus de receptors glutamatèrgics**

Subtipus de receptors de glutamat						
Classes funcionals	IONOTRÒPICS			METABOTRÒPICS		
	NMDA	AMPA	Kainat	Classe I	Classe II	Classe III
Famílies gèniques	NR1	GluR1	GluR5	mGluR1	mGluR2	mGluR4
		GluR2	GluR6	mGluR2	mGluR3	mGluR6
	NR2A	GluR3	GluR7			mGluR7
	NR2B	GluR4				mGluR8
	NR2C		KA1			
	NR2D		KA2			
	NR3A					

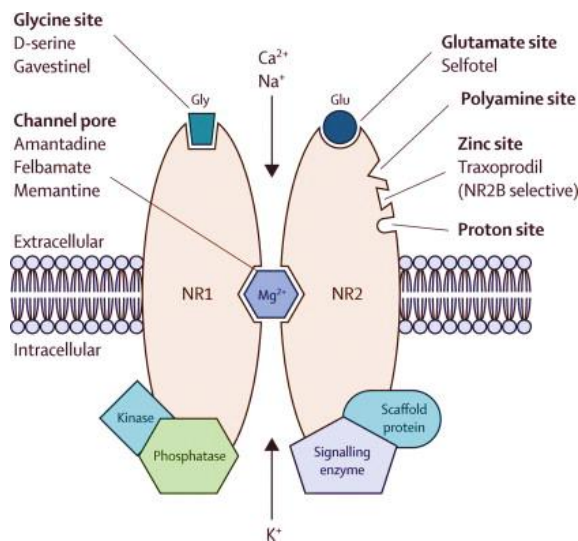
## ELS RECEPTORS IONOTRÒPICS DE GLUTAMAT (IGLUR)

Els receptors ionotròpics de glutamat són canals iònics activats per la unió de glutamat, el qual provoca un canvi de conformació en la proteïna, induint la seva obertura i permetent l'entrada massiva d'ions de  $Ca^{2+}$  i/o  $Na^+$  i la sortida de  $K^+$  en poc temps (milisegons). Els receptors ionotròpics de glutamat són codificats per 18 gens, que formen 3 principals famílies en vertebrats: els receptors de NMDA (N-metil-D-aspartat), els d'AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionic) i els de Kainat (tots tres deuen el seu nom a l'agonista específic que s'hi uneix). Quatre gens codifiquen pel receptor AMPA (GluR1-4), cinc pel receptor kainat (GluR5-7, KA1 i 2), i set pel receptor NMDA (NR1, NR2A-D, NR3A i B). Existeix consemblança dins una mateixa família (~80%), però no entre elles (<55%), que permet generar un ampli nombre de subunitats (Mayer 2005, Mayer 2011).

### ***Els receptors de NMDA (NMDAR)***

El receptor NMDA és un receptor ionotròpic de glutamat que està implicat en diversos mecanismes fisiològics com la generació de l'activitat motora rítmica, la regulació en el desenvolupament neuronal embrionari, i la potenciació a llarg termini (LTP, *long-term*

*potentiation*) com a base d'aprenentatge i formes de memòria. L'NMDA com a agonista específic del receptor NMDA és 30 vegades menys potent que el glutamat. L'activació del canal de NMDA provoca l'entrada d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  i de  $\text{Na}^+$ , i la sortida de  $\text{K}^+$ , i produeix un corrent de caràcter lent i tardà, mediada pel flux intern de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ampli nombre de llocs d'unió al·lostèrics de l'estructura del receptor d'NMDA (figura 16) permet que aquest tingui diferents mecanismes de regulació. Necessita de dos agonistes com a mínim per a ser activat (per això s'anomenen co-agonistes): apart de la unió del glutamat (o NMDA), es requereix la presència de la glicina. El glutamat s'uneix a les subunitats NR2 mentre que la glicina a la subunitat NR1 (figura 16). Apart d'aquest fet, el receptor d'NMDA és inactivat per  $\text{Mg}^{2+}$  en condicions de repòs (aquets bloqueig és sensible a canvis de voltatge, quan més voltatge menys afinitat de l'ió  $\text{Mg}^{2+}$ ). Quan hi ha una despolarització de membrana (produïda per receptors AMPA), hi ha el desbloqueig de l'ió  $\text{Mg}^{2+}$ , i això permet l'activació del canal i l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . També els protons poden bloquejar el canal de NMDA i en canvi les poliamines (espermina o espermidina) poden augmentar la seva activitat. Finalment, també tenen un mecanisme de regulació per calci on la calmodulina activada per l'entrada de calci interactuarà amb el domini C-terminal de la subunitat NR1, que causarà la reducció de l'obertura del canal. La calcineurina fosfat-dependent del  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina també inactivaria els receptors de NMDA (Dingledine et al. 1999, Hassel & Dingledine 2006, Kalia et al. 2008).



**Figura 16.** Il·lustració esquemàtica del receptor ionotòpic d'NMDA. En negreta els diferents agonistes principals al·lostèrics, i a sota d'aquests, diferents fàrmacs específics per aquests llocs. La glicina s'uneix a la subunitat NR1, mentre que el glutamat, així com les poliamines, el zinc i els protons a la NR2 (Kalia et al. 2008).

Estructuralment, el receptor de NMDA és un heterotetràmer compost generalment per 2 subunitats de NR1, que comprenen la part essencial del receptor i 2-3 subunitats NR2(A-D), que determinen les constants d'obertura del canal iònic, i modifiquen els efectes dels antagonistes, donant a lloc a receptors amb diferents característiques electro-fisiològiques i de diferent localització. Les diferents subunitats estan codificades per diversos gens (NR1, 4 gens

NR2 (A-D), i 2 gens NR3(A-B). La subunitat NR1 (~900 aminoàcids) té 8 variants d'*splicing alternatiu* en 3 llocs diferents, conferint-li diferents propietats: una a l'exò 5 a la regió N-terminal (N1), que regula les propietats farmacològiques, i dos en l'extrem C-terminal, anomenats C1 (a l'exò 21) i C2 (exò 22), i que regulen la interacció de proteïnes reguladores en el tràfic del receptor de NMDA. Cada subunitat consta de 3 segments transmembrana i un *loop* transmembrana. La subunitat NR1 conté el lloc d'unió dels co-agonistes endògens glicina i D-serina (Kleckner & Dingledine 1988, Kalia et al. 2008). Aquesta es troba present en tot el sistema nerviós central, i en totes les etapes, tant al neurodesenvolupament com el cervell adult. En canvi la subunitat NR2(A-D) (~1450 aminoàcids) conté el lloc d'unió del glutamat, i els llocs d'unió d'altres moduladors endògens com el  $Zn^{2+}$  i les poliamines (potenciadores, i específiques del lligand NR2B). Apart també és aquesta subunitat la que conté els llocs d'unió d'antagonistes no competitiu com el  $Mg^{2+}$ , el MK-801, la droga anestèsica-al·lucinògena feniciclidina (PCP) i la ketamina, sent aquests més sensibles a la subunitat NR2A i B, i menor a la C i D. Entre elles difereixen sobretot en el temps de desactivació del receptor, on NR2A s'inactiva abans (és a dir, el glutamat es troba menys temps unit activant-lo) i NR2D més tard (Cull-Candy et al. 2001). La expressió de mRNA que codifica les diferents subunitats de NMDA té diferent distribució. Així com la subunitat NR1 està present a totes les neurones del sistema nerviós central, les diferents subunitats de NR2 i de NR3 tenen diferents patrons de distribució al cervell cada una (Nakanishi 1992, Monyer et al. 1994, Nishi et al. 2001).

### ***Els receptors d'AMPA i kainat***

Els receptors d'AMPA i kainat són canals iònics permeables a  $Na^+$ ,  $K^+$ , i en alguns casos a  $Ca^{2+}$ , els quals són responsables de la transmissió sinàptica excitadora ràpida. Els canals AMPA presenten menor afinitat pel glutamat que els de NMDA ( $EC_{50}=200-500 \mu M$  i  $2,5-3 \mu M$ , respectivament) però tenen una cinètica d'activació més ràpida (Artigas & Suñol 2009). Les quatre subunitats que conformen el canal d'AMPA són GluR1-4, mentre que les que conformen el receptor de kainat són GluR5-7 i KA1-2. A diferència dels receptors de Kainat, els receptors d'AMPA tenen baixa permeabilitat al  $Ca^{2+}$ , exceptuant els receptors d'AMPA mancats de la subunitat GluR2. Això és degut a que la subunitat GluR2 conté una arginina (R) on les altres subunitats (1, 3 i 4) contenen una glutamina (Q); aquest lloc rep el nom de Q/R *site* (Hume et al. 1991, Higuchi et al. 1993, Hassel & Dingledine 2006).

Els receptors de kainat (estructuralment semblants als de NMDA i d'AMPA) poden ser presinàptics, i trobar-se en neurones GABAèrgiques. Els homòmers GluR5 i 7 tenen relativament baixa afinitat pel  $^3H$ -kainat (80-100 nmol/l) mentre que les subunitats GluR6, KA1

i KA2 en tenen molta (4-15 nmol/l). La seva activació és més lenta que la dels receptors AMPA i són altament permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . La seva activació produeix una despolarització de la membrana plasmàtica que comporta l'obertura de canals de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  regulats per voltatge, i dels receptors de NMDA, de manera que augmenta més la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular. La unió dels agonistes en els receptors d'AMPA i de kainat, provoquen una dessensibilització d'aquests al poc temps (milisegons) (Fletcher & Lodge 1996, Hassel & Dingledine 2006).

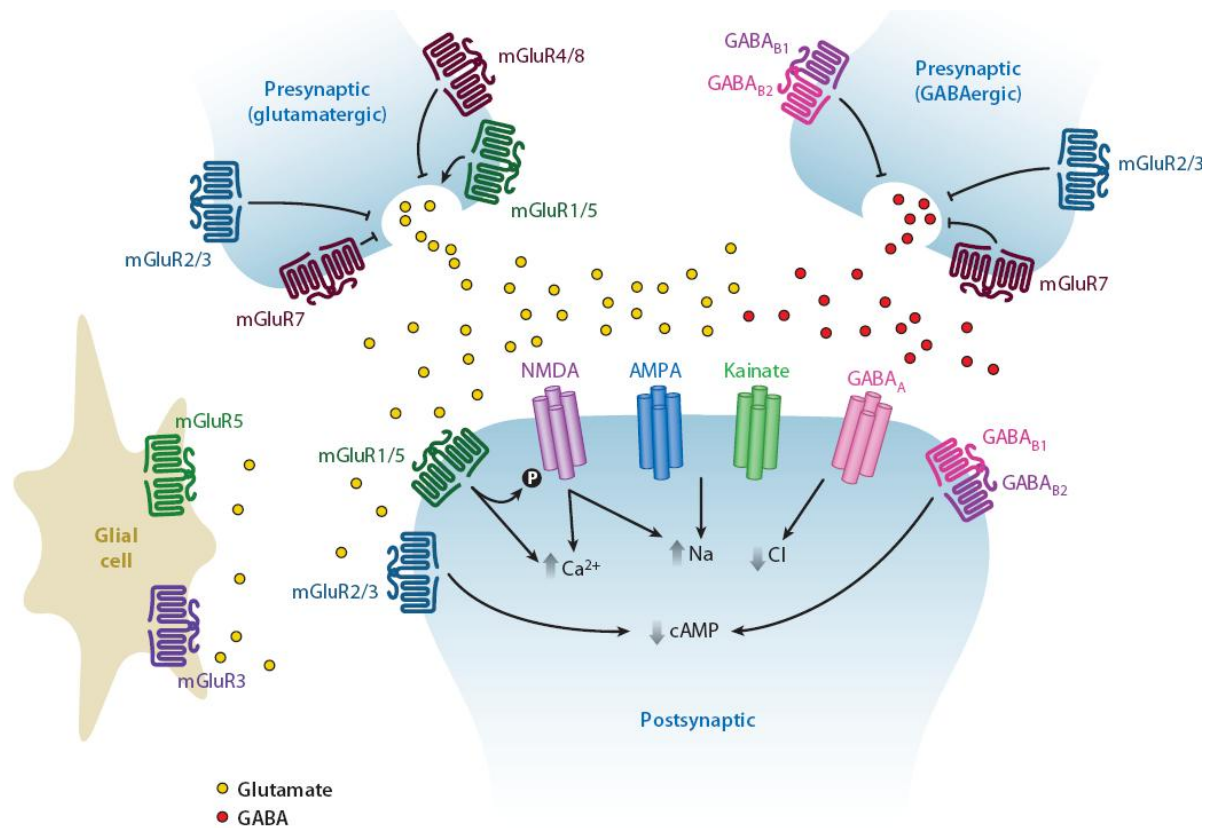
### **ELS RECEPTORS METABOTRÒPICS DE GLUTAMAT (mGLUR)**

Els receptors metabotròpics de glutamat són receptors acoblats a proteïnes G, i pertanyen al grup C d'aquest tipus de receptor. Aquest grup es caracteritza per tenir un gran domini N-terminal extracel·lular que conté un lloc d'unió al lligand endogen. Aquest domini, anomenat *Venus Flytrap Domain* (VFD), conté dos lòbuls que es col·loquen un sobre l'altre i que uneixen el glutamat en una fissura entre els dos, podent presentar tres estats: obert-obert (estat inactiu, estabilitzat per antagonistes) /obert-tancat/tancat-tancat. Apart d'unir el principal agonista glutamat, també pot unir cations divalents com magnesi o calci, els quals poden potenciar o activar el receptor. El domini C-terminal, també és d'alta importància en la modulació de l'acoblament de la proteïna G, que es troba subjecte a *splicings* alternatius, a regulació per fosforilació i a interaccions proteïna-proteïna (Niswender & Conn 2010, Nicoletti et al. 2011).

Existeixen 8 subgrups classificats en tres grups en funció la seva homologia i propietats farmacològiques. El grup I (mGluR 1 i 5) pot estar acoblat a diferents tipus de proteïna  $G_q/G_{11}$  (generalment, tot i que també s'ha vist que poden estar acoblats a altres tipus de proteïna G). El grup II (mGluR 2 i 3) i el grup III (mGluR 2 i 3) estan acoblats a proteïna  $G_{i/o}$ , i inactiven a l'adenilat ciclasa (disminuint l'expressió de cAMP). Apart d'aquestes vies més comuns poden actuar en altres (Nicoletti et al. 2011). La figura 17 mostra una il·lustració dels diferents receptors glutamatèrgics en la sinapsi i les seves interaccions amb els receptors ionotròpics de glutamat (Niswender & Conn 2010).

En aquesta tesi treballarem amb el receptor mGluR I. L'estimulació de  $G_q$  induïda per agonistes de mGluR I activa la fosfolipasa C (PLC) que produeix inositol trifosfat ( $\text{IP}_3$ ) i diacilglicerol (DAG), els quals induiran l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle endoplasmàtic, al mateix temps que activaran la proteïna quinasa C (PKC). Tant l'activació de la PKC com l'augment dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular tenen un efecte sobre els canals iònics. El (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine [(S)-3,5-DHPG] és l'agonista més selectiu per a mGluR I, tot i no ser selectiu entre subgrups (Nicoletti et al. 2011).





**Figura 17.** Il·lustració dels receptors ionotròpics i els diferents subtipus de receptors metabotròpics localitzats en la neurona pre-sinàptica i post-sinàptica (obtinguda de Niswender et al. 2010).

L'expressió de mGluR1 difereix a la de mGluR5, així com la seva funcionalitat. El receptor de mGluR1 s'expressa sobretot en cèl·lules de Purkinje de cerebel i en el bulb olfatori, i també en la substància negra, el globus pàl·lidum, etc. (Martin et al. 1992, Nicoletti et al. 2011). En canvi, el receptor mGluR5 té una expressió més difusa en el SNC i és altament expressat en l'etapa post-natal (Casabona et al. 1997). mGluR1 es troba sobretot a nivell post-sinàptic participant en la transmissió excitadora. El receptor mGluR5 és abundant en l'hipocamp de l'adult, en el cos estriat, i el còrtex cerebral (Romano et al. 1996). mGluR5 interacciona funcionalment amb els receptors NMDA, que té a veure amb el seu rol en la regulació de la plasticitat sinàptica. També s'expressa en cèl·lules no neuronals, com els astròcits, els oligodendròcits, la microglia, cèl·lules troncales progenitores, i una varietat de cèl·lules perifèriques (Nicoletti et al. 2011).

Una disfunció en el seu normal funcionament i/o expressió pot comportar diferents desordres neuronals; una baixa expressió de mGluR1 s'ha observat en el mecanisme d'una atàxia (Conti et al. 2006), i la seva expressió és important en processos de neurodegeneració, de neuroprotecció, i en la fisiopatologia de l'esquizofrènia. mGluR5 està involucrat en els símptomes del més comú dels retards mentals (la síndrome del cromosoma X fràgil), en l'esquizofrènia, en l'addicció per drogues d'abús, en el Parkinson, en trastorns d'ansietat, en el dolor crònic, etc. (Nicoletti et al. 2011).

## **EI SENYAL EXCITADOR**

L'alliberació del glutamat a l'espai intersinàptic produeix l'activació dels canals de NMDA i AMPA en poc temps (1 ms); l'activació d'AMPA genera una senyal que s'inicia i decau ràpidament, mentre que la senyal d'NMDA s'inicia més lentament, però també dura més en el temps (~100 ms). L'acció de les dos senyals s'anomena corrent postsinàptica excitadora (Hassel & Dingledine 2006).

És per la propietat del glutamat a produir un senyal excitador que és important que aquest estigui en les concentracions adequades en el moment adequat; d'altra manera, el glutamat pot jugar un paper com a neurotòxic. Per aquest motiu és important un adequat funcionament i expressió dels transportadors (per mantenir les concentracions adequades de glutamat) i dels receptors (per tal que l'estimulació d'aquests sigui la justa). Totes aquestes estructures estan subjectes a mecanismes de regulació complexos; qualsevol canvi en una regió del sistema nerviós pot desencadenar un altre canvi a una altra regió.

L'**excitotoxicitat** és la mort causada per una excessiva activació dels receptors glutamatèrgics (Olney 1969) i aquest fenomen és un important factor en la fisiopatologia de la isquèmia, del trauma craneoencefàlic o l'epilèpsia. La mort neuronal per glutamat pot implicar dos mecanismes diferents: a) una entrada massiva de Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup>, seguida d'una entrada d'aigua per osmosi o b) una entrada de Ca<sup>2+</sup> i conseqüent activació de proteases i fosfolipases (quan les concentracions de glutamat són més baixes) (Choi 1987). La resposta excitadora dependrà de molts factors: quins receptors estan activats, les diferents subunitats dels receptors, la seva localització, la duració i intensitat del estímulo. Els receptors de NMDA juguen un paper principal en l'excitotoxicitat (Cui et al. 2007), però altres receptors també, tant glutamatèrgics com GABAèrgics. L'entrada de Ca<sup>2+</sup> provocarà dany mitocondrial i estrès oxidatiu: en condicions normals la mitocondria capta Ca<sup>2+</sup> citosòlic i facilita la síntesi d'ATP. Quan hi ha una augment de Ca<sup>2+</sup> es reverteix l'ATP-sintasa, consumint ATP enlloc de generar-ne, a la vegada

que es produeixen radicals lliures per un desacoblament del transport electrònic a la fosforilació oxidativa i l'alliberació de factors proapoptòtics de la mitocòndria. També hi ha una excessiva formació de òxid nítric (NO) per sobreactivació de NMDA, una activació de les calpaïnes i de vies MAPK que participen en el procés excitotòxic (Bondy & Lee 1993, Schinder et al. 1996, Hardingham 2009).

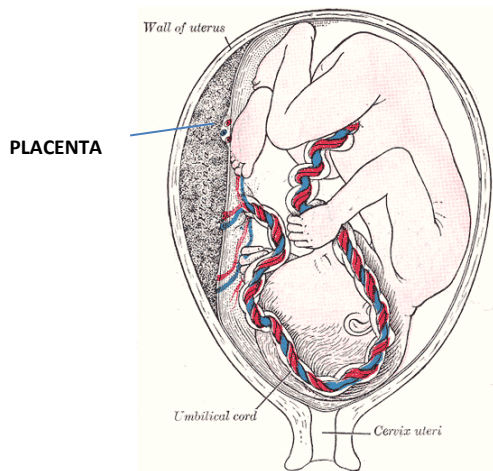
Es creu que la hiperestimulació dels receptors glutamatèrgics pot influir en la neurodegeneració de les neurones induint o contribuint a l'aparició de patologies tipus com l'esclerosi lateral amiotròfica, l'Alzheimer, el Huntington i el Parkinson. Algunes neurotoxines de la dieta, com l'àcid domoïc (una neurotoxina de certes algues i diatomees present en el marisc) han demostrat tenir els seus efectes neurotòxics, ja que activen els receptors de kainat, produint-se atacs i mort, o en cas de supervivència, discapacitat en la memòria crònica, per dany a l'hipocamp (Meldrum 2000, Watanabe et al. 2011). El MeHg també provoca una hiperestimulació dels receptors glutamatèrgics per inhibició del transport de glutamat (explicat més endavant).

## **MODEL IN VITRO DE CULTIUS PRIMARIS DE NEURONES CORTICALS**

Per tal d'estudiar els efectes de certs contaminants en el sistema glutamatèrgic, s'han utilitzat cultius primaris enriquits en neurones corticals de ratolí. Els cultius primaris de neurones corticals estan preparats amb còrtex cerebral de fetus de ratolins de 16 dies (Suñol et al. 2008). Aquests cultius estan enriquits en neurones GABAèrgiques, colinèrgiques i glutamatèrgiques (Sonnewald et al. 2004, Suñol et al. 2008). Expressen constitutivament receptors glutamatèrgics ionotròpics (NMDA, AMPA i Kainat) metabotròpic del tipus I que responen als seus agonistes amb un augment de  $Ca^{2+}$  intracel·lular (en el cas dels ionotròpics per entrada directa i activació dels canals de voltatge tipus L i dels metabotròpics per l'alliberació del calci intracel·lular dels compartiments). També expressen el transportador de glutamat EAAT (2 i 3) (Blitzblau et al. 1996, Chen & Swanson 2003) i el transportador vesicular de glutamat (Briz et al. 2010, Briz & Suñol 2011, Briz 2011).

## EL SISTEMA GLUTAMATÈRGIC A LA PLACENTA

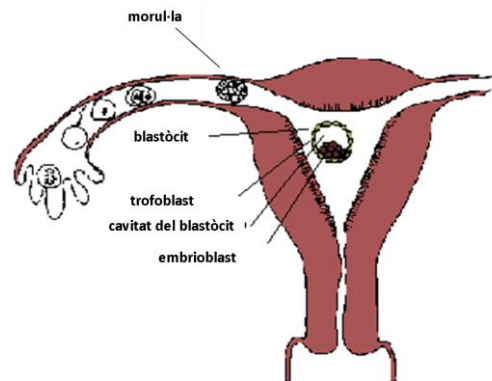
La **placenta** és un òrgan especialitzat durant l'embaràs, que comunica la mare i la nova vida, connectant-les i separant-les (figura 18). És l'encarregada d'abastar de nutrients, d'oxigen i d'aigua al fetus, a la vegada que de protegir-lo de factors externs, entre d'altres funcions vitals (Cross 2005, Myllynen et al. 2005).



**Figura 18.** Il·lustració del interior d'un úter d'una embarassada, on s'observa la placenta (anatomia de Grays).

## FORMACIÓ, ANATOMIA I FUNCIÓ DE LA PLACENTA

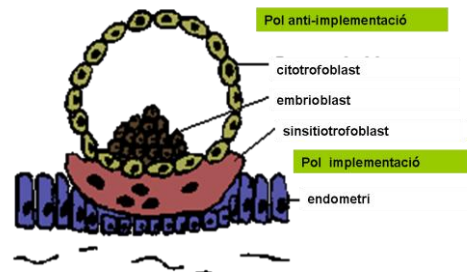
La formació de la placenta comença als 6-7 dies de la fecundació; un cop l'òvul és fecundat per l'esperma es forma el zigot, una cèl·lula única que conté els cromosomes de totes dues cèl·lules; a partir d'aquí comença un procés de divisió cel·lular que a les 30h dona a lloc a 2 cèl·lules anomenades blastòmers, i als 3 dies ja se n'han format 16. Aquests 16 blastòmers constitueixen una altra unitat anomenada mòrula, i que és la que entra a l'interior de l'úter.



**Figura 19.** Il·lustració de l'úter un cop fecundat on s'observa la moru-la, el blastòcit i les seves parts: la cavitat, embrioblast i el trofoblast (imatge modificada de *Placental Triage 101*).

El dia següent d'entrar-hi es filtra dins d'aquesta líquid uterí. Aquesta penetració de líquid, mentre les cèl·lules segueixen creixent i dividint-se, dona a lloc a una altra entitat anomenada **blastòcit** i la qual té dues parts diferenciades: un grup central format per una gran massa de

cèl·lules anomenat **embrioblast** i que constituirà l'embrió i el cordó umbilical, i una capa fina de cèl·lules que l'envolten, anomenades **trofoblast** (del grec *throphe*, "nutrició") i que formaran la placenta. Aquest procés de canvi dura uns 5-6 dies i el líquid que ha penetrat en el blastòcit formarà la **cavitat amniòtica** (figura 19).



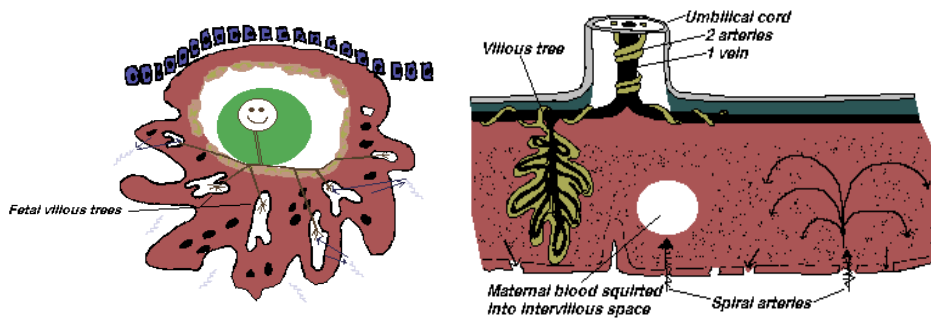
**Figura 20.** Il·lustració de la implantació del blastòcit on s'observa el sincitiotrofoblast a l'endometri al pol d'implantació, i el embrioblast i el citotrofoblast al anti-pol (imatge modificada de *Placental Triage 101*).

El blastòcit resta lliure per l'úter dos dies fins que comença el procés d'**implantació**: el blastòcit (ara ja amb unes 107-256 cèl·lules) es fixa a l'epiteli endometrial, orientant l'embrioblast cap aquesta direcció (pol d'implantació). Aquesta fusió del

trofoblast amb les mucoses uterines origina dues noves capes de cèl·lules: el **citotrofoblast** (la capa més interna, no amb contacte amb l'endometri i encarada al cantó fetal) i el **sincitiotrofoblast** (Figura 20). El sincitiotrofoblast constitueix la major barrera d'intercanvi materno-fetal; es tracta d'un epitelí multinuclear polaritzat que té una membrana apical microvillosa en la cara materna, i una membrana basal en la cara fetal. La composició de cada cara en lípids i proteïnes és totalment diferent, i aquesta doble membrana diferenciada i polaritat cel·lular és un fet crític pel transport vectorial unidireccional de mare a fetus (Myren et al. 2007, Marín et al. 2008, Riquelme 2011).

Al tercer mes d'embaràs es formarà la placenta: al sincitiotrofoblast (que està introduït a l'estroma uterí) li apareixeran una sèrie d'espais anomenats llacunes, les quals s'ompliran de sang materna i secrecions de glàndules endometrials, fent un líquid nutritiu que passarà al nadó per difusió. La circulació sanguínia entre mare i fetus es tractarà de la comunicació entre branques arterials i venoses de vasos sanguinis materns amb les llacunes; aquestes es fusionen formant xarxes llacunars que constituiran la base de l'espai intervellòs de la placenta. Al mateix temps el citotrofoblast genera una sèrie de túnels que aniran fins a aquests espais al sincitiotrofoblast. Aleshores l'embrió envia una sèrie de capil·lars que es submergiran als túnels fins arribar als espais vasculars de la placenta, establint-se la circulació materno-fetal. Els capil·lars fetals es ramifiquen creant els "arbres vellosos" i l'espai que queda s'anomena espai intervellòs. S'anomenen arbres degut a la seva estructura: com una espècie de tronc sorgeix de la zona fetal, seguit d'unes ramificacions cada cop més desenvolupades per a captar millor les demandes d'oxigen i nutrients del fetus en desenvolupament. Al voltant de 60 "arbres vellosos" es troben a la placenta, banyats en sang materna, i que s'ajuntaran en un

únic vas formant el cordó umbilical, constituït per 2 artèries i una vena (figura 21)(Myren et al. 2007).



**Figura 21.** A l'esquerra: il·lustració de les ramificacions capil·lars que s'estenen del embrió als espais vasculars de la placenta. A la dreta: il·lustració de la placenta, on s'observa el cordó umbilical, els espais vasculars, la sang materna i el "arbres vellosos". (imatge de *Placental Triage 101*).

Així doncs, la funció de la placenta varia durant l'embaràs; la seva primera funció es canalitzar la implementació de l'embrió al úter, i la segona és la de produir hormones per prevenir el cicle ovàric. Després de la implantació la seva següent funció és la de regular l'entrada de nutrients i oxigen de mare a fetus. La placenta té un rol actiu en regular la fisiologia de la nutrició pels beneficis del fetus: des de la producció de vasodilatadors i factors angiogènics que estimulen la producció de sang, fins la de lactògens i hormones que estimulen o suprimeixen l'apetit de la mare. La placenta té un rol important en la protecció de substàncies perilloses que venen de la mare al fetus, l'anomenada barrera placentària (per exemple, s'hi troben diversos citocroms P450 encarregats de la desintoxicació de certes drogues i toxines)(Myren et al. 2007).Tot i això, molts contaminants tòxics, com els organoclorats i el metilmercuri, tenen la capacitat de atravessar-la i arribar al fetus (Myllynen et al. 2005)

## SÍNTESI, METABOLISME I TRANSPORT DE GLUTAMAT A LA PLACENTA

El sistema glutamatèrgic en la placenta, com en el sistema nerviós, requereix d'un mecanisme de regulació complex i encara no conegut en detall.

El glutamat és sintetitzat en el fetge del fetus a partir de la glutamina materna. Aquesta és transportada de la circulació materna a la circulació fetal en grans quantitats (a través de la membrana microvillosa de la placenta), i en el fetge del fetus és desaminada a través de l'activitat de l'enzim glutaminasa a glutamat. La glutamina materna és la segona font de

nitrogen proveïda per aminoàcids. 2/3 d'aquesta prové de la captació uterina, i l'altre 1/3 de producció placentària. El 45% de la glutamina materna que entra al fetge és convertida en glutamat, i implica gairebé la totalitat del glutamat generat al fetus (Battaglia et al. 2000). El cicle de glutamat-glutamina feto-placentar és molt important tant pel desenvolupament del fetus com de la pròpia placenta. El 90% del glutamat en circulació fetal és captat per la placenta (a través de transportadors glutamatèrgics  $\text{Na}^+$ -dependents) i el 70% d'aquest és oxidat a les mitocòndries placentals, i un 5% d'aquest es usa per a la producció de glutamina (Battaglia 2000, Battaglia & Regnault 2001; Novak et al. 2001).

En la placenta humana s'han descrit doncs transportadors  $\text{Na}^+$ -dependents iguals que els caracteritzats en cervell. El treball de Noorlander et al. (2004) descriu la diferent expressió i localització dels transportadors EAAT1, 2 i 3 en placenta humana en diferents estadis de la gestació humana (8,16,22,25,27,30,36,38,39,40 setmanes). Així doncs, EAAT1 ha estat localitzada en la capa sincitiotrofoblàstica en tots els estadis analitzats, en la capa citotrofoblàstica i en les cèl·lules mesenquimals, sense observar una diferència en el patró de distribució segons l'estadi. EAAT2 ha estat localitzada també en els diferents estadis estudiats en la capa sincitiotrofoblàstica de les vellositats coriòniques, en algunes cèl·lules mesenquimals, i en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis fetals. Tampoc observen canvis en la localització del transportador segons l'estadi de gestació. Finalment, EAAT3 es va trobar predominantment en l'endoteli de vasos fetals, i en la capa del sincitiotrofoblast i citotrofoblast només a partir de la setmana 8 de gestació. La funció del transportador de glutamat en la placenta no es 100% clara, però. Es creu que té una principal funció en mantenir les concentracions de glutamat baixes, doncs altes concentracions de glutamat podrien ser tòxiques pel fetus en desenvolupament.

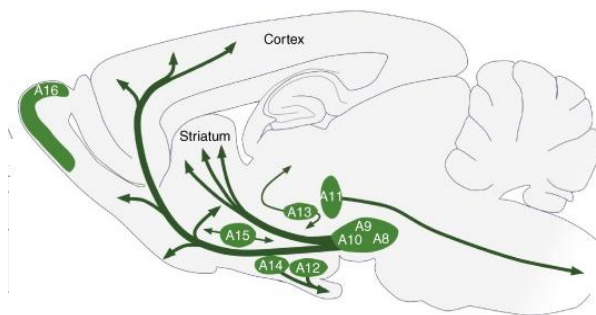
L'estudi de Novak et al. 2001 demostra que el transportador de glutamat en línies cel·lulars de placenta de ratolí (HRP1) es troba regulat per la disponibilitat d'aminoàcids (glutamat, aspartat, glutamina i altres), especialment el de l'aspartat. Mostra que quan existeix una privació d'aminoàcids, el transportador GLT1 (corresponent a l'humà EAAT2) augmenta la seva expressió; en canvi el transportador GLAST (EAAT1 en humans) disminueix, i el EAAC1 (equivalent al EAAT3) es manté igual. Això suggereix que GLT1 té un rol important en situacions on existeix una disminució dels nivells d'aminoàcids, mentre que els altres predominen en condicions basals. Altres estudis previs d'aquest grup realitzats amb placenta de ratolí mostren com el transport de glutamat és majoritàriament  $\text{X}^-\text{AG}$  (transport d'aminoàcids aniònics, depenent de sodi, i que pot ser inhibit tant per glutamat com aspartat) i que aquest transport es troba tant a la membrana basal (cara fetal) com a l'apical (cara

materna) de la placenta i on té una major taxa en la membrana basal. A mesura que augmenten els dies de gestació (en ratolins del dia 14 al dia 20) hi ha un augment del transport que es relaciona amb l'augment de EAAC1 i GLAST1, però no GLT1, que disminueix. Detecten l'expressió de mRNA i proteica per immunohistoquímica i immunoblot dels tres transportadors abans esmentats, amb diferent expressió i distribució segons l'estadi, i a més a més, detecten l'expressió de mRNA de el transportador EAAT4, però en canvi, no detecten aquesta expressió a nivell proteic (Matthews et al. 1998).



### 3 EL SISTEMA DOPAMINÈRGIC

La dopamina (DA) és un neurotransmissor que forma part de la família de les catecolamines, junt amb la noradrenalina (o norepinefrina) i l'adrenalina (o epinefrina). Aquests neurotransmissors comparteixen molts mecanismes, a la vegada que tenen funcions diferenciades. Actua en vies particulars del SNC i en la perifèria, sobretot al ronyó. Al SNC existeixen 16 grups de neurones catecolaminèrgiques, de les quals 9 són dopaminèrgiques. Tres grups es troben al mesencèfal: el grup retrotuboral (A8), substància negra (A9) i l'àrea tegmental ventral (A10); cinc en el diencèfal (A11-15) i un al bulb olfatori (A16) (Figura 22). La dopamina és troba sobretot al nucli accumbens, l'estriat, el tubercle olfatori, l'amígdala, l'eminència mitja i algunes àrees de l'escorça prefrontal (Dahlstroem & Fuxe 1964, Björklund & Dunnet 2007).

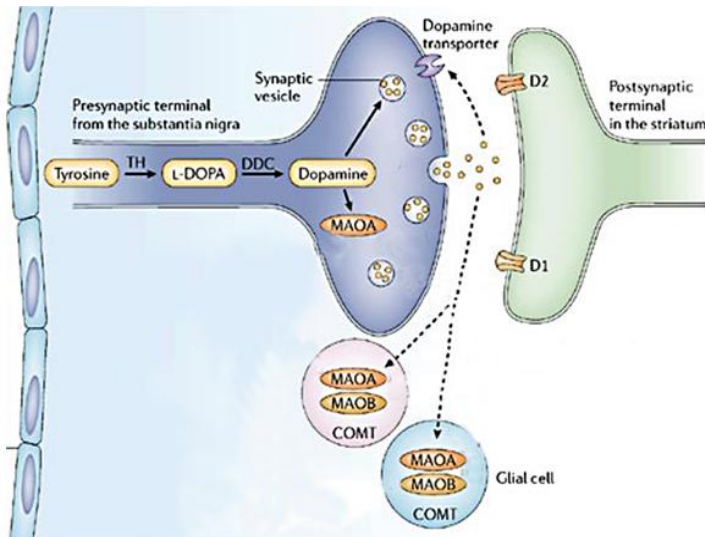


**Figura 22.** Distribució de les neurones dopaminèrgiques en el cervell adult d'un rosegador. Es troben localitzades en 9 grups diferents, des del mesencèfal al bulb olfatori (Björklund & Dunnet 2007).

La neurotransmissió dopaminèrgica (figura 23) està involucrada en una gran varietat de funcions cerebrals superiors: la memòria, l'aprenentatge, la funció cognitiva, la motora; participa en processos incentivadors-emocionals, en el sistema de recompensa, en la resposta a l'estrès, la por i l'ansietat etc. Disfuncions en el sistema dopaminèrgic s'han detectat en desordres neurològics tals com la malaltia de Parkinson, la síndrome de la Tourette, l'esquizofrènia i tumors en la glàndula pituïtària, en la depressió i en processos psicòtics, en el trastorn d'hiperactivitat i dèficit d'atenció, en l'addicció a drogues (Giros & Caron 1993, Jackson & Westlind-Danielsson 1994).

La dopamina és sintetitzada a través d'una reacció en cadena on el precursor principal és la L-tirosina (Tyr). Aquesta és convertida a L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) a través l'acció de la tirosina hidroxilasa (TH) (l'enzim limitant en la formació de la DA). Posteriorment la L-DOPA perd un grup carboxil (acció catalitzada per l'enzim DOPA descarboxilasa (DDC)) per a formar DA. Aquests enzim té una Km baixa i una Vmax alta per a L-DOPA, la qual cosa permet la ràpida

formació de dopamina. Aquest enzim es troba àmpliament distribuït per l'organisme, especialment en neurones serotoninèrgiques, catecolaminèrgiques i teixits no neuronals com ara els ronyons o els vasos sanguinis. La dopamina després pot ser convertida a noradrenalina a través l'acció de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (Zigmond et al. 1989, Kuhar et al. 2006).



**Figura 23.** Il·lustració esquemàtica de la neurona dopaminèrgica on s'observa la síntesi, emmagatzematge, metabolisme i sinapsis.

## ENMAGATZEMATGE DE DOPAMINA

El procés de biosíntesi de dopamina descrit anteriorment és produït al citosol; després aquesta és recaptada pels transportadors vesiculars de monoamines (VMAT) a vesícules d'emmagatzematge que es troben a les terminals sinàptiques (Njus et al. 1986).

Existeixen dos tipus de transportadors vesiculars de monoamines (VMAT): VMAT1 i VMAT2. VMAT1 es troba principalment en les cèl·lules endocrines i paracrines dels òrgans perifèrics, mentre que la VMAT2 és predominant en el sistema nerviós, tot i també trobar-se en cèl·lules histaminèrgiques de l'estómac, de la medul·la adrenal i de la sang (Masson et al. 1999).

El transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2) té 12 dominis transmembrana i alta afinitat per la reserpina, que el bloqueja. El seu mecanisme per emmagatzemar DA és ATP-dependent i lligat a una bomba de protons. La concentració de DA intravesicular és de 0.5 mol/l aproximadament. El complex vesicular conté molècules d'ATP i proteïnes àcides anomenades cromogranines. Aquest transportador té la capacitat de captar diverses amines biogèniques (noradrenalina, adrenalina, triptamina, tiramina i amfetamines). Els ratolins deficients (*knock*

out) de VMAT2 no són viables i nivells alterats de VMAT2 són associats a trastorns bipolars<sup>17</sup> en humans (Zubieta et al. 2000), entre d'altres; Les vesícules, per una banda, tenen el rol de mantenir els nivells adequats intracel·lulars de catecolamines, i per altre, regular el seu alliberament en l'espai sinàptic. Existeixen 3 pools vesiculars diferents: un que es troba a punt per a ser alliberat (anomenat "*ready releseable pool*"), un altre pròxim a la terminal ("*proximal pool*") i un tercer que és llunyà, i està dedicat a la reserva de catecolamines ("*reserve pool*") (Boehm & Kubista, 2002). L'entrada de calci (promoguda per l'obertura de canals de  $Ca^{2+}$  quan arriba un potencial de membrana) activa els sensors de calci que indueixen la fusió de les membranes vesiculars amb la membrana presinàptica neuronal (aquest procés s'anomena excitosi) (Llinas 1977).

### **METABOLISME/INACTIVACIÓ DE LA DOPAMINA.**

Els enzims responsables de la inactivació de la DA lliure a les terminals sinàptiques són la monoaminoxidasa (MAO) i la catecol-O-metiltransferasa (COMT). La MAO és un enzim localitzat en la membrana externa de la mitocòndria que conté flavina i que desamina les catecolamines, mentre que la COMT és un enzim que requereix de  $Mg^{2+}$ , i transfereix un grup metil al grup 3-hidroxid. La MAO desamina la dopamina a àcid 3,4-dihidroxifenilacètic (DOPAC)) que serà deshidroxilat per la COMT a àcid homovanílic. A la vegada la DA també pot ser metabolitzada per la COMT a 3-metoxitiramina (3-MT) que serà desaminada per la MAO a àcid homovanílic (Kuhar et al. 2006).

### **EI TRANSPORTADOR DE DOPAMINA**

La dopamina alliberada és recaptada per transportadors de dopamina dependents de  $Na^+$  i  $Cl^-$ , que es troben tant en les neurones dopaminèrgiques del cervell com de la perifèria. En les neurones dopaminèrgiques hi ha més d'un tipus de transport catecolaminèrgic. El transportador de dopamina (DAT) és fosforilat a l'extrem N-terminal i en regions intracel·lulars. La captació per part del transportador de dopamina és dependent d'energia, i per això pot ésser inhibit per incubació en fred (Masson et al. 1999). Els transportadors de catecolamines poden ser inhibits per drogues/fàrmacs com els antidepressius tricíclics o la cocaïna. Drogues com l'amfetamina també són substrat dels transportadors catecolaminèrgics, competint amb les pròpies catecolamines extracel·lulars per unir-s'hi. Certes neurotoxines com la 1-metil-4-fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>:1-methyl-4-phenylpyridine) i la 6-hidroxidopamina també són

---

<sup>17</sup> El tractament amb liti usualment donat per aquest desordre regula l'expressió de VMAT2 al cervell (Cordeiro et al. 2002).

recaptades pel transportador. Els ratolins *knock out* per DAT presenten retard en el creixement i hiperactivitat (Chen & Zhuang 2003). Depenent de la regió del cervell hi ha diferents mecanismes de control de la concentració de DA (Garris & Wightman 1994) i la cinètica del transport en cada regió del cervell correlaciona amb els nivells de DAT (Sesack et al. 1998).

## **RECEPTORS DE DOPAMINA**

La dopamina alliberada actua sobre els receptors dopaminèrgics, que es troben principalment al cervell, tot i que també es poden trobar al ronyó. Aquests es classifiquen en 2 subtipus: la D1 (que compren el tipus D<sub>1</sub> i D<sub>5</sub>) i la D2 (que comprèn la D<sub>2</sub>, la D<sub>3</sub> i la D<sub>4</sub>) (Sibley 1999, Pivonello et al. 2007) (taula 5). S'han classificat aquests 2 subtipus per les seves diferències en la seva especificitat davant l'acció de certes drogues, i pels seus diferents mecanismes de senyalització. L'activació dels receptors de la família D1 estimula l'adenilat ciclase, mentre que els de la família D2 l'inhibeixen. Aquests formen part de la superfamília de receptors acoblats a la proteïna G, amb 7 dominis transmembrana i el domini N-terminal extracel·lular i el C-terminal intracel·lular.

Els receptors de la família D1 estan acoblats a la proteïna G<sub>s</sub> que implica l'estimulació de l'activitat de l'adenilat ciclase i l'augment de la proteïna AMP cíclica (AMPC), que comporta l'activació de PKA. El D<sub>5</sub> té més elevada afinitat per la dopamina que D<sub>1</sub>.

Els diferents receptors de la família D2 es troben en diverses regions del cervell. Aquests estan acoblats a G<sub>i</sub>, que inhibeix l'adenilat ciclase. En el model utilitzat en aquesta tesi treballarem amb les dues isoformes del subtipus D<sub>2</sub> de la família D2. El subtipus D<sub>2</sub> de la família D2 es diferencia dels altres perquè conté introns en la seva estructura, permeten que hi hagi un *splicing* alternatiu i es creïn dues isoformes diferents: la S (small) i la L (large). Les dues isoformes es diferencien per 29 aminoàcids en el loop I<sub>3</sub>. Tots dos estan acoblats a la proteïna G<sub>i</sub>, inhibint l'activitat de l'adenilat ciclase (i per tant, disminuint la producció de AMPC). Apart d'estar acoblat negativament a l'adenilat ciclase, es troben també acoblats a canals de Ca<sup>2+</sup> i K<sup>+</sup> (Caccavelli et al.1992).

Els D<sub>2</sub>L es troben majoritàriament en les terminals postsinàptiques, mentre que la D<sub>2</sub>S es troba en les terminals presinàptiques, exercint com a autoreceptor. Els DRD2 (*dopamine receptor* D2) regulen funcions relacionades amb la locomoció, la producció d'hormones, l'addicció a drogues. També són la diana d'antipsicòtics per a "trastorns psiquiàtrics" com l'esquizofrènia. Aquesta família està altament expressada en el complex estriatal i la glàndula pituïtària. L'absència de DRD2 en animals els hi redueix l'espontaneïtat de moviments, així com provoca

l'aparició de comportaments acinètics i bradicinèsies, presentant analogies amb els símptomes característics de la malaltia de Parkinson (Baik et al. 1995) També es relaciona amb l'aparició de tumors en la glàndula pituïtària, i la major tendència a l'addició a drogues d'abús.

**Taula 5. Característiques principals dels receptors tipus 1 i tipus 2. Kuhar et al. 2006.**

	tipus D1		tipus D2		
	D1	D5	D2	D3	D4
<b>vies efectores</b>	↑cAMP	↑cAMP	↓cAMP ↑canals K+ ↓canals Ca2+	↓cAMP ↑canals K+ ↓canals Ca2+	↓cAMP ↑canals K+ ↓canals Ca2+
<b>Distribució mRNA</b>	cortex cerebral nucleus accumbens tubercl olfactori cortex cerebral	hipocamp hipotàlem còrtex cerebral	nucleus accumbens: caudat putamen cervell mitjà	Hipotàlem tubercl olfactori	cortex frontal cervell mitjà Medula nucleus accumbens

Diferents estudis han constatat que una administració crònica de fàrmacs antidepressius provoca un augment de la sensibilització dels receptors de dopamina, sent aquests més sensibles a agonistes del receptor (Durlach-Misteli & Van Ree 1992, D'Aquila et al. 2003).

**LÍNIA CEL·LULAR DE NEUROBLASTOMA HUMÀ SH-SY5Y**

Per tal d'estudiar els efectes de certs contaminants en el sistema dopaminèrgic, s'ha utilitzat la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y. Es tracta d'una sublínia clonada de cèl·lules SK-N-SH que s'obtingué originàriament al 1970 d'una biòpsia de neuroblastoma provinent d'un gangli adrenèrgic simpàtic. Les SK-N-SH contenen cèl·lules de 3 tipus de fenotips: neuronal (tipus N), schwannià (tipus S) i Intermediari (tipus I), sent les SH-SY5Y del tipus neuronal (Xie et al. 2010).

Les cèl·lules SH-SY5Y van ser derivades d'una cresta neural neoplàsica immadura que tenia les propietats de les cèl·lules mare, i per això estan en continu creixement; després aquestes cèl·lules es poden diferenciar mitjançant una varietat d'agents: l'àcid retinoïc (RA), l'ester de forbol 12-O-tetradecanioforbol-13-acetat (TPA), el factor neurotròfic derivat de cervell (BDNF),

el AMP dibutiril cíclic (dBcAMP), la purina o l'estaurosporina. Cadascun d'aquests agents, però, confereix propietats cel·lulars diferents (Xie et al. 2010).

El model cel·lular utilitzat en aquesta tesi és el de cèl·lules SH-SY5Y diferenciades amb àcid retinoic (RA)<sup>18</sup>. S'ha escollit aquest model, per ser un dels més caracteritzats, i que ens serveix per a observar les alteracions en el sistema dopaminèrgic durant el procés de diferenciació cel·lular. Les cèl·lules sense diferenciar no serien un bon model per a l'estudi dels mecanismes de neurotoxicitat en el sistema dopaminèrgic degut a que: a) es troben en continu creixement, b) no expressen certs marcadors típics de cèl·lules madures, c) no expressen nivells elevats d'enzims sintetitzadors de DA ni del transportador de dopamina, d) tenen baixa expressió dels receptors de dopamina (Preesgraves et al. 2004), i e) tenen baixa activitat de l'enzim dihidroxifenil descarboxilasa (Ikeda et al. 1994).

Les cèl·lules diferenciades amb àcid retinoic han demostrat expressar el receptor de dopamina DRD2 (S i L) (Wernicke et al. 2010, Farooqui et al.1994), VMAT2 (Preesgraves et al. 2004, Wernicke et al. 2010), DAT (Wernicke et al. 2010) i TH (Cheung et al. 2009, Preesgraves et al. 2004). Tot i expressar diferents indicadors del sistema dopaminèrgic, existeix controvèrsia en la literatura (Xie et al. 2010) sobre el seu fenotip: s'ha associat a un fenotip adrenèrgic pel fet de que acumula i allibera noradrenalina (Encinas et al. 2000), però altres estudis mostren un fenotip més aviat de cèl·lula colinèrgica degut a l'alta expressió de l'activitat de la colina acetil transferasa (ChAT) (Adem et al. 1989, Xie et al. 2010).

---

<sup>18</sup> L'àcid retinoic exerceix el seu efecte unint-se a dos classes de hormones nuclears no esteroïdees: els receptors de l'àcid retinoic (RARs) i els receptors X retinoics (RXRs). L'àcid retinoic indueix la diferenciació a través de la regulació de la transcripció dels gens dels receptors de la neurotrofina, la via de senyalització Wnt, una via que involucra la proteïna kinasa A (PKA) tipus II. (Uemura et al. 2003, Kim et al. 2000, Encinas et al. 2000). Ha estat descrit, però, que les cèl·lules SH-SY5Y diferenciades amb RA confereixen certa neuroprotecció (Cheung et al. 2009).

## 4 EFECTES NEUROQUÍMICS DELS CONTAMINANTS

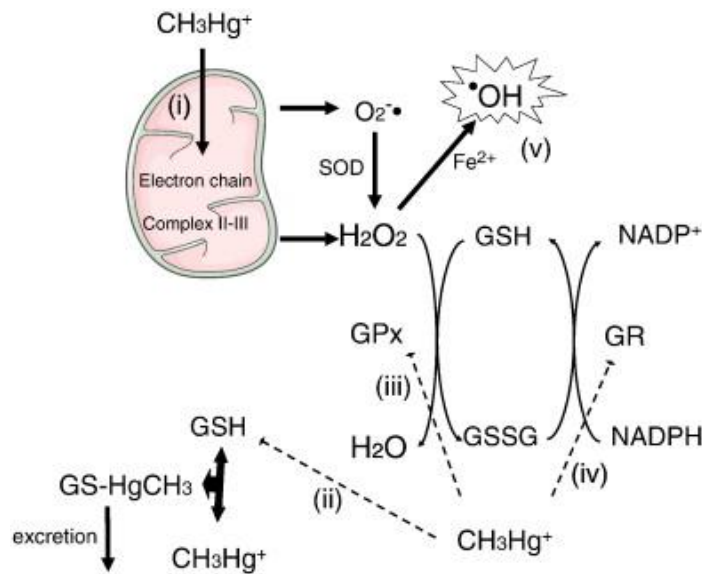
Els tres contaminants estudiats han demostrat en estudis previs, afectar a la salut a múltiples nivells: aquests poden actuar com a carcinògens, disruptors endocrins, poden alterar el sistema immunitari, el normal funcionament hormonal, el reproductiu... (ATSDR 1999, ATSDR 2000, National Research Council 2000, ATSDR 2005). Però tots tres han demostrat tenir un major efecte al sistema nerviós. A continuació es fa una breu descripció dels principals efectes neuroquímics coneguts dels tres principals contaminants d'aquesta tesi (MeHg, PCB i HCH), emfasitzant els seus efectes en el sistema glutamatèrgic i dopaminèrgic.

### A) EL METILMERCURI

Els efectes del MeHg difereixen entre cervell madur i immadur, sent aquest últim més susceptible. El MeHg en cervell madur té un efecte més focalitzat, afectant a regions concretes del cervell (inhibició de la síntesi proteica en les cèl·lules granulars i les cèl·lules de Purkinje del cerebel i en neurones d'àrees corticals (Syversen 1977, Clarkson 2002) mentre que en cervells en desenvolupament el dany causat pel mercuri és més difós. Aquest fet es creu està vinculat als mecanismes de protecció existents en el cervell adult (Sarafian et al. 1996).

Els mecanismes d'acció del MeHg al SNC encara no són completament coneguts, però diferents factors que intervenen en els mecanismes de toxicitat han estat descrits a nivell experimental (per revisió Castoldi et al. 2001, Sanfeliu et al. 2003, Farina et al. 2011). A continuació es descriuran resumidament els principals:

A) **Unió covalent del MeHg a grups tiols i interacció amb els grups selenol** : El MeHg combina covalentment amb els grups tiols (-SH); aquest fet juga un paper important en la



**Figura 24.** Il·lustració representativa del estrès oxidatiu generat pel MeHg obtinguda de Farina et al. 2011. (i) El MeHg trenca la cadena de transport electrònic en la mitocondria desencadenant un augment de la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) com ara peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i anió superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ). (ii) A més també redueix el GSH degut a la formació del complex GSH-MeHg, el qual és excretat. Això provoca una alteració en l'activitat de GPx i GR (iii-iv). Tots aquests fets (i-iv) acaben amb un augment de ROS i estrès oxidatiu (v).

toxicitat del MeHg, doncs aquesta unió es pot donar en proteïnes, inhibint enzims que contenen grups tiols (Kung et al. 1987) o molècules no proteiques com ara el glutatió ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine, GSH). La GSH és la molècula més petita en pes molecular que conté grups tiols de tots el teixits. La glutatió peroxidasa (GPx) i la glutatió reductasa (GR) són enzims molt importants en l'eliminació de peròxids i la reducció de la GSSG (glutatió oxidat). El bon funcionament d'aquests enzims és clau per a que no hi hagi estrès oxidatiu, així com pel manteniment de l'equilibri GSH/GSSG. La interacció del MeHg amb els grups

tiols del GSH genera el complex excretable  $GS-HgCH_3$  que comporta la disminució de molècules GSH; com a conseqüència hi hauria un augment d'espècies oxidatives com l' $H_2O_2$ , i un augment de l'estrès oxidatiu danyant varies biomolècules. La figura 24 mostra un esquema d'aquest fet (Franco et al. 2007, Farina et al. 2011). Apart, la interacció directa del MeHg amb proteïnes nucleofíliques també genera dany per estrès oxidatiu. La disminució de la molècula GSH s'ha observat en diferents estudis experimentals *in vitro* (en línies cel·lulars no-neuronals (Amonpatumrat et al. 2008), en cultius primaris glials i neuronals (Kaur et al. 2006)), en mitocondries aïllades de cervell de rata (Franco et al. 2007), i *in vivo*, on els animals més joves són més vulnerables, i on l'exposició prenatal del MeHg afecta també a la normal formació/maduració del sistema de GSH en el període postnatal (Stringari et al. 2008). Apart de la interacció del MeHg amb els grups tiols, aquest



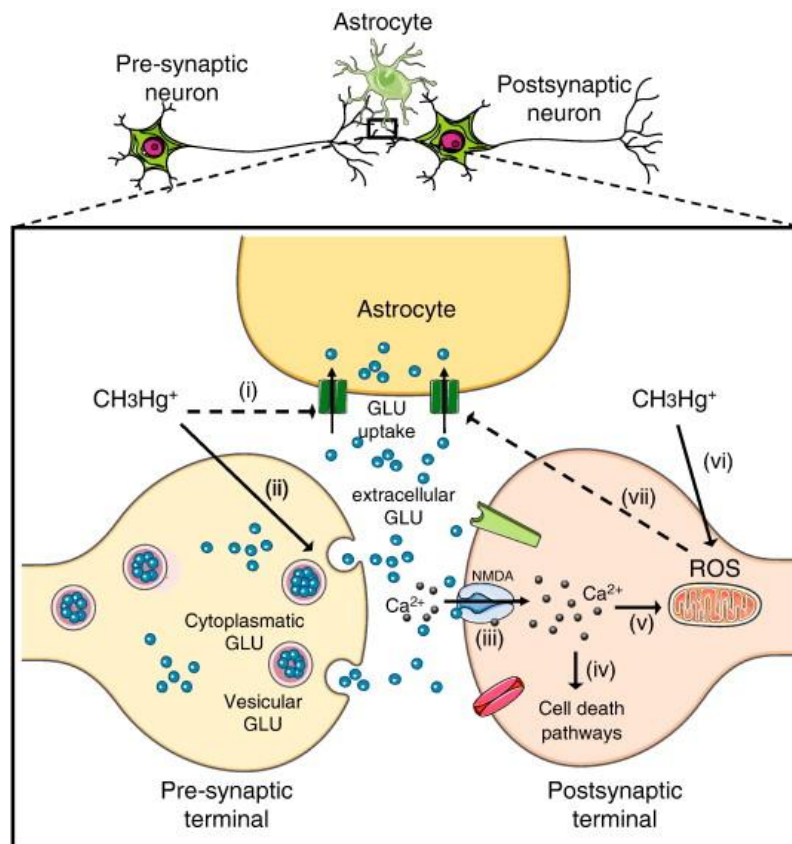
també ho fa amb grups selenol<sup>19</sup> (Khan & Wang 2009). Recentment s'ha demostrat que una de les primeres dianes del MeHg a dosis subcitotòxiques (100 nM) en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel és la GPx, que és una seleno-proteïna (Farina et al. 2009). Estudis previs ja havien demostrat la disminució d'aquest enzim pel MeHg (Prohaska & Ganther 1977), però aquest estudi demostra que a dosis baixes aquests enzim es veu disminuït en cultius neuronals, mentre que altres paràmetres que normalment es veuen alterats en dosis altes no ho estan. La unió del MeHg a grups tiols també afecta a la migració i divisió cel·lular, ja que aquest s'uneix als grups tiols dels monòmers de tubulina afectant a la normal estructura del sistema microtubular (Choi et al. 1978, Clarkson 2002).

**B) Disrupció de la homeòstasi del glutamat i del Ca<sup>2+</sup>:** L'altre principal mecanisme implicat en la neurotoxicitat del MeHg és el trencament de la homeòstasi del glutamat i del calci (figura 25). Diferents estudis han demostrat com el MeHg inhibeix la captació de glutamat en cultius primaris granulars de cerebel (Fonfría et al. 2005, Vendrell et al. 2007) i d'astròcits (Brookes 1992, Aschner et al. 2000, Aschner et al. 2007), en talls corticals de cervell de rata (Moretto et al. 2005) i en vesícules sinàptiques de rata (Porciuncula et al. 2003). També s'ha demostrat la inhibició del transport de glutamat en altres tipus cel·lulars, com ara plaquetes, afectant així a altres àmbits com el sistema immunitari (Borges et al. 2007). El mecanisme d'inhibició no es coneix del tot, podent ser aquest per unió directa o a través de la generació de peròxid d'hidrogen (que és un inhibidor del transport de glutamat). A més a més, el MeHg allibera glutamat a l'espai sinàptic en cultius de cèl·lules granulars de cerebel (CGC) (Fonfría et al. 2005; Vendrell et al. 2007) i talls de cerebel de ratolí (Reynolds & Racz 1987). Aquest augment de glutamat a l'espai sinàptic generaria una resposta excitadora en activar receptors glutamatèrgics tipus NMDA que induirien a l'entrada de calci; l'augment de la concentració de calci intracel·lular actuaria a nivell mitocondrial generant espècies reactives d'oxigen i estrès oxidatiu (que a la vegada, en generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potenciarà l'efecte inhibitori del transport glutamatèrgic, seguint augmentant els nivells de glutamat), generant mort neuronal per excitotoxicitat (Reynolds & Hastings 1995, Farina et al. 2011). Els mecanismes que regulen l'alliberació de glutamat encara no són coneguts, però es creu que hi podria estar implicada la inhibició de la

---

<sup>19</sup> Els extractes d'all (*Allium sativum*) han estat considerats protectors contra els efectes del MeHg i un dels motius és perquè conté seleni (0.72-1.52µg/g) i grups tiols en interaccionar amb el MeHg, generant complexos MeHg-Se i MeHg-SH excretables. (National Research Council 2000, Bellé et al. 2009).

captació vesicular de glutamat (per inhibició directa del transport  $H^+$ -ATPasa) (Porciuncula et al. 2003).



**Figura 25.** Il·lustració representativa del mecanisme d'inhibició del glutamat i consegüent estrès oxidatiu generat pel MeHg obtinguda de Farina et al. 2011. La inhibició de la captació de glutamat (i) i l'alliberació d'aquest en la terminal de la neurona pre-sinàptica (ii) activa els receptors glutamatèrgics (iii) que provoquen un augment del calci intracel·lular (iv) i un disrupció de la mitocondria (v) que generarà la formació de ROS; a la vegada el propi MeHg ( $CH_3Hg^+$ ) també danyarà la mitocondria (vi). La formació de  $H_2O_2$  també potenciarà la inhibició de la captació de glutamat (vii).

## B) L'HEXAFLUOROCICLOHEXÀ

El lindà al sistema nerviós també actua en una varietat de llocs, però probablement el seu efecte en els receptors GABAèrgics és un dels més descrits. El seu efecte convulsionant (Tusell et al. 1987, Suñol et al. 1988) s'ha atribuït principalment a la inhibició del receptor  $GABA_A$ <sup>20</sup> en el lloc d'unió de la picrotoxina, inhibint el flux de  $Cl^-$  (Lawrence & Casida 1984, Pomés et al. 1993, 1994; Vale et al. 2003). En cultius de cèl·lules granulars de cerebel la toxicitat s'ha

<sup>20</sup> La seva principal diana com a insecticida actua bloquejant els canals de clor regulats per GABA en insectes. També bloqueja glutamat i glicina (Bloomquist 2003)).

previngut amb antagonistes del receptor GABA<sub>B</sub> mentre que en cultius primaris de neurones corticals amb antagonistes de GABA<sub>A</sub> (Vale et al. 1998a i 1998b).

El lindà també actua sobre el sistema dopaminèrgic, tot i que els mecanismes encara siguin desconeguts. La majoria dels estudis realitzats sobre els efectes que produeix el pesticida lindà sobre el sistema dopaminèrgic han estat realitzats *in vivo*. Un estudi en rates exposades a dosis agudes (150 mg/kg) mostrà com aquestes patien convulsions i com la concentració de dopamina augmentava al mesencèfal, així com la del seu metabòlit DOPAC, que augmentava tant al mesencèfal com al cos estriat (Suñol et al. 1988). L'estudi de Rivera et al. (1991) realitzat amb rates lactants exposades a una única dosi de lindà de 20 mg/kg (1/6 part de la dosi letal) durant una hora, va mostrar un augment de la ratio de triptòfan (5-HIAA)/serotonina i DOPAC/DA, i una disminució dels nivells de noradrenalina en regions del cervell riques en terminals noradrenèrgiques. Aquesta disminució també va ser observada en la regió de l'hipocamp i al còrtex cerebral de cervells de rates exposades a 20 mg/kg durant 30 min i 40 mg/kg durant 24h, mentre que es va tornar a observar un augment de les relacions DOPAC/DA, i HVA/DA en el hipotàlem i el còrtex cerebral (Llorens et al. 1991). L'alliberament de dopamina davant l'exposició a diferents pesticides en l'estriat va ser estudiada per Faro et al. (2009) *in vivo* mitjançant tècniques de microdiàlisi. El lindà, tot i provocar un efecte més baix que altres pesticides, va comportar un augment del  $281 \pm 28\%$  respecte els nivells basals (el DDT augmentava el  $779 \pm 32\%$  i el paraquat de  $956 \pm 80\%$ ).

Altres estudis demostren que l'efecte citotòxic del  $\gamma$ -HCH (lindà) també és degut a un augment del calci intracel·lular, augmentant així el caràcter excitotòxic d'aquest compost. L'entrada de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular per acció del lindà s'ha demostrat en sinaptosomes (0.02-25  $\mu$ M), en cèl·lules granulars de cerebel (150  $\mu$ M) i astròcits (300nM) (Bondy & Halsall 1988, Rosa et al. 1997, Fujita et al. 1998). A altes concentracions (150  $\mu$ M) afecta els canals de Ca<sup>2+</sup> voltatge-dependent i els canals de Ca<sup>2+</sup> sensibles a I<sub>3</sub>P (Fujita et al. 1998), tot i que les elevades concentracions fan difícil la interpretació dels resultats.

### **C) POLICLOROBIFENILS**

Els PCB al sistema nerviós han estat intensament estudiats, on un ampli nombre d'estudis s'han realitzat a nivell neuroquímic i a nivell neuroendocrí. Nombrosos estudis mostren la incidència dels PCB en el sistema dopaminèrgic, el glutamatèrgic, el colinèrgic, GABAèrgic...així com en la homeòstasi del calci i en l'estrès oxidatiu (Fonnum & Mariussen 2009).

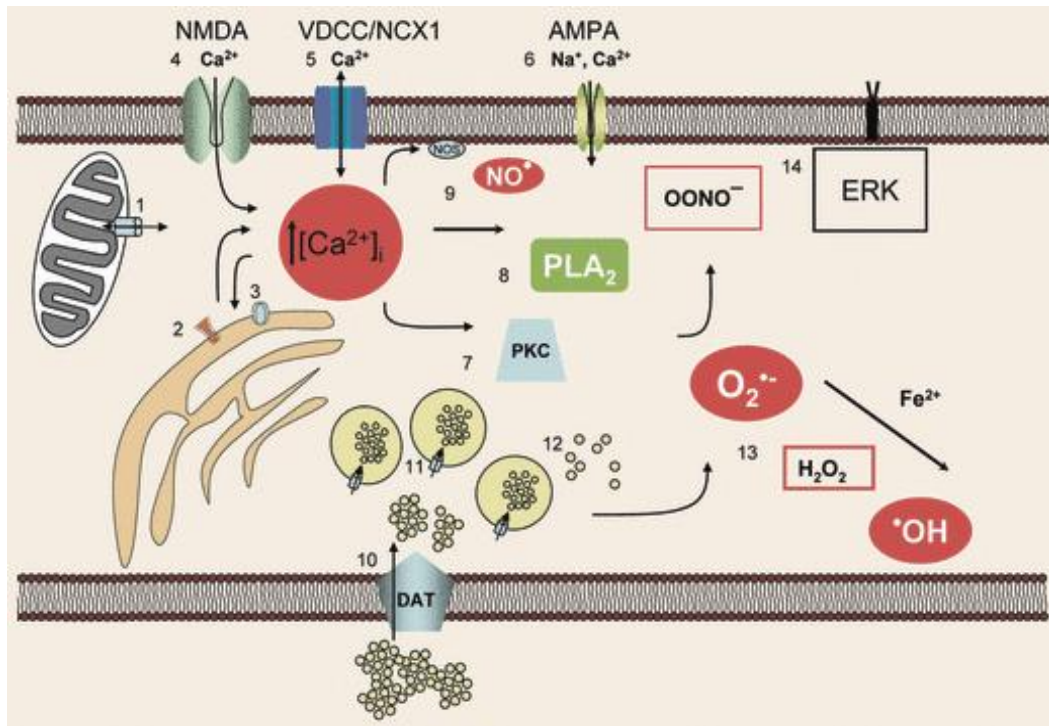
L'acció dels PCB al sistema dopaminèrgic ha estat demostrada en nombrosos estudis *in vivo*, *in vitro* i *ex vivo*, els quals es troben resumits en diverses revisions (Seegal 1996, Mariussen & Fonnum 2006, Fonnum & Mariussen 2009). En el conjunt d'assaigs *in vivo* on es mesuren les alteracions dels nivells de dopamina s'observa una gran varietat de resultats (augment o disminució) que difereixen segons el congènere, el període en que han estat exposats els animals (període prenatal o adult), el temps i les concentracions d'exposició (Seegal 1994, Seegal 1996). Una disminució dels nivells de serotonina també ha estat observada (Tilson & Kodavanti 1997).

L'alliberació d'amines biògenes induïda per PCBs ha estat observada en cultius neuronals dopaminèrgics (PC12) (Angus & Contreras 1996). Altres estudis relacionen aquest amb una inhibició del transportador vesicular de monoamines (VMAT) i del transportador de dopamina (DAT), demostrat en vesícules sinàptiques i en sinaptosomes davant l'exposició a diferents congèneres de PCB (Mariussen et al. 1999, 2001, Mariussen & Fonnum 2001). Altres estudis *in vivo* observen la inhibició del transportador de DAT a l'estriat davant l'exposició a dosis subcròniques en ratolins (Caudle et al. 2006).

La DA lliure al citosol és oxidada, formant radicals lliures que poden causar toxicitat cel·lular. L'augment de DA lliure al citosol (deguda a la disminució de l'activitat de VMAT, i la diferent expressió de DAT i VMAT) és associada a l'augment d'estrès oxidatiu. Lee & Opanashuk (2004) demostren que una població de cèl·lules primàries dopaminèrgiques del mesencèfal són més susceptibles al dany per estrès oxidatiu que les que no són dopaminèrgiques, on hi ha un augment de la producció de ROS en aquest tipus cel·lular (MN9D) dosi/temps-depenent que es previngut amb tractament amb l'antioxidatiu trolox.

Apart d'alterar el sistema dopaminèrgic, diferents treballs han demostrat com els PCB afecten al sistema glutamatèrgic: el transport (Mariussen & Fonnum 2001) i els receptors (Altmann et al. 2001, Takahashi et al. 2009, Llansola et al. 2010), al sistema GABAèrgic (Inglifield & Shafer 2000a, 2000b) i muscarínic (Eriksson et al. 1991). Apart, els PCBs provoquen disrupció en la homeòstasi del calci (Kodavanti 2006, Pessah et al. 2010). L'exposició aguda a aroclor A1254 a demostrat provocar l'alliberació intracel·lular de calci dels compartiments de  $Ca^{2+}$  sensibles a inositol-3-fosfat ( $IP_3$ ) del reticle endoplasmàtic, seguit d'un influx per art de receptors glutamatèrgics i de canals de calci tipus-L voltatge dependents en cèl·lules corticals de rata. Aquest augment de calci també és generador d'estrès oxidatiu (Inglifield et al. 2001). La figura 26 mostra un esquema il·lustrat dels diferents mecanismes mencionats.

Tot i haver una tendència dels efectes dels PCB en els diferents estudis, cal tenir en compte que l'efecte varia segons el congènere (Llansola et al. 2010, Boix et al. 2011). A la discussió d'aquesta tesi s'entrarà amb més detall dels diferents efectes al sistema dopaminèrgic i glutamatèrgic prèviament observats dels PCB i més en concret del PCB 138.



**Figura 26.** Il·lustració representativa de diferents llocs on hi actuen els PCB (de Fonnum i Mariussen 2009). 1) Disrupció de l'homeòstasi del calci en la mitocondria i el porus de transició mitocondrial. 2) Activació de RyR en el reticle endoplasmàtic. 3) Activació del receptor IP<sub>3</sub> en el reticle endoplasmàtic. 4) Activació del receptor de NMDA. 5) Activació dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) i inhibició dels intercanviadors de Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup>. 6) Activació dels canals de AMPA. 7) Activació de la PKC (proteïna quinasa C). 8) Activació de la PLA<sub>2</sub> (fosfolipasa A<sub>2</sub>) i 9) Activació de la nitric òxid sintasa (NOS) i formació de NO per l'augment de calci intracel·lular. 10) Inhibició de DAT i 11) de VMAT. 12) Augment de la DA lliure citosòlica que és oxidada formant ROS (13).

### COCKTAÏL DE CONTAMINANTS

Tot i que l'estudi dels mecanismes de toxicitat d'un compost sol fer-se a nivell individual, la realitat viscuda és que la humanitat està exposada a un gran nombre de substàncies tòxiques que interactuen al mateix temps, com mostren diferents estudis epidemiològics determinant els nivells de contaminants en l'organisme humà (Llop et al. 2010, Vizcaino et al. 2011, Woodruff et al. 2011).

L'acció conjunta del *cocktail* de contaminants a l'organisme humà és encara desconeguda, però diferents recerques han dirigit la mirada en estudiar els possibles efectes conjunts, per tal de portar a la llum la interacció existent entre ells. Així doncs, l'estudi dels PCB conjuntament amb el MeHg s'ha realitzat en diferents estudis donant diferents resultats: per una banda alguns estudis han mostrat efectes compensatoris, on s'observava una disminució dels efectes quan actuaven conjuntament respecte a quan ho feien de forma individual (Piedrafita et al. 2008, Powers et al. 2009), mentre que altres han observat una potenciació dels efectes (Stavenes Andersen 2009). Un altre estudi al Canadà en genotoxicitat va investigar els efectes del *cocktail* de contaminants que reflectia el perfil de contaminants en sang de la població canadenca de l'Àrtic en diferents dianes gèniques (Padhi et al. 2007). L'exposició conjunta a dieldrín (5 µM) i lindà (25 µM) en neurones dopaminèrgiques N27 de rates van mostrar que l'efecte dels dos contaminants era major quan aquests actuaven conjuntament que per separat, on s'apreciava un augment de la caspasa 3/7 i el posterior augment de radicals lliures (Sharma et al. 2010).

De quina manera aquests contaminants estan afectant a les poblacions més vulnerables (infància i vellesa) quan estan exposats a dosis baixes, però en conjunt, i durant llargs períodes de temps (exposició vinculada a la dieta) està sent un tema de preocupació i una pregunta encara no resolta. La dificultat d'observar canvis subclínicament directament en la població demana que és realitzin estudis a diferents nivells metodològics.



## **2. OBJECTIUS**





## OBJECTIU GENERAL

Estudiar els efectes de certs contaminants orgànics tòxics persistents a paràmetres del sistema glutamatèrgic i dopaminèrgic quan es troben presents a baixes concentracions (dosis subtòxiques) i de manera perllongada, en especial èmfasi en l'etapa del desenvolupament.

## OBJECTIU CONCRETS

1. Estudiar paràmetres del sistema glutamatèrgic en mostres de placenta humana i sang de cordó umbilical en relació als nivells d'exposició ambiental a mercuri i contaminants organoclorats.
2. Estudiar el efectes del MeHg i altres contaminants organoclorats sobre el transportador de glutamat en mostres de placenta humana.
3. Estudiar els efectes de l'exposició prolongada (> 96h) a concentracions subtòxiques dels contaminants organoclorats PCB 138 i HCH ( $\beta$  i/o  $\gamma$ ) en els transportadors i receptors glutamatèrgics de cultius primaris de neurones corticals de ratolí.
4. Estudiar els efectes de l'exposició prolongada (> 96h) a concentracions subtòxiques dels contaminants organoclorats PCB 138 i  $\gamma$ -HCH en transportadors i receptors dopaminèrgics de cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y.



## **3. MATERIALS I MÈTODES**



## **PART 1. ESTUDI D'INDICADORS DEL SISTEMA GLUTAMATÈRGIC EN MOSTRES HUMANES DE PLACENTA I SANG DE CORDÓ UMBILICAL EN RELACIÓ ALS SEUS NIVELLS DE MERCURI I CONTAMINANTS ORGANOCLORATS.**

### ***Població***

L'estudi dels aminoàcids excitadors -glutamat i aspartat- en sang de cordó umbilical, es va fer en 40 mostres de sang de cordó umbilical provinents de 40 parelles de mares i fills/es de la cohort de València de l'estudi INMA (que té 855 parelles mares-fills/es) (Guxens et al. 2011). El criteri de selecció es va fer en funció dels nivells de mercuri total (T-Hg), escollint mostres de contingut alt, mitjà i baix. La meitat de les mostres tenien concentracions superiors a 20 µg/L i una altra meitat tenien concentracions per sota de 6.6 µg/L. El màxim de concentració detectada va ser 66 µg/L, superant els límits en que s'han detectat disfuncions en el sistema nerviós. Les mostres també havien estat caracteritzades pels nivells de 7 congèneres de PCB (nombres IUPAC: 28, 52, 101, 118, 138, 153 i 180), hexaclorobenzè (HCB), pentaclorobenzè (PeCB), 4 isòmers del hexaclorociclohexà ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH), 4,4'-DDT, 2,4'-DDT i els seus metabòlits 4,4'-DDE, 2,4'-DDE, 4,4'-DDD, 2,4'-DDD (Vizcaino et al. 2010, 2011, Lopez-Espinosa et al. 2011; Ramon et al. 2011). La taula 6 mostra l'estadística descriptiva de les mostres de sang de cordó umbilical seleccionades.

L'estudi del transport de glutamat en homogenats de membrana de placenta humana es va realitzar a través de 9 placentes de la mateixa cohort de València de l'estudi INMA, que corresponien a 9 de les mostres de sang de cordó umbilical prèviament analitzades pels nivells de contaminants en sang de cordó umbilical. La taula 7 mostra l'estadística descriptiva dels contaminants analitzats en sang de cordó umbilical corresponents a les 9 mostres de placenta seleccionades.

Un informe de consentiment es va obtenir de tots els participants en cada fase i l'estudi va ser aprovat pel comitè Ètic de l'Hospital La Fe (València).

**Taula 6. Estadística descriptiva dels contaminants analitzats en sang de cordó umbilical (N=40). Cohort INMA-València, 2004-2006.**

Contaminants (ng/mL)	LD	%≥LD	MG	(95% IC)	P25	P50	P75	P95	Max
T-Hg	2.0	65.0	9.2	(5.5; 15.4)	<LOD	13.8	42.8	64	66
HCB	0.035	92.5	0.207	(0.144; 0.299)	0.121	0.289	0.485	0.974	1.048
β-HCH	0.008	82.5	0.07	(0.043; 0.115)	0.045	0.127	0.164	0.357	1.237
PCB 118	0.029	77.5	0.057	(0.042; 0.076)	0.023	0.073	0.102	0.215	0.234
PCB 138	0.031	90.0	0.076	(0.059; 0.098)	0.036	0.098	0.128	0.221	0.404
PCB 153	0.020	95.0	0.100	(0.075; 0.134)	0.061	0.122	0.194	0.310	0.331
PCB 180	0.018	95.0	0.069	(0.053; 0.090)	0.044	0.086	0.123	0.176	0.440
ΣPCBs	-	-	0.344	(0.279; 0.425)	0.278	0.433	0.557	0.761	0.768
4,4'-DDE	0.016	100	0.511	(0.407; 0.642)	0.302	0.542	0.803	1.493	1.817
4,4'-DDT	0.009	47.5	-	-	<LOD	<LOD	0.066	0.128	0.144
Σ <sub>8</sub> OCs	-	-	1.362	(1.115; 1.665)	1.029	1.591	1.907	3.315	3.360

IC: Interval de confiança; LD: Límit de detecció; MG: mitjana geomètrica P: percentil T-Hg: mercuri total; HCB: Hexaclorobenzè; HCH: Hexaclorociclohexà; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PCB 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>OCs: Suma dels vuit compostos organoclorats.

**Taula 7. Estadística descriptiva dels contaminants analitzats en sang de cordó umbilical de les nou mostres de placentes (N=9). Cohort INMA-València , 2004-2006.**

Contaminants (ng/mL)	LD	% ≥LD	MG	(95% CI)	P 25	P 50	P 75	P 95	Max
Hg	2	100	13,5	(6,5; 27,9)	5,75	21,0	32,5	40,0	40,0
HCB	0,04	100	0,35	0,22 0,57	0,21	0,34	0,57	1,05	1,05
β-HCH	0,01	89	0,11	0,03 0,38	0,05	0,16	0,25	1,24	1,24
Σ <sub>4</sub> PCBs	-	-	0,38	0,26 0,57	0,26	0,47	0,61	0,67	0,67
4,4'-DDE + 4,4'-DDT	-	-	0,58	0,34 1,01	0,38	0,48	1,12	1,82	1,82
PCB 118	0,03	78	0,07	0,03 0,15	0,04	0,08	0,16	0,21	0,21
PCB 138	0,03	89	0,06	0,03 0,11	0,03	0,06	0,12	0,18	0,18
PCB 153	0,02	100	0,12	0,07 0,19	0,06	0,16	0,19	0,26	0,26
PCB 180	0,02	100	0,07	0,04 0,15	0,04	0,08	0,12	0,44	0,44
4,4'-DDE	0,02	100	0,50	0,27 0,95	0,28	0,41	1,09	1,82	1,82
4,4'-DDT	0,01	78	0,03	0,01 0,08	0,02	0,05	0,07	0,13	0,13

IC: Interval de confiança; LD: Límit de detecció; MG: mitjana geomètrica T-Hg: mercuri total; HCB: Hexaclorobenzè; HCH: Hexaclorociclohexà; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PCB 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>OCs: Suma dels vuit compostos organoclorats..

**Mostres de sang de cordó umbilical i placenta**

La sang de cordó umbilical va ser recollida per venipuntura després que la placenta fos obtinguda. Les mostres de plasma i sèrum van ser obtingudes fent una centrifugació de 2500 rpm i separades en al·liqüotes de 1 ml. Les placentes van ser recollides, examinades, pesades i homogeneïtzades, incloent la cara materna i fetal, així com parts perifèriques. Totes les mostres van ser codificades, congelades i guardades sota confidencialitat i anònimament a -80°C fins abans de ser processades. Aquest procés va ser dut a terme per integrants del grup INMA a València i les mostres de plasma van ser enviades en fred al nostre laboratori, on van

ser immediatament guardades a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Compostos químics**

La sacarosa, el Tris-HEPES, el àcid acètic glacial i el cocktail d'inhibidor de proteases (P8340) es va obtenir de Sigma (St.Louis). L' $[^3\text{H}]$ -D-aspartat (27 Ci/mmol) es va obtenir de Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, UK). El cocktail líquid de centelleig (Optiphase 'Hisafe' 2) es va obtenir de Wallace Oy (Turku, Finland). El *clorur de metilmercuri* és de ICN (Cleveland, OH, USA). El PCB 138 és obtingut de Dr. Ehrenstoner GmbH (Augsburg, Germany).  $\beta$ -HCH va ser obtingut dels "National Physical Laboratories UK" (Teddington, United Kingdom). Els compostos químics van ser dissolts i diluïts en tampó tris-acetat o en dimetil sulfòxid (DMSO). Quan van ser dissolts en DMSO, una solució 200 vegades més concentrada a la solució final va ser preparada, de manera que la solució final de DMSO era del 0.5% (els controls contenien la mateixa quantitat de DMSO). L'àcid L-glutamic, L-aspartic i el reactiu *o*-ftaldehid-/mercaptoetanol (50:50) eren de Sigma, St. Louis. L'àcid ortho-phosphoric era de Merck. Tots els altres compostos químics són de Sigma (St. Louis) i Merck (Darmstadt, Germany).

Els anticossos primaris de cabra policlonal EAAT2 per a rata i l'anticòs monoclonal de ratolí anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa- $\alpha$ 1 era de BD Biosciences i Santa Cruz Biotechnology, Inc, respectivament. Els anticossos secundaris anti-cabra i anti-ratolí conjugats a "*horseradish peroxidase-conjugated (HRP)*" eren de Molecular Probes.

### **Preparació d'homogenats de membrana plasmàtica de placenta**

La preparació de homogenats de membrana plasmàtica de placenta es va realitzar seguint el protocol descrit per Jimenez et al. (2004), amb algunes modificacions. Primerament, peces de la cara fetal de placenta van ser descongelades, i es van agafar uns 10 g aproximadament per assaig. El teixit de placenta va ser triturat en petites peces i netejat amb NaCl 0.9% per eliminar la sang; es va filtrar amb un gassa. Després el teixit va ser homogeneïtzat 8 vegades (uns 30 segons cada cop) a velocitat baixa amb un homogeneïtzador *B. Braun Potter S*. en tres volums de tampó A (sacarosa 250 mM, Tris-HEPES 10 mM ajustat a pH 7.4 amb àcid acètic glacial), banyat en gel; un cocktail inhibidor de proteases va ser afegit després de la homogeneïtzació (1:200). L'homogenat va ser centrifugat a 1000xg, 10 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  i el sobrenedant es va retirar i guardar. El precipitat va ser resuspès amb tampó A, i es va homogeneïtzar 5 vegades durant 30 segons. Aquest segon homogenat va ser centrifugat un altre cop a 1000xg, 10 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$ . Els dos sobrenedants es van combinar. El sobrenedant va ser centrifugat a 10.000xg durant 15 minuts (el pellet resultant corresponia a la mitocondria). El sobrenedant resultant es va centrifugar a 100.000xg durant 1 h i 20 min amb una ultracentrífuga L-90K (Beckman Coulter Optime™); El *pellet* obtingut es va resuspendre amb 2 mL de tampó A, i el



contingut de proteïnes es va determinar amb el mètode de Bradford.

### ***Expressió del transportador de glutamat en placenta***

20 µl d'homogenat de placenta que contenia 5.4 µg de proteïna van ser bullits durant 5 minuts i es van depositar en un gel d'electroforesis del 12% de poliacrilamida sotmès a 100 mA durant 2 h aproximadament. Les proteïnes van ser transferides a una membrana de nitrocel·lulosa i incubades amb 5% de llet en pols no grassa en tampó Tris- Sali Tween-20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 140 mM NaCl, i 0.1% Tween-20).

Les membranes van ser incubades tota la nit a 4°C amb l'anticòs policlonal *anti-rata EAAT2* (1:1000; BD Biosciences) en solució TBS-T que contenia 5% de BSA. Després les membranes van ser rentades amb TBS-T, i van ser incubades amb l'anticòs secundari anti-cabra conjugat a peroxidasa de rave *horseradish peroxidase-conjugated (HRP)* (1:1500; Molecular Probes). Un anticòs *monoclonal anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase $\alpha$ 1* (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) i un anticòs secundari anti-*mouse* conjugat a HRP (1:1500) va ser utilitzat com a control de la quantitat de proteïna i marcador de membrana plasmàtica.

La membrana va ser rentada i incubada durant 4 minuts amb solució quimioluminiscent (Immun-Star HRP kit; Bio-Rad, Hercules, CA). La luminescència va ser determinada amb l'aparell Versadoc Imagine System (Bio-Rad). Les imatges digitals van ser quantificades amb el programa Quantity One (Bio-Rad).

### ***Unió al transport de glutamat en placenta***

El transport de glutamat va ser determinat mitjançant la unió de [<sup>3</sup>H]-glutamat o de [<sup>3</sup>H]-D-aspartat, ja que el D-aspartat es una anàleg no metabolitzable del glutamat (Fonfría et al. 2005, Galofré et al. 2010). El protocol que es va utilitzar per a determinar la unió de [<sup>3</sup>H]-D-aspartat als transportadors d'EAAT de glutamat es va fer seguint modificacions dels mètodes descrits per Cross et al. (1986) i Borges et al. (2007) per cervell humà congelat i plaquetes respectivament.

El homogenat de teixit de placenta que contenia 150 µg de proteïna va ser incubat amb tampó Tris-acetat 50 mM (pH=7.4), 200 mM NaCl, i 20 nM [<sup>3</sup>H]-D-aspartat (1 TBq/mmol) en presència o absència de MeHg, PCB 138,  $\beta$ -HCH i glutamat a diferents concentracions (volum total: 1 mL). Es va realitzar l'incubació a 25°C durant 1 hora i la reacció es va parar per una ràpida filtració al buit en un filtre Whatman GF/C, utilitzant l'aparell Brandell Cell Harvester, equipat amb 24 pous i es van fer 2 neteges amb tampó d'incubació fred. Les fulles de filtre van ser prèviament banyades amb tampó d'incubació fred. Cada filtre individual va ser ubicat a un vial de centelleig de 3 ml, que contenia 2 mL de líquid de centelleig i la seva activitat va ser

mesurada a través l'espectrofotòmetre de centelleig.

#### ***Determinació dels aminoàcids glutamat i aspartat en plasma de cordó umbilical***

El glutamat i l'aspartat van ser determinats per cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) amb detecció fluorimètrica (Waters, Milford, MA; and Applied Biosystems, Foster City, CA) (Reynolds et al. 2002, López-Gil et al. 2009).

Les mostres de plasma van ser descongelades i es van fer alíquotes de 25 µL mesclades amb 475 µL d'àcid perclòric 0.14 M. Després de 10 minuts en bany de gel, les mostres van ser centrifugades durant 2 minuts a 14000xg a 4°C (x2). El sobrenedant va ser filtrat amb filtres millex®-HV (0.45 µm/4 mm) i dividit en alíquotes que van ser congelades a -80°C fins el moment de ser analitzades. La solució d'aminoàcids va ser injectada mitjançant un injector automàtic prèvia derivatització amb la solució reactiva *o*-phthalaldehyde-/mercaptoethanol (50:50) durant 5 minuts. Els aminoàcids es van separar en una columna de fase reversa C18 (*Tracer Nucleosil C18 5-µm particle size, 10 x 0.4 cm; Teknokroma, Spain*). La separació dels aminoàcids es va realitzar mitjançant un gradient de fase mòbil consistent en 100 mM de fosfat sodi dissolt en aigua mili-Q ajustat a pH 6.4 amb àcid orto-fosfòric (Merck) i metanol 28%, seguit per un gradient lineal que augmentava fins arribar el 80% de metanol en aigua per 4 minuts. El sistema va ser mantingut en metanol 80% en aigua durant 2 minuts i va tornar seguint un gradient lineal a les condicions inicials en 5 minuts. El flux de la fase mòbil va ser de 0,8 ml/min. Ambdues fases mòbils van ser contínuament desgasificades amb heli. Les mostres s'injectaven cada 20 minuts. El glutamat i l'aspartat van ser quantificats per detecció fluorescent (Excitació a 360 nm; Emissió a 450 nm) usant un patró extern d'àcid L-glutàmic i àcid L-aspartic dissolt en àcid perclòric 0.14 M. Es va realitzar una corba patró de 9 punts amb una rang de concentració de 0 a 9.6 µmol/L en cada sèrie analitzada en HPLC i la linearitat va ser assegurada ( $r^2 > 0.99$ ).

Les 40 mostres van ser analitzades per triplicat-quintuplicat en diferents assaigs durant el període de dos mesos. Un control aquós de solució de 1 µM de glutamat va ser analitzat cada 10 mostres per confirmar que els paràmetres d'assaig es mantenien constants. La mitjana del coeficient de variació (CV) intra-assaig va ser de 5.5% pels 8 experiments, i la inter-assaig va ser 9.1%.

#### ***Activitat del enzim glutamat deshidrogenasa***

L'assaig es va fer en una placa negra de 96 pous, on es va afegir 70 µl/pou d'una solució de glutamat (que comprenien el rang de 0 a 10 mM en 8 punts (0-0.125-0.25-0.5-0.75-1-5-10 mM). Acte seguit es van afegir 10 µL de PCB 138 (1-10-50 µM) (dissolt en DMSO 1%), β-HCH (1-10-50 µM) (dissolt en DMSO 1%), MeHg dissolts en HBSS (1-10-100 µM), i els seus respectius

controls (HBSS amb o sense 1% de DMSO). Finalment es van afegir 10 µl de NADP<sup>+</sup> 2.5 mM i 10 µl de l'enzim glutamat deshidrogenasa (50 u/ml). Es van realitzar 10 lectures en un interval de 30segons cadascuna (5 minuts) al fluorímetre lector de plaques (SpectraMax GeminiXS; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a labs 340 nm-λemi 460 nm. Es mesura la formació de NADPH de la reacció glutamat+ NADP<sup>+</sup> → α-cetoglutarat + NADPH +H<sup>+</sup>.

### ***Anàlisi estadístic de les dades***

Els resultats de l'assaig de unió de [<sup>3</sup>H]-D-aspartat són expressats en mitjana± SD. La corba concentració-resposta correspon a dos-tres experiments independents, cadascun del qual es fet per triplicat, i ajustat a una corba sigmoïdal utilitzant el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Almenys 6 concentracions de cada contaminant van ser utilitzades per a definir la corba. Els anàlisis descriptius inclouen mitjanes geomètriques i percentils per a l'exposició. L'associació de glutamat i aspartat amb T-Hg i Ocs va ser analitzada utilitzant una regressió lineal. Les variables de exposició-resposta van ser esbiaixades a la dreta i van ser transformades a logaritme de 10 per aproximar la normalitat. Els OCs amb una freqüència de detecció < 50% van ser analitzades com a variables dicotòmiques (per sota i per sobre del límit de detecció). Els models de regressió incloïen lípids en sèrum i l'edat materna com a termes separats per tal de controlar els factors de confusió. En els models d'ajust, 6 dones de Llatino-Amèrica van ser excloses dels anàlisis perquè els seus nivells de OCs i T-Hg eren molt diferents als de les dones espanyoles. La interacció entre OCs i T-Hg amb el glutamat va ser analitzada incloent el terme T-Hg com un producte, dividit en dos categories: nivells alts vs nivells baixos d'exposició i els OCs en escala logarítmica. Quan la interacció va ser marginalment significant (p-valor < 0.10), es va realitzar un anàlisi estratificat dels nivells de T-Hg. Tots els anàlisis van ser realitzats utilitzant el paquet estadístic SPSS, versió 17 per a Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

## **PART 2. ESTUDI *IN VITRO* DELS EFECTES DE L'EXPOSICIÓ PROLONGADA (> 96h) I A CONCENTRACIONS SUBTÒXIQUES DE PCB 138 I HCH ( $\gamma/\beta$ ) EN ELS TRANSPORTADORS I RECEPTORS GLUTAMATÈRGICS DE CULTIUS PRIMARIS DE NEURONES CORTICALS.**

### ***Materials***

Les ratolines NMRI prenyades (16 dies de gestació) van ser obtingudes de Charles River Iffa Credo (Saint Germain-sur-l'Arbreste, France). Les plaques de plàstic de cultius eren de Nunc (Roskilde, Denmark). El sèrum fetal boví va ser obtingut de Gibco (Invitrogen, Barcelona) i el Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) era de Biochrom (Berlin, Germany). La tripsina, l'inhibidor de tripsina soybean (*fava de soja*), la DNasa, el dimetilsulfòxid (DMSO), L-glicina, l'àcid L-glutàmic, l'NMDA, l'àcid kaïníc, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli (MTT), eren de Sigma (St. Louis, MO). El (R,S)-3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) van ser de Tocris Cookson (Bristol, UK). El Fluo-3 AM era de Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). El lindà es va obtenir de Sigma-Aldrich (alemanya), i la resta de contaminants són citats als materials de la part 1.

### ***Cultius primaris de neurones corticals***

Els cultius primaris de neurones corticals van ser preparats a través de còrtex cerebrals de fetus de ratolins de 16 dies de gestació, seguint el mètode de Frandsen & Schousboe (1990) i Solà et al. 2011. Les femelles de ratolí prenyades van ser anestesiades amb isofluorà (FORANE; Abbott Laboratories SA, Madrid, Spain), i sacrificades amb dislocació cervical i els fetus van ser extrets. Els còrtex van ser dissecats amb pinces, i triturats mecànicament. Les cèl·lules van ser dissociades amb tripsina (0.02% [wt/vol]) a 37°C durant 10 minuts seguit d'una trituració en una solució de DNasa (0.004% [wt/vol]) que contenia l'inhibidor de tripsina soybean [0.05% (wt/vol)]. Les cèl·lules van ser resuspeses en DMEM (5 mM KCl, 31 mM glucosa, i 0.2 mM de glutamina), i suspeses amb p-aminobenzoat, insulina, penicil·lina, i 10% fetal calf serum. La suspensió cel·lular ( $1.5 \cdot 10^6$  cells/mL) va ser sembrada en plaques de 6- o 96- pous preincubades amb poly-D-lysina i incubades almenys 8 dies en una atmosfera humidificada amb el 5% de CO<sup>2</sup> i 95% atmosfera d'aire a 36.8°C. Una mescla 5  $\mu$ M 5-fluoro-2'-desoxiuridina i 20  $\mu$ M uridina va ser afegida després de 2 dies *in vitro* (DIV) en el cultiu per evitar la proliferació de la glia. Els animals van ser tractats d'acord amb el protocol DMA1852 de la

Universitat de Barcelona, aprovat per la Generalitat de Catalunya, i seguint les guies de la Unió Europea.

***Tractament amb  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH i PCB 138.***

Una solució stock 20 mM dels diferents contaminants en DMSO va ser preparada i congelada en alíquotes. El hexaclorociclohexà era preparat cada dos setmanes. Els cultius van ser tractats el dia després de la seva sembra amb diferents solucions dels contaminants en DMSO durant 6 DIV; la concentració final de DMSO al medi de cultiu era del 0.5%. El medi de cultiu no era canviat fins que es duien a terme els experiments. En alguns experiments es va realitzar exposició aguda (entre 1 i 5 minuts).

***Assaig de viabilitat cel·lular pel mètode d'MTT***

Per tal de conèixer a quines concentracions no es produïa mort a llargues exposicions (6 DIV), i poder confeccionar així el model d'estudi de toxicitat a concentracions cròniques, es va estudiar la viabilitat cel·lular a diverses concentracions dels contaminants, utilitzant el mètode d'MTT. L'assaig de MTT és un assaig colorimètric que utilitza bromur de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli (MTT). Aquest és captat per les cèl·lules per endocitosis i és reduït a una sal de formazan insoluble (principalment a les mitocondries) que confereix el color violeta que serà llegit al lector de plaques. A més color, és considera més viabilitat cel·lular, doncs més cèl·lules hauran fet el procés de reduir el compost d'MTT.

Es varen tractar les cèl·lules en plaques de 96 pous el dia després de la seva sembra a diferents concentracions dels contaminants, realitzant una corba de 9 punts que anava del rang 0 a 300  $\mu$ M pel lindà, de 0 a 100  $\mu$ M pel PCB 138 durant 6 DIV. Cada concentració es va tractar per triplicat. El setè dia de sembra es va realitzar l'assaig d'MTT seguint el protocols prèviament descrits (Briz et al. 2010). Per a les proves d'excitotoxicitat es van tractar les cèl·lules al sisè dia amb diferents concentracions de glutamat (0-0.3-1 mM) o NMDA (0-0.03-0.1-0.3-1 mM), i es va deixar 24 h. Al dia següent es va realitzar l'assaig de MTT. Es van netejar les plaques de cultius tres vegades amb solució HBSS, i es van incubar amb una solució de MTT (500  $\mu$ g/ml) dissolta en HBSS durant 1 hora a 37°C i protegides de la llum; després es va eliminar l'excés de solució de MTT amb compte, i es va afegir 100  $\mu$ l de solució de SDS 5% per disgregar-les. Es va deixar incubant tota la nit a 37°C, i protegides de la llum; el dia següent es realitzaren les lectures a 560 nm en el lector de plaques (iEMS Reader MF; Lab Systems, Helsinki, Finland).

***Captació d' $^3$ H]-aspartat***

Es van rentar les plaques tractades 3 vegades amb 0.5 ml de HBSS a temperatura ambient. Es

va afegir 0.5 ml de solució salina HBSS ((136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, i 9 mM glucosa, ajustat a pH 7.3) i 25 µl de solució 4 nM d'D-[2,3-<sup>3</sup>H]aspartat; es va incubar al agitador termostatitzat durant 5 min a 36°C. Es va parar la captació posant la placa en gel, i eliminant el medi amb la bomba de buit. Les cèl·lules van ser rentades 3 vegades amb 1.5 ml de solució HBSS 4°C, i van ser observades al microscopi per veure que estan en bon estat, i són disgregades afegint 250 µl de NaOH 0.2 M durant 4h mínim. El contingut del pou es va afegir en vials de centelleig de 5 ml amb 4 ml de *optiphase*.

### ***Funció dels receptors glutamatèrgics per determinació de [Ca<sup>2+</sup>] intracel·lular***

Per tal de estudiar la funció dels receptors ionotròpics (NMDAR i AMPA-Kainat) i metabotròpics de glutamat (mGluR), es va realitzar l'assaig de determinació de calci intracel·lular (*increment de la fluorescència de Fluo-3 induïda per agonista*) descrit prèviament (Babot et al. 2007, Briz et al. 2010).

Per a l'estudi dels receptors davant exposicions cròniques l'assaig es va realitzar en cultius primaris de neurones corticals sembrades durant 7 DIV en plaques de 96 pous i on cada placa va ser tractada durant 6 DIV amb un única concentració del contaminant (PCB 138 0.1 µM, lindà 10 µM o DMSO al 0.5% com a control) per evitar contaminacions creuades. Per als assaigs de calci en exposicions agudes, es va tractar un única placa amb DMSO al 0.5% com a control, PCB 138 50 µM i lindà 100 µM durant 5 minuts simultàniament al tractament amb l'agonista.

Primerament, les plaques van ser netejades tres vegades amb 100 µl/pou de solució HANKS (CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, KCl 5.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM, MgCl 0.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.4 mM, NaCl 137 mM, NaHCO 34.2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 mM, HEPES 8 mM, i glucosa 5.5 mM, ajustada a pH 7.4); acte seguit van ser incubades durant una hora a 37°C amb una solució de fluo-3/AM en solució HANK's (concentració final de 8.8 µM i contenint 0.3% volum/volum de DMSO i 0.05% per/volum d'àcid plurònic F-127). L'acetoximetilèster de fluo-3 és permeable en la cèl·lula, i no és fluorescent. Quan penetra a la cèl·lula és hidrolitzat per esterases cel·lulars que el fan impermeable a aquesta, quedant aquest atrapat dins la cèl·lula i tornant-se fluorescent quan s'uneix a ions de Ca<sup>2+</sup>. Passada l'hora, s'elimina la solució de fluo-3/AM de les plaques i són rentades amb solució HANKs sense magnesi (CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, KCl 5.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM, NaCl 137 mM, NaHCO 34.2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 mM, HEPES 8 mM, i glucosa 5.5 mM, ajustada a pH 7.4) tractades amb 100 µl de glutamat o NMDA a diferents concentracions (5 punts de 0 a 100 µM) en HANKs sense magnesi i amb glicina 5 µM o bé amb Kainat (de 0 a 600 µM) o DHPG (de 0 a 100 µM) en solució HANKs. Acte seguit es mesura l'increment de la fluorescència induïda per l'agonista a longitud d'ona 485 nm (excitació) i 530 nm (emissió) en el fluorímetre lector de plaques (SpectraMax GeminiXS; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Acte seguit s'afegeixen 20

$\mu\text{l}$  del ionòfor A23187 (10  $\mu\text{M}$ ) durant 30 minuts a 37°C, i es mesura de nou per obtenir la fluorescència màxima ( $F_{\text{max}}$ ). Una següent incubació es realitza afegint 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  (5 mM en 0.9% pes/volum) durant 12 min per a obtenir la fluorescència mínima ( $F_{\text{min}}$ ).

La concentració de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es mesura amb la següent fórmula:

$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$ , on  $K_D$  és la constant de dissociació del Fluo-3/AM que correspon a 320 nm.

### ***Expressió de NR1 per western blot***

L'expressió dels receptors ionotròpics de NMDA (NMDAR) davant l'exposició a PCB 138 0.1  $\mu\text{M}$  i lindà 10  $\mu\text{M}$  durant 6 DIV va ser determinada per western blot utilitzant protocols ja descrits prèviament (Briz et al. 2010).

Els cultius van ser crescuts en plaques de 6-pous i van ser rentats 2 vegades amb solució HANKs freda. Les cèl·lules es van retirar amb solució de càrrega (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10 % glicerol, 2% SDS, i 50 mM dithiothreitol), i sonicades seguidament. Després van ser bullides durant 5 minuts i congelades fins el seu ús. Van tornar a ser bullides durant 5 minuts i centrifugades a 13.000xg durant 30 segons, abans de carregar 20  $\mu\text{L}$  al gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida del 7%. Aquest va córrer a 15V durant tota la nit. Al dia següent les proteïnes van ser transferides a una membrana de nitrocel·lulosa i incubades amb solució de llet en pols 5% en solució TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween -20*) (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 140 mM NaCl, i 0.1% Tween-20). Les membranes van ser incubades tota la nit amb els anticossos primaris següents: anticòs policlonal de cabra anti-NMDAR1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) en solució TBS-T. Després les membranes van ser rentades 3 vegades durant 5 minuts amb T-TBS i incubades amb els respectius anticossos secundaris (anti-cabra) conjugat a *horseradish peroxidase* (HRP) (peroxidasa de rave) (1:4000; Molecular Probes). Després de realitzar la lectura, es van incubar les membranes amb l'anticòs monoclonal anti-actina (1:10000; Sigma) i un anticòs secundari anti-ratolí (1:5000) conjugat a HRP va ser utilitzat com a control de la quantitat de proteïna. Les membranes van ser rentades amb T-TBS durant 15 minuts en agitació 3 vegades; després es va incubar durant 4 minuts a solució quimioluminescent (Immuno-Star HRP kit; Bio-Rad, Hercules, CA). La luminescència va ser determinada amb l'aparell Versadoc Imagine System (Bio-Rad). Les imatges digitals van ser quantificades amb el *software* Quantity One (Bio-Rad).

### ***Anàlisi estadística de les dades***

Els resultats estan expressats en mitjana $\pm$ SD i els gràfics estan mostrats en mitjana $\pm$ SEM, de 3 a 5 experiments, cada un per triplicat, en cultius independents. La comparació dels resultats es

va fer per One-way Anova (test de comparació múltiple de Dunnet) quan es comparaven més de dos grups o el t-test quan es comparaven dos grups. Les corbes van ser ajustades amb una correlació no-lineal sigmoïdal dosi-resposta. Es va utilitzar el software GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).



### PART 3. ESTUDI *IN VITRO* DELS EFECTES NEUROTÒXICS DE L'EXPOSICIÓ PROLONGADA (> 96H) A CONCENTRACIONS SUBTÒXIQUES DE PCB 138 I $\gamma$ -HCH EN TRANSPORTS I RECEPTORS DOPAMINÈRGICS EN CÈL·LULES HUMANES DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y.

#### **Materials**

El medi de creixement, medi mínim essencial (*minimum essential medium*) amb sals Earl's (MEM-Earl's) i la gentamicina (50 mg/ml) són de GIBCO Invitrogen (Auckland); el sèrum fetal boví (FBS) i la Tripsina de Sigma (St Louis, MO). El DMSO (dimetilsulfòxid), l'àcid retinoïc, la penicilina (100 I.E./ml) són de Sigma-Aldrich. Els anticossos són: VMAT2 (H-90):SC-15314 i el DRD2 (h-50):SC-9113 de Santa Cruz Biotechnology, INC (Santa Cruz, EEUU). Els encebadors (*primers*) són de ThermoFisher Scientific (Whaltman, USA) menys els DRD2 (DRD2f, DRD2Sr, DRD2Lr) que són de biomers (Ulm, Alemanya). Aquests últims ja havien estat utilitzats en un altre estudi (Wernicke et al. 2010) mentre que els *primers* de DAT i el VMAT2 van ser sintetitzats de nou per a aquest treball. Els primers sintetitzats i utilitzats es mostren a la taula 8.

**Taula 8. Encebadors (*Primers*)**

<b>FUNCIÓ</b>	<b>Seqüència</b>
DATf	5'-CTGCGAGGCGTCTGTTTGGATTG-3
DATr	5'-GTCCCTGTGCAGTTGTTGGTGA-3
VMAT2f	5'-GCAATTGGAATGGATTTCGT-3'
VMAT2r	5'-ACCACCAGCAGAAGGACCTATA-3'
DRD2f	5'-GGACTCAATAACGCAGACCAGAA-3'
DRD2Sr	5'-CGGGCAGCCTCCTTAGT-3
DRD2Lr	5'-GGTGAGTACAGTTGCCCTTAGT-3
<b>Gens normalitzadors (<i>Housekeeping genes</i>)</b>	
HPRTf	5'-AGCCAGACTTTGTTGGATT-3
HPRT r	5'-ACTCAACTGAACTCTCATCTTAG-3
PBDGf	5'-AACATTGAAAGCCTCGTACC-3
PBDGr	5'-CAGGTCCACTTCATTCTTCTC-3

#### **Cultius de SH-SY5Y**

Els cultius de neuroblastoma s'han dut a terme en dos laboratoris i han vingut de cultius cel·lulars en *stock* diferents. Les SH-SY5Y utilitzades pels assaigs de viabilitat i pels assaig de RT-PCR usats en el laboratori de la universitat tècnica de TH-Wildau (Berlín) provenien de GewebeResourcenZentrum Braunschweig, Germany. Les utilitzades pels westerns blots en el

laboratori de l'IIBB-CSIC provenien de ECACC (european collection of cell cultures, UK). Les cèl·lules van ser sembrades inicialment en un flascó de 75cm<sup>3</sup> a una densitat aproximada de 10<sup>5</sup>cèl·lules/cm<sup>2</sup> i crescudes en el medi MEM-Earle suplementat amb FBS al 10% i gentamicina al 1%. Les cèl·lules van ser mantingudes a 37°C en una atmosfera d'humitat saturada al 5% de CO<sub>2</sub>. Les cèl·lules es van fer créixer de la següent manera: cada flascó era netejat dues vegades amb 10 ml de solució PBS i acte seguit es desenganxaven del flascó amb 2 ml/flascó de PBS-EDTA o tripsina-EDTA actuant 2-3 minuts. 5 ml de medi de creixement eren afegits seguidament per parar l'acció de la tripsina, i es centrifugava la mescla durant 4 min a 800 rpm. Es retirava el sobrenedant i s'afegien 3 ml de medi de creixement, que es tornaven a sembrar; aquest procés es repetia fins a obtenir els flascons necessaris per a dur a terme l'assaig experimental. Aleshores les cèl·lules es sembraven per a ser diferenciades en plaques de 96 pous a la densitat de 4x10<sup>4</sup> cèl·lula/pou (pels assaigs de viabilitat), flascons de 25 cm<sup>3</sup> (2x10<sup>6</sup> cells) per la RT-qPCR, i plaques de 6 pous a 80x10<sup>4</sup> cèl·lula/pou (pel western blot). El dia següent de sembrar les cèl·lules s'afegien 10 µM d'àcid retinoïc (dissolt en DMSO) al medi de creixement per tal de diferenciar-les.

#### ***Tractament amb γ-HCH i PCB 138***

El tractament de les cèl·lules es va fer de la mateixa manera que pels cultius primaris de neurones corticals, i es va tractar al mateix moment en que s'afegia l'àcid retinoïc per a la diferenciació.

#### ***Assaig de viabilitat pel mètode de MTT***

Aquest s'ha realitzat amb el mètode de colorimètric per MTT que s'havien realitzat pels cultius primaris de neurones corticals, però amb certes modificacions en el protocol.

La corba es va obtenir d'una única placa de 96 pous tractada amb 8 repliques de les diferents concentracions de contaminants; les cèl·lules van estar exposades durant 2 DIV i 6 DIV, i 9 concentracions van ser utilitzades per a confeccionar-la en un rang de rang 0 a 300 µM pel lindà, de 0 a 100 µM pel PCB 138. En aquests assaig 50 µM del compost MTT es van incubar durant 4 hores a 37°C i després les cèl·lules van ser disgregades durant 30 minuts amb DMSO. Es van realitzar les lectures a 560 nm en el lector de plaques.

#### ***Expressió de DRD2L i S, VMAT2 i DAT per RT-PCR***

A 7 DIV les cèl·lules van ser recollides afegint PBS/EDTA (26:1) per desenganxar-les; es van recollir i centrifugar durant 5 min a 300-500xg; es va aspirar el sobrenedant, es va afegir 3 ml de PBS i es va recentrifugar; el pellet es va resuspendre amb 1 ml de PBS i es va realitzar una

centrifugació de 5 minuts a 3000 rpm. Es va aspirar el sobrenedant i es va deixar secar el pellet amb aire; un cop sec es va congelar a -80°C fins el seu ús.

La extracció del RNA es va realitzar seguint el protocol i amb els materials del *High Pure RNA isolation Kit* de *Roche Applied Science* (Manheim, Alemanya). El control de qualitat es va fer amb l'agilent 6000 pico Kit amb 5 ng/μL de RNA. 1 μL de cada mostra va ser utilitzada per a saber les ratios d'extinció a 260/280 i 260/230 nm amb Nanodrop (Thermocientífic). Per a la transcripció de fase reversa del RNA es va utilitzar el "*Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit*" de *Roche Applied Science* (Manheim, Alemanya) amb 500 ng de RNA. Es va utilitzar el primer (encebador) del *Housekeeping gene* PBDG (*Porphobilinogendeaminase*) i HPRT (*hypoxanthinephosphoribosyltransferase*). La RT-qPCR es va dur a terme utilitzant l'equip de Roche LightCycler® 480; es van utilitzar 0.625 ng/μL de cDNA i 0.5 μM de primer amb SYBR® Green (LightCycler®480 SYBR® Green I, Roche). La Tm òptima va ser assajada prèviament pels diferents encebadors. El protocol seguit va ser: desnaturalització a 94°C durant 5 minuts seguits de 50 cicles de 95°C a 10 s, 7 s a 65°C i 10 s a 72°C. La quantitat relativa de cada diana estudiada era comparada a la quantitat dels *housekeeping genes* HPRT i PBDG. La quantificació es va realitzar amb el mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001).

#### ***Determinació de dopamina (DA) i DOPAC.***

La DA i el DOPAC es van determinar amb cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) amb detecció electroquímica (Waters 2465, Milford, MA; and Applied Biosystems, Foster City, CA). El medi de cultiu es va recollir i es va congelar a -80°C fins el moment del seu ús. Aquest es va desproteïnit amb àcid perclòric 0.14 M i centrifugar i 30 μL eren injectats amb injector automàtic refrigerat a 8°C.

La DA i el DOPAC es van separar en una columna Hichrom Ultrasphere 3 ODS, 3 μm (75x4.6 mm). La fase mòbil consistia en 0.15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.81 mM octyl sodi sulfat, 0.5 mM EDTA, ajustat a pH 2.8 amb 85% d'àcid fosfòric, i metanol 85%. El flux era bombejat a 0.9 mL/min i els temps de retenció de la DA i del DOPAC va ser de 2 i 2.25 minuts respectivament.

#### ***Expressió proteica de DRD2 i VMAT2 per western blot***

30 μg de proteïna total desnaturalitzada (100°C durant 5 min) va ser subjecte a un gel d'electroforesis de poliacrilamida al 10%, junt amb un marcador de pes molecular (Fullrange Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham, Buckinghamshire, UK) i les proteïnes van ser transferides a una membrana de diflorur de polivinil (Millipore, Bedford, MA, USA). Després de netejar la membrana en tampó salí Tris (TBS: 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5) durant 5 min, es banyà en metanol durant 10 segons, i incubà amb els anticossos primaris tota la nit a 4°C:

policlonal de conill anti-DRD2 (1 : 250, Santa Cruz Biotechnology, Temecula, CA, USA), policlonal de conill anti-VMAT2 (1 :250, Santa Cruz Biotechnology), i monoclonal de ratolí anti- $\beta$ -actin (1:50000, Sigma-Aldrich) diluïts en tampons d'immunoblot TBS amb 0.05% Tween-20 (TBS-T) i 5% llet en pols no grassa. Les membranes van ser netejades dues vegades amb TBS-T i incubades amb anticossos secundaris conjugats a HRP durant 1 h a 23–25°C: *donkey anti-rabbit* (1 : 5000, Amersham), *goat anti-mouse* (1 : 5000, Santa Cruz Biotechnology). Es van fer diferents rentats amb TBS-T i van ser incubats amb ECL-Plus (Amersham) per 5 minuts. Les membranes van ser exposades a la cambra del sistema VersaDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), i les intensitats dels píxels de les bandes immunoreactives van ser quantificades utilitzant el % ajustat al volum del *software* Quantity One 5.4.1. (Bio-Rad Laboratories). Les dades estan expressades com la *ratio* entre la intensitat de la proteïna de la banda d'interès i la banda de la proteïna control ( $\beta$ -actina).

#### ***Anàlisi estadístic de les dades***

Els resultats estàn expressats en mitjana $\pm$ SD i els gràfics es mostren en mitjana $\pm$ SEM. Tres flascons de cultius independents es van realitzar per la RT-qPCR, i tres flascons independents es van realitzar per a fer el Western Blot. La comparació dels resultats es va fer per One-Way Anova (*Bonferroni's multiple comparison test*) quan es comparaven més de dos grups. Les corbes van ser fetes amb una correlació no-lineal sigmoïdal dosi-resposta. Es va utilitzar el *software* GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).



## 4. RESULTATS



## **PART 1. ESTUDI D'INDICADORS DEL SISTEMA GLUTAMATÈRGIC EN MOSTRES HUMANES DE PLACENTA I SANG DE CORDÓ UMBILICAL EN RELACIÓ ALS SEUS NIVELLS DE MERCURI I CONTAMINANTS ORGANOCLORATS.**

La primera part d'aquesta tesi té com a objectiu estudiar el sistema glutamatèrgic en mostres de placenta humana i sang de cordó umbilical. Com s'ha mencionat a la introducció, un dels mecanismes de toxicitat del MeHg descrit, és la inhibició dels transport de glutamat en neurones, astròcits, i altres tipus cel·lulars com ara plaquetes. A la vegada, altres contaminants OCs també han demostrat afectar al sistema glutamatèrgic del sistema nerviós de diferents maneres (mirar introducció). Aquesta primera part parteix de la possibilitat de treballar amb mostres de placenta i sang de cordó umbilical que pertanyen a una cohort de València del projecte INMA. Aquestes mostres havien estat prèviament analitzades pels seus nivells en T-Hg (mercuri total) i contaminants organoclorats (OCs). Atès que la cohort de València amb la que treballàvem havia demostrat en recents estudis presentar uns nivells elevats de T-Hg (valor mitjà de 9,9 µg/L, superior a la U.S EPA RfD:5.3 µg/L), es va decidir seleccionar les mostres en funció dels seus nivells de T-Hg (tenint mostres de sang de cordó umbilical i de placenta amb nivells baixos, mitjans i alts en T-Hg). La idea era corroborar si la inhibició del transportador de glutamat per part del MeHg descrita en altres estudis, també es podia observar en placenta. Partint d'aquesta suposició, els nivells d'aminoàcids excitatoris, glutamat i aspartat, es podrien veure alterats en la sang de cordó umbilical en funció del MeHg i els altres contaminants OCs. Inicialment al treball aquí presentat, es va fer una prova pilot amb 11 mostres de sang de cordó umbilical de baix i alt contingut en T-Hg. En aquesta primera prova es van provar diferents protocols d'anàlisi dels aminoàcids excitadors, i es va posar apunt el mètode finalment utilitzat. Com es van observar certes correlacions entre glutamat i contaminants, es va ampliar la mida de la mostra a N=40.

### **1.1. Quantificació dels nivells de glutamat i aspartat en mostres humanes de plasma de cordó umbilical i la relació amb els nivells de T-Hg i contaminants organoclorats (OCs).**

La taula 9 mostra la mitjana dels nivells de glutamat i aspartat determinats en les 40 mostres de sang de cordó umbilical corresponents a la cohort INMA de València i seleccionades en funció dels seus nivells de T-Hg (materials i mètodes: pàg. 71-72). L'aspartat i el glutamat correlacionen positivament entre ells en les mostres analitzades de sang de cordó umbilical, com mostra la figura 27.



Taula 9. Nivells de glutamat i aspartat en sang de cordó umbilical (c.u) en µg/L.

	N	M	DE	MG	(95% IC)	Min	P 25	P 50	P 75	Max
Glutamat	40	43.4	(22.4)	38.0	(32.0; 45.0)	11.3	26.8	35.3	55.6	92.6
Aspartat	40	9.4	(9.2)	6.8	(5.3; 8.6)	2.4	3.9	5.3	11.2	41.6

M = Mitjana; DE: Desviació Estàndard; MG: Mitjana Geomètrica; IC: Interval de Confiança; P: Percentil.

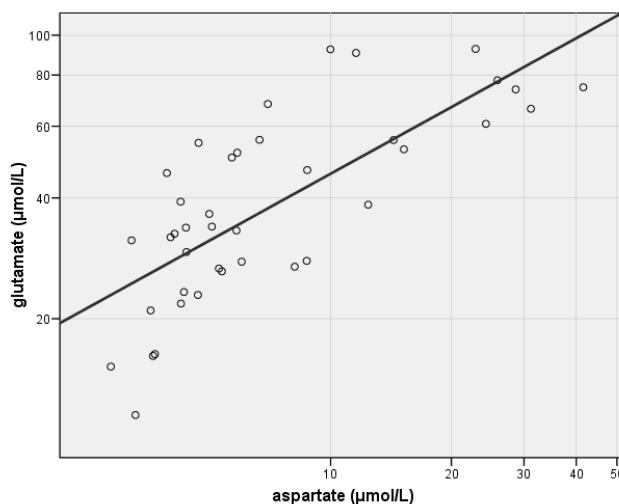


Figura 27. Associació lineal entre els nivells de glutamat i aspartat en sang de cordó umbilical a escala logarítmica. Correlació de Pearson:  $r=0.754(p<0.0001)$   $R^2=0.57$

En estudiar la possible correlació entre el glutamat i l’aspartat analitzats en sang de cordó umbilical i els contaminants presents en les mostres, es va observar, primerament, que no hi havia associació entre ells en la totalitat de les mostres (N=40), ni ajustades per quantitat de lípids i edat de la mare (Taules 10a i 10b).

Taula 10a. Associació entre els nivells de glutamat i els de contaminants en sang de cordó umbilical<sup>a,b</sup> (N=40).

	n	Cru			Ajustat a lípids			Ajustat a lípids i edat		
		coef <sup>b</sup>	95% IC	sign	coef <sup>b</sup>	95% IC	sign	coef <sup>b</sup>	95% IC	sign
log <sub>10</sub> Hg	40	-0.2	(-22.3; 28.1)	0.987	-2.9	(-23.9; 23.9)	0.801	2.7	(-24.4; 39.6)	0.861
Hg<6.6	20	reference			Reference			reference		
Hg>20	20	2.2	(-27.7; 44.4)	0.899	-1.7	(-29.8; 37.8)	0.919	7.2	Hg≥21 20	
log <sub>10</sub> HCB	40	-19.6	(-43.0; 13.5)	0.208	-18.4	(-41.6; 13.9)	0.225	-19.6	(-47.4; 23.0)	0.306
log <sub>10</sub> β -HCH	40	-11.5	(-31.7; 14.7)	0.345	-13.8	(-32.9; 10.7)	0.236	-14.2	(-37.2; 17.2)	0.325
log <sub>10</sub> (Σ <sub>4</sub> PCBs)	40	-14.1	(-53.3; 58.0)	0.616	-13.9	(-52.3; 55.4)	0.611	-8.5	(-52.3; 75.4)	0.783
log <sub>10</sub> PCB118	40	22.4	(-21.1; 89.9)	0.357	26.6	(-17.1; 93.5)	0.267	30.9	(-15.1; 101.7)	0.216
log <sub>10</sub> PCB138	40	-19.3	(-51.3; 33.7)	0.395	-25.6	(-54.5; 21.4)	0.229	-24.0	(-54.3; 26.4)	0.281
log <sub>10</sub> PCB153	40	-16.9	(-46.5; 29.3)	0.402	-19.0	(-47.1; 24.1)	0.323	-17.1	(-49.3; 35.4)	0.443
log <sub>10</sub> PCB180	40	-25.9	(-54.2; 19.8)	0.214	-29.9	(-55.9; 11.5)	0.130	-29.0	(-56.9; 17.0)	0.173
log <sub>10</sub> 4,4'-DDE	40	-29.2	(-59.4; 23.5)	0.217	-33.4	(-61.0; 13.9)	0.133	-32.2	(-61.6; 19.9)	0.175
4,4'-DDT<LOD	21	reference			Reference			reference		
4,4'-DDT>LOD	19	-21.8	(-44.2; 9.5)	0.147	-13.0	(-39.7; 25.4)	0.445	-11.7	(-39.3; 28.5)	0.506

IC: Interval de confiança; LD: Límit de detecció T-Hg: mercuri Total; HCB: Hexaclorobenzè; HCH: Hexaclorociclohexà; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PCB 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>OCs: Suma dels vuit compostos organoclorats..

a Model de regressió lineal entre glutamat i contaminants on les variables són transformades log<sub>10</sub> per conformar el model suposat.

b Els coeficients són elevats((10<sup>coef</sup>-1)\*100) i interpretats com el percentatge de canvi de glutamat per cada creixement de 10-vegades en la concentració de contaminant.

Taula 10b. Associació entre aspartat i contaminants en sang de cordó umbilical<sup>a,b</sup> (N=40).

	n	Cru			Ajustat a lípids			Ajustat a lípids i edat		
		coef <sup>b</sup>	95% IC	sign	coef <sup>b</sup>	95% IC	sign	coef <sup>b</sup>	95% IC	sign
log <sub>10</sub> Hg	40	-9.2	(-36.3; 29.4)	0.586	-11	(-37.7; 27.2)	0.512	-19.3	(-48.5; 26.5)	0.339
Hg<6.6	20	reference			Reference			Reference		
Hg>20	20	0.6	(-38.5; 64.6)	0.981	-2.2	(-40.5; 60.9)	0.929	-7.4	Hg≥21	20
log <sub>10</sub> HCB	40	-20.9	(-51.7; 29.7)	0.344	-20.1	(-51.3; 31.3)	0.367	-32.9	(-64.1; 25.3)	0.203
log <sub>10</sub> β -HCH	40	-13.2	(-40.1; 25.7)	0.443	-14.9	(-41.4; 23.5)	0.386	-24	(-51.9; 20.3)	0.234
log <sub>10</sub> (Σ <sub>4</sub> PCBs)	40	-3.7	(-59.7; 130.0)	0.931	-3.5	(-59.7; 131.1)	0.935	-7.9	(-64.9; 141.8)	0.864
log <sub>10</sub> PCB118	40	57.2	(-14.9; 190.6)	0.144	61.4	(-12.8; 198.7)	0.124	62.1	(-14.1; 205.8)	0.132
log <sub>10</sub> PCB138	40	-9.1	(-56.0; 87.8)	0.792	-14.1	(-58.8; 79.4)	0.679	-16.1	(-61.0; 80.2)	0.644
log <sub>10</sub> PCB153	40	-21.7	(-58.2; 47.0)	0.437	-23.1	(-59.1; 44.5)	0.404	-31.4	(-66.7; 41.3)	0.297
log <sub>10</sub> PCB180	40	-42.1	(-70.5; 13.8)	0.110	-44.5	(-71.8; 9.3)	0.086	-49.9	(-75.7; 3.3)	0.061
log <sub>10</sub> 4,4'-DDE	40	-22.7	(-65.4; 72.6)	0.520	-26	(-67.0; 66.1)	0.455	-30	(-70.3; 65.0)	0.404
4,4'-DDT<LOD	21	reference			Reference			Reference		
4,4'-DDT>LOD	19	-32.4	(-58.0; 8.8)	0.104	-30.3	(-59.0; 18.5)	0.176	-31.5	(-60.3; 18.0)	0.167

IC: Interval de confiança; LD: Límit de detecció T-Hg: mercuri total; HCB: Hexaclorobenzè; HCH: Hexaclorociclohexà; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PCB 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>OCs: Suma dels vuit compostos organoclorats..

a Model de regressió lineal entre glutamat i contaminants on les variables són transformades log<sub>10</sub> per conformar el model suposat.

b Els coeficients són exponenciats ((10<sup>coef</sup>-1)\*100) i interpretats com el percentatge de canvi de glutamate per cada creixement de 10-vegades en la concentració de contaminant..

Aleshores, es va excloure de l'estudi les mostres de sang de cordó umbilical provinents del grup de dones embarassades llatinoamericanes (n=6), doncs aquestes presentaven un altre patró de contaminants OC y MeHg. Segons s'ha descrit en altres estudis d'aquesta mateixa cohort, l'origen geogràfic de la mare demostrava ser un determinant important dels patrons de contaminants (Llop et al. 2010, Ramon et al. 2011). En el nostre grup en concret, les mostres pertanyents a dones espanyoles tenien una concentració més elevada de mercuri (on la mitjana geomètrica era d'11.8 µg/L, i assolien nivells màxims de 66 µg/L) respecte el grup de 6 dones llatinoamericanes (on la mitjana geomètrica era de 2,3 µg/L i el seu màxim era 10 vegades menor, 6.4 µg/L) (taula 11). Si tenim en compte la possible interacció entre els diferents contaminants, la presència de dos grups de contaminants molt diferenciats en quant a concentracions, podria distorsionar el resultat final.

**Taula 11. Estadística descriptiva de la concentració de contaminants (µg/L) en grup de dones espanyoles (N=34) i dones llatinoamèricanes (N=6).**

<b>Dones espanyoles</b>	MG	(95% CI)		P 25	P 50	P 75	P 95	Max
Hg	11.8	(6.7;	20.6)	1.414	32.5	43.3	64.5	66.0
HCB	0.243	(0.166;	0.356)	0.136	0.335	0.584	1.000	1.048
β-HCH	0.074	(0.043;	0.129)	0.056	0.135	0.173	0.578	1.237
4,4'-DDE	0.469	(0.372;	0.593)	0.285	0.476	0.760	1.496	1.817
4,4'-DDT	0.015	(0.009;	0.025)	0.004	0.004	0.064	0.133	0.144
PCB 118	0.055	(0.041;	0.075)	0.021	0.072	0.101	0.200	0.215
PCB 138	0.085	(0.068;	0.106)	0.062	0.102	0.132	0.196	0.223
PCB 153	0.121	(0.092;	0.159)	0.088	0.157	0.198	0.317	0.331
PCB 180	0.087	(0.070;	0.106)	0.060	0.097	0.128	0.242	0.440
Σ <sub>4</sub> PCBs	0.379	(0.311;	0.460)	0.293	0.458	0.592	0.765	0.768
Σ <sub>8</sub> Ocs	1.36	(1.11;	1.67)	1.03	1.59	1.91	3.31	3.36

<b>Dones de Llatinoamèrica</b>	MG	(95% CI)		P 25	P 50	P 75	P 95	Max
Hg	2.3	(1.0;	5.0)	1.414	1.4	5.7	6.4	6.4
HCB	0.085	(0.026;	0.277)	0.027	0.111	0.239	0.291	0.291
β-HCH	0.049	(0.012;	0.199)	0.031	0.072	0.120	0.177	0.177
4,4'-DDE	0.833	(0.358;	1.935)	0.546	1.134	1.456	1.496	1.496
4,4'-DDT	0.018	(0.004;	0.089)	0.004	0.026	0.078	0.110	0.110
PCB 118	0.067	(0.020;	0.220)	0.021	0.074	0.220	0.234	0.234
PCB 138	0.041	(0.011;	0.153)	0.018	0.022	0.158	0.404	0.404
PCB 153	0.034	(0.014;	0.083)	0.015	0.044	0.069	0.087	0.087
PCB 180	0.019	(0.008;	0.043)	0.009	0.016	0.042	0.068	0.068
Σ <sub>4</sub> PCBs	0.199	(0.074;	0.539)	0.067	0.310	0.381	0.540	0.540
Σ <sub>8</sub> Ocs	1.48	(1.13;	1.94)	1.19	1.45	1.82	2.26	2.26

MG:mitjana geomètrica IC: Interval de confiança P:Percentil

T-Hg: mercuri total; HCB: Hexaclorobenzè; HCH: Hexaclorociclohexà; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PCB 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>Ocs: Suma dels vuit compostos organoclorats.

La taula 12 mostra com el glutamat correlaciona significativament de forma negativa amb la suma dels vuit contaminants OCs de la sang de cordó umbilical un cop ajustat per contingut en lípids (coef=-54.8;p=0.022). Concretament, s'observa com el  $\beta$ -HCH i el PCB 138 correlacionen negativament de manera significativa amb el glutamat, amb coeficients de -23.6 i -51.1 i p-valors de 0.036 i 0.023 respectivament quan és ajustat per lípids, i es mantenen significatius un cop ajustats per lípids i edat. L'HCB, el 4,4'-DDE i el PCB180, així com la suma dels PCB analitzats, mostren una tendència negativa, tot i no assolir la significança. D'altre banda, tot i que el mercuri total (T-Hg) no mostra una correlació amb els nivells de glutamat, s'observa un tendència positiva quan les mostres són ajustades per edat i lípids.

Finalment, cap associació s'observa entre l'aspartat i els contaminants OCs (taula 13), tot i que la suma d'aquests, així com el  $\beta$ -HCH, tenen una forta tendència a correlacionar negativament un cop són ajustats per lípids i edat, tot i no assolir la significança (coeficients= -64 i -33.1 i p-valor=0.068 i 0.064, respectivament).

Taula 12. Associació entre els nivells de glutamat i de contaminants en sang de cordó umbilical<sup>a</sup>. Les mostres de dones llatinoamericanes van ser excloses (n=34).

	n	Cru			Ajustat a lípids			Ajustat a lípids i edat		
		coef <sup>c</sup>	95% IC	p-valor	coef <sup>c</sup>	95% IC	p-valor	coef <sup>c</sup>	95% IC	p-valor
log <sub>10</sub> T-Hg	34	8.2	(-17.8; 42.5)	0.564	3.9	(-20.0; 35.0)	0.766	23.7	(-10.3; 70.8)	0.187
T-Hg<6.6	14	Reference			reference			reference		
T-Hg>20	20	12.9	(-23.1; 65.7)	0.525	6.1	(-26.4; 52.9)	0.743	33.0	(-14.4; 106.8)	0.197
log <sub>10</sub> HCB	34	-28.4	(-51.5; 5.7)	0.090	-29.0	(-50.5; 1.8)	0.062	-28.0	(-54.4; 13.6)	0.152
log <sub>10</sub> β -HCH	34	-17.6	(-37.3; 8.2)	0.157	-23.6	(-40.5; -1.8)	0.036	-23.3	(-43.6; 4.3)	0.088
log <sub>10</sub> 4,4'-DDE	34	-35.6	(-66.2; 22.8)	0.174	-41.3	(-67.6; 6.5)	0.078	-37.0	(-67.5; 21.9)	0.163
4,4'-DDT<LOD	18	Reference			reference			reference		
4,4'-DDT>LOD	16	-25.6	(-48.4; 7.2)	0.109	-15.6	(-42.1; 23.0)	0.365	-13.3	(-40.7; 26.9)	0.451
log <sub>10</sub> PCB118	34	1.6	(-38.7; 68.3)	0.951	0.0	(-37.7; 60.6)	0.998	2.2	(-36.3; 63.9)	0.926
log <sub>10</sub> PCB138	34	-38.9	(-68.6; 18.9)	0.141	-51.1	(-73.5; -9.9)	0.023	-48.5	(-72.7; -2.7)	0.041
log <sub>10</sub> PCB153	34	-26.7	(-57.9; 27.8)	0.264	-32.7	(-59.8; 12.6)	0.127	-27.7	(-59.3; 28.4)	0.258
log <sub>10</sub> PCB180	34	-41.2	(-71.6; 21.8)	0.147	-47.9	(-73.3; 1.9)	0.056	-44.5	(-72.3; 11.4)	0.095
log <sub>10</sub> (Σ <sub>4</sub> PCBs)	34	-42.3	(-73.3; 24.3)	0.154	-48.4	(-74.6; 4.7)	0.066	-44.3	(-73.8; 18.3)	0.123
log <sub>10</sub> (Σ <sub>8</sub> OCs)	34	-48.4	(-75.3; 7.6)	0.076	-54.8	(-76.9; -11.7)	0.022	-55.1	(-80.0; 0.8)	0.052

IC: Interval de confiança; LD: Límit de detecció T-Hg: mercuri total; HCB: Hexaclorobenzè; HCH: Hexaclorociclohexà; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PCB 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>OCs: Suma dels vuit compostos organoclorats..

a Model de regressió lineal entre glutamat i contaminants on les variables són transformades log<sub>10</sub> per conformar el model suposat.

b Els coeficients són exponenciats ((10<sup>coef</sup>-1)\*100) i interpretats com el percentatge de canvi de glutamat per cada creixement de 10-vegades en la concentració de contaminant.

Taula 13. Associació entre els nivells d'aspartat i de contaminants en sang de cordó umbilical<sup>a</sup>. Les mostres de dones llatinoamericanes van ser excloses (n=34).

	n	Cru			Ajustat a lípids			Ajustat a edat i lípids		
		coef <sup>c</sup>	95% CI	p-valor	coef <sup>c</sup>	95% CI	p-valor	coef <sup>c</sup>	95% CI	p-valor
log <sub>10</sub> Hg	34	13.0	(-19.8; 59.2)	0.472	10.0	(-22.0; 55.3)	0.575	16.2	(-25.5; 81.4)	0.496
Hg<6.6	14	Referència			referència			referència		
Hg>20	20	30.9	(-18.4; 109.9)	0.254	26.0	(-21.8; 102.9)	0.331	42.1	(-22.0; 158.9)	0.241
log <sub>10</sub> HCB	34	-22.1	(-52.7; 28.5)	0.317	-22.5	(-52.8; 27.2)	0.302	-33.1	(-64.1; 24.5)	0.196
log <sub>10</sub> β -HCH	34	-18.9	(-42.4; 14.2)	0.222	-23.3	(-45.5; 8.1)	0.125	-32.1	(-55.0; 2.4)	0.064
log <sub>10</sub> 4,4'-DDE	34	-27.6	(-68.1; 64.3)	0.428	-32.1	(-70.0; 53.5)	0.340	-37.5	(-74.8; 54.6)	0.297
4,4'-DDT<LOD	18	Referència			referència			referència		
4,4'-DDT>LOD	16	-35.1	(-58.6; 1.8)	0.059	-31.4	(-57.8; 11.5)	0.124	-32	(-58.7; 12.0)	0.125
log <sub>10</sub> PCB118	34	23.3	(-34.1; 130.4)	0.501	22.0	(-34.5; 127.2)	0.519	22.1	(-35.3; 130.3)	0.526
log <sub>10</sub> PCB138	34	-30.1	(-70.1; 63.5)	0.397	-40.2	(-74.7; 41.3)	0.232	-42.1	(-76.4; 42.1)	0.223
log <sub>10</sub> PCB153	34	-13.7	(-57.4; 74.5)	0.672	-18.6	(-59.7; 64.4)	0.555	-22.6	(-64.8; 70.4)	0.512
log <sub>10</sub> PCB180	34	-45.2	(-78.0; 36.7)	0.189	-49.8	(-79.7; 24.2)	0.131	-52	(-81.4; 23.7)	0.124
log <sub>10</sub> (Σ <sub>4</sub> PCBs)	34	-28.3	(-73.2; 91.4)	0.495	-33.6	(-75.0; 76.6)	0.400	-36.8	(-77.8; 80.0)	0.378
log <sub>10</sub> (Σ <sub>8</sub> OCs)	34	-46.5	(-79.1; 36.5)	0.183	-51.4	(-80.8; 23.1)	0.124	-64	(-88.0; 8.2)	0.068

IC: Interval de confiança; LD: Límit de detecció T-Hg: mercuri total; HCB: Hexaclorobenzè; HCH: Hexaclorociclohexà; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PC B 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>OCs: Suma dels vuit compostos organoclorats..

a Model de regressió lineal entre glutamat i contaminants on les variables són transformades a log<sub>10</sub> per conformar el model suposat.

b Els coeficients són exponenciats ((10<sup>coef</sup>-1)\*100) i interpretats com el percentatge de canvi de glutamat per cada creixement de 10-vegades en la concentració de contaminant.

Per tal d'observar si existia una possible interacció entre mercuri i contaminants organoclorats, les diferents mostres van ser estratificades en dos models, consistint en nivells baixos (<7 µg/L) i alts (≥21 µg/L) de T-Hg (taula 14). D'aquesta manera varem poder observar si l'associació entre els nivells d'OCs i el glutamat variava en funció del mercuri. La taula 14 mostra com el PCB 138 i el 4,4'-DDE tenen un patró d'interacció amb el T-Hg (p<0.1). Observem com el coeficient d'associació del PCB 138 és més elevat (coef.= -73,4 ; p=0.01) quan els nivells de T-Hg són baixos que quan s'analitzen en la totalitat de les mostres (coef.= -51.1; p=0.023). En canvi, quan els nivells de T-Hg són elevats no existeix associació entre PCB 138 i glutamat (figura 28B). De la mateixa manera passa amb el 4,4'-DDE, on també presenta una semblant forta associació negativa amb el glutamat quan els nivells de mercuri són baixos (coef.= -75,5; p=0.01), però no presenta associació quan són alts (figura 28A). Patrons semblants apareixen en el cas de la suma dels vuit contaminants organoclorats en sang i la suma dels diferents congèneres de PCB, però no per a la resta de OCs a nivell individual.

**Taula 14. Associació entre OC i nivells de glutamat a nivells de Hg alts (>21 µg/L) o baixos (<7 µg/L).<sup>a,b</sup>**

		Ajustat a lípids					
		n	coef <sup>c</sup>	95 % IC		p	p(inter)
<b>log<sub>10</sub> 4,4'-DDE</b>							0.052
Model 1	Hg<6.6 µg/L	14	-73.4	-90.0	-29.1	0.01	
Model 2	Hg>20 µg/L	20	0.3	-59.0	145.2	1.00	
<b>log<sub>10</sub> PCB138</b>							0.066
Model 1	Hg<6.6 µg/L	14	-75.5	-89.9	-40.4	0.01	
Model 2	Hg>20 µg/L	20	-11.9	-68.1	143.1	0.80	
<b>log<sub>10</sub> Σ<sub>4</sub>PCBs</b>							0.502
Model 1	Hg<6.6 µg/L	14	-65.7	-88.7	4.5	0.06	
Model 2	Hg>20 µg/L	20	-35.5	-87.2	223.7	0.57	
<b>log<sub>10</sub> Σ<sub>8</sub>OCs</b>							0.230
Model 1	Hg<6.6 µg/L	14	-78.7	-92.8	-37.3	0.01	
Model 2	Hg>20 µg/L	20	-44.9	-84.3	94.1	0.33	

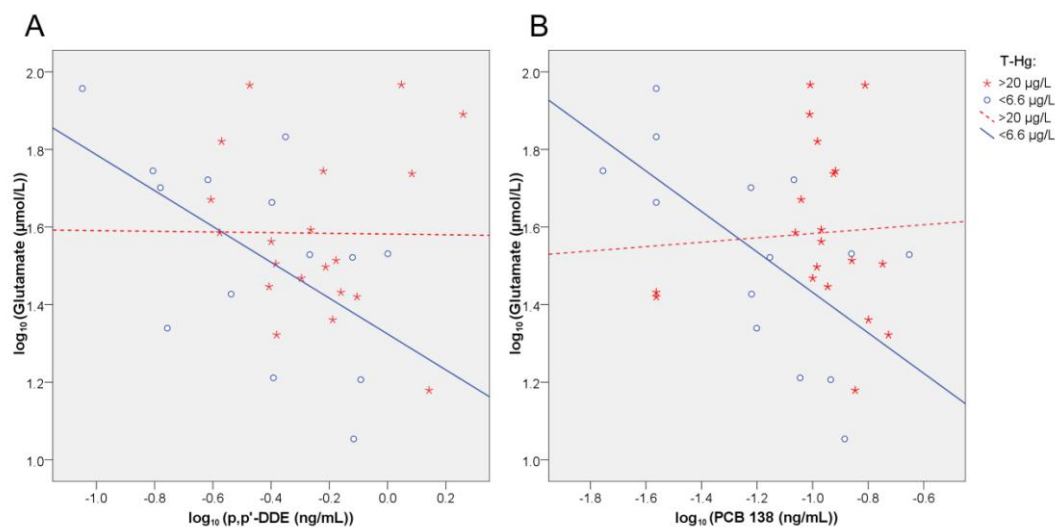
IC: Interval de confiança; Hg: mercuri total; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PCB 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>OCs: Suma dels vuit compostos organoclorats..

a Les dones llatinoamericanes van ser excloses de l'anàlisi (n=6) perquè els seus nivells d'organoclorats i mercuri eren diferents als de les espanyoles.

b Model de regressió lineal entre glutamat i contaminants on les variables són transformades a log<sub>10</sub> per conformar el model suposat.

c Els coeficients són exponenciats ((10<sup>coef</sup>-1)\*100) i interpretats com el percentatge de canvi de glutamat per cada creixement de 10-vegades en la concentració de contaminant.



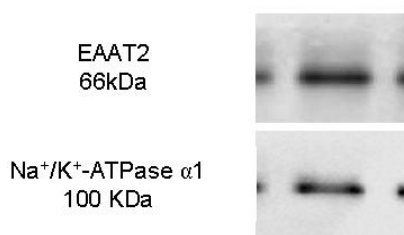


**Figura 28.** Correlació lineal dels nivells de 4,4'-DDE(A) i el PCB 138(B) amb la concentració de glutamat en la sang de cordó umbilical en les mostres que contenen baixos nivells de T-Hg (<7 µg/L) (°, línia contínua) o alts nivells de T-Hg (>21 µg/L) (\*, línia discontinua).

## 1.2. Inhibició de la unió d<sup>3</sup>H-aspartat/glutamat al transportador de glutamat en homogenats de placenta humana pel MeHg i altres contaminants OCs.

El segon objectiu d'aquesta primera part consistia en determinar si el MeHg inhibia el transport de glutamat en placenta, de la mateixa manera que ho feia en el cervell. D'igual forma, es volia provar l'acció d'aquells contaminants que havien demostrat tenir una associació significativa amb el glutamat en sang de cordó umbilical (el PCB 138 i el β-HCH).

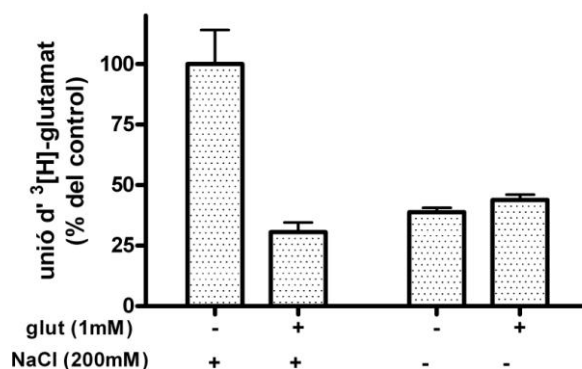
Per tal d'assegurar-nos la presència de transportadors de glutamat en les mostres de placenta amb les que treballàvem, es va realitzar un western blot pel transportador d'EAAT2 (figura 29). Es va escollir aquest transportador al ser el majoritari en el sistema nerviós central (on és responsable del 90% del transport del glutamat en el sistema nerviós (Danbolt 2001)) i perquè es troba en la capa sincitiotrofoblàstica de la placenta i en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis de cordó umbilical (Noorlander et al. 2004).



**Figura 29.** Immunoblot representatiu del transportador de glutamat EAAT2 en homogenats de membrana plasmàtica de placenta i el corresponent immunoblot per a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa α1 com a marcador de membrana plasmàtica.

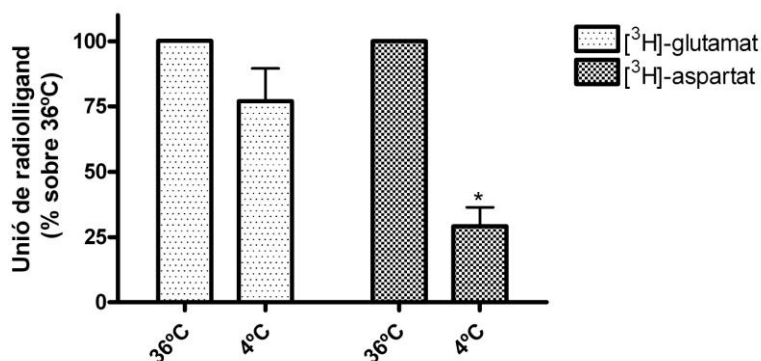
Per tal de poder dur a terme els experiments d'unió d'<sup>3</sup>H]-aspartat per la mesura del transport de glutamat en homogenats de membrana de placenta humana en funció de l'exposició a contaminants, diversos assaigs previs es van realitzar per a posar a punt el mètode.

Com el transport de glutamat requereix de la presència de ions Na<sup>+</sup>, es va voler comprovar si davant l'absència de Na<sup>+</sup> s'observava una manca de transport. En lloc d'NaCl es va afegir clorur de colina (ChCl), per a mantenir les condicions d'osmolaritat. Com s'observa a la figura 30, l'absència de sodi no permet que hi hagi transport, sent la senyal d'unió d'<sup>3</sup>H]-glutamat, igual que la senyal que es produeix davant la presència de glutamat 1 mM (és a dir, la unió inespecífica). Amb aquest assaig corroboràvem que amb NaCl mesuràvem el transport de glutamat.



**Figura 30.** Unió d'<sup>3</sup>H]-glutamat davant la presència i absència de NaCl. Les gràfiques corresponen a la mitjana±SD d'un assaig realitzat per triplicat.

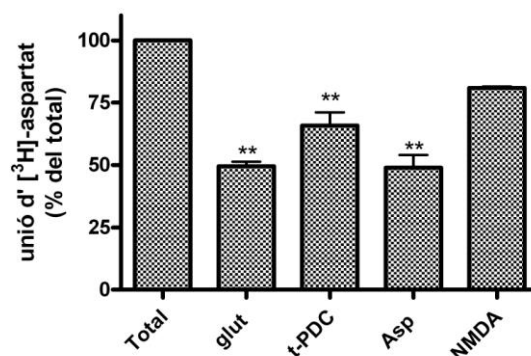
Es va assajar la temperatura d'incubació a 4°C i 36°C. La unió específica d' [<sup>3</sup>H]-aspartat a 4°C va ser estadísticament menor que a 36°C. En canvi, la unió d' [<sup>3</sup>H]-glutamat a 4°C va ser menor, però no significativa (figura 31) (això es justificava per la possible unió a més llocs per part del glutamat). Es va decidir realitzar la incubació a 36°C i utilitzar l' [<sup>3</sup>H]-aspartat com a radiolligand específic del transport.



**Figura 31. Unió específica de [<sup>3</sup>H]-aspartat i [<sup>3</sup>H]-glutamat en funció de la temperatura.** Les gràfiques corresponen a la mitjana±SD de dos assaig realitzats per triplicat. L'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el t-test. On \* correspon a p<0.05.

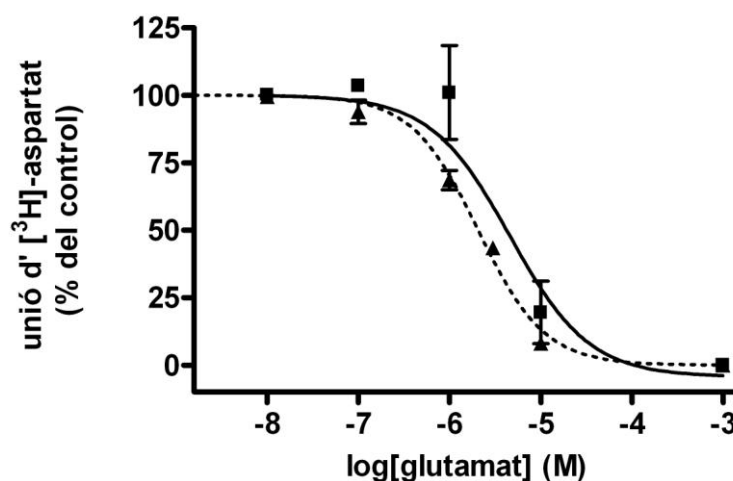
Per tal de corroborar que s'estava mesurant la unió al transportador de glutamat, es va mesurar la unió d' [<sup>3</sup>H]-aspartat davant l'exposició a diferents substrats del transportador de glutamat i agonistes dels receptors glutamatèrgics.

La unió de [<sup>3</sup>H]-aspartat es va assajar davant l'exposició a t-PDC(L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate)(solució 100 µM), glutamat, aspartat i NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) (solució 1 mM). Com mostra la figura 32, el glutamat i l'aspartat van inhibir la unió d' [<sup>3</sup>H]-aspartat, observant-se una disminució de la senyal significativa (p<0.01) igual que el t-PDC (inhibidor del transportador de glutamat) que també va disminuir la unió significativament (p<0.01). Per altre banda, l'agonista del receptor de NMDA no va inhibir la unió de [<sup>3</sup>H]-aspartat. Amb aquests resultats corroboraven que amb el protocol seguit estàvem mesurant bàsicament unió al transport (figura 32).



**Figura 32. Unió de l' [<sup>3</sup>H]-aspartat davant a l'exposició a diferents agonistes i antagonistes del transport i receptors glutamatèrgics.** Les gràfiques corresponen a la mitjana±SD de dos assaigs realitzats per triplicat. L'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el test One Way Anova (Bonferroni Multiple's test). \*\* p<0.01,

Finalment, es va realitzar la corba d'inhibició del glutamat utilitzant com a radiolligand específic el [<sup>3</sup>H]-aspartat. La figura 33 mostra com la corba d'inhibició de la unió específica d' [<sup>3</sup>H]-aspartat per glutamat en placenta és molt semblant a la corba en cervell. La IC<sub>50</sub><sub>glut</sub> en placenta (6.3 ± 1.7µM per a tres assaig realitzats per triplicat) és similar a la IC<sub>50</sub><sub>glut</sub> en cervell de rata (2,25 µM, experiment representatiu fet en triplicat).



**Figura 33. Inhibició concentració-depenent de la unió específica de [<sup>3</sup>H]-aspartat per glutamat en homogenats de membrana de placenta humana (■; línia contínua) o en homogenats de cervell de rata (▲;línia discontinua).** Les dades corresponen a la mitjana± SD de tres experiments realitzats en triplicat en la placenta i un únic assaig per triplicat en els homogenats de cervell de rata.

Un cop demostrada l'existència del transportador de glutamat en les nostres mostres de placenta i un cop posat apunt el protocol per a mesurar la unió específica, es va realitzar l'assaig amb els contaminants. La figura 34 mostra la inhibició concentració-depenent de la

unió d' [<sup>3</sup>H]-aspartat per part del MeHg, el PCB 138 i el β-HCH; El MeHg va mostrar inhibir completament el transport de glutamat amb una  $IC_{50_{MeHg}}=4.9\pm 0.8\mu M$ . El PCB 138 i el β-HCH, en canvi, inhibien parcialment el transport de glutamat amb una  $IC_{50_{PCB138}}=14.2\pm 1.2$  nM i una  $IC_{50_{\beta-HCH}}=6.9\pm 2.9$  nM (mitjana±SD). Tot i la seva elevada afinitat, la inhibició no era completa, sent la inhibició màxima d'un  $46\pm 14\%$  i una  $55\pm 1\%$  pel PCB 138 i β-HCH respectivament, aconseguida a concentracions  $\geq 1\mu M$ .

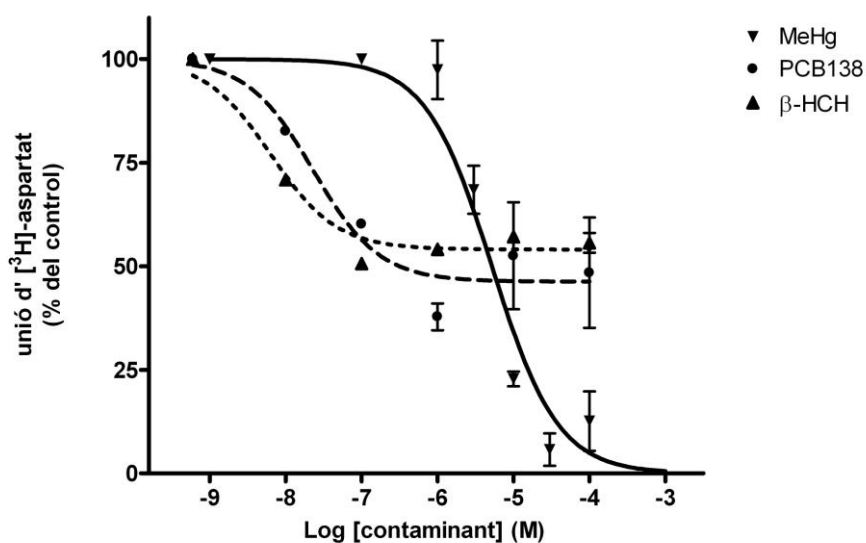


Figura 34. Inhibició de la unió específica de [<sup>3</sup>H]-aspartat en homogenats de membrana de placenta humana per MeHg, PCB 138 i β-HCH. Els valors són mitjana±SD per a 2-3 experiments, cadascun fet per triplicat.

### 1.3. Quantificació de l'expressió proteica del transport de glutamat EAAT2 i la Bmax en nou mostres de placenta humana de la cohort de València i relació amb les nivells de T-Hg i OCs.

Ja que es disposaven de nou mostres de placenta de la cohort INMA corresponents a una subsèrie de subjectes analitzats per la concentració dels vuit contaminants OC i el Hg, es va voler determinar si la quantitat de transportadors de glutamat es podia veure alterada en aquestes mostres en funció dels nivells d'aquests. Per tal objectiu, es va determinar l'expressió del transportador EAAT2 per western blot i la unió específica d' [<sup>3</sup>H]-aspartat al transportador de les mostres de placenta humana repartides amb valors alts i baixos de mercuri.

Es va analitzar la relació entre la unió específica de l' [<sup>3</sup>H]-aspartat en el transportador, així com l'expressió d'EAAT2, i els nivells dels contaminants organoclorats i el mercuri de les mostres, i

també de l'aspartat i el glutamat analitzats en les mostres corresponents de sang de cordó umbilical.

La taula 15 mostra les diferents relacions detectades: la unió específica d'[H<sup>3</sup>]-aspartat correlaciona amb els nivells d'aspartat en sang de cordó umbilical, però no amb el glutamat. D'altre banda, la unió específica no mostra correlació amb el mercuri ni amb els contaminants organoclorats. En canvi, EAAT2 sí que correlaciona amb la suma de 4,4'-DDE i 4,4'-DDT, així com el 4,4'-DDE sol.

**Taula 15. Associació entre unió màxima específica/EAAT2 i contaminants (N=9) (Correlació d'Spearman)**

	Unió específica		EAAT-2/Na-K-ATPasa	
	rho	p-valor	rho	p-valor
EAAT-2	0,05	0,90		
<b>aminoàcid (µmol/L)</b>				
Glutamat	-0,03	0,93	0,42	0,26
Aspartat	-0,70	0,04	-0,05	0,90
<b>Lípids (mg/dL)</b>				
Lípids en sèrum	0,58	0,10	0,28	0,46
<b>Contaminants (ng/mL)</b>				
Hg	-0,10	0,80	0,27	0,49
HCB	0,20	0,61	0,22	0,58
β-HCH	0,18	0,64	0,18	0,64
Σ <sub>4</sub> PCBs	-0,07	0,86	-0,35	0,36
4,4'-DDE + 4,4'-DDT	-0,25	0,52	0,70	0,04
PCB 118	-0,04	0,91	0,13	0,75
PCB 138	0,21	0,59	-0,44	0,23
PCB 153	-0,45	0,22	0,02	0,97
PCB 180	0,40	0,29	-0,48	0,19
4,4'-DDE	-0,25	0,52	0,70	0,04
4,4'-DDT	0,54	0,13	-0,16	0,68

Hg: mercuri total; PCBs: Policlorobifenils; ΣPCBs: Suma dels quatre PCBs (PCB 118, 138, 153, and 180) ; Σ<sub>8</sub>OCs: Suma dels vuit compostos organoclorats.

#### 1.4. Estudi de l'activitat de l'enzim glutamat deshidrogenasa (GDH) in vitro en relació al MeHg, el PCB 138 i el β-HCH.

Per tal de buscar altres condicionants que podessin justificar la relació dels nivells de glutamat amb els contaminants PCB 138 i β-HCH, així com el MeHg, es va analitzar l'activitat de l'enzim glutamat deshidrogenasa (un dels principals enzims que participa en el metabolisme del glutamat en la placenta) davant l'exposició a diferents concentracions d'aquests contaminants. L'hipèrbola ajustada de la figura 35 mostra com el MeHg va inhibir significativament (p<0.001) l'activitat de la GDH a concentracions de 100 µM, i a partir de 10 µM va augmentar la Km. El

PCB 138 també va inhibir significativament la activitat de GDH quan la concentració era de 50  $\mu\text{M}$  (figura 35). El  $\beta\text{-HCH}$  no va mostrar una disminució significativa de l'activitat (mostrat en columnes a la figura 35).

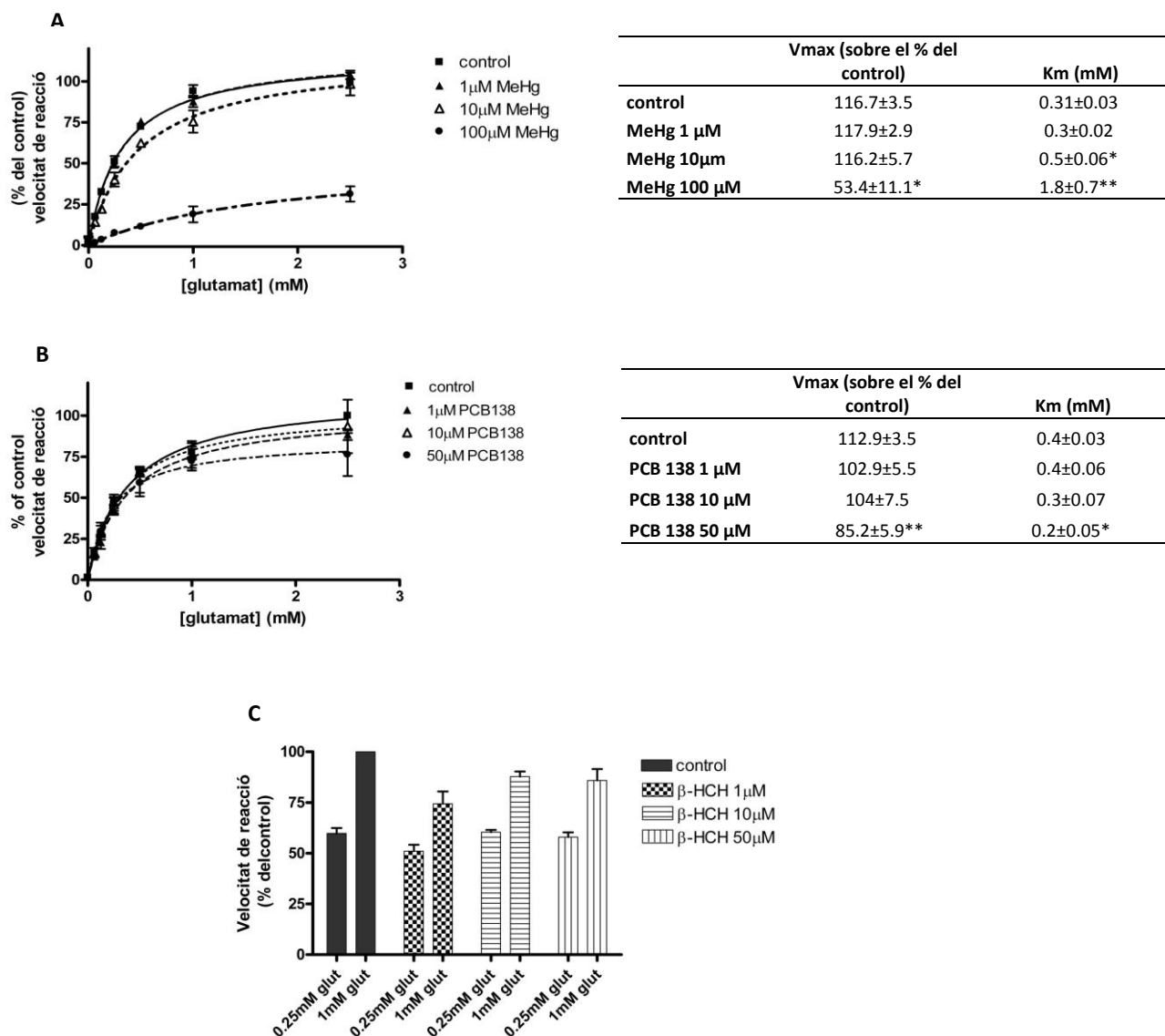


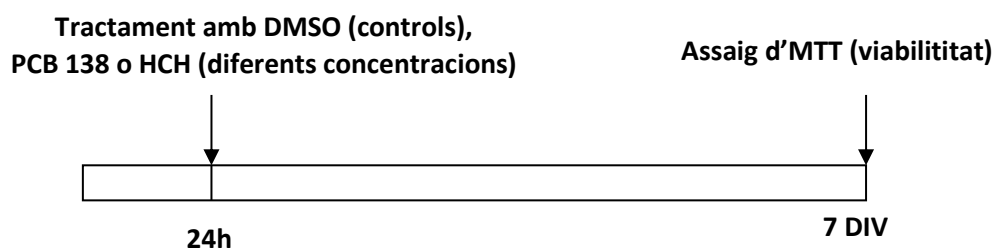
Figura 35 . Corbes i columnes i taules de l'activitat enzimàtica de la GDH a concentracions creixents de glutamat i davant l'exposició a diferents concentracions de MeHg (A), PCB 138 (B) i  $\beta\text{-HCH}$  (C). Els resultats de les corbes corresponen a la mitjana±SD de dos assaig realitzats per triplicat. Valors comparats respecte el control, on \* correspon a  $p<0.05$  i \*\* correspon a  $p<0.01$ .

## **PART 2. ESTUDI *IN VITRO* DELS EFECTES DE L'EXPOSICIÓ PROLONGADA (> 96h) A CONCENTRACIONS SUBTÒXIQUES DE PCB 138 I HCH ( $\gamma/\beta$ ) EN ELS TRANSPORTADORS I RECEPTORS GLUTAMATÈRGICS DE CULTIUS PRIMARIS DE NEURONES CORTICALS.**

Seguint els resultats anteriors, es va decidir estudiar l'efecte citotòxic del PCB 138 i de l'hexaclorociclohexà (isòmers gamma i beta) (els contaminants organoclorats que en el primer estudi havien demostrat incidir en el sistema glutamatèrgic) durant exposicions prolongades en cultius de neurones durant el període de diferenciació. En concret, a aquesta segona part es va voler estudiar l'efecte del PCB 138 i l'HCH ( $\gamma$  i  $\beta$ ) sobre el sistema glutamatèrgic en cultius primaris de neurones corticals (CTX) degut a l'importància del sistema glutamatèrgic en el còrtex cerebral en funcions com l'aprenentatge i la memòria. Es va utilitzar un model d'excitotoxicitat *in vitro* amb cultius primaris de neurones corticals (CTX) que ja havia estat prèviament posat apunt per a l'estudi d'altres contaminants (Babot et al. 2007, Briz et al. 2010).

### **2.1. Viabilitat cel·lular dels cultius primaris de neurones corticals exposades durant 6 DIV a concentracions creixents de PCB 138 i isòmers $\gamma$ i $\beta$ -HCH.**

Primerament es va estudiar la viabilitat cel·lular dels cultius primaris de CTX quan estaven exposats a diferents concentracions de PCB 138,  $\gamma$ -HCH i  $\beta$ -HCH durant 6 dies *in vitro* (DIV), mitjançant el mètode d'MTT (figura 36). Es va seguir l'esquema de sota:



Els valors de LC50 per PCB 138 i  $\beta$ -HCH van ser  $43,9 \pm 11,5 \mu\text{M}$  i  $> 100 \mu\text{M}$ , respectivament. En el cas del lindà, l'exposició a  $10 \mu\text{M}$  no va produir citotoxicitat (valor d'MTT=  $105 \pm 17$ ,  $n=4$ , respecte el control) i la LC50 va ser de  $24 \mu\text{M}$ . Aquest últim es va fer un únic cop, doncs ja havia estat realitzat prèviament al nostre laboratori (Briz 2011).



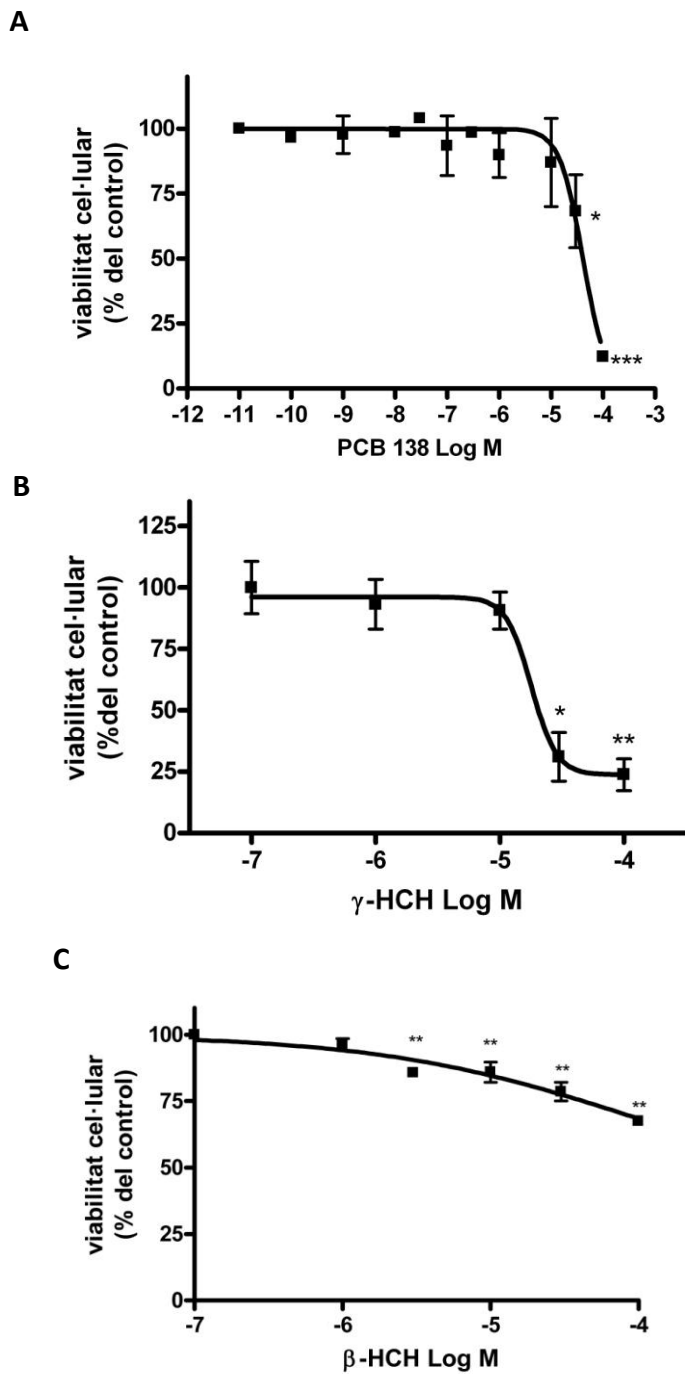


Figura 36. Viabilitat cel·lular mesurada a través del mètode de MTT en cultius primaris de neurones corticals exposades durant 6 dies in vitro a concentracions creixents de PCB 138 (A), lindà (B) i  $\beta$ -HCH (C). Les gràfiques representen la mitja  $\pm$  SEM de dos-tres assaigs realitzats per triplicat pel PCB 138 i el  $\beta$ -HCH i un únic assaig per quadruplicat pel  $\gamma$ -HCH). L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA (test de comparació múltiple de Dunnett) on \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 2.2 Estudi del transport de glutamat en cultius primaris de neurones corticals exposats durant 6 DIV a concentracions creixents de PCB 138 i $\beta$ -HCH.

Es va realitzar l'estudi del transport de glutamat en cultius de neurones corticals exposades a PCB 138 i  $\beta$ -HCH durant 6 DIV a diferents concentracions. Els resultats que s'observen a la figura 37 mostren com el transport no es va veure alterat davant l'exposició prolongada a aquests compostos.

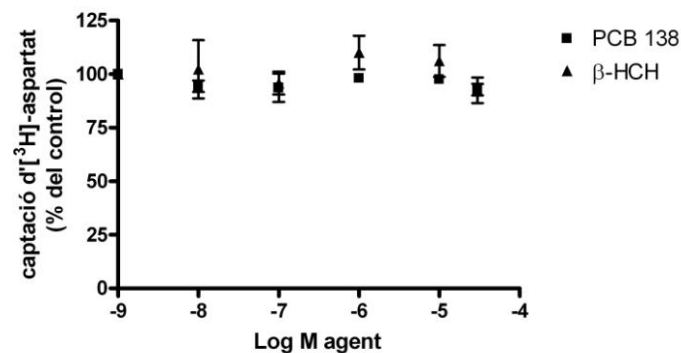
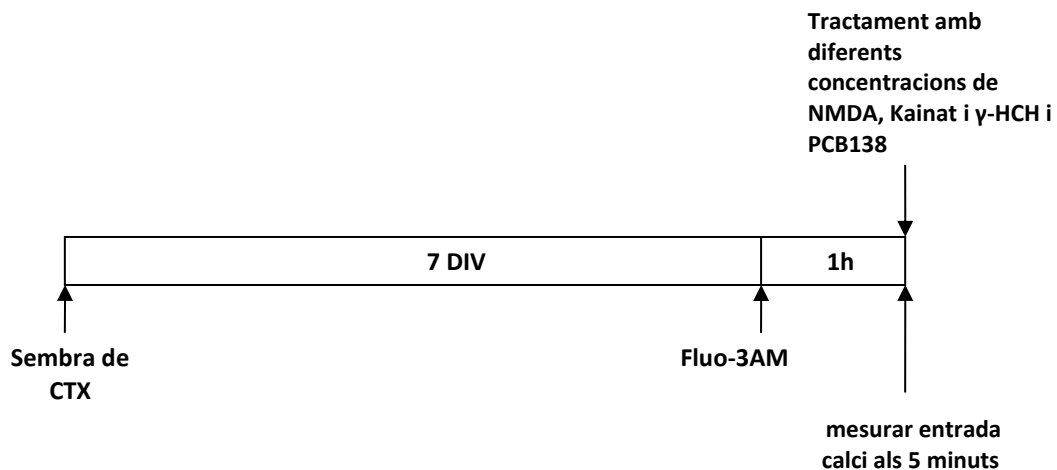


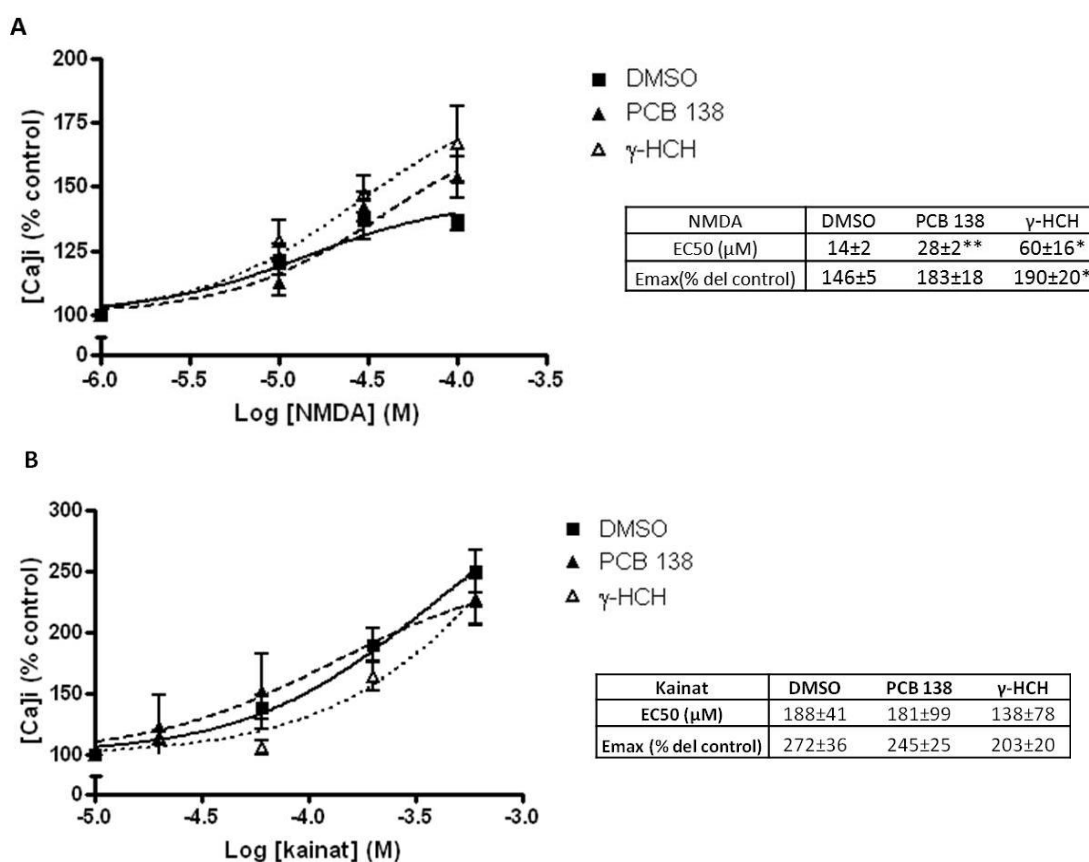
Figura 37. Transport de glutamat en cultius primaris de neurones corticals exposades a concentracions creixents de PCB 138 i  $\beta$ -HCH durant 6 DIV. Els resultats expressen la mitjana $\pm$ SEM de tres assaig per triplicat.

## 2.3 ESTUDI IN VITRO DE L'INCREMENT DEL CALCI INTRACEL·LULAR INDUÏT PER NMDA I ÀCID KAINIC DAVANT L'EXPOSICIÓ AGUDA DE PCB 138 I EL $\gamma$ -HCH EN CULTIUS PRIMARIS DE NEURONES CORTICALS.

Es va estudiar l'entrada de calci intracel·lular induïda per l'activació de NMDA i Kainat davant exposicions agudes de PCB 138 i  $\gamma$ -HCH, seguint el següent esquema:



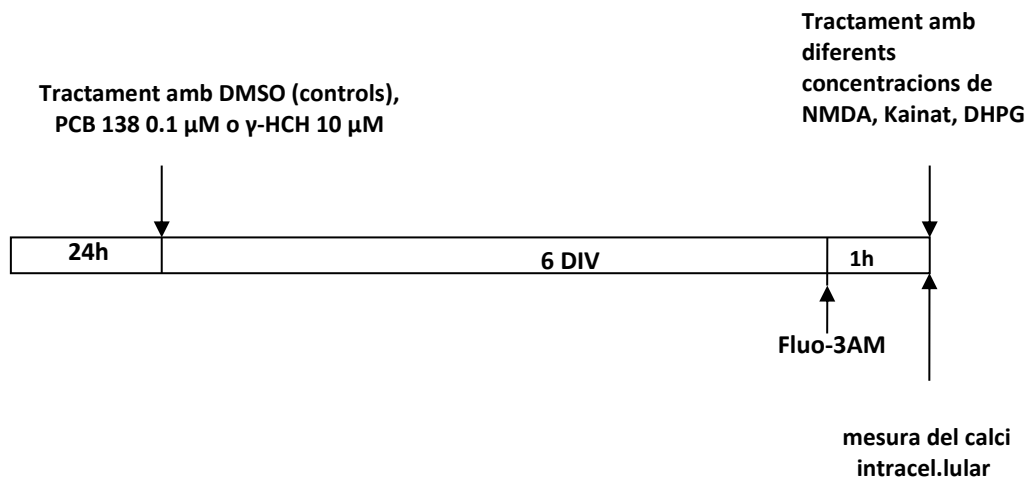
La corba de l'increment de calci induït per NMDA davant l'exposició aguda a PCB 138 (50 µM) va donar una EC50 significativament major ( $p < 0.01$ ), i una tendència a augmentar la Emax no significativa. A la vegada, l'exposició a  $\gamma$ -HCH (100 µM) també augmentar la EC50 ( $p < 0.05$ ) i la Emax ( $p < 0.05$ ) (figura 38A). En canvi, no es va observar alteració significativa del senyal de calci induït per Kainat a dosis agudes de PCB 138 (50 µM) i  $\gamma$ -HCH (100 µM), com s'observa en la figura 38B.



**Figura 38.** Entrada de calci per NMDA i KAINAT davant l'exposició aguda de PCB 138 (50 µM) i  $\gamma$ -HCH (100 µM) durant 5 minuts en cultius primaris de neurones corticals de 7 DIV. Els resultats expressen la mitjana±SEM de tres assaigs independents realitzats per triplicat, ajustats a una corba sigmoïdal dosi-resposta.

**2.4 ESTUDI IN VITRO DE L'INCREMENT DE CALCI INTRACEL·LULAR INDUÏT PER NMDA, KAINAT, I DHPG DAVANT L'EXPOSICIÓ PROLONGADA (6 DIV) A CONCENTRACIONS SUBTÒXIQUES DE PCB 138 I  $\gamma$ -HCH EN CULTIUS PRIMARIS DE NEURONES CORTICALS.**

Seguidament es va assajar l'augment de calci intracel·lular degut a l'activació de receptors glutamatèrgics davant l'exposició a concentracions subtòxiques de PCB 138 (01  $\mu$ M) i de lindà (10  $\mu$ M) durant 6 DIV (veure apartat 2.1), per tal d'assajar l'efecte d'exposicions perllongades de contaminants organoclorats en la funció dels receptors glutamatèrgics. Les concentracions dels contaminants es van escollir arrel de les gràfiques obtingudes de l'assaig de viabilitat cel·lular (secció 2.1). Es va seguir el següent esquema:



**2.4.1. CALCI BASAL**

Primerament es va determinar l'augment de calci intracel·lular basal (sense ser activat per cap agonista dels receptors glutamatèrgics). Els nivells de calci basal no es van veure modificats davant l'exposició a PCB 138 o  $\gamma$ -HCH, tant en les cèl·lules que es trobaven en un medi amb  $Mg^{2+}$  (HANKS) com sense  $Mg^{2+}$  ( $Mg^{2+}$  free)(figura 39); una tendència a augmentar el calci basal es va observar en les cèl·lules que contenien solució HANKS sense magnesi ( $Mg^{2+}$  free) davant l'acció del PCB 138 (0,1  $\mu$ M) durant 6 DIV (figura 39A).

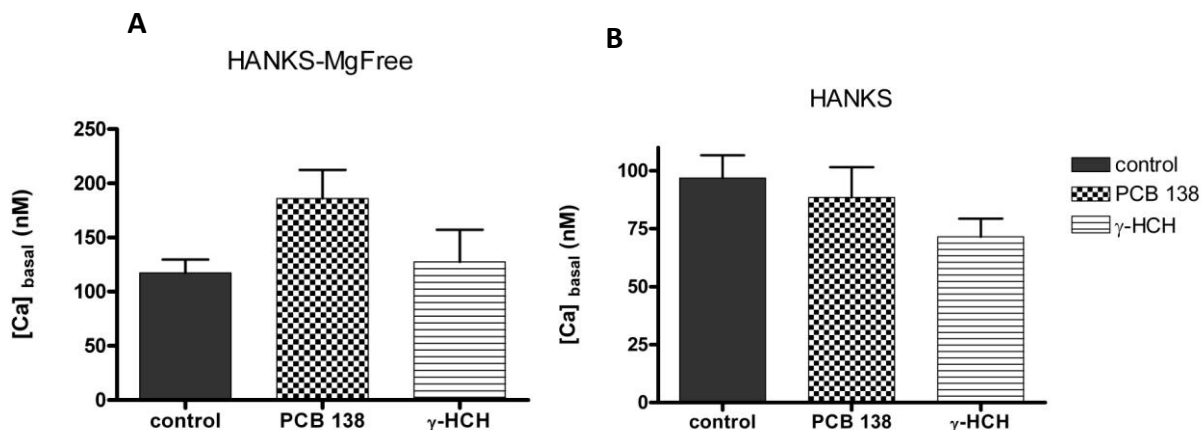
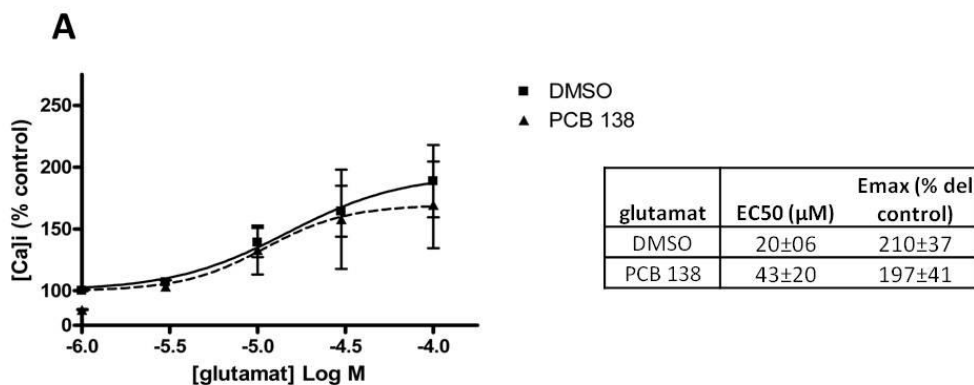


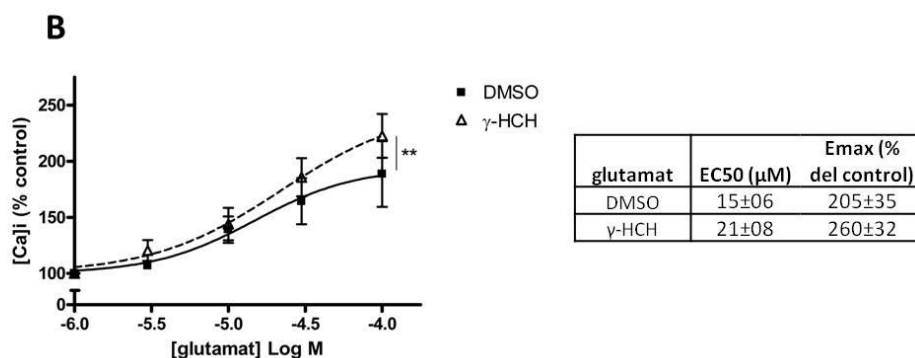
Figura 39. Calci intracel.lular en cultius primaris de CTX tractats durant 6 DIV amb PCB 138 (0,1  $\mu\text{M}$ ) o  $\gamma\text{-HCH}$  (10  $\mu\text{M}$ ) en medis amb HANKS Mg-Free (A) i HANKS (B). Les gràfiques corresponen a la mitjana $\pm$ SEM de 5-10 experiments per triplicat. L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA (test de comparació múltiple de Dunnett).

### 2.4.2. RECEPTORS GLUTAMATÈRGICS

L'augment de calci induït per glutamat en cèl.lules exposades a PCB 138 no va ser significativament diferent respecte al control (figura 40A).

En canvi les cèl.lules exposades durant 6 DIV a  $\gamma\text{-HCH}$  (10  $\mu\text{M}$ ) (figura 40B) van mostrar un lleuger augment de l'increment de calci induït per glutamat en comparació al control significatiu ( $p < 0.01$ ) un cop ajustada la corba dels 4 experiments. Ara bè, la mitjana dels valors de  $\text{EC}_{50}$  i  $\text{E}_{\text{max}}$  de cada experiment (mostrats a les taules de la figura 40), no van mostrar diferència significativa.

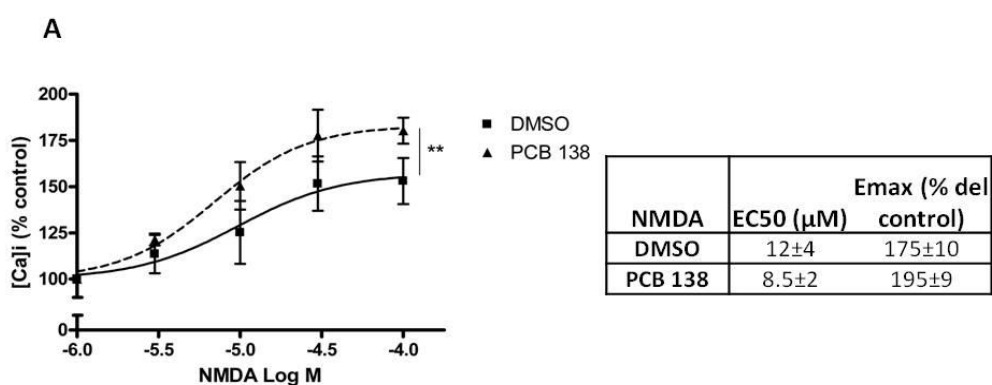


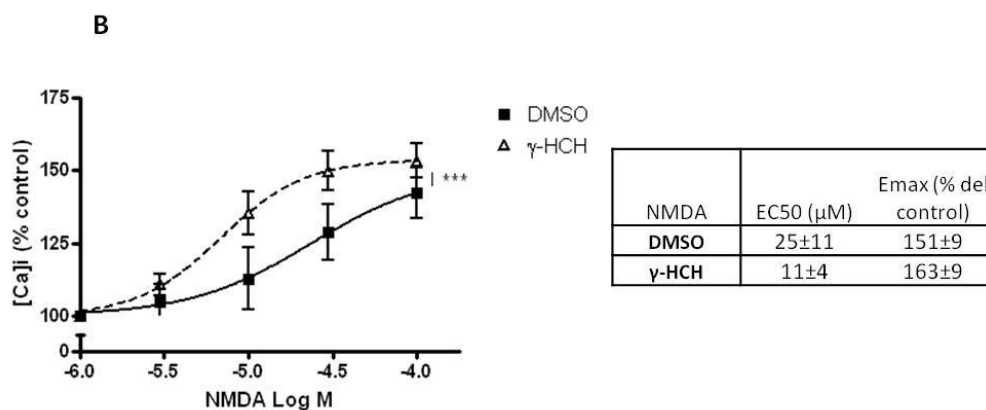


**Figura 40.** Increment de calci intracel·lular induït per glutamat davant l'exposició a concentracions subtòxiques de PCB 138 (0.1  $\mu\text{M}$ ) (A) i  $\gamma$ -HCH (10  $\mu\text{M}$ ) (B) durant 6 dies *in vitro* en cultius primaris de neurones corticals. Els resultats expressen la mitjana $\pm$ SEM de tres-quatre assaigs realitzats per triplicat. La comparació estadística d'ambdues corbes indica diferències significatives ( $p < 0.01$ ) entre els dos ajustos quan es comparen la EC50 i la Emax.

### 2.4.3. RECEPTORS D'NMDA

L'augment de calci induït per NMDA (figura 41) va ser significativament major en les cèl·lules exposades tant a 0.1  $\mu\text{M}$  de PCB 138 com a  $\gamma$ -HCH 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ), respecte les cèl·lules control un cop ajustades les corbes dels diferents experiments. En el cas de  $\gamma$ -HCH la diferència de la corba un cop ajustada bé donada per la EC50 ( $p > 0.001$ ), mentre que en el cas del PCB la diferència de la corba venia donada pel conjunt d' Emax i EC50. En aquest cas, tampoc es va observar una diferència significativa entre els valors d'Emax i EC50, obtinguts de la mitjana d'Emax i EC50 de les diferents corbes de cada experiment (mirar taules corresponents a la figura 41) però sí una tendència a disminuir la EC50 i a augmentar la Emax.

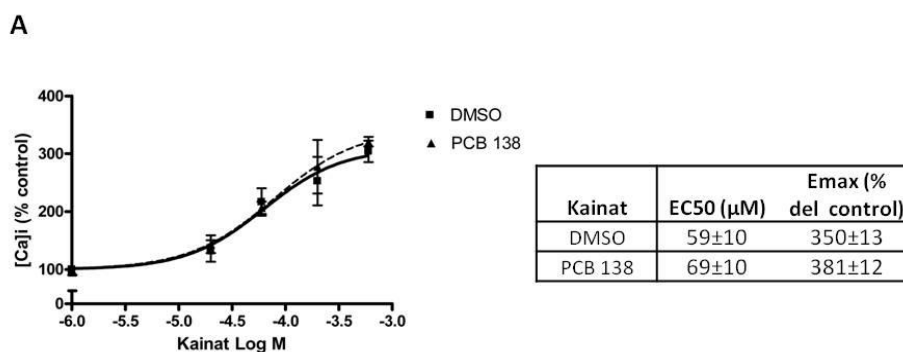




**Figura 41.** Increment de calci intracel·lular induït per NMDA davant l'exposició durant 6 DIV a concentracions subtòxiques de PCB 138 (0.1  $\mu\text{M}$ ) (A) i  $\gamma$ -HCH (10  $\mu\text{M}$ ) (B) en cultius primaris de neurones corticals. Els resultats expressen la mitjana $\pm$ SEM de tres-cinc assaigs realitzats per triplicat. L'estadística s'ha realitzat amb el *t*-test on \*\* equival a  $p < 0.01$ , \*\*\* equival a  $p < 0.001$ .

#### 2.4.4. RECEPTORS DE KAINAT

L'entrada de calci per Kainat no va augmentar significativament ni davant la presència d' $\gamma$ -HCH ni de PCB 138 respecte el control (figura 42); tot i que  $\gamma$ -HCH no va donar un augment significatiu, si que mostra una tendència a augmentar l'entrada de calci intracel·lular, com es pot observar en els valors de la Emax de la taula de la figura 42B.



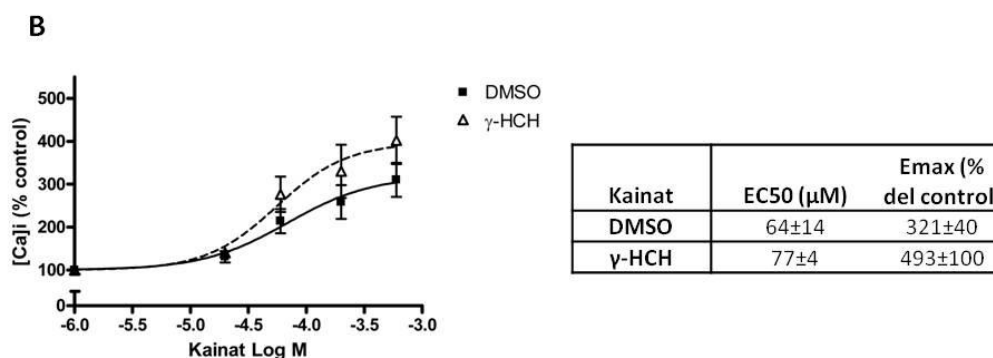


Figura 42. Entrada de calci per Kainat davant l'exposició durant 6 DIV a concentracions subtòxiques de PCB 138 (0,1 μM) (A) i γ-HCH (10 μM) (B) en cultius primaris de neurones corticals. Els resultats expressen la mitjana±SEM de tres-cinc assaigs realitzats per triplicat.

#### 2.4.5. RECEPTORS METABOTRÒPICS DE GLUTAMAT TIPUS I

L'increment de calci intracel·lular induït per l'agonista del receptor metabotròpic de glutamat tipus I, DHPG, no es va veure alterat significativament davant la presència de PCB 138 i γ-HCH, però de la mateixa manera que amb el Kainat, γ-HCH va mostrar una tendència a augmentar. La figura 43 està expressada en columnes, doncs l'entrada de calci per DHPG és massa baixa com per ajustar una corba.

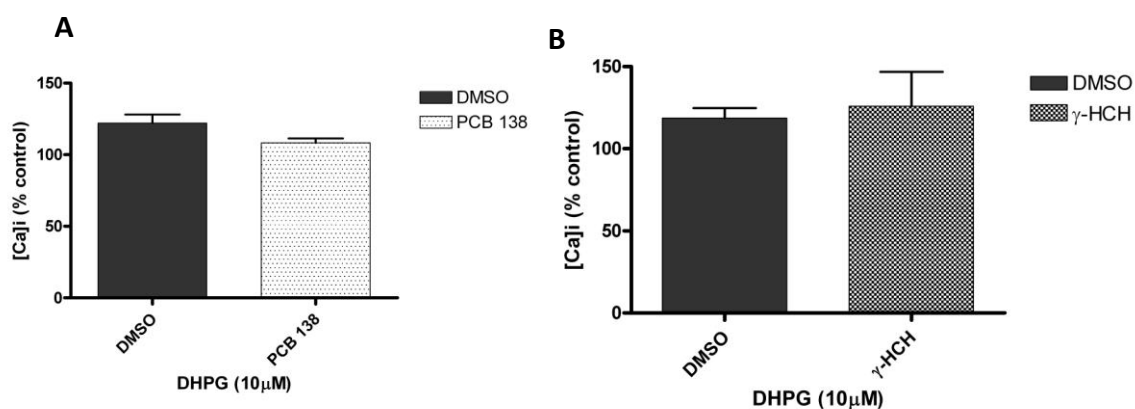
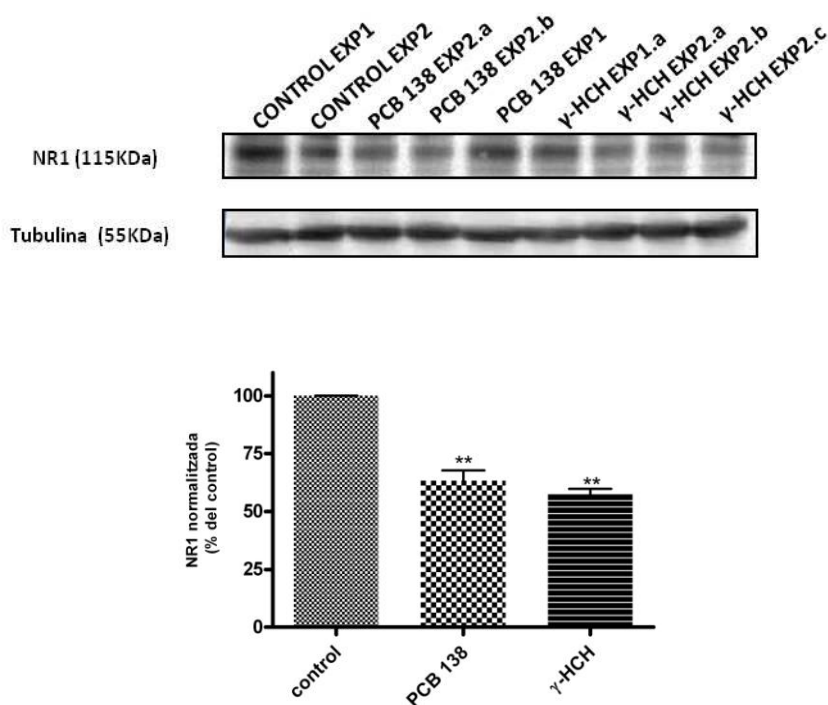


Figura 43. Increment del calci intracel·lular en presència de DHPG (10 μM) davant l'exposició a 6 dies in vitro a concentracions subtòxiques de PCB 138 (0.1 μM) (A) i γ-HCH (10 μM) (B) en cultius primaris de neurones corticals. Els resultats expressen la mitjana±SEM de tres-cinc assaigs realitzats per triplicat.



## 2.5 ESTUDI IN VITRO DE L'EXPRESSION DE NR1 DAVANT L'EXPOSICIO Prolongada (6 DIV) A CONCENTRACIONS SUBTOXiques DE PCB 138 I $\gamma$ -HCH EN CULTIUS PRIMARIS DE NEURONES CORTICALS.

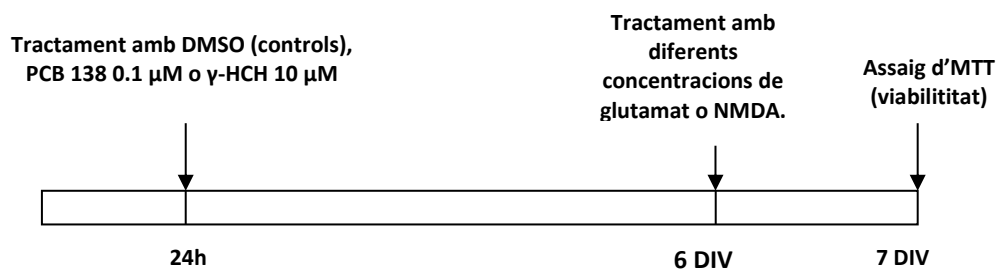
Per tal de justificar si l'augment de l'entrada de calci induït per NMDA davant l'exposició als organoclorats es devia a un augment en l'expressió del receptor d'NMDA, es va realitzar un western blot per a la subunitat NR1 del receptor en cultius primaris de CTX tractats durant 6 DIV amb PCB 138 (0.1  $\mu$ M) o  $\gamma$ -HCH (10  $\mu$ M). La figura 44 mostra una disminució significativa de la subunitat NR1 davant l'exposició durant 6 DIV a 0,1  $\mu$ M de PCB 138 respecte el control, sent el senyal obtinguda del 63 $\pm$ 9 % respecte el control. De manera semblant la exposició a  $\gamma$ -HCH durant 6 DIV també comporta una disminució de l'expressió de NR1, mostrant una senyal de 57 $\pm$ 3 % respecte el control.



**Figura 44. Expressió de la subunitat NR1 davant l'exposició a concentracions subtòxiques de PCB 138 (0.1  $\mu$ M) i  $\gamma$ -HCH (10  $\mu$ M) durant 6 dies in vitro en cultius primaris de neurones corticals.** Adalt un western blot representatiu on s'observen dos experiments diferenciats (1 i 2) i diferents mostres (a,b,c). Abaix la gràfica que expressa la mitjana $\pm$ SEM de dos-tres assaigs independents realitzat amb 1-3 mostres.

## 2.6. ESTUDI DE LA MORT PER EXCITOTOXICITAT INDUÏDA PER GLUTAMAT I NMDA EN CULTIUS DE CTX EXPOSATS DURANT 6 DIV A CONCENTRACIONS SUBTÒXIQUES DE PCB 138 I $\gamma$ -HCH.

Es va voler veure si l'augment de calci intracel·lular induït per glutamat i NMDA davant l'exposició a  $\gamma$ -HCH (10  $\mu$ M) durant 6 DIV produïa un increment de l'excitotoxicitat per activació dels receptors de glutamatèrgics; de la mateixa manera, es va voler veure si l'augment de calci intracel·lular induït per NMDA davant exposicions de PCB 138 (0,1  $\mu$ M) durant 6 DIV implicava un increment de l'excitotoxicitat. L'assaig va consistir en exposar els cultius primaris de neurones corticals a concentracions subtòxiques de PCB38 o lindà i provocar posteriorment la mort cel·lular per excitotoxicitat (afegint-hi glutamat o NMDA). L'objectiu era observar si hi havia un augment de la mort per excitotoxicitat. El següent esquema mostra la temporalitat experimental:



A partir de 0.3 mM de glutamat i 0.1 mM de NMDA observavem mort cel·lular ( $p < 0.01$ ) (figura 45 i 46). L'exposició a  $\gamma$ -HCH (1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M), no va modificar l'excitotoxicitat produïda pel glutamat ni per NMDA, com s'observa en la figura 45 (A i B, respectivament), ni tampoc l'exposició a PCB 138 (0.01 i 0.1  $\mu$ M) va modificar l'excitotoxicitat produïda per NMDA (figura 46).

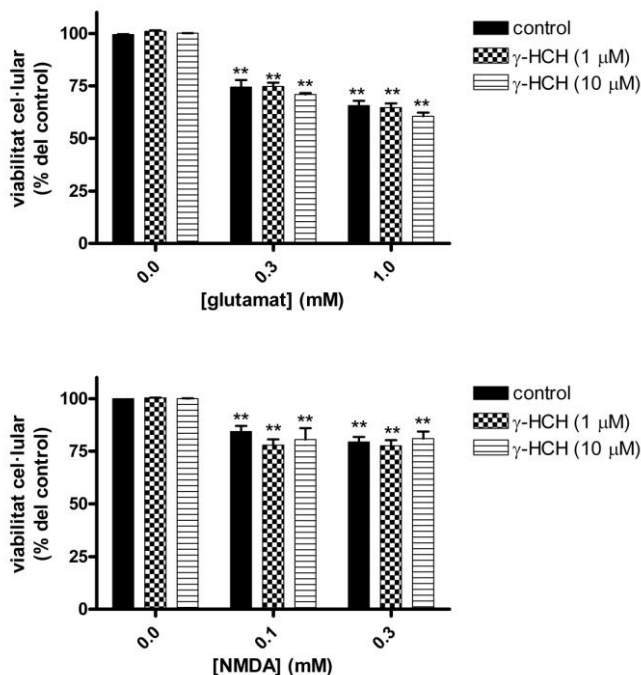


Figura 45. Viabilitat cel·lular dels cultius primaris de neurones corticals exposades 6 DIV a concentracions sub tòxiques de lindà (1 i 10 μM) i concentracions creixents de glutamat (A) i NMDA (B). Les gràfiques representen la mitjana±SEM de quatre-cinc assaigs realitzats per triplicat. L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA (*Dunnnett's multiple comparison test*), on \*\*p<0.01 respecte el control.

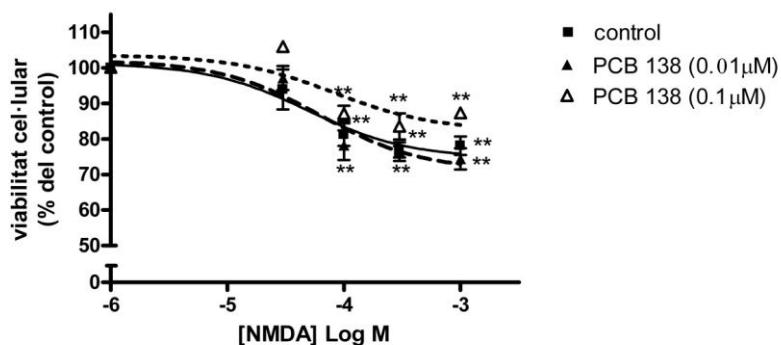


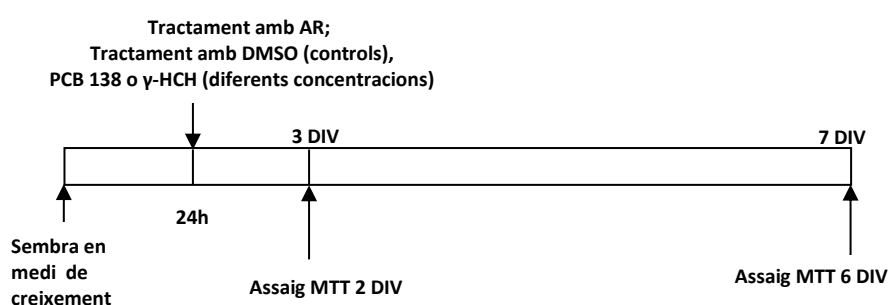
Figura 46. Viabilitat cel·lular dels cultius primaris de neurones corticals exposades 6 DIV a concentracions sub tòxiques de PCB 138 (0.01/0.1 μM) d'NMDA. Les gràfiques representen la mitjana±SEM de tres assaigs realitzats per triplicat. L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA (*Dunnnett's multiple comparison test*) on \*\*p<0.01 respecte el control.

### **PART 3. ESTUDI *IN VITRO* DELS EFECTES DE L'EXPOSICIÓ PROLONGADA (> 96H) A CONCENTRACIONS SUBTÒXIQUES DE PCB 138 I $\gamma$ -HCH A TRANSPORTADORS I RECEPTORS DOPAMINÈRGICS EN CÈL·LULES HUMANES DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y.**

En la tercera part d'aquesta tesi es va voler estudiar diferents indicadors del sistema dopaminèrgic que es podrien veure alterats davant l'exposició prolongada i a dosis subtòxiques de PCB 138 i  $\gamma$ -HCH. Per tal objectiu es van escollir les cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciades amb àcid retinoïc (10  $\mu$ M). Un cop iniciada la diferenciació de les cèl·lules SH-SY5Y, aquestes van ser exposades durant 6 DIV a diferents concentracions subtòxiques dels contaminants PCB 138 i  $\gamma$ -HCH, i l'expressió gènica del receptor DRD2 (S i L), del transportador vesicular de monoamines (VMAT2) va ser determinada.

#### **3.1 Viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma SH-SY5Y exposades durant la seva diferenciació neuronal a concentracions creixents de PCB 138 i $\gamma$ -HCH.**

Es van exposar les cèl·lules SH-SY5Y (un cop iniciada la seva diferenciació) a diferents concentracions de PCB 138 i  $\gamma$ -HCH durant 2 o 6 DIV, segons el següent esquema de tractament.



La figura 47 mostra els resultats de la viabilitat cel·lular a 6 DIV, on hi havia un 20% de mort cel·lular ( $p < 0.01$ ) en els cultius exposats a 30  $\mu$ M de lindà i un 80% a 300  $\mu$ M ( $p < 0.01$ ). En canvi, el PCB 138 va produir un 80% de mort significativa a partir de 100  $\mu$ M ( $p < 0.01$ ).

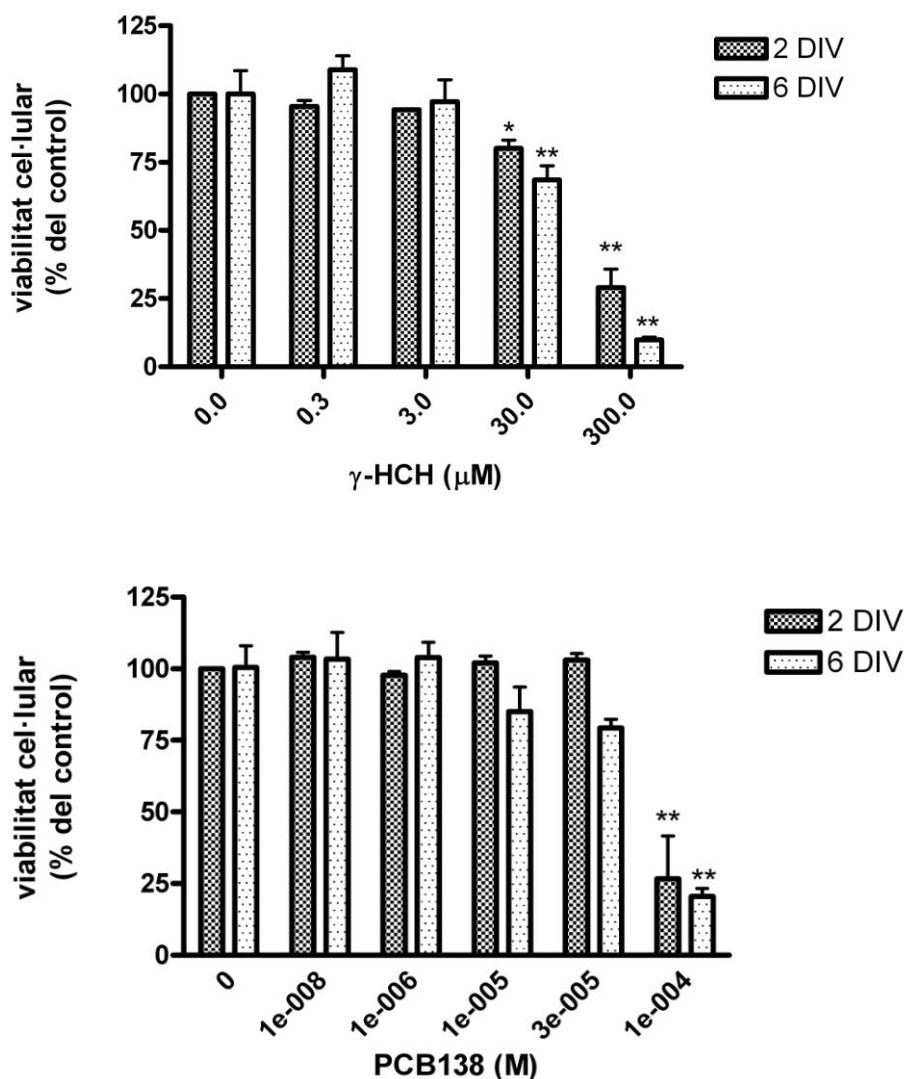


Figura 47. Viabilitat cel·lular mesurada a través del mètode de MTT en cèl·lules SH-SY5Y exposades durant 2 i 6 dies in vitro a concentracions creixents de PCB 138 (A) i lindà (B). Les gràfiques representen la mitjana $\pm$ SEM (N=8) d'un o dos assaigs realitzats amb una N=8 per cada concentració. L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA (*Turkey's Multiple Comparison Test*). \*p<0.05, \*\*p<0.01.

### 3.2 Estudi de l'expressió gènica dels receptors dopaminèrgics (DRD2 S i L) i el transport vesicular de monoamines (VMAT2) davant l'exposició de PCB 138 i $\gamma$ -HCH a concentracions subtòxiques durant 6 DIV.

Es va voler estudiar si existia una alteració de l'expressió gènica de DRD2 (S i L), VMAT2, i DAT en les cèl·lules SH-SY5Y diferenciades amb àcid retinoïc degut a l'exposició prolongada als

contaminants  $\gamma$ -HCH i PCB 138. Les concentracions de contaminants amb que es va treballar van ser 0.1/1/10/60  $\mu$ M pel  $\gamma$ -HCH i 0.01/0.1/1/50  $\mu$ M pel PCB 138, basant-nos en els resultats de l'apartat anterior (figura 47); es van escollir 3 concentracions que no produïssin citotoxicitat als 6 DIV, i una tercera concentració que s'aproximes a la LC50 dels contaminants als 6 DIV. Tres flascons de cèl·lules diferenciades de SH-5YSY van ser tractades durant 6 DIV amb les concentracions de contaminants elegides i una RT-q-PCR (*Real Time-quantitative PCR*) es va realitzar pels diferents gens d'interès a estudiar: les dos isoformes (*small* i *large*) del receptor de dopamina 2 (DRD2S i L), el transportador vesicular de monamina 2 (VMAT2), i el transportador de dopamina (DAT).

Primerament es van dissenyar i/o crear els encebadors per aquests gens (descrits a materials i mètodes, taula 8); es va corroborar que les cèl·lules de neuroblastoma amb les que treballàvem expressessin els gens d'interès així com es va cercar la Tm de treball òptima (figura 48). En aquest punt es va veure que el transportador de dopamina no s'expressava en les nostres cèl·lules; es va descartar un error en el disseny de l'encebador al corroborar que si funcionava amb cèl·lules que sobreexpressaven el transportador de dopamina (no es mostra el resultat). El DRD2 (S i L) i el VMAT2 si que s'expressaven correctament, i la Tm de treball va ser 65°C. La figura 48 mostra un gel d'agarosa pels gens VMAT2 (x3), DRD2s (x2) i DRD2L (x2).



**Figura 48.** Gel d'electroforesis corresponent a les bandes per replicat de VMAT2, DRD2s i DRD2L a 65°C.

Els gens *Housekeeping* (gens constitutius) escollits per a normalitzar els gens d'interès van ser el PBDG (*porphobilinogen deaminase*) i el HPRT (*Hypoxanthinephosphoribosyltransferase*). La SDHA (*succinate dehydrogenase*) també es va determinar, però la seva quantificació va donar variabilitat en diferents lectures i en el cas del  $\gamma$ -HCH un augment dosi-resposta, que va ser justificat al haver-se descrit en la bibliografia que el lindà actua sobre aquest enzim (Dikshith et

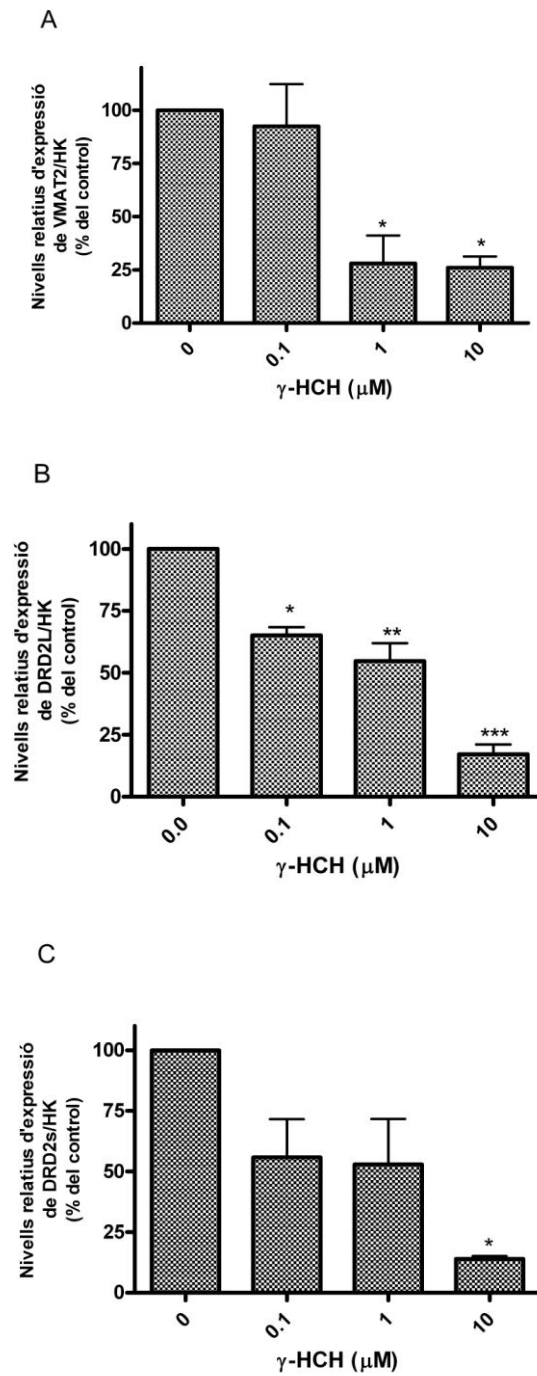
al. 1978, Bhatt et al. 2009). L'anàlisi del mRNA davant la exposició a 60  $\mu\text{M}$  ( $\sim\text{LC50}$ ) va ser exclosa al donar molta variabilitat, probablement per la mort cel·lular que s'hi produïa.

La figura 49A mostra com l'exposició durant 6 DIV a  $\gamma\text{-HCH}$  va produir una disminució significativa de l'expressió de VMAT2 a partir d'1  $\mu\text{M}$ , havent-hi una reducció al  $28\pm 13\%$  sobre el control ( $p < 0.05$ ), i aquesta disminució es va mantenir aproximadament a 10  $\mu\text{M}$  ( $26\pm 5\%$ ,  $p < 0.05$ ).

La exposició durant 6 DIV a  $\gamma\text{-HCH}$  també va induir una disminució en l'expressió del receptor de dopamina DRD2, com s'observa en la figura 49B i 49C. La figura 49B mostra com el receptor DRD2L disminueix significativament, de manera concentració-depenent. La disminució de l'expressió de DRD2L va ser significativa a partir de 0.1  $\mu\text{M}$ , sent l'expressió del  $65.0\pm 3.2\%$  respecte el control ( $p < 0.05$ ). A exposicions d'1  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  la disminució va ser més forta, sent l'expressió del  $54.7\pm 7.3\%$  ( $p < 0.01$ ) i el  $17\pm 3.9\%$  ( $p < 0.001$ ) respectivament respecte el control.

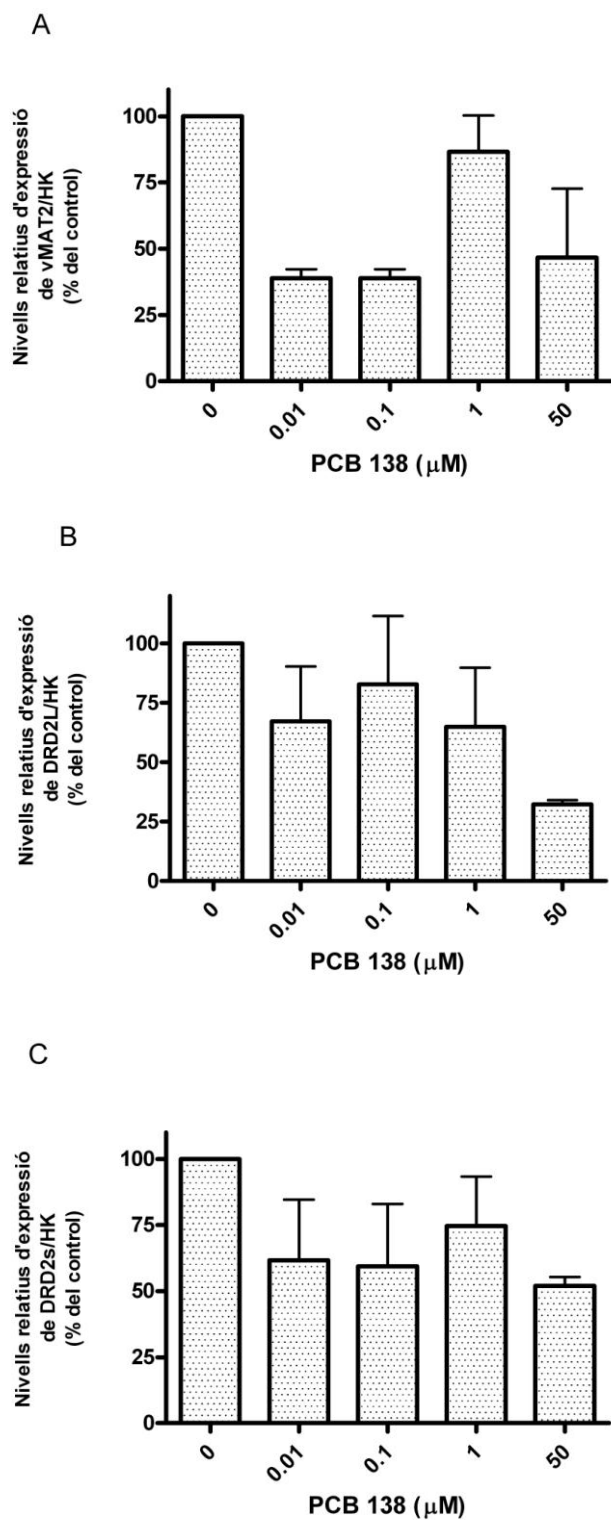
La figura 49C mostra que també hi va haver una disminució significativa en la isoforma DRD2s, si bé només a partir de 10  $\mu\text{M}$  la disminució és estadísticament significativa quan es refereix als dos *Housekeeping genes*, sent l'expressió del  $13.9\pm 1.1\%$  respecte el control ( $p < 0.05$ ). Tot i això, a partir de 0.1  $\mu\text{M}$  ja s'observa una tendència a disminuir (sent l'expressió del  $55.7\pm 15\%$  respecte el control). El DRD2s normalitzat respecte el *housekeeping gene* PBDG únicament, va donar una disminució significativa a partir de 0.1  $\mu\text{M}$ , sent del  $40.1\pm 9.1\%$  respecte el control ( $P < 0.05$ ) (resultat no mostrat).

Per altre banda, l'exposició durant 6 DIV a PCB 138 no va donar una alteració significativa (tot i que sí una tendència a disminuir) en les expressions de VMAT2 (figura 50A), de DRD2L i S (figura 50B i 50C respectivament).



**Figura 49.** Nivells relatius de l'expressió de mRNA de VMAT2 (A), DRD2L (B) i DRD2s en relació a l'exposició a diferents concentracions de  $\gamma$ -HCH en cèl·lules diferenciades de neuroblastoma SH-SY5Y durant 6 DIV. Les gràfiques representen la mitjana $\pm$ SEM de l'expressió determinada de tres cultius independents per cada concentració i normalitzada per dos *Housekeeping genes* diferents (PBDG i HPRT) (determinats en dues lectures de PCR diferents). L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA (Turkey's Multiple Comparison Test). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  i \*\*\* $p < 0.001$ .

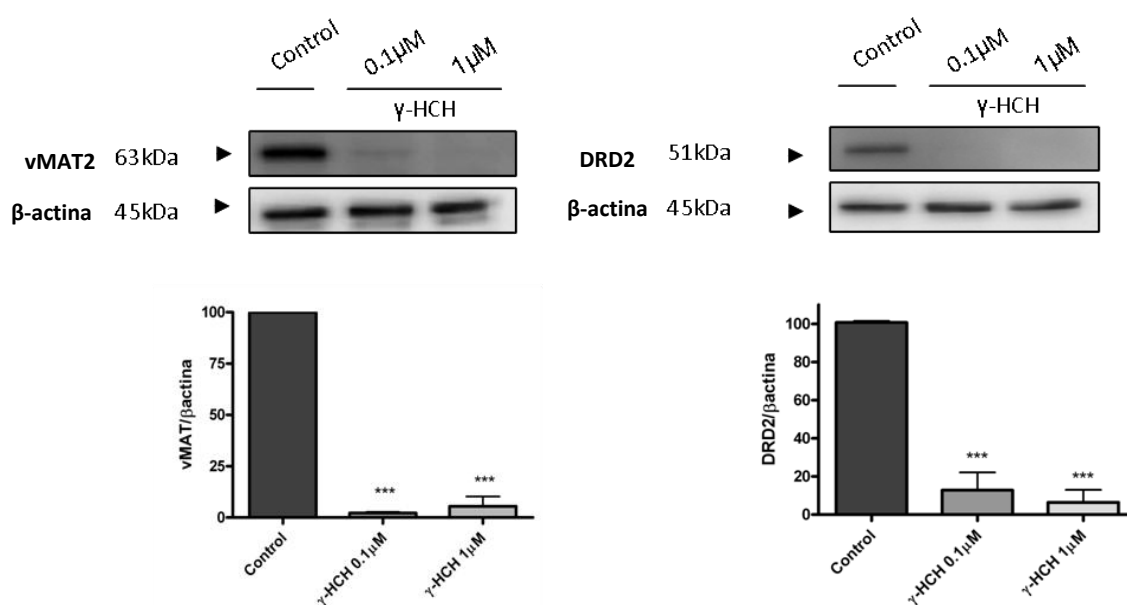




**Figura 50.** Nivells relatius de l'expressió de mRNA de VMAT2 (A), DRD2I (B) i DRD2s en relació a l'exposició a diferent concentracions de PCB 138 en cèl·lules diferenciades de neuroblastoma SH-SY5Y durant 6 DIV. Les gràfiques representen la mitjana $\pm$ SEM de l'expressió determinada de tres cultius independents per cada concentració i normalitzada per dos *Housekeeping genes* diferents (PBDG i HPRT) (determinats en dues lectures de PCR diferents). L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA (*Turkey's Multiple Comparison Test*).

### 3.3 Estudi de l'expressió proteica dels receptors de dopamina DRD2 i VMAT2 davant l'exposició a concentracions creixents de lindà durant 7 DIV.

Per tal de corroborar la disminució de l'expressió gènica de VMAT2 i DRD2 (S i L) davant l'exposició de  $\gamma$ -HCH durant 6 DIV, es va quantificar per western blot la seva expressió proteica. A través d'aquest s'observa com a exposicions de 0.1  $\mu$ M de  $\gamma$ -HCH VMAT2 va disminuir fins al  $2.2\pm 0.5\%$  respecte el control ( $p < 0.001$ ). Aquesta disminució es va mantenir a exposicions de 10  $\mu$ M (figura 51A). El mateix passa amb l'expressió proteica de DRD2, on la intensitat de la banda per western blot va disminuir al  $12.8\pm 9.3\%$  i al  $6.5\pm 9.3\%$  respecte el control a exposicions de 0.1 i 1  $\mu$ M respectivament ( $p < 0.001$ ) (figura 51B).



**Figura 51. Expressió proteica de VMAT2 (A) i DRD2 (B) en relació a l'exposició a diferent concentracions de  $\gamma$ -HCH en cèl·lules diferenciades de neuroblastoma SH-SY5Y durant 6 DIV.** La part superior mostra un immunoblot representatiu amb les bandes corresponents a VMAT2 (63 kDa), DRD2 (51 kDa) i actina (45 kDa); la part inferior mostra la quantificació densitomètrica de VMAT2 i DR2 respecte l'actina. Les gràfiques representen la mitjana $\pm$ SEM de l'expressió determinada en tres cultius independents. L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA (*Turkey's Multiple Comparison Test*). \*\*\* $p < 0.001$ .

### **3.4 Determinació de la concentració de dopamina (DA) i DOPAC en el medi extracel·lular de cèl·lules SH-SY5Y exposades a concentracions creixents de PCB 138 i lindà durant 7 DIV.**

Es va determinar per HPLC la concentració de la dopamina i el seu metabòlit DOPAC presents en el medi de cultiu de les cèl·lules exposades a PCB 138 i a lindà (les mateixes cèl·lules que es varen utilitzar pels assaigs de RT-qPCR).

La figura 52A i 52B mostra com no hi ha variació significativa de la dopamina ni el DOPAC en el medi extracel·lular a diferents exposicions de  $\gamma$ -HCH. Remarcar que tot i no significatiu, a concentracions de 60  $\mu$ M (concentració més elevada on ja hi comença a haver-hi mort cel·lular) les concentracions de dopamina tenen una tendència a ser més baixes que les del control, amb una disminució del  $\sim$ 50% (figura 52A). Paral·lelament, les concentracions de DOPAC (figura 52B) es mantenen, però a 60  $\mu$ M hi ha una tendència a augmentar. La figura 52C mostra la ratio de tots dos metabòlits, on s'observa una constància en el valor d'aquests fins arribar als 60  $\mu$ M, on hi ha una tendència no significativa a la disminució de la *ratio* DA:DOPAC.

La figura 53A i 53B mostra els nivells de dopamina i DOPAC en el medi de cultiu de cèl·lules SH-SY5Y exposades 6 DIV a PCB 138 i on s'observa com no existeix una alteració dels nivells de dopamina i DOPAC (la figura 53C mostra com la ratio DA:DOPAC és manté constant).

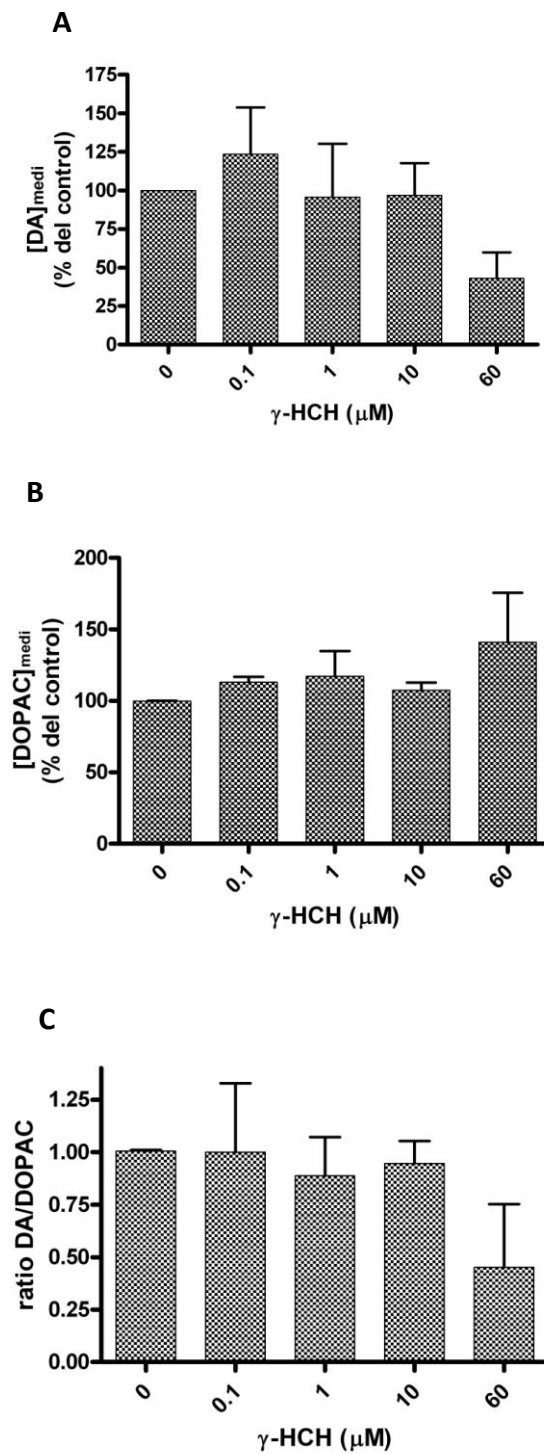


Figura 52. Nivells de dopamina (DA) (A) i del seu metabòlit DOPAC (B) alliberats al medi, i la ratio DA/DOPAC(C), en relació a l'exposició a diferent concentracions de  $\gamma$ -HCH durant 6 DIV en cèl·lules diferenciades de neuroblastoma SH-SY5Y. Les gràfiques representen la mitjana $\pm$ SEM dels valors determinats en sis medis de cultius obtinguts de dos assaigs independents. L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA.

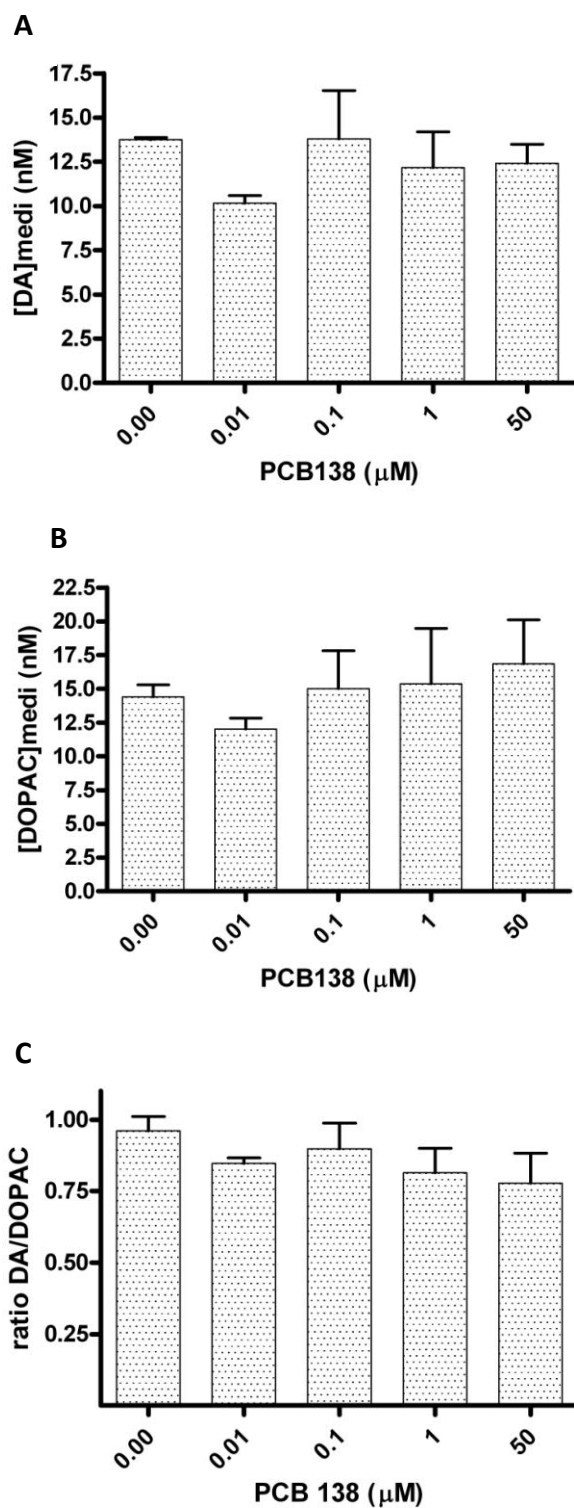


Figura 53. Nivells de dopamina (DA) (A) i del seu metabòlit DOPAC (B) alliberats al medi, i la ratio DA/DOPAC(C), en relació a l'exposició a diferent concentracions de PCB 138 en cèl·lules diferenciades de neuroblastoma SH-SY5Y durant 6 DIV. Les gràfiques representen la mitjana $\pm$ SEM dels valors determinats en tres medis de cultius independents. L'estadística s'ha realitzat amb el test one-way ANOVA.

## **5. DISCUSSIÓ**



Els tres treballs aquí presentats mostren de diferent manera com el PCB 138 i el hexaclorociclohexà ( $\beta$  o  $\gamma$ ) actuen sobre el normal funcionament de vies glutamatèrgiques i dopaminèrgiques quan hi són presents a dosis baixes de manera perllongada en mostres humanes de placenta, sang de cordó umbilical, i en cultius neuronals.

La humanitat està exposada a una àmplia varietat de contaminants de manera crònica (durant llargs períodes de temps) a través de la dieta (Ramón et al. 2008, Freire et al. 2010, Llop et al. 2010, Arrebola et al. 2011). Els efectes que poden estar produint aquests contaminants de manera prolongada en el normal desenvolupament dels infants i especialment en el sistema nerviós, s'ha convertit en un dels temes de salut pública més preocupants des que diversos estudis estan demostrant la forta associació existent entre l'exposició a contaminants orgànics persistents i una àmplia varietat de desordres neurològics o disfuncions en el sistema nerviós (Grandjean & Landrigan 2006, Jones & Miller 2008, Guxens et al. 2011).

Sabent que el MeHg inhibeix el transportador glutamatèrgic en astròcits i neurones (Aschner et al. 2000, Fonfría et al. 2005) i també la implicació d'altres contaminants organoclorats sobre diferents paràmetres del sistema glutamatèrgic en cervell (Fonnum & Mariussen 2009, Llansola et al. 2010) es va proposar la hipòtesi de que també podria donar-se una disfunció en diferents indicadors del sistema glutamatèrgic en la placenta. A la primera part d'aquesta tesi es va investigar la influència que podien tenir el metilmercuri i el conjunt de contaminants orgànics persistents analitzats en un subgrup de 40 mostres de sang de cordó umbilical de la cohort de València del projecte INMA en les concentracions de glutamat i aspartat. També es va treballar amb mostres de placenta d'aquesta cohort per tal d'estudiar l'efecte del MeHg, el PCB 138 i el  $\beta$ -HCH sobre el transportador de glutamat en la placenta.

La mitjana de mercuri total en sang de cordó umbilical d'aquest subgrup (n=40) de la cohort de València era de 9,2 ng/mL, valor comparable a la mitjana detectada a un grup més gran d'aquesta cohort (n=253), 9,9 ng/mL. Recordar que en aquest grup, més del 75% de les mostres varen superar el valor recomanat com a segur per l'U.S EPA (5,8 ng/mL) i els valors van ser semblants o superiors als d'altres poblacions consumidores de peix com les del Japó, l'Àrtic o Suècia (Ramón et al. 2008). La mitjana dels contaminants organoclorats del subgrup de la cohort escollida aquí són comparables, tot i que menors, als obtinguts en altres estudis de la cohort de València (Vizcaino et al. 2011).

L'expressió d'EAAT2 en les mostres de placenta va ser determinada per western blot, corroborant-se així la presència d'aquest transportador. Es va escollir aquest subtipus degut a



que aquest es troba tant en el sincitiotrofoblast com en les cèl·lules endotelials dels vasos fetals, i perquè aquest és el responsable del 90% de la captació en el sistema nerviós (Danbolt 2001, Noorlander et al. 2004). Per tal de caracteritzar-lo, diferents paràmetres del transport van ser analitzats; per una banda, la dependència del transport de glutamat de la presència de  $\text{Na}^+$ ; la inhibició de la unió específica d' $[\text{H}^3]$ -aspartat pels substrats d'EAAT, t-PDC, aspartat i glutamat, així com la disminució de la unió a 4 °C davant la unió a 36 °C, i finalment, la corba d'inhibició dosi-dependent davant concentracions creixents de glutamat. La inhibició del transport d' $[\text{H}^3]$ -aspartat en la placenta humana per part del glutamat ( $\text{IC}_{50}=6,3\pm 1,7 \mu\text{M}$ ) va donar una afinitat semblant que la descrita en treballs previs en cervell de rata ( $\text{IC}_{50}=8 \mu\text{M}$ ; Trotti et al. 1995), i que l'observada en homogenats de cervell de rata en el present treball ( $\text{IC}_{50}=2,25 \mu\text{M}$ ).

La inhibició total del transport de glutamat en homogenats de placenta humana per part del MeHg va ser mostrada amb una  $\text{IC}_{50}=4,9\pm 0,8\mu\text{M}$ , en concordança amb treballs previs realitzats en cèl·lules neuronals, astrocítiques o en plaquetes (Aschner et al. 2000, Fonfría et al. 2005, Borges et al. 2007). A més a més, el  $\beta$ -HCH i el PCB 138 també van demostrar inhibir el transport de glutamat amb alta afinitat ( $\sim 10 \text{ nM}$ ) però baixa eficàcia ( $\sim 50\%$  de la inhibició màxima). Respecte els PCB, altres estudis reforcen aquests resultats: estudis previs en sinaptosomes de cervell de rata ja van demostrar que certs congèneres de PCB amb alt contingut de clors inhibeixen el transport de glutamat parcialment i a dosis molt més baixes (Mariussen & Fonnum 2001, Stavenes Andersen et al. 2009). En aquest cas, el PCB 138 és un dels congèneres amb més contingut de clors. De la mateixa manera, el PCB ha demostrat actuar en vies d'implicació glutamatèrgica (via glutamat-NO-cGMP) a concentracions de l'ordre de nanomolar (Llansola et al. 2010). Respecte el  $\beta$ -HCH no hem trobat estudis previs en el transport glutamatèrgic.

Els valors de les concentracions de glutamat i aspartat determinats en les mostres de sang de cordó umbilical van ser semblants als trobats en altres estudis realitzats en sang de cordó umbilical (Jauniaux et al. 2001, Cetin et al. 2005). No es va observar una relació significativa entre els nivells de mercuri total (T-Hg) en sang de cordó umbilical i el glutamat. Cal remarcar que les mostres analitzades s'havien determinat pels nivells de mercuri total (T-Hg) com a mesura indirecta del MeHg, ja que aquest comprèn el  $\geq 90\%$  del mercuri total (Ramón et al. 2011). L'absència de relació entre Hg i glutamat en les mostres analitzades podria ser explicat pel fet que els nivells màxims de T-Hg en les mostres analitzades era de  $66 \mu\text{g/L}$ , equivalent a  $0,33 \mu\text{M}$ . Aquest nivell és deu vegades més baix que les concentracions detectades en que el

metilmercuri inhibeix significativament la captació de glutamat (valor IC50=4.9  $\mu$ M). De totes maneres, assenyalar que tot i no significatiu, la seva associació segueix sent positiva, és a dir, hi ha una tendència a augmentar el glutamat a nivells més alts de MeHg.

En canvi, una correlació negativament significativa es va demostrar pel PCB 138 i el  $\beta$ -HCH respecte el glutamat, un cop ajustada per lípids i no incloent a l'estudi el grup de dones llatinoamericanes (n=6). També el PCB 180, l'HCB i el 4,4'-DDE i la  $\Sigma$ PCB analitzats (PCB 118, 183, 153 i 180) van mostrar una forta tendència a disminuir els nivells de glutamat en la sang de cordó umbilical. Finalment, la suma de tots els contaminants organoclorats de l'estudi també va mostrar una disminució significativa ( $p < 0.05$ ) dels nivells de glutamat. Es va decidir no incloure a l'estudi el grup de dones llatinoamericanes perquè estudis previs realitzats en aquesta cohort havien mostrat que el lloc d'origen era una variable condicionant del patró de contaminants (Llop et al. 2010, Ramon et al. 2011). Concretament en les nostres mostres vam observar uns nivells màxims de MeHg molt diferents entre dones espanyoles i llatinoamericanes (66 vs 6,4 ng/mL respectivament), de  $\beta$ -HCH (1,2 vs 0,18 ng/mL respectivament) i de HCB (1,0 vs 0,29 ng/mL respectivament). Si tenim en compte la possible interacció que existeix entre contaminants, la presència de dos grups diferenciats en la població d'estudi pot influir en el resultat final. Quan en l'estudi vam incloure totes les participants no vam observar disminució significativa del glutamat. Els nivells d'aspartat no es van veure alterats significativament en funció dels contaminants, però cal destacar que una forta tendència a disminuir va ser observada en relació a la suma de contaminants organoclorats ajustats per lípids i edat, i no incloent-hi les dones llatinoamericanes (coeficient=-64, p-valor= 0,068).

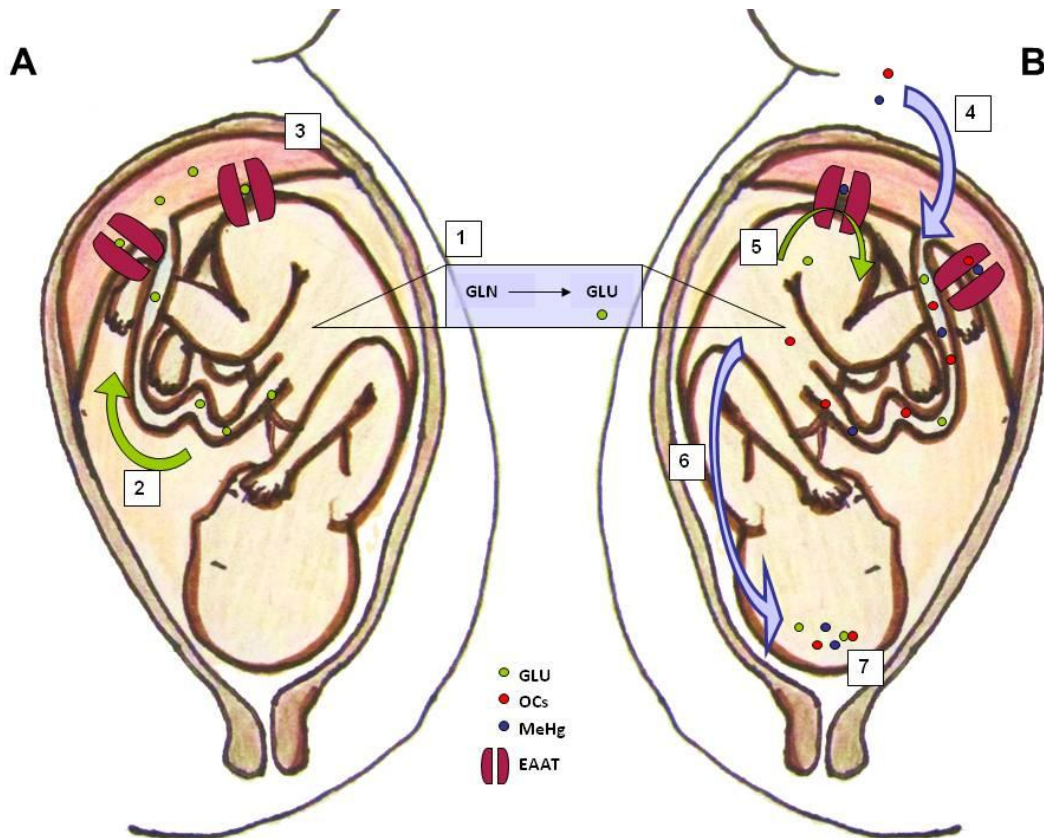
El perquè de la disminució del glutamat respecte el PCB 138 o el  $\beta$ -HCH no s'ha identificat en aquesta tesi. Molts factors poden estar contribuint a la disminució observada en els nivells de glutamat a la sang de cordó umbilical, com podria ser una alteració en les vies de degradació i/o síntesi del glutamat per part dels contaminants organoclorats en la placenta o el fetge fetal. En un intent de justificar-ho, es va analitzar l'activitat de l'enzim glutamat deshidrogenasa, enzim implicat en el metabolisme del glutamat en placenta (Remesar et al. 1980). La presència de  $\beta$ -HCH no va alterar l'activitat de l'enzim mentre que la de PCB 138 va disminuir la velocitat màxima de l'enzim, però a partir de concentracions de 50  $\mu$ M, concentracions molt superiors a les presents en sang de cordó umbilical. El MeHg va començar a tenir un efecte a partir de 10  $\mu$ M, augmentant la Km de glutamat de 0.3 a 0.5 mM ( $p < 0.05$ ). De totes maneres, les concentracions que produïxen una alteració en la GDH segueixen sent concentracions superiors a les que comporten una inhibició del transportador i a les concentracions presents

en les mostres. Per tant, es va descartar que una alteració en aquest enzim fos la conseqüència de la disminució observada. Tot i que la glutamat deshidrogenasa juga un rol important en el metabolisme del glutamat en la placenta, molts més són els enzims implicats de manera directa i indirecta en la placenta (la glutaminasa, la glutamina sintetasa, l'aspartat transaminasa, la tirosina transaminasa i l'adenilat ciclase) (Remesar et al. 1980). Un altre enzim important que es podria veure alterat és la glutaminasa, encarregada de la síntesi de glutamat a través de la glutamina materna al fetge fetal (Battaglia 2000). No s'ha trobat bibliografia que estudi la implicació dels organoclorats en aquest enzim.

Com l'escenari real és que la població es troba permanentment exposada a una varietat de contaminants al mateix temps, els quals poden tenir efectes compensatoris o additius entre ells, ens vam preguntar si la interacció entre contaminants podia afectar el resultat final. Per aquest motiu es va dividir el grup en dos, generant dos models: un on les concentracions de MeHg eren baixes ( $\leq 6 \mu\text{M}$ ) i un altre on eren elevades ( $\geq 21 \mu\text{M}$ ). Una interacció significativa entre els nivells de T-Hg i els contaminants PCB 138, 4,4'-DDE i la suma de contaminants organoclorats va ser observada. Quan les concentracions de T-Hg eren baixes, es va observar una forta associació negativa significativa entre els nivells de PCB 138, el 4,4'-DDE i la suma dels compostos organoclorats amb els de glutamat, mentre que quan els nivells eren alts aquesta associació es perdia. Emfasitzar que l'associació de PCB 138/ $\Sigma\text{OCs}$  i glutamat era més forta quan els nivells de MeHg eren baixos que quan no s'havia fet la divisió entre nivells alts i baixos de T-Hg. Aquest resultat ens suggereixen que existeix un efecte compensatori entre el PCB 138, el 4,4'-DDE (i la suma de contaminants organoclorats) i el mercuri. Una explicació podria ser que quan els nivells de T-Hg eren més elevats es perdia l'associació perquè aquest podria estar afectant en major mesura al transport de glutamat, que tindria el seu efecte augmentant els nivells de l'aminoàcid. Aquests resultats es veuen reforçats per estudis com el de Piedrafita et al. (2008) o el de Powers et al. (2009), on aquests autors observen una atenuació dels efectes produïts pels PCB o el MeHg en l'aprenentatge (a través la via glutamat-NO-cGMP al cerebel) o en l'oïda respectivament, quan aquests son administrats de manera conjunta. Bemis & Seegal (2000) també van descriure un efecte antagònic dels dos contaminants en la concentració de calci intracel·lular en cèl·lules granulars de cerebel que també depenia de la concentració i el temps d'exposició als contaminant. La figura 54 mostra esquemàticament les diferents hipòtesis obertes de com poden estar afectant a la placenta els contaminants estudiats.

L'expressió del transportador de glutamat va ser determinada en nou mostres de placenta seleccionades segons el seu contingut en MeHg, en funció de la unió específica i l'expressió del transportador EAAT2 determinat per western blot. L'aspartat en sang va correlacionar negativament amb la unió específica d'<sup>3</sup>H-aspartat al transportador de glutamat, coincidint amb allò esperat (a més transport menys nivells d'aspartat a la placenta), però no va passar així amb el glutamat. Com ja s'ha dit anteriorment, diferents mecanismes regulen els nivells de glutamat en la placenta, i per aquest motiu es possible que no es vegin correlacionats els nivells de glutamat i transportador de glutamat. Per altre banda, no es va detectar associació significativa entre contaminants OCs ni T-Hg amb la unió específica d'<sup>3</sup>H-aspartat al transportador de glutamat. Els nivells d'EAAT2 mesurats per western blot tampoc van donar cap associació significativa excepció feta del 4,4'-DDE, el qual també havia donat una associació significativament negativa amb els nivells de glutamat en sang quan els nivells de T-Hg eren baixos. En aquest cas, podríem especular que un augment d'EAAT2 per part de 4,4'-DDE podria contribuir a la disminució dels nivells de glutamat. Aquests resultats però, són amb una N molt baixa (N=9) i per tant, no es poden obtenir conclusions, doncs existeixen moltes variables quan es tracta de mostres humanes.

Com la placenta i la sang de cordó umbilical són materials de fàcil obtenció i com aquestes es troben estretament vinculades al fetus són considerades una bona matriu per l'anàlisi de biomarcadors d'efecte en el desenvolupament (Myllynen et al. 2005). La recerca de biomarcadors que facin de mirall del sistema nerviós és quelcom encara complex però molt útil per predir els primers esdeveniments de possibles respostes posteriors d'inducció a la malaltia (Manzo et al. 2001, Staessen et al. 2001).



**Figura 54.** Il·lustració esquemàtica del que pot passar en el compartiment fetal de les dones embarassades quan estan exposades als contaminants (B) o no (A). Pas a pas: 1) El glutamat és sintetitzat al fetge del fetus a través la glutamina. 2) El glutamat en excés del plasma fetal és recaptat per transportadors de glutamat que l'envien a la placenta on és metabolitzada (3). En la il·lustració B, els contaminants (MeHg i compostos organoclorats (OCs)), travessen la placenta (4) i circulen per la sang de cordó umbilical. Aquests podrien estar actuant en múltiples vies, com la síntesi del glutamat (1) o bé acumular-se en el cervell fetal, interferint en el normal neurodesenvolupament (6,7). En aquesta tesi hem mostrat que el MeHg inhibeix el transport de glutamat (EAAT) en placenta, i el PCB 138 i el  $\beta$ -HCH també ho fan de manera parcial (5). Si els nivells de MeHg fossin suficientment alts, aquests podrien estar inhibint el transport d'EAAT en la placenta, resultant en un augment dels nivells de glutamat en sang de cordó umbilicals, i els quals podrien tenir un efecte excitotòxic en el cervell, ja que la barrera hematoencefàlica no està completament formada.

En la primera part, doncs, observem una disminució dels nivells de glutamat en funció del PCB 138, el  $\beta$ -HCH i la suma de contaminants organoclorats (HCB,  $\beta$ -HCH, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, PCB 118, PCB 153, PCB 138 i PCB 180). Apart dels possibles efectes en el normal desenvolupament del fetus que pot comportar una variació dels nivells de glutamat, la placenta també es podria veure afectada. Disfuncions en la placenta s'han associat a diverses patologies prenatales, entre elles alteracions en el neurodesenvolupament (Altshuler 1996). La hipòtesi de Barker diu que certes patologies manifestades en l'edat adulta podrien tenir els seus orígens en el desenvolupament prenatal (Barker 1999).

Aquest treball preliminar realitzat amb 40 mostres provinents de mare-llena caldria ser verificat amb un nombre major de participants, per tal de treure conclusions amb més fermesa. Recentment, a un estudi del projecte INMA en infants de 2 anys s'ha observat una associació negativa entre el MeHg i el desenvolupament mental i psicomotor en nenes, però no en nens (Llop et al. 2012). Més estudis caldrien per tal d'analitzar si les alteracions en les concentracions de glutamat observades aquí podrien estar contribuint als subtils dèficits neurològics descrits en infants exposats a contaminants orgànics tòxics persistents (Grandjean & Landrigan 2006, Freire et al. 2010, Llop et al. 2012).

El sistema nerviós és la diana més vulnerable als efectes dels contaminants organoclorats, i en particular el sistema nerviós en desenvolupament (Mariussen & Fonnum 2006, Grandjean & Landrigan 2006). Els estudis *in vitro* han estat realitzats amb cultius primaris de neurones corticals (CTX) per a l'estudi de paràmetres del sistema glutamatèrgic i amb línies humanes de neuroblastoma SH-SY5Y per a l'estudi de paràmetres del sistema dopaminèrgic. Els cultius primaris de neurones corticals (CTX) han demostrat en treballs previs ser un bon model per a l'estudi de toxicitat generada per contaminants (Galofré et al. 2010, Briz 2011). Tot i que els cultius de cèl·lules granulars de cerebel (CGC) són el principal model utilitzat per a l'estudi específic del sistema glutamatèrgic (ja que el >90% de les neurones en aquest tipus cel·lular són glutamatèrgiques), hem escollit les neurones corticals, les quals apart de presentar neurones glutamatèrgiques, principalment conté neurones GABAèrgiques (~40%), i també colinèrgiques (Thomas 1985, Suñol et al. 2008, Briz et al. 2010). És ben sabut que el còrtex és el responsable de les altes funcions del cervell, on tant les neurones glutamatèrgiques com GABAèrgiques hi tenen un paper important. Estudis amb dieldrín van evidenciar que la inhibició que aquest organoclorat provocava en els receptors GABA<sub>A</sub> de manera perllongada en cultius primaris de neurones corticals induïa una posterior disminució de l'expressió del receptor mGluR5 i una internalització del receptor NMDAR (Briz et al. 2010). Sabent que el lindà en cultius de CTX actua principalment en el receptor GABA<sub>A</sub> (Pomés et al. 1994, Vale et al. 1998a) ens qüestionàvem si s'observaria el mateix mecanisme compensatori a nivell glutamatèrgic que en el cas del dieldrín quan s'exposava prolongadament. Alguns congèneres de PCB no coplanars (entre ells el 138) també han demostrat alterar els receptors de GABA<sub>A</sub> (Inglefield & Shafer 2000 a i b, Antunes Fernandes et al. 2010). Per altre banda, l'estudi dels efectes produïts sobre els receptors glutamatèrgics per PCB 138 de manera perllongada ja ha estat documentat prèviament en cultius de cèl·lules granulars de cerebel (Llansola et al. 2010), mentre que l'estudi en neurones corticals no ha estat encara realitzat. Degut a que aquesta

tesi va enfocada principalment als efectes dels contaminants al neurodesenvolupament s'ha cercat un model cel·lular que s'aproximés al màxim a aquesta situació. En l'estudi en cultius primaris de neurones corticals (CTX) s'exposen les neurones durant tot el període de maduració, del dia 2 al dia 7. Als 7 dies les neurones són considerades madures en rates (Luhmann & Prince 1991, Yuste & Katz 1991, Inglefield & Shafer 2000a) així com en cultius, expressant receptors glutamatèrgics i GABAèrgics (Frandsen & Schousboe 1990, Segal 1993, Inglefield & Shafer 2000a, Briz 2011). S'ha demostrat en altres estudis que els cultius de neurones corticals immadures (2 DIV) són més susceptibles als efectes citotòxics produïts pel lindà (així com pels organoclorats dieldrín i endosulfan) que les neurones madures (6 DIV) (Briz 2011). Cal tenir present que les corrents excitadores postsinàptiques induïdes per NMDA són més prolongades en la infància que en l'edat adulta, doncs els receptors contenen majoritàriament la subunitat NR2B (Hestrin 1992, Galvan et al. 2003).

Per altre banda, la línia cel·lular humana de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciada amb àcid retinoïc (10  $\mu$ M) durant 7 DIV també va demostrar en diferents estudis ser un bon model per als estudis de mecanismes involucrats en l'expressió de gens/proteïnes dopaminèrgiques, i en mecanismes involucrats en la malaltia de Parkinson (Larouche et al. 2008, Lopes et al. 2010, Wernicke et al. 2010, Xie et al. 2010, Ham et al. 2012). Apart de l'estudi en paràmetres del sistema dopaminèrgic, també s'ha utilitzat aquest model per estudis de toxicitat sobre receptors glutamatèrgics de NMDA (Singh & Kaur 2005, Ndounste & Chan 2008, 2009), i altres paràmetres tals com la captació de noradrenalina o l'activitat de l'acetilcolinesterasa davant l'exposició a diferents tòxics, entre ells el lindà (Gustafsson et al. 2010).

Tant el PCB 138 com el  $\beta$ -HCH són compostos altament persistents i per aquest motiu avui en dia es troben presents en la majoria de mostres humanes analitzades en diferents estudis (Carrizo et al. 2007, Tanabe & Kunisue 2007, Herrero-Mercado et al. 2010, Llop et al. 2010, Shakeel et al. 2010, Rudge et al. 2012, Arrebola et al. 2012). Les concentracions en sang de cordó umbilical detectades a diferents cohorts espanyoles del projecte INMA (València, Sabadell, Guipúscoa, Menorca) mostren uns nivells mitjans de  $\beta$ -HCH i de PCB 138 de 15-98 ng/g i 19-60 ng/g respectivament (en sang de cordó umbilical ajustats per lípids) (Alvarez-Predrerol et al. 2009, Llop et al. 2010, Vizcaino et al. 2011). En canvi, el lindà és un compost que es degrada molt abans i per aquest motiu actualment a moltes cohorts ja no es detecta aquest organoclorat (Llop et al. 2010, Vizcaino et al. 2011). Les regulacions aplicades a les emissions de hexaclorociclohexà es veuen reflectides en la disminució dels nivells de  $\gamma$ -HCH i  $\beta$ -

HCH a diferents matrius humanes (Porta et al. 2008, Linderholm et al. 2010). Tot i això, encara hi ha llocs on es troba lindà en la població, doncs tot i la inclusió recent d'aquests composts en les restriccions imposades pel Conveni d'Estocolm, fins fa poc el seu ús com a pesticida era limitadament permès en molts països, i actualment encara és permès el seu ús com a fàrmac de segona línia per a la pediculosi i la sarna. Per exemple, l'estudi en una cohort del Sud d'Espanya va mostrar com el 74% de les placentes contenien lindà (Lopez-Espinosa et al. 2007). A nivell global destaquen les concentracions en llet materna de la mescla d'isòmers  $\gamma$ ,  $\beta$  i  $\alpha$  d'HCH a la Xina i la Índia, amb valors de 1400 i 640 ng/g lípids respectivament (Kunisue et al. 2002, Kunisue et al. 2004, Tanabé & Kunisue 2007), i a comunitats de Mèxic, amb una mitjana de 3947 ng/g en sang (ajustat per lípids) en un estudi realitzat a infants (Trejo-Acevedo et al. 2009). Cal recordar a més, que hi ha una generació de persones que van ser exposades prenatalment en el moment de màxima producció d'aquests compostos (entre els anys 1970 i 1990; Breivik et al. 2002, Vijgen et al. 2011) i que actualment poden estar-ne patint les conseqüències, des que diferents estudis mostren que les alteracions en el desenvolupament prenatal degudes a neurotòxics poden estar vinculades a l'aparició de malalties en l'edat adulta (Fox et al. 2012).

L'estudi de Tusell et al. (1987) mostra com la relació de concentracions sang/cervell de lindà en rates és de 1:5. Els nivells de lindà i de PCB 138 trobats en cervells humans *postmortem* oscil·len entre 0.1-0.5  $\mu\text{g/g}$  de lípids i 0.04-0.11  $\mu\text{g/g}$  de lípids respectivament (Corrigan et al. 1998, 2000). Si tenim en compte que la proporció de lípids al cervell humà és del 6% en teixit humit (Chavko et al. 1993) podem fer una estimació de la quantitat present al cervell que seria d'uns 0.02-0.1  $\mu\text{M}$  pel lindà i 0.007-0.02  $\mu\text{M}$  pel PCB 138. Cal tenir en compte que als estudis amb cultius neuronals, només un 10% del lindà és incorporat a l'interior de la neurona cortical als 6 DIV i que la quantitat de lindà present al medi extracel·lular es redueix unes 100 vegades als 6 DIV (Briz 2011). Per tant, si la concentració afegida al medi extracel·lular de lindà és de 10  $\mu\text{M}$ , als 6 DIV aquesta quantitat equivaldrà a 0.1  $\mu\text{M}$  aproximadament, valors més pròxims als trobats en cervell.

L'estudi de Briz (2011) mostrava com l'acció citotòxica del lindà en cultius de CTX durant 6 DIV (del dia 2 al 6) tenia una LC50 de  $39.5 \pm 2.0 \mu\text{M}$ . Tot reproduint l'abans citat estudi, un assaig realitzat per quadruplicat a aquesta tesi va donar una LC50 de 24  $\mu\text{M}$ , valor similar a l'obtingut en el treball de Briz 2011. Per altre banda, la LC50 del PCB 138 i del  $\beta$ -HCH va ser major ( $43.9 \pm 11.5 \mu\text{M}$  i  $> 100 \mu\text{M}$ ). Els diferents contaminants donaven diferents perfils de citotoxicitat: així



com per exemple es va observar mort neuronal a partir dels 30  $\mu\text{M}$  de PCB 138 i de  $\gamma$ -HCH (amb un  $\sim 30\%$  i un  $\sim 70\%$  de mort respectivament), el  $\beta$ -HCH produïa mort cel·lular a partir de 3  $\mu\text{M}$ , tot i que només a un  $\sim 20\%$  de les cèl·lules, i a 100  $\mu\text{M}$  només produïa el  $\sim 30\%$  de mort. El PCB 138 va donar una perfil de mort semblant que al de l'estudi de Llansola et al. 2010 realitzat amb neurones granulars de cerebel durant 11-14 DIV, on la LC50 va ser de 31  $\mu\text{M}$ ; tots dos treballs mostren com a 100  $\mu\text{M}$  només sobreviuen el 10% de les neurones. Tot i això al treball de Llansola et al. (2010) començaven a veure mort a 0.3  $\mu\text{M}$ , tot i que només a un  $\sim 10\%$  de les cèl·lules respecte el control. Aquesta diferència pot ser deguda al major temps d'exposició, o a la diferent susceptibilitat dels cultius granulars de cerebel. L'estudi de Briz (2011) va mostrar que les cèl·lules granulars de cerebel eren més sensibles als efectes citotòxics del lindà que les corticals ( $p < 0.05$ ). Aquest fet es pot deure al major nombre de neurones glutamatèrgiques en les cèl·lules granulars de cerebel, i al possible efecte excitotòxic dels contaminants.

En canvi, les cèl·lules SH-SY5Y van mostrar ser més resistents als efectes citotòxics del lindà, on l'exposició durant 6 DIV a 30  $\mu\text{M}$  donava un 20% de mort en comparació al  $> 50\%$  de mort observat en les neurones corticals. Aquets menor efecte citotòxic del lindà també es va demostrar en cèl·lules dopaminèrgiques N27, on es va observar mort a partir de 50  $\mu\text{M}$  a les 48h a un 10% de les cèl·lules (Sharma et al. 2010). En canvi, el PCB 138 va induir un perfil de mort semblant en les SH-SY5Y i les neurones corticals, doncs aproximadament a 50  $\mu\text{M}$  s'obtenia una 50% de la mort, i a 100  $\mu\text{M}$  tots dos tipus cel·lulars presentaven  $> 80\%$  de mort.

El transport de glutamat a concentracions subcitotòxiques de PCB 138,  $\beta$ -HCH no es va veure alterat en els cultius primaris de neurones corticals. Al treball realitzat a la primera part amb homogenats de membrana de placenta es va observar la inhibició parcial de la unió d' $[^3\text{H}]$ -aspartat al transportador de glutamat per part del PCB 138 i del  $\beta$ -HCH a concentracions baixes de contaminant; Mariussen i Fonnum (2001) també van demostrar que hi havia inhibició parcial de la captació d' $[^3\text{H}]$ -glutamat quan s'exposava directament a diversos congèneres de PCB. Cal tenir en compte que als assaigs *in vitro*, es mesurava la captació d' $[^3\text{H}]$ -aspartat en cultius exposats prèviament als contaminants durant 6 DIV, però no es mesurava la inhibició que podria venir donada per competició directa, com en el cas de la placenta. Una possible justificació és que la inhibició parcial competitiva observada per Mariussen & Fonnum (2001) o per nosaltres en la placenta, no impulsaria una modificació del transport (ni en l'expressió, ni en l'activitat) quan es dut a terme perllongadament en el temps, i per aquest motiu no

observaríem diferències. El lindà ( $\gamma$ -HCH) en exposició aguda tampoc inhibia la captació de glutamat en cultius primaris de CGC (Galofré et al. 2010). Per altre banda, no està clara la presència de transportadors en els cultius de CTX amb els que hem treballat, i per tant no podem dir que la manca d'efecte no sigui deguda a una manca de la seva expressió. El treball de Chen & Swanson (2003) descriu la presència de transportadors EAAT 2 i 3 en cultius de neurones corticals, tot i que el treball de Gegelashvili et al. 1997 mostra com els nivells d'EAAT 2 són bastant baixos i més quan s'inhibeix la proliferació astrogial amb citosin-arabinosida. En aquest treball, el dihidrokainat (DHK) (inhibidor del transportador glial de glutamat GLT-1) no va donar inhibició de la unió d' $[^3\text{H}]$ -aspartat en cultius primaris de neurones corticals (resultat no mostrat) fet que ens fa pensar que el nostre sistema de cultius no expressava GLT-1 (EAAT2). Altres cultius neuronals serien probablement més adequats alhora d'estudiar el transport de glutamat, com ara una mescla de cultius neuronals de granulars de cerebel (CGC) que contenen transportador de glutamat EAAT3 (Fonfría et al. 2005), i d'astròcits, que contenen transportadors EAAT1 i EAAT2 (Gegelashvili et al. 1997, Briz & Suñol 2011).

L'exposició aguda a lindà (100  $\mu\text{M}$ ) va augmentar significativament el senyal de calci intracel·lular; per altre banda, l'exposició aguda a PCB 138 (50  $\mu\text{M}$ ), tot i que no significativament, també va augmentar aquest senyal. Aquest fet ens està dient que els receptors d'NMDA augmenten la seva funcionalitat davant la presència de lindà i de PCB 138. A la vegada aquest augment va comportar un augment significatiu de la EC50 d'NMDA. L'augment de calci induït per NMDA davant l'exposició aguda de PCBs no coplanars, com el PCB 138, havia estat prèviament descrit (Inglefield & Shafer 2000a, 2000b, Gafni et al. 2004). L'increment de calci induït per PCB no coplanars para-substituïts (com el PCB 138) ha estat també vinculat a una activació dels receptors de rianodina (RyR) (receptors que indueixen l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  en el reticle endoplasmàtic) i dels canals dependents de voltatge (VDCC)(Kodavanti et al. 1993, Inglefield & Shafer 2000a, 2000b, Gafni et al. 2004, Pessah et al. 2010). Cal tenir en compte que el senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  mediat per NMDA és amplificat per l'alliberament de calci per canals dependents de voltatge (VDCC) i canals de compartimentació de calci (SOCC, *storage-operated calcium channels*) acoblats al complex RyR/FKBP12 (FK506 binding protein 12 kDa)(Chavis et al. 1996, Qiu et al. 1998, Netzeband et al. 1999, Gafni et al. 2004). L'estudi de Gafni et al. (2004) en cèl·lules granulars de cerebel de ratolí incubades amb PCB 95 (no-coplanar) durant 20 minuts van demostrar que existia un augment del senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  induït per NMDA i AMPA, millorant la resposta als agonistes. Apart, també va demostrar com existia un augment de l'activació dels receptors de rianodina (RyR) (ja que la cafeïna

(agonista de RyR) en presència de PCB 95 va donar major resposta). Gafni et al. (2004) suggereix que l'increment del senyal de calci mediat pel receptor de NMDA és degut a una modificació del complex RyR/FKBP12 que resultaria en una amplificació del senyal glutamatèrgic (Gafni et al. 2004, Pessah et al. 2010). Els estudis en neurones corticals de ratolí (Inglefield et al. 2000a, 2000b) també van mostrar que l'aroclor 1254 i el PCB 138 (a exposicions d'entre 20 minuts i 1h, a 1-20  $\mu$ M segons el treball) augmentaven les oscil·lacions de calci, degut a l'activació del receptor de NMDA (doncs eren bloquejades amb antagonistes AP-5 (*D-2-amino-5-fos-fonopentanoic acid*) i NBQX (*2,3-dihidroxi-6,7-dinitroquinoxaline*)) i de VDCC (tipus-L) (doncs l'adició de tetrodoxina o nifedipina les bloquejava). Per altre banda, l'augment de calci intracel·lular per exposició a lindà també havia estat anteriorment observat en cultius de cèl·lules glutamatèrgiques de CGC (Rosa et al. 1997) i en cèl·lules SH-SY5Y (Joy & Burns 1988)). L'atenuació dels efectes convulsionants produïts pel lindà amb antagonistes del receptor d'NMDA i AMPA també mostra la influència de l'organoclorat en l'activació de receptors glutamatèrgics (Tusell et al. 1992, Blaszcak & Turski 1998, Hrncić et al. 2009). Aquest efecte pot ser degut a la hiperexcitabilitat induïda pel bloqueig dels receptors de GABA inhibidors (Pomés et al 1994). Apart, antagonistes dels canals de calci voltatge-depenent (com la nifedipina o el verapimil) també van demostrar tenir un efecte antagonista sobre les convulsions induïdes pel lindà (Tusell et al. 1992, Vendrell et al. 1992) o l'augment de calci intracel·lular en neurones CGC (Rosa et al. 1997); en aquest últim treball també es va demostrar que l'augment de calci era atenuat davant l'adició de *dantrolene*, fàrmac que s'havia mostrat en neurones corticals prevenir l'alliberació de calci en els compartiments interns cel·lulars. Tot i això, Rosa et al. (1997b) va demostrar que la inhibició de l'alliberació de calci en compartiments interns no era per unió directa del lindà al receptor de RyR (ja que no inhibia la unió d' $[^3\text{H}]$ rianodina). Per tant, l'augment de calci (induït per NMDA) davant l'exposició aguda a PCB 138 respecte el control concorda amb els diferents estudis que demostren com els PCBs no coplanars augmenten el calci intracel·lular a través de l'activació de NMDAR, així com l'acció conjunta de VDCC tipus-L i complexos RyR/FKBP12. A la vegada, l'augment del senyal de calci intracel·lular induït per NMDA davant l'exposició aguda a  $\gamma$ -HCH respecte el control, també pot donar altres explicacions als ara citats estudis, també amb una vinculació als VDCC tipus-L i als compartiments interns de calci.

L'exposició a PCB 138 i  $\gamma$ -HCH durant 6 DIV a concentracions subtòxiques (0.1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M) també va modificar significativament la corba d'increment de calci induït per NMDA, augmentant-la; tot i que l'EC50 i l'Emax de la corba no van canviar significativament respecte

el control, la EC50 va mostrar una tendència a disminuir, suggerint un lleuger augment de la funcionalitat del receptor NMDA. Llansola et al. 2010 també va determinar el senyal de calci, tant basal com induït per NMDA, en cèl·lules (de CGC) exposades a diferents concentracions sub tòxiques de PCB 138 durant 11-14 DIV, i on va veure que les alteracions no eren dosi-dependents. A concentracions de 0.001 i 0.01  $\mu\text{M}$  van observar una disminució del senyal de calci induït per NMDA respecte el control, i a 0.1  $\mu\text{M}$  i 1  $\mu\text{M}$  no van observar canvi. De la mateixa manera el  $\text{Ca}^{2+}$  basal en un medi lliure de  $\text{Mg}^{2+}$  només va disminuir a concentracions de 0.001  $\mu\text{M}$  i va augmentar significativament a concentracions de 1  $\mu\text{M}$ . Els resultats de Llansola et al. (2010) ens reforcen els propis resultats, on observem l'acció del PCB 138 sobre els receptors de NMDA de manera perllongada, tot i que en funció de les concentracions l'efecte és diferent.

Finalment, l'exposició durant 6 DIV a 0.1  $\mu\text{M}$  de PCB 138 i a 10  $\mu\text{M}$  de  $\gamma$ -HCH va disminuir l'expressió de NR1 un 40% aproximadament. Hem estudiat la subunitat NR1 perquè és la que es troba present a tots els receptors d'NMDA. Es podria pensar (no demostrat aquí) que degut a l'increment de la funcionalitat davant de PCB 138 i  $\gamma$ -HCH observat en exposició prolongada, hi hagués una disminució de l'expressió de la subunitat NR1 de NMDAR com a mecanisme de protecció a l'augment de senyal. La compensació a través de l'expressió gènica en funció de l'activitat és quelcom bastament descrit. Per exemple, en períodes crònics d'hiperexcitabilitat es dona una reducció de l'expressió de la subunitat GluR1 d'AMPA (O'Brien et al. 1998). De manera contrària, una disminució de l'activitat glutamatèrgica pot induir a un augment de l'expressió dels receptors d'AMPA i NMDA per a millorar la sensibilitat de les neurones al glutamat (Rao & Craig 1997, Turrigiano et al. 1998, Galvan et al. 2003). O bé, la inhibició dels receptor  $\text{GABA}_A$  pot provocar la disminució de l'expressió de subunitats d'NMDA i AMPA durant el desenvolupament (Swann et al. 2007), o la internalització del receptor d'NMDA (Briz et al. 2010, Briz et al. 2012).

Altmann et al. (2001), en concordança amb els resultats obtinguts aquí, van observar una disminució de l'expressió de NMDAR (a través la disminució de la  $B_{\text{max}}$  d' $[\text{H}^3]$ -MK-801) en talls de còrtex visual de cries de ratolí alimentades amb una mescla de PCBs que reproduïa el perfil de congèneres de la llet materna. En canvi, a l'hipocamp no van veure reducció de NMDAR. L'estudi de Takahashi et al. (2009) també va mostrar l'alteració de l'expressió de mRNA de diferents tipus i subtipus de receptors glutamatèrgics en funció de la regió del cervell exposada pre-natalment i perllongadament a un metabòlit hidroxilat de PCB. En el còrtex en concret, van

observar una disminució significativa de NR2B i mGLUR7, i una tendència a disminuir de NR1. L'exposició *in vivo* lactacional i postnatal a A1254 també va provocar una disminució del receptor NMDA en el còrtex frontal, cingulat i motor així com altres àrees del cervell (Tian et al. 2011). Tot i això, altres estudis en altres tipus cel·lulars o regions del cervell demostren un augment de NR1 davant l'exposició a PCBs, com el de Ndounste & Chan (2009) que veuen que l'exposició durant 24h a PCB 99 o a aroclor A1254 (a concentracions de 10 i 25  $\mu\text{M}$ ) en cultius SH-5YSY va provocar un augment dels llocs d'unió d'[H<sup>3</sup>]-MK-801. Llansola et al. (2010) també van observar un augment de la expressió de NR1 i NR2C en cultius de CGC a partir de concentracions de 0.001  $\mu\text{M}$  i 0.0001  $\mu\text{M}$  (durant 11-14 DIV) de PCB 138 respectivament. Per altre banda, un altre estudi d'aquest mateix grup va demostrar una disminució de l'expressió de NR1 en cerebels de rata exposades a PCB 138, associada a una disminució de la via glutamat-NO-cGMP activada per NMDA i vinculada a una disminució de l'aprenentatge (Boix et al. 2010). Així doncs els diferents treballs citats reforcen la incidència dels PCB i el lindà en la expressió de NMDA, i mostren que la resposta als PCB no-coplanars varia en funció del tipus cel·lular i el congènere; mentre als cultius granulars de cerebel es sol observar un augment de l'expressió (Ndounste & Chan 2009, Llansola et al. 2010), al còrtex cerebral a tendència és a disminuir (Altmann et al. 2001, Takahashi et al. 2009, Tian et al. 2011, aquest treball). El fet que les cèl·lules de CTX continguin neurones GABAèrgiques, mentre que les granulars no, podria donar explicació als diferents resultats observats entre CTX i CGC. En canvi, no hi ha estudis que determinin l'expressió dels receptors glutamatèrgics d'NMDA en funció de l'exposició a lindà; mencionar que s'ha demostrat que mGluR 1 i 5 disminueixen la seva expressió proteica en neurones corticals exposades a lindà en les mateixes condicions que les nostres, però no en cèl·lules granulars de cerebel (Briz 2011), i aquest fet és vinculat al paper del lindà en el receptor GABA<sub>A</sub>, que actua i té efectes semblants als de la picrotoxina. Tant els PCBs com el  $\gamma$ -HCH han mostrat actuar sobre els receptors GABAèrgics (Pomés et al. 1994, Vale et al. 1998a, Inglefield & Shafer 2000a, 2000b, Antunes Fernandes et al. 2010). Els receptors de GABA<sub>A</sub> presents durant el procés de maduració dels 2 als 5 DIV en neurones corticals estimulen l'entrada de Ca<sup>2+</sup> (activant els canals de calci a VDCC tipus L) i a partir del 6 DIV només l'entrada de Cl<sup>-</sup> (Inglefield & Shafer 2000a). El neurotransmissor GABA és el primer neurotransmissor excitatori en neonats (Cherubini et al. 1991). L'increment de Ca<sup>2+</sup> induït per muscimol, activant receptors de GABA<sub>A</sub>, en neurones corticals immadures (<6 DIV) és inhibït per A1254 i per PCB 138 (10  $\mu\text{M}$  durant 1 hora) (Inglefield & Shafer 2000a). A la vegada, A1254/PCB 138 augmenten les oscil·lacions de calci intracel·lular en neurones corticals immadures degut a la interacció amb el receptor GABA<sub>A</sub>, ja que s'inhibeixen davant l'exposició

a bicuculina (Inglefield & Shafer 2000b). Si tenim en compte la interrelació existent entre GABA i glutamat (Briz et al. 2010, Babot et al. 2007), l'alteració prolongada d'aquests receptors podria modificar l'expressió/funcionalitat/composició dels receptors de glutamat. Sabent que el lindà en cultius de CTX actua principalment en el receptor GABA<sub>A</sub> (Pomés et al. 1994, Vale et al. 1998a), i sabent que el PCB també ho fa, podríem especular que la disminució de NR1 observada és deguda a un mecanisme compensatori als efectes sobre el receptor GABA, de manera semblant al cas del dieldrín, on s'observa internalització de NR1 i disminució de l'expressió en membrana de NR1 i NR2B (Briz et al. 2010, Briz et al. 2012). El perquè no observem una disminució en la corba de calci en relació a la disminució de NR1 pot ser degut a l'efecte compensatori mencionat, on la major funcionalitat es veu compensada per la disminució del receptor.

En canvi, el senyal de calci induït per kainat no es va veure alterat davant l'exposició, ni aguda ni perllongada dels contaminants (PCB 138 i lindà), indicant-nos que aquests agents no actuen sobre aquest receptor. Cal mencionar, que tot i no significatiu, observem la tendència del lindà a augmentar el senyal de calci induït per kainat i DHPG, per aquest motiu, és possible que la corba de calci provocada per glutamat augmenti significativament en presència de lindà a concentracions subtòxiques, si bé la EC50 o la Emax no es veuen alterades significativament.

Finalment, l'exposició a PCB 138 (0.1 µM) com a γ-HCH (10 µM) durant 6 DIV no va generar un increment de l'excitotoxicitat induïda per glutamat o NMDA, en els assajos de viabilitat, on s'exposaven simultàniament als contaminants organoclorats (durant 6 DIV) i l'NMDA/glutamat (24h). Això es justifica perquè l'augment de calci intracel·lular induït per NMDA davant l'exposició a PCB 138 o a γ-HCH durant 6 DIV en relació al control no va ser molt elevada, i a la vegada, la disminució de NR1 implicaria una menor entrada de calci per part dels receptors de NMDA.

Els nostres resultats mostren com l'exposició prolongada als organoclorats PCB 138 i lindà augmenten lleugerament la funció dels receptors d'NMDA a neurones corticals; a la vegada mostren una disminució d'NR1 davant l'exposició perllongada als contaminants, que implicaria una compensació dels efectes anteriors. Aquest fet es reforça al no augmentar ni disminuir l'excitotoxicitat generada per glutamat i/o NMDA en cultius exposats perllongadament a PCB 138 i γ-HCH. El senyal de calci durant el neurodesenvolupament és important en processos com la migració i la supervivència neuronal, la síntesi i l'alliberament de factors de creixement,

i el creixement de neurites (Gu & Spitzer 1997). El desequilibri excitatori/inhibitori (com la generació d'hiperexcitabilitat pel trencament de la inhibició mediada per GABA<sub>A</sub> i l'activació mediada per NMDAR) s'ha descrit en malformacions en el desenvolupament del còrtex cerebral associant-se a alteracions neurològiques i síndromes epilèptics (Schmidt et al. 2006). De la mateixa manera, la declinació de la funció cognitiva i de la memòria en l'hipocamp relacionades amb l'edat ha estat vinculada a la senescència de les regulacions de calci i la funció alterada de NMDAR, VDCC i RyR lligada als compartiments de calci (Foster 2012). Tant el PCB 138 com el lindà han mostrat en aquest treball incidir en el receptor d'NMDA, tant en la seva funcionalitat com la seva expressió, i tot i l'efecte compensatori observat, poden tenir un efecte en el neurodesenvolupament humà, que pot augmentar quan existeixen altres variables, com l'exposició conjunta a altres contaminants.

En la tercera part vam observar com el lindà disminuïa significativament l'expressió de mRNA i proteica tant de VMAT2 com de les isoformes L i S de DRD2 en cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y. L'exposició als contaminants estudiats, lindà i PCB 138 es va realitzar durant el període de diferenciació cel·lular per tal de mimetitzar el període del neurodesenvolupament (Wernicke et al. 2010). L'expressió de DAT no es va aconseguir detectar en aquest tipus cel·lular, com passa a altres estudis que observen la limitació de mesurar l'expressió de mRNA per a DAT en cèl·lules SH-SY5Y diferenciades únicament amb àcid retinoïc, així com la seva expressió proteica, que és semblant que en les de cèl·lules sense diferenciar (Cheung et al. 2009, Wernicke et al. 2010).

L'expressió de mRNA per VMAT2 i DRD2 davant l'exposició de PCB 138 no es va veure alterada. Aquests resultats van ser confirmats amb la manca de variació d'aminoàcids observada al medi extracel·lular. Diferents estudis apunten a l'acció de certs PCB en la inhibició de VMAT2 i DAT, l'acció dels quals trencaria l'homeòstasi de la dopamina i generaria el posterior estrès oxidatiu (Bemis & Seegal 2004, Richardson & Miller 2004, Caudle et al. 2006, Lyng et al. 2007, Fonnum & Mariussen 2009). Ara bé, cap d'aquests treballs va utilitzar PCB 138, sinó que la majoria van utilitzar una mescla d'aroclor A1254. En canvi, l'únic treball realitzat específicament amb PCB 138 sobre el sistema dopaminèrgic va mostrar que aquest no alterava els nivells basals de DA directament en el nucli acumbens de rates, però sí que ho feia indirectament, quan s'activava mGluR I per DHPG; aquest estudi va mostrar que l'acció del PCB 138 sobre el sistema dopaminèrgic era via receptors metabotràpics glutamatèrgics i dependent del sexe del ratolí (a diferència d'altres congèneres) (Boix et al. 2011). Un altre estudi en que es realitzava una

exposició *in vivo* en ratolins de manera lactacional i post-natal de la mescla de PCBs A1254 mostrava que no hi havia canvis en l'expressió de D1, D2 ni DAT en l'estriat (Tian et al. 2011). En aquest sentit podria ser interessant observar l'efecte de PCB 138 sobre el sistema dopaminèrgic un cop activats els receptors de NMDA, els quals també interactuen amb els receptors dopaminèrgics (Keefe et al. 1992, Tomita et al. 1995, Segovia et al. 1997).

Pocs estudis hi ha realitzats sobre els mecanismes de toxicitat dopaminèrgics del lindà en comparació a altres contaminants. La majoria dels estudis sobre els efectes del lindà (en exposició aguda o crònica) en el sistema dopaminèrgic han estat realitzats "in vivo", on han estat mesurats els nivells de DA i DOPAC a diferents àrees del cervell, així com les alteracions en l'activitat locomotora en relació al pesticida (Suñol et al. 1988, Llorens et al. 1991, Ortiz Martinez & Martinez-Conde 1995, Rivera et al. 1998, Faro et al. 2009). El lindà ha mostrat sobradament en tots ells alterar els nivells de DA, i de manera diferent segons les diferents condicions (la freqüència, concentració, àrea del cervell, etc.).

Les cèl·lules exposades durant 6 DIV a diferents concentracions de  $\gamma$ -HCH van disminuir significativament l'expressió de mRNA de VMAT2, de DRD2L, de DRD2s, seguint un patró dosi-resposta. Aquesta disminució de l'expressió gènica es va veure reflectida en una disminució significativa dels nivells de les corresponents proteïnes de VMAT2 i del receptor DRD2.

La funció de VMAT2 en emmagatzemar la DA citosòlica lliure és clau per evitar la formació d'espècies oxidatives. L'estudi de Vergo et al. (2007) demostra que en cultius de cèl·lules dopaminèrgiques PC12 *Knock Down* de VMAT2 (és a dir, cultius on s'indueix una disminució de l'expressió del mRNA que codifica VMAT2) hi havia una disminució dels nivells basals de dopamina al medi i dels nivells de dopamina un cop s'havia induït l'alliberació de les vesícules de dopamina amb KCl (disminució del 50-70%), però en canvi, hi havia un augment dels nivells de DA lliures al citosol. En canvi, quan la VMAT2 és sobreexpressada s'observa l'efecte contrari, havent-hi un augment dels nivells de DA provinents dels compartiments vesiculars. Per tant, podríem especular que la disminució de l'expressió de VMAT2 pot induir a l'acumulació de DA lliure citosòlica. La VMAT2 manté baixos els nivells de DA en el citosol i prevé de la toxicitat induïda per DA lliure. La DA lliure a nivell citosòlic és altament susceptible a l'oxidació, formant-se adductes de 5-cysteinyl-dopamina (dopamines-quinones tòxiques) que augmenten la producció d'estrès oxidatiu depenent de dopamina, i acaben generant inhibició de la respiració mitocondrial i mort cel·lular (Ben-Shachar et al. 1995, Hastings et al. 1996). A la



vegada, l'augment de dopamina lliure citosòlica, inhibeix l'activitat E3 ligasa de la *parkina* (un proteïna protectora de l'estrès oxidatiu) (Barzilai et al. 2001, Conway et al. 2001, Asanuma et al. 2003, Lavoie & Hastings 2005, Vergo et al. 2007). Baixos nivells de VMAT2 en ratolí han demostrat generar degeneració nigroestriatal, i la inhibició de VMAT2 també augmenta la susceptibilitat de la DA a induir neurotoxicitat (Miller et al. 1999). En aquest sentit, el lindà juntament amb el dieldrín han mostrat augmentar el nombre d'espècies oxidatives en cèl·lules dopaminèrgiques de rata N27, així com els nivells de caspasa 3/7 i el pretractament amb l'antioxidant N-acetylcisteïna bloquejava els efectes dels dos organoclorats en quant a la producció de radicals lliures en les neurones dopaminèrgiques (Sharma et al. 2010).

S'ha suggerit que VMAT2 és la primera diana de la malaltia de Parkinson (en un estudi realitzat amb primats no-humans administrats amb la toxina MPTP (toxina inductora de parkinsonisme) de manera crònica, on demostren que la primera resposta asimptomàtica de parkinsonisme és la pèrdua selectiva de VMAT2 a l'estriat (Chen et al. 2008). La desregulació de l'homeòstasi de la DA i la producció d'estrès oxidatiu depenent de DA en la substància negra són fets clau en el desenvolupament de la malaltia de Parkinson (Miller et al. 1997, Jenner 2003, Caudle et al. 2007, Vergo et al. 2007). Els primers signes clínics aparents de la malaltia de Parkinson (MP) apareixen quan hi ha hagut el 70-80% de pèrdua de les neurones dopaminèrgiques (Schapira 1999). El parkinsonisme és el conjunt de signes i símptomes de la malaltia de Parkinson caracteritzats per un tremolor progressiu, bradicinèsia, rigidesa, i inestabilitat postural (Brown et al. 2006). Aquesta malaltia afecta a un 2% de la població major de 60 anys i més d'un milió de persones als EEUU (Edwards & Myers 2007, Lopes et al. 2010). La majoria dels casos de la MP són esporàdics, mentre que el 5-10% es deu a una mutació hereditària en els gens DJ-1, *parkin* i PINK1. La proteïna DJ-1, apart de regular nombroses cascades de senyals i actuar com a reguladora transcripcional, juga un paper clau en la transcripció de VMAT2, interactuant directament sobre ella (Ishikawa et al. 2012). En un altre estudi ocupacional en àrees on els treballadors s'exposaven a fums de soldadures (que contenen manganès i alumini) Sriram et al. (2010) van observar un increment de la malaltia de Parkinson vinculat a una *down-regulation* del mRNA dels gens que codifiquen del receptor de dopamina DRD2 (30-40%) i de la VMAT2 (33-55%) al mesencèfal, com també hem observat en aquest treball.

L'etiologia d'aquesta malaltia és avui en dia encara poc coneguda (Pedro-Cuesta et al. 2009), i l'exposició a pesticides s'ha pensat que és un dels possibles causants, tot i no poder-se

considerar com a única causa. Diferents estudis plantegen, qüestionen i demostren el paper d'aquests agents (insecticides, herbicides, fungicides...) en l'aparició de parkinsonisme (revisió: Brown et al. 2006): en estudis en autòpsies de cervell *postmortem* de persones que havien tingut la malaltia de Parkinson s'hi va observar uns nivells significatius majors de lindà, de dieldrín i de PCB153 (Fleming et al. 1994, Corrigan et al. 1998, 2000.). Altres estudis de casos-control també van demostrar una forta associació entre l'exposició a insecticides i herbicides (però no fungicides) en el desenvolupament de la malaltia de Parkinson, vinculada a l'exposició ocupacional en ambients rurals (Butterfield et al. 1993, Semchuk & Love 1995, Gorell et al. 1998). L'estudi de Richardson et al. 2009 també va demostrar com el  $\beta$ -HCH en sèrum era significativament major en pacients diagnosticats amb MP. Un altre estudi recent (Pedro-cuesta et al. 2009) va mostrar la forta associació geogràfica de la malaltia a Espanya, on les regions de Tarragona, Osca, el País Basc i Astúries són les més afectades per aquesta malaltia; aquest fet és va vincular als elevats nivells de tòxics alliberats per indústries que es trobaven en aquestes regions. L'etiologia de la malaltia s'ha relacionat també amb els canvis en la regulació gènica induïda ambientalment (Edwards & Myers 2007). L'estudi de l'expressió gènica per a determinar de manera més específica i quantitativa quins són els efectes de certs tòxics quan es troben a concentracions baixes està sent recentment utilitzat (Padhi et al. 2007, Hogberg et al. 2010). En aquest sentit, l'estudi toxicològic a nivell genètic permet anar més enllà d'entendre l'acció mecànica d'un tòxic, caracteritzant els gens que es veuen directament afectats pel tòxic o indirectament, com a resposta adaptativa de l'insult xenobiòtic (Pennie et al. 2001).

En aquest treball observem una disminució de l'expressió de VMAT2 i DRD2 com l'observada en l'aparició dels primers signes de la malaltia de Parkinson; les cèl·lules SH-SY5Y s'han caracteritzat com a bon model per a l'estudi d'aquesta malaltia (Larouche et al. 2008, Lopes et al. 2010, Wernicke et al. 2010, Xie et al. 2010, Ham et al. 2012), ja que contenen diferents indicadors dels sistema dopaminèrgic que permeten esbrinar els diferents mecanismes que s'hi veuen involucrats. Part dels mecanismes de toxicitat del lindà en el sistema dopaminèrgic observats aquí es poden relacionar amb els observats en aquesta malaltia, i permeten justificar millor els resultats observats a nivell epidemiològic. Cal dir, però, que en el model utilitzat s'ha estudiat l'exposició al lindà en el procés de diferenciació (model probablement més adequat per a descriure el neurodesenvolupament); tot i que les alteracions observades en el neurodesenvolupament poden afectar a l'edat adulta (Fox et al. 2012). Seria interessant

observar si la disminució de VMAT2 observada en les nostres cèl·lules comporta augment de la DA citosòlica, nivells d'espècies oxidatives o agregats d' $\alpha$ -sinucleïna.

Apart de la malaltia de Parkinson, nombroses malalties i/o trastorns han estat vinculats a un mal funcionament del sistema dopaminèrgic, el qual s'ha descrit com el sistema de neurotransmissió més implicat en desordres neurològics i psiquiàtrics (distonia, síndrome de la Tourette, esquizofrènia, l'addicció a drogues, trastorns d'hiperactivitat i dèficit d'atenció (THDA), depressió, ansietat, trastorn obsessiu-compulsiu, deliris, etc.) (Chen & Zhuang 2003, Nikolaus et al. 2009, Kelley et al. 2011). Les variacions genètiques que afecten les funcions de transportadors i receptors dopaminèrgics són importants en aquests trastorns, i la interacció amb factors ambientals cada cop està sent més vinculada a aquestes disfuncions (Thapar et al. 2005). Apart, com el sistema dopaminèrgic comparteix molts mecanismes amb altres sistemes monoaminèrgics, les disfuncions en aquest poden afectar també al sistema adrenèrgic i serotoninèrgic (Chen & Zhuang 2003). L'alteració del receptor DRD2 en concret ha estat vinculada a la modulació del sistema de recompensa i de processos emocionals (Peciña et al. 2012), i a un elevat nombre de trastorns neuropsiquiàtrics, com ara l'esquizofrènia (Arinami et al. 1994) o els deliris (Morimoto et al. 2002, Chen & Zhuang 2003). En aquesta tesi observem com l'efecte del lindà es dona primerament a la isoforma L del receptor dopaminèrgic D2 i després a la S (a partir de 0.1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M respectivament). Cal tenir en compte que la forma llarga (L) de DRD2 està involucrada principalment en la resposta post-sinàptica, mentre que la forma petita (S) té principalment una funció reguladora de l'alliberació i síntesi de DA (Mercuri et al. 1997, Khan et al. 1998, Usiello et al. 2000). Per tant, es podria dir que primerament es veu afectada la resposta post-sinàptica i després la modulació de l'alliberació de DA. En aquest sentit, un estudi amb cèl·lules dopaminèrgiques PC12 va demostrar com l'exposició a lindà augmentava els nivells d'exocitosi (Heusinkveld et al. 2010).

La concentració de DA i DOPAC en el medi extracel·lular de les cèl·lules exposades a 60  $\mu$ M lindà va mostrar una tendència, tot i no donar significativa, a augmentar els nivells DOPAC/DA de la mateixa manera que s'havia observat en diferents experiments *in vivo* (Rivera et al. 1991, Llorens et al. 1991, Rivera et al. 1998).

En aquesta tesi s'han estudiat els efectes dels organoclorats PCB 138 i lindà en el sistema glutamatèrgic i el sistema dopaminèrgic per separat en tipus neuronals diferents, però en els cultius primaris de neurones corticals i els cultius de cèl·lules SH-SY5Y hi coexisteixen receptors

dopaminèrgics i glutamatèrgics (Suñol et al. 2008, Ndouste & Chan 2008, 2009, Kurokawa et al. 2012). Tot i que no hem estudiat els mecanismes interrelacionats entre els dos sistemes, cal tenir present aquest fet, de la mateixa manera que també hem de tenir en compte els efectes coneguts que tenen aquests contaminants en el sistema GABAèrgic.

La interacció de receptors D2 de dopamina (així com altres subtipus) i receptors de glutamat s'ha descrit en la majoria de desordres neuropsiquiàtrics (Wang et al. 2012, Nikolaus et al. 2009). Aquesta interacció ha estat demostrada en nombrosos treballs; per exemple, antagonistes de D2 provoquen una fosforilació de les subunitats NR1 i NR2B de NMDAR (Wang et al. 2012). L'estimulació dels receptors D2 (per excés de DA) atenua les corrents mediades per NMDAR en el còrtex prefrontal de rata via GSK-3b (Li et al. 2009). Per altre banda, el bloqueig del receptor de NMDA altera l'expressió del receptor D2 (Micheletti et al. 1992, Tomita et. al 1995). L'augment de glutamat en afegir t-PDC (inhibidor del transport de glutamat) en ratolins provoca l'augment de DA, GABA i Tau en rates, que es veu atenuat en afegir antagonistes del receptor NMDA i AMPA-kainat (Segovia et al. 1997). L'estimulació amb agonistes de NMDA i kainat en l'estriat, comporta un augment de la DA (Keefe et al. 1992). En aquesta tesi hem observat que el lindà afecta tant al sistema glutamatèrgic com el dopaminèrgic, augmentant la funcionalitat del receptor NMDA i disminuint l'expressió de DRD2 en dos cultius neuronals diferents. Si aquests efectes són conseqüència directa de l'exposició al lindà o conseqüència secundària a qualsevol dels tres sistemes alterats no ho podem predir amb els resultats actuals, però seria interessant concretament d'estudiar els efectes interrelacionats en un model que contingui els receptors GABAèrgics, glutamatèrgics i dopaminèrgics.

L'augment d'emissions antropogèniques de compostos químics a la biosfera (com a conseqüència del sistema de producció actual, la manca de polítiques de protecció i reguladores eficaces...) ha comportat qüestionar-se com poden estar afectant els contaminants alliberats la salut humana i ambiental. Diferents estudis (referenciats al llarg d'aquesta tesi) demostren que l'exposició prenatal a baixes dosis de determinats contaminants orgànics persistents és associada a trastorns en el neurodesenvolupament (dificultats en l'aprenentatge, dèficits sensorials...). Aquest treball corrobora l'hipòtesi inicial, demostrant-ne que els contaminants orgànics tòxics persistents estudiats afecten al sistema glutamatèrgic i dopaminèrgic, a dosis baixes i de manera prolongada, tant en mostres de placenta i sang de cordó umbilical humana com en cultius neuronals. Els resultats obtinguts aquí aporten una

peça més als complexos mecanismes involucrats en l'alteració que exerceixen contaminants organoclorats sobre les funcions del sistema nerviós. Finalment, aquesta tesi reforça els resultats àmpliament descrits en diferents estudis, on es posa de manifest l'impacte que estan exercint els citats contaminants sobre la salut humana.

## 6.CONCLUSIONS



1. El MeHg (metilmercuri) inhibeix completament el transport de glutamat en placenta amb una  $IC_{50_{MeHg}} = 4.9 \pm 0.8 \mu M$  i el  $\beta$ -HCH ( $\beta$ -hexaclorociclohexà) i el PCB 138 (policlorobifenil 138) inhibeixen parcialment ( $\sim 50\%$  de la inhibició màxima) el transport de glutamat amb alta afinitat  $IC_{50_{PCB138}} = 14.2 \pm 1.2 nM$  i una  $IC_{50_{\beta-HCH}} = 6.9 \pm 2.9 nM$ .
2. Els nivells de glutamat en sang de cordó umbilical disminueixen significativament en relació a les concentracions de PCB 138,  $\beta$ -HCH i la suma de contaminants organoclorats analitzats (HCB,  $\beta$ -HCH, 44'-DDT, 44'-DDE, PCB 118, 138, 153, 180).
3. Els nivells de glutamat en sang de cordó umbilical disminueixen significativament en relació a les concentracions de PCB 138 i de 4,4'-DDE i la suma de contaminants organoclorats analitzats quan els nivells de MeHg són baixos, i es perd la relació quan els nivells de MeHg són alts. El MeHg exerceix un efecte compensatori als efectes dels organoclorats.
4. El PCB 138 i el  $\gamma$ -HCH en exposicions agudes potencien el senyal de calci mediat pel receptor glutamatèrgic d'NMDA (N-metil-D-aspartat). L'exposició prolongada (6DIV) a concentracions subcitotòxiques de PCB 138 i el  $\gamma$ -HCH (lindà) ( $0.1 \mu M$  i  $10 \mu M$  respectivament) durant el procés de maduració neuronal augmenten l'afinitat d'NMDA pel receptor glutamatèrgic d'NMDA en cultius primaris de neurones corticals de ratolí.
5. L'exposició prolongada (6 DIV) a PCB 138 i a  $\gamma$ -HCH a concentracions subcitotòxiques ( $0.1 \mu M$  i  $10 \mu M$ , respectivament) en cultius primaris de neurones corticals de ratolí durant el procés de maduració disminueix l'expressió d'NR1.
6. El PCB 138 no produeix alteració de l'expressió de mRNA VMAT2 i DRD2 (S i L) en cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y exposades prolongadament (6 DIV) durant el procés de diferenciació amb àcid retinoïc.
7. El  $\gamma$ -HCH disminueix de manera dosi-dependent l'expressió de mRNA i l'expressió proteica de VMAT2 i DRD2 (S i L) en cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y exposades prolongadament (6 DIV) durant el procés de diferenciació amb àcid retinoïc.





## **7. BIBLIOGRAFIA**



## A

- Adinolfi M.** 1985. The development of the human blood-CSF-brain barrier. *Dev Med Child Neurol.* 27: 532-7.
- Adem A, Mattsson ME, Nordberg A, Pålman S.** 1987. Muscarinic receptors regulation in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced and differentiation. *Brain Res.* 430: 235-242.
- Altmann L, Mundy WR, Ward TR, Fastabend A & Lilienthal H.** 2001. Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on long-term potentiation and [H- 3]MK-801 binding in occipital cortex and hippocampus. *Toxicol Sci.* 61: 321-330.
- Altshuler G.** 1996. Role of the placenta in perinatal pathology (revisited). *Pediatr Pathol Lab Med.* 16: 207-33.
- Alvarez-Pedrerol M, Guxens M, Ibarluzea J, Rebagliato M, Rodriguez A, Espada M, Goñi F, Basterrechea M, Sunyer J.** 2009. Organochlorine compounds, iodine intake, and thyroid hormone levels during pregnancy. *Environ Sci Technol.* 43: 7909-15.
- AMAP/UNEP Chemicals Branch.** 2008. The Global Atmospheric Mercury Assessment: Sources, Emissions and Transport. UNEP-Chemicals, Geneva.
- Amonpatumrat S, Sakurai H, Wiriyasermkul P, Khunweeraphong N, Nagamori S, Tanaka H, Piyachaturawat P, Kanai Y.** 2008. L-glutamate enhances methylmercury toxicity by synergistically increasing oxidative stress. *J Pharmacol Sci.* 108: 280-9.
- Angus WGR & Contreras ML.** 1996. Effects of polychlorinated biphenyls on dopamine release from PC12 cells. *Toxicol. Lett.* 89: 191-199.
- Antunes Fernandes EC, Hendriks HS, van Kleef RG, Reniers A, Andersson PL, van den Berg M, Westerink RH.** 2010. Activation and potentiation of human GABAA receptors by non-dioxin-like PCBs depends on chlorination pattern. *Toxicol Sci.* 118: 183-90.
- Arinami T, Itokawa M, Enguchi H, Tagaya H, Yano S, Shimizu H, Hamaguchi H, Toru M.** 1994. Association of dopamine D2 receptor molecular variant with schizophrenia. *Lancet.* 343: 703-704.
- Arrebola JP, Mutch E, Rivero M, Choque A, Silvestre S, Olea N, Ocaña-Riola R, Mercado LA.** 2011. Contribution of sociodemographic characteristics, occupation, diet and lifestyle to DDT and DDE concentrations in serum and adipose tissue from a Bolivian cohort. *Environ Int.* 38: 54-61.
- Arrebola JP, Cuellar M, Claire E, Quevedo M, Antelo SR, Mutch E, Ramirez E, Fernandez MF, Olea N, Mercado LA.** 2012. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and adipose tissue from Bolivia. *Environ Res.* 112:40-7.
- Artigas F & Suñol C.** 2009. Neurotransmisión química en el sistema nervioso central. En: Tratado Psiquiatría. Ed: Vallejo J, Leal C. *Ars Medica.* Cap 15. pp.1-33.

- Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. 2003.** Dopamine or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 5: 165-176.
- Aschner M, Yao CP, Allen JW & Tan KH. 2000.** Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem Int.* 37: 199–206.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M. 2007.** Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res.* 40:285–91.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1999.** Toxicological profile for Mercury. U. S. Department of Health & Human Services. Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp46.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2000.** Toxicological profile for Polychlorobiphenils. U. S. Department of Health & Human Services. Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2005.** Toxicological profile for hexachlorocyclohexanes. U. S. Department of Health & Human Services. Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp43.htm>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2011.** CERCLA Priority List of Hazardous Substances. US Department of Health and Human Services, Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>
- Auger C & Attwell D. 2000.** Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters. *Neuron* 28: 547-558

## B

---

- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E. 1995.** Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature.* 377:424-8.
- Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. 1973.** Methyl mercury poisoning in Iraq. *Science.* 181: 230–241.
- Barlow BK, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Thiruchelvam M. 2007.** The gestational environment Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *Reprod Toxicol.* 23: 457–70.
- Barker DJP. 1999.** Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med.* 31: 3–6.
- Barzilai A, Melamed E, Shirvan A. 2001.** Is there a rationale for neuroprotection against dopamine toxicity in Parkinson's disease? *Cell Mol. Neurobiol.* 21:215-235.
- Battaglia FC. 2000.** Glutamine and glutamate exchange between the fetal liver and the placenta. *J Nutr.* 130(S4)974S-977S.

- Battaglia FC & Regnault TR.** 2001. Placental transport and metabolism of amino acids. *Placenta*. 22: 145-61
- Baumann K, Angerer J, Heinrich R, Lehnert G.** 1980. Occupational exposure to hexachlorocyclohexane: Body burden of HCH-isomers. *Int Arch Occup Health*. 47: 119-127.
- Bellé LP, De Bona KS, Abdalla FH, Pimentel VC, Pigatto AS, Moretto MB.** 2009. Comparative evaluation of adenosine deaminase activity in cerebral cortex and hippocampus of young and adult rats: effect of garlic extract (*Allium sativum* L.) on their susceptibility to heavy metal exposure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 104: 408-13.
- Bemis JC & Seegal RF.** 2000. Polychlorinated biphenyls and methylmercury alter intracellular calcium concentrations in rat cerebellar granule cells. *Neurotoxicology*. 21: 1123-1134.
- Bemis JC & Seegal RF.** 2004. PCB-induced inhibition of the vesicular monoamine transporter predicts reductions in synaptosomal dopamine content. *Toxicol Sci*. 80: 288-295.
- Ben-Shachar D, Zuk R, Glinka Y.** 1995. Dopamine neurotoxicity - inhibition of mitochondrial respiration. *J Neurochem*. 64: 718-723.
- Bhatt DK & Banno M.** 2009. Modulation of tricarboxylic acid cycle dehydrogenases during hepatocarcinogenesis induced by hexachlorocyclohexane in mice. *Exp Toxicol Pathol*. 61: 325-32.
- Björklund A & Dunnett SB.** 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*. 30: 194-202
- Blaszczak P & Turski WA.** 1998. Excitatory amino acid antagonists alleviate convulsive and toxic properties of lindane in mice. *Pharmacol Toxicol*. 82: 137-141.
- Blitzblau R, Gupta S, Djali S, Robinson MB, Rosenberg PA.** 1996. The glutamate transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity in rat cortical cultures. *Eur J Neurosci*. 8: 1840-1852.
- Bloomquist J.** 2003. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Arch Insect Biochem Physiol*. 54: 145-56.
- Boehm S & Kubista H.** 2002. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev*. 54: 43-99.
- Boix J, Cauli O, Felipo V.** 2010. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neuroscience* 167: 994-1003.
- Boix J, Cauli O, Leslie H, Felipo Vicente.** 2011. Differential long-term effects of developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 on motor activity and neurotransmission. Gender dependence and mechanisms involved. *Neurochem Int*. 58: 69-77.

- Bondy SC & Lee DK.** 1993. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res.* 610: 229-233.
- Bondy SC & Halsall L.** 1988. Lindane-induced modulation of calcium levels within synaptosomes. *Neurotoxicology.* 9: 645-652.
- Borges VC, Santos FW, Rocha BT, Nogueira CW.** 2007. Heavy Metals Modulate Glutamatergic System in Human Platelets. *Neurochem Res.* 32: 953-958.
- Breivik K, Sweetman A, Pacyna JM, Jones KC.** 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners--a mass balance approach. 1. Global production and consumption. *Sci Total Environ.* 290: 181-98.
- Breivik K, Sweetman A, Pacyna JM, Jones KC.** 2007. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners--a mass balance approach 3. An update. *Sci Total Environ.* 377: 296-307.
- Briz V, Galofré M, Suñol C.** 2010. Reduction of Glutamatergic Neurotransmission by Prolonged Exposure to Dieldrin Involves NMDA Receptor Internalization and Metabotropic Glutamate Receptor 5 Downregulation. *Toxicol Sci.* 113: 138-149.
- Briz V, Parkash J, Sánchez-Redondo S, Prevot V, Suñol C.** Allopregnanolone prevents dieldrin-induced NMDA receptor internalization and neurotoxicity by preserving GABA(A) receptor function. *Endocrinology.* 153: 847-60.
- Briz V.** 2011. Neurotransmisión glutamatérgica en cultivos primarios: Efectos de los pesticidas organoclorados sobre la neurotransmisión glutamatérgica en cultivos primarios neuronales. Tesis Doctoral.
- Briz V & Suñol C.** 2011. Homeostatic Regulation of Glutamate Neurotransmission in Primary Neuronal Cultures. Lucio G. Costa et al. (eds.), *In Vitro Neurotoxicology: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* 758: 253-265.
- Brookes N.** 1992. In vitro evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology.* 76: 245-256.
- Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS.** 2006. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect.* 114: 156-64.
- Bunch L, Erichsen MN & Jensen A.** 2009. Excitatory amino acid transporters as potential drug targets. *Expert Opin Ther Targets.* 13: 719-31.
- Butterfield PG, Valanis BG, Spencer PS, Lindeman CA, Nutt JG.** 1993. Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. *Neurology* 43: 1150-1158.

## C

---

- Caccavelli L, Cussac D, Pellegrini I, Audinot V, Jaquet P, Enjalbert A.** 1992. D2 dopaminergic receptors: normal and abnormal transduction mechanisms. *Horm Res.* 38: 78-83.

- Carrizo D, Grimalt JO, Ribas-Fito N, Torrent M, Sunyer J.** 2007. In utero and post-natal accumulation of organochlorine compounds in children under different environmental conditions. *J. Environ. Monit.* 9: 523-529.
- Casabona G, Knöpfel T, Kuhn R, Gasparini F, Baumann P, Sortino MA, Copani A, Nicoletti F.** 1997. Expression and coupling to polyphosphoinositide hydrolysis of group I metabotropic glutamate receptors in early postnatal and adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 9: 12-17.
- Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S & Manzo L.** 2001. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull.* 55: 197- 203.
- Castoldi AF, Johanson C, Onishchenko N, Coccini T, Roda E, Vather M, Ceccatelli S, Manzo L.** 2008. Human developmental neurotoxicity of methylmercury: Impact of variables and risk modifiers. *Regul Toxicol Pharmacol.* 51: 201-214.
- Caudle WM, Richardson JR, Delea KC, Guillot TS, Wang M, Pennell KD, Miller GW.** 2006. Polychlorinated biphenyl induced reduction of dopamine transporter expression as a precursor to Parkinson's disease-associated dopamine toxicity. *Toxicol. Sci.* 92: 490-499.
- Caudle WM, Richardson JR, Wang MZ, Taylor TN, Guillot TS, McCormack AL, Colebrooke RE, Di Monte DA, Emson PC & Miller GW.** 2007. Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *J Neurosci.* 27: 8138–8148.
- Cernichiari E, Myers GJ, Ballatori N, Zareba G, Vyas J, Clarkson T.** 2007. The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. *Xenobiotica.* 28: 1015-1022.
- Cetin I, de Santis MS, Taricco E, Radaelli T, Teng C, Ronzoni S, Spada E, Milani S, Pardi G.** 2005. Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192: 610-617.
- Chaudhry F, Schmitz D, Reimer R, Larsson P, Gray A, Nicoll R, Kavanaugh R, Edwards M.** 2002. Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *J Neurosci.* 22: 62-72.
- Chavis P, Fagni L, Lansman JB, Bockaert J.** 1996. Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature.* 382: 719-722.
- Chavko M, Nemoto EM, Melick JA.** 1993. Regional lipid composition in the rat brain. *Mol Chem Neuropathol.* 18: 123-131.
- Chen L & Zhuang X.** 2003. Transgenic mouse models of dopamine deficiency. *Ann Neurol.* 54:S91-S102.
- Chen Y & Swanson RA.** 2003. The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J Neurochem.* 84: 1332-1339.
- Chen MK, Kuwabara H, Zhou Y, Adams RJ, Brasić JR, McGlothan JL, Verina T, Burton NC, Alexander M, Kumar A, Wong DF, Guilarte TR.** 2008. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 105:78-90.



- Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y.** 1991. GABA: An excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* 14: 515-519.
- Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC.** 2009. Effect of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology.* 30: 127-135.
- Choi BH, Lapham LW, Amin-Zaki L, Saleem T.** 1978. Abnormal neuronal migration, deranged cerebellar cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain. A major effect of methylmercury poisoning in utero. *J Neuropathol Neurol.* 37: 719-733.
- Choi DW.** 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 7: 369-379.
- Clarkson TW.** 2002. The Three Modern Faces of Mercury Methyl Mercury in Fish History of Human Exposure. *Environ Health Perspect.* 110: 11-23.
- Conti V, Aghaie A, Cilli M, Martin N, Caridi G, Musante L, Candiano G, Castagna M, Fairen A, Ravazzolo R, Guenet JL, Puliti A.** 2006. crv4, a mouse model for human ataxia associated with kyphoscoliosis caused by an mRNA splicing mutation of the metabotropic glutamate receptor 1 (Grm1). *Int J Mol Med.* 18: 593-600.
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT.** 2001. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science.* 294: 1346-1349.
- Cordeiro ML, Gundersen CB & Umbach JA.** 2002. Lithium ions modulate the expression of VMAT2 in rat brain. *Brain Res.* 953:189-94.
- Coppede F, Migliore L.** 2010. Evidence linking genetics, environment, and epigenetics to impaired DNA repair in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 20: 953-66.
- Corrigan FM, Murray L, Wyatt CL, Shore RF.** 1998. Diorthosubstituted polychlorinated biphenyls in caudate nucleus in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 150: 339-42.
- Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE & Mann D.** 2000. Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A.* 59: 229-234.
- Cross AJ, Skan WJ, Slater P.** 1986. The association of [3H]-D-aspartate binding and high affinity glutamate uptake in the human brain. *Neurosci Lett.* 63: 121-124.
- Cross JC.** 2005. How to Make a Placenta: Mechanisms of Trophoblast Cell Differentiation in Mice – A Review. *Placenta.* 26 Suppl A:19:S3-S9.
- Cui H, Hayashi A, Sun HS, Belmares MP, Cobey C, Phan T, Schweizer J, Salter MW, Wang YT, Tasker RA, Garman D, Rabinowitz J, Lu PS & Tymianski M.** 2007. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. *J Neurosci.* 27: 9901-9915.
- Cull-Candy S, Brickley S & Farrant M.** 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 11: 327-335.

---

**D**

---

- Dahlstroem A & Fuxe K.** 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl.* S232: 231-255.
- Danbolt NC.** 2001. Glutamate uptake. *Prog in Neurobiol.* 65: 1 - 105.
- Daud Y, Daud-ur-Rehman, Farooq U.** 2010. Lindane toxicity in a 7 year old boy. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 22: 223.
- Davies JE, Dedhia HV, Morgade C, Barquet A, Maibach HI.** 1983. Lindane poisonings. *Arch Dermatol.* 119: 142-4.
- D'Aquila PS, Peana AT, Panin F, Grixoni C, Cossu M, Serra G.** 2003. Reversal of antidepressant-induced dopaminergic behavioural supersensitivity after long-term chronic imipramine withdrawal. *Eur J Pharmacol.* 458: 129-134.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF.** 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 51: 7-61.
- Dikshith TS, Tandon SK, Datta KK, Gupta PK, Behari JR.** 1978. Comparative response of male rats to parathion and lindane: histopathological and biochemical studies. *Environ Res.* 17: 1-9.
- Dorgan JF, Brock JW, Rothman N, Needham LL, Miller R, Stephenson Jr HE, Schussler N, Taylor PR.** 1999. Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk: results from a prospective analysis (USA). *Cancer Causes Control.* 10: 1-11.
- Duarte-Davidson R & Jones KC.** 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the UK population: estimated intake, exposure and body burden. *Sci Total Environ.* 151: 131-52.
- Durlach-Misteli C & Van Ree JM.** 1992. Dopamine and melatonin in the nucleus accumbens may be implicated in the mode of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol.* 217: 15-21.

---

**E**

---

- Edwards GN.** 1865. Two cases of poisoning by mercuric methide. *Saint Bartholomew's Hosp Rep.* 1:141-150.
- Edwards TM & Myers JP.** 2007. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ Health Perspect.* 115: 1264-1270.

- Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T.** 2007. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J Neurol Sci.* 262: 131-44.
- El-Shahawi MS, Hamza a, Bashammakh a S, Al-Saggaf WT.** 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta.* 80: 1587-97.
- Eriksson P, Lundkvist U & Fredriksson A.** 1991. Neonatal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl – changes in spontaneous behavior and cholinergic muscarinic receptors in the adult-mouse. *Toxicology.* 69: 27-34.
- Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V Gallego C, Comella JX.** 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 75: 991-1003.
- Eugene Smith W.** 1971. Minamata vs the Chisso corporation. [http://www.magnumphotos.com/c.aspx?VP=XSpecific\\_MAG.StoryDetail\\_VPage&pid=2TYRYDDWZXTR](http://www.magnumphotos.com/c.aspx?VP=XSpecific_MAG.StoryDetail_VPage&pid=2TYRYDDWZXTR)

## F

---

- Farina M, Campos F, Vendrell I, Berenguer J, Barzi M, Pons S, Suñol C.** 2009. Probuco increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci.* 112: 416–26.
- Farina M, Rocha JBT & Aschner M.** 2011. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sci.* 89: 555-563.
- Faro L, Alfonso M, Cervantes R, Durán R.** 2009. Comparative effects of pesticides on in vivo dopamine release in freely moving rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 105: 395-400.
- FDA (US. Food and drug administration).** 2010. Mercury levels in commercial fish and shellfish (1990-2010). <http://www.fda.gov/food/foodsafety/product-specificinformation/seafood/foodbornepathogenscontaminants/methylmercury/ucm115644.htm>
- Fein GG, Jacobson JL, Jacobson SW, Schwartz PM & Dowler JK.** 1984. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: effects on birth size and gestational age. *J Pediatr.* 105: 315-320.
- Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggie T, Sanchez-Ramos JR.** 1994. Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann Neurol.* 36: 100- 103.
- Fletcher EJ & Lodge D.** 1996. New developments in the molecular pharmacology of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazole propionate and kainate receptors *Pharmacol Ther.* 70: 65-89.

- Fonfría E, Vilaro MT, Babot Z, Rodriguez-Farre E, Suñol C.** 2005. Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci Res.* 79: 545-553.
- Fonnum F.** 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem.* 42: 1-11.
- Fonnum F & Mariussen E.** 2009. Mechanisms involved in the neurotoxic effects of environmental toxicants such as polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants. *J Neurochem.* 111: 1327-47.
- Fox DA, Grandjean P, de Groot D, Paule MG.** 2012. Developmental origins of adult diseases and neurotoxicity: Epidemiological and experimental studies. *Neurotoxicol.* In press.
- Foster TC.** 2012. Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in senescent synaptic plasticity. *Prog Neurobiol.* 96: 283-303.
- Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, Leal RB, Santos AR, Dafre AL, Pizzolatti MG, Farina M.** 2007. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol.* 20: 1919–26.
- Frandsen A & Schousboe A.** 1990. Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int J Dev Neurosci.* 8: 209–216.
- Freire C, Ramos R, Lopez-Espinosa MJ, Díez S, Vioque J, Ballester F, Fernández MF.** 2010. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environ Res.* 110: 96-104.
- Fujita K, Nakanishi K, Sobue K, Ueki T, Asai K & Kato T.** 1998. Astrocytic gap junction blockage and neuronal Ca<sup>2+</sup> oscillation in neuron-astrocyte cocultures in vitro. *Neurochem Int.* 33: 41-49.

## G

- Gafni J, Wong PW, Pessah IN.** 2004. Ionotropic Glutamate Receptor Signaling in Embryonic Cerebellar Granule Neurons by a Mechanism Involving Ryanodine Receptors. *Toxicological Sciences.* 82: 72- 82.
- Galofré M, Babot Z, Garcia DA, Iraola S, Rodriguez-Farre E, Forsby A, Suñol C.** 2010. GABAA receptor and cell membrane potential as functional endpoints in cultured neurons to evaluate chemicals for human acute toxicity. *Neurotoxicol Teratol.* 32: 52-61.
- Galvan CD, Wenzel JH, Dineley KT, Lam TT, Schwartzkroin PA, Sweatt JD, Swann JW.** 2003. Postsynaptic contributions to hippocampal network hyperexcitability induced by chronic activity blockade in vivo. *Eur J Neurosci.* 18: 1861-72.
- Garris P & Wightman RM.** 1994. Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci.* 14: 442-50.

- Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A.** 1997. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J Neurochem.* 69: 2612-2615.
- George TS.** 2001. Minamata: Pollution and the Struggle for Democracy in Postwar Japan. Harvard University Asia Center.
- Gill SS, Pulido OM, Mueller RW & McGuire PF.** 1999. Immunochemical localization of the metabotropic glutamate receptors in the rat heart. *Brain Res Bull.* 48: 143-146.
- Gill SS & Pulido OM.** 2001. Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology. *Toxicol Pathol.* 29: 208-223.
- Giros B & Caron MG.** 1993. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci.* 14: 43-49.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ.** 1998. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50: 1346-1350.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen, N, Dahl R, Jørgensen PJ.** 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol.* 19: 417-428.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F.** 1998. Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury. *Environ Res.* 77: 165-172.
- Grandjean P, White RF, Nielsen A, Cleary D, de Oliveira Santos EC.** 1999. Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. *Environ Health Perspect.* 107: 587- 591.
- Grandjean P, Weihe P, Burse VW, Needham LL, Storr-Hansen E, Heinzow B, Debes F, Murata K, Simonsen H, Ellefsen P, Budtz-Jørgensen E, Keiding N, White RF.** 2001. Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicol Teratol.* 23: 305-317.
- Grandjean P & Landrigan PJ.** 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *The Lancet.* 368: 2167-2178.
- Grandjean P, Satoh H, Murata K, Eto K.** 2010. Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. *Environ Health Perspect.* 118: 1137-45.
- Gu X & Spitzer NC.** 1997. Breaking the code: Regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev Neurosci.* 19: 33-41.
- Gustafsson H, Runesson J, Lundqvist J, Lindegren H, Axelsson V, Forsby A.** 2010. Neurofunctional endpoints assessed in human neuroblastoma SH-SY5Y cells for estimation of acute systemic toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 245: 191-202.
- Guxens M, Ballester F, Espada M, Ferna MF, Grimalt JO, Vioque J.** 2011. Cohort Profiles: The INMA — Infancia y Medio Ambiente —(Environment and Childhood) Project. *Int J Epidemiol.* 54: 1-11.

---

**H**

---

- Hanneman WH, Legare ME, Barhoumi R, Burghardt RC, Safe S, Tiffany-Castiglioni E.** 1996. Stimulation of calcium uptake in cultured rat hippocampal neurons by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology*. 112: 19-28.
- Ham A, Lee SJ, Shin J, Kim KH, Mar W.** 2012. Regulatory effects of costunolide on dopamine metabolism-associated genes inhibit dopamine-induced apoptosis in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 507: 101-5.
- Harada M.** 1978. Congenital Minamata disease: intrauterine methylmercury poisoning. *Teratology*. 18: 285-288.
- Hardingham GE.** 2009. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans*. 37: 1147-1160.
- Hassel B & Dingledine R.** 2006. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Seventh edition. Edited by Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL. Chapter 15. Glutamate. 267-290.
- Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ.** 1996. Reactive dopamine metabolites and neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Adv. Exp. Med. Biol*. 387: 97-106.
- Herrero-Mercado M, Waliszewski S, Caba M, Martínez-Valenzuela C, Hernández-Chalate F.** 2010. Organochlorine Pesticide Levels in Umbilical Cord Blood of Newborn in Veracruz, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*. 85: 367-371.
- Hestrin S.** 1992. Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. *Nature*. 357: 686-9.
- Heusinkveld HJ, Thomas GO, Lamot I, van den Berg M, Kroese AB, Westerink RH.** 2010. Dual actions of lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) on calcium homeostasis and exocytosis in rat PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 248: 12-19.
- Higuchi M, Single FN, Köhler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH.** 1993. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell*. 75: 1361-70.
- Hilson G.** 2006. Abatement of mercury pollution in the small-scale gold mining industry: restructuring the policy and research agendas. *Sci Total Environ*. 362: 1-14.
- Hinton JJ, Veiga MM, Veiga ATC.** 2003. Clean artisanal gold mining : a utopian approach ? *J Clean Prod* 11: 99-115.
- Hogberg HT, Kinsner-Ovaskainen A, Coecke S, Hartung T, Bal-Price AK.** 2010. mRNA expression is a relevant tool to identify developmental neurotoxicants using an in vitro approach. *Toxicol Sci*. 113: 95-115.

**Howell JA, Matthews AD, Swanson KC, Harmon DL & Matthews JC.** 2001. Molecular identification of highaffinity glutamate transporters in sheep and cattle forestomach, intestine, liver, kidney, and pancreas. *J Anim Sci.* 79: 1329–1336.

**Hrcić D, Rasić-Marković A, Susić V, Djurić D, Stanojlović O.** 2009. Influence of NR2B-selective NMDA antagonist on lindane-induced seizures in rats. *Pharmacology.* 84: 234-9.

**Hsu ST, Ma CI, Hsu SKH, Wu SS, Hsu NHM, Yeh CC & Wu SB.** 1985. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan—a 4-year follow-up. *Environ Health Perspect.* 59: 5-10.

**Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF.** 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science.* 253: 1028-31.

**Hunter D, Bomford RR & Russell DS.**1940. Poisoning bymethylmercury compounds. *Quart J Med.* 9: 193-213.

I

---

**Iida T, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Matsueda T, Watanabe S, Yamada T.** 2007. Concentration and distribution of dioxins and related compounds in human tissues. *Chemosphere.* 67: 263-71.

**Inglefield JR & Shafer TJ.** 2000a. Perturbation by the PCB mixture Aroclor 1254 of GABA(A) receptor-mediated calcium and chloride responses during maturation in vitro of rat neocortical cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 164: 184-195.

**Inglefield JR & Shafer TJ.** 2000b. Polychlorinated biphenyl stimulation of Ca<sup>2+</sup> oscillations in developing neocortical cells: a role for excitatory transmitters and L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 295: 105-113.

**Inglefield JR, Mundy WR & Shafer TJ.** 2001. Inositol 1, 4, 5- triphosphate receptor-sensitive Ca<sup>2+</sup> release, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and cAMP responsive element binding protein phosphorylation in developing cortical cells following exposure to polychlorinated biphenyls. *J Pharmacol Exp Ther.* 297:762-773.

**Insel TR.** 2010. Rethinking schizophrenia. *Nature.* 468: 187-193.

**IPEN (International POPs Elimination Network).** 2009. Lindane: pharmaceutical and agricultural alternatives. <http://www.ipen.org/ipenweb/documents/ipen%20documents/alternatives%20lindane%20report%2009.pdf>

**IPEN (International POPs Elimination Network).** 2009. Guía para las ONG sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. [http://www.ipen.org/ipenweb/documents/book/ngo\\_guide\\_pops\\_spanish.pdf](http://www.ipen.org/ipenweb/documents/book/ngo_guide_pops_spanish.pdf)

**Ishikawa S, Tanaka Y, Takahashi-Niki K, Niki T, Ariga H, Iguchi-Ariga SM.** 2012. Stimulation of vesicular monoamine transporter 2 activity by DJ-1 in SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 421: 813-8.

---

**J**

---

- Jackson DJ & Westlind-Danielsson A.** 1994. Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* 64: 291-369.
- Jacobson JL, Fein GG, Jacobson SW, Schwartz PM & Dowler JK.** 1984. The transfer of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs) across the human placenta and into maternal milk. *Am J Public Health.* 74: 378-379.
- Jacobson JL, Jacobson SW & Humphrey HEB.** 1990. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J Pediatr.* 116: 38-45.
- Jauniaux E, Gulbis B & Gerloo E.** 1999. Free amino acids in human fetal liver and fluids at 12 – 17 weeks of gestation. *Hum Reprod.* 14: 1638-1641.
- Jauniaux E, Biernaux V, Gerlo E, Gulbis B.** 2001. Chronic maternal smoking and cord blood amino acid and enzyme levels at term. *Obstet Gynecol.* 97: 57-61.
- Jenner P.** 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 53(Suppl 3):S26–S38.
- Jimenez V, Henriquez M, Llanos P, Riquelme G.** 2004. Isolation and purification of human placental plasma membranes from normal and pre-eclamptic pregnancies. A comparative study. *Placenta.* 25: 422-437.
- Johnson FO & Atchison WD.** 2009. The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology.* 30: 761-5.
- Jones DC & Miller GW.** 2008. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem Pharmacol.* 76: 569-81.
- Joy RM & Burns VW.** 1988. Exposure to lindane and two other hexachlorocyclohexane isomers increases free intracellular calcium levels in neurohybridoma cells. *Neurotoxicology.* 9: 637-43.

---

**K**

---

- Kalia LV, Kalia SK & Salter MW.** 2008. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurology.* 7: 742-55.
- Kanai Y & Hediger MA.** 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 360: 467-471
- Kanner B.** 2007. Gate Movements in Glutamate Transporters. *Acs Chemical Biology.* 2: 163-66.
- Kaur P, Aschner M, Syversen T.** 2006. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *Neurotoxicology.* 27: 492–500.



- Keefe KA, Zigmond MJ, Abercrombie ED.** 1992. Extracellular dopamine in striatum: influence of nerve impulse activity in medial forebrain bundle and local glutamatergic input. *Neuroscience*.47: 325-332.
- Kelly A & Stanley C.** 2001. Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 7: 287-95.
- Khan MAK & Wang F.** 2009. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: Toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environ Toxicol Chem.* 28:1567-77.
- Khan ZU, Mrzljak I, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic P.**1998.Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci.* 95:7731-7736.
- Kleckner NW & Digledine R.** 1988. Requirement for glycine in activation of NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Science.* 241: 835-837.
- Knerr S & Schrenk D.** 2006. Carcinogenicity of “non-dioxinlike” polychlorinated biphenyls. *Crit Rev Toxicol.* 36: 663–694.
- Kodavanti PR, Shin DS, Tilson HA, Harry GJ.** 1993. Comparative effects of two polychlorinated biphenyl congeners on calcium homeostasis in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 123: 97-106.
- Kodavanti PR, Ward TR, Derr-Yellin EC, Mundy WR, Casey AC, Bush B, Tilson HA.** 1998. Congener-specific distribution of poly- chlorinated biphenyls in brain regions, blood, liver, and fat of adult rats following repeated exposure to Aroclor 1254. *Toxicol Appl Pharmacol.* 153: 199-210.
- Kodavanti PR, Kannan N, Yamashita N, Ward TR, Birnbaum LS, Tilson HA.** 1999. Differential effects of Aroclor 1254 mixtures with two lot numbers: Intracellular calcium buffering and protein kinase C translocation in rat brain. *Toxicologist.* 48(1S): 277.
- Kodavanti PR.** 2006. Neurotoxicity of persistent organic pollutants: possible mode(s) of action and further considerations. *Dose Response.*3: 273-305.
- Komuro H & Rakic P.** 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260: 95–97.
- Kuhar MJ, Minneman K, Muly EC.** 2006. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Seventh edition. Edited by Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL. Chapter 12. Catecholamines. 211-226.
- Kunisue T, Watanabe M, Someya M, Monirith I, Minh TB, Subramanian A, Tana TS, Viet PH, Prudente M, Tanabe S.** 2002. PCDDs, PCDFs, PCBs and organochlorine insecticides in human breast milk collected from Asian developing countries: risk assessment for infants. *Organohalogen Compd.* 58: 285-288.
- Kunisue T, Someya M, Kayama F, Jin Y, Tanabe S.** 2004.Persistent organochlorines in human breast milk collected from primiparae in Dalian and Shenyang, China. *Environ Pollut* 131: 381-92.

- Kung MP, Kostyniak P, Olson J, Malone M, Roth JA.** 1987. Studies of the in vitro effect of methylmercury chloride on rat brain neurotransmitter enzymes. *J Appl Toxicol.* 7: 119-21.
- Kuratsune M, Yoshimura T, Matsuzaka J, Yamaguchi A.** 1972. Epidemiologic study on Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ health persp.* 1: 119-128
- Kurokawa K, Mizuno K, Ohkuma S.** 2012. Increase of ryanodine receptors by dopamine D1 receptors is negatively regulated by  $\gamma$ -aminobutyric acid type B receptors in primary cultures of mouse cerebral cortical neurons. *J Neurosci Res.* 90: 1626-38.

---

**L**

---

- Laake JH, Slyngstad TA, Haug FMS, Ottersen OP.** 1995. Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J Neurochem.* 65: 871-881.
- Landrigan PJ.** 2010. What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Curr Opin Pediatr.* 22: 219-25.
- Larouche A, Berube P, Sarret P, Grignon S.** 2008. Subacute H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not poly(IC), upregulates dopamine D2 receptors in retinoic acid differentiated SH-SY5Y neuroblastoma. *Synapse.* 62: 70-3.
- Lavoie MJ & Hastings TG.** 1999. Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci.* 19: 1484-1491.
- Lawrence LJ & Casida JE.** 1984. Interactions of lindane, toxaphene and cyclodienes with brain-specific t-butylbicyclophosphorothionate receptor. *Life Sci.* 35: 171-178.
- Lee DW & Opanashuk LA.** 2004. Polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254-induced oxidative stress plays a role in dopaminergic cell injury. *Neurotoxicology.* 25: 925-939.
- Li YC, Xi D, Roman J, Huang YQ, Gao WJ.** 2009. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta is required for hyperdopamine and D2 receptor-mediated inhibition of synaptic NMDA receptor function in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci.* 29: 15551-15563.
- Li YF & Macdonald RW.** 2005. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review. *Sci Total Environ.* 342: 87-106.
- Linderholm L, Biague A, Månsson F, Norrgren H, Bergman A, Jakobsson K.** 2010. Human exposure to persistent organic pollutants in West Africa - A temporal trend study from Guinea-Bissau. *Environ Int* 36: 675-82.
- Livak KJ & Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative geneexpression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods.* 25: 402-408.

- Llansola M, Montoliu C, Boix J, Felipo V.** 2010. Polychlorinated Biphenyls PCB 52, PCB 180, and PCB 138 Impair the Glutamate-Nitric Oxide-cGMP Pathway in Cerebellar Neurons in Culture by Different Mechanisms. *Chem Res Toxicol.* 23: 813-820.
- Llinas RR.** 1977. Details depolarization-release coupling systems in neurons. *Neurosci Res Program Bull.* 15: 555–687.
- Llop S, Ballester F, Vizcaino E, Murcia M, Lopez-Espinosa MJ, Rebagliato M et al.** 2010. Concentrations and determinants of organochlorine levels among pregnant women in Eastern Spain. *Sci Total Environ.* 408: 5758-67.
- Llop S, Guxens M, Murcia M, Lertxundi A, Ramon R, Riaño I, et al.** 2012. Prenatal exposure to mercury and infant neurodevelopment in a multicenter cohort in Spain: study of potential modifiers. *Am J Epidemiol.* 175: 451-65.
- Llorens J, Tusell JM, Suñol C, Rodríguez-Farré E.** 1989. Effects of lindane on spontaneous behavior of rats analyzed by multivariate statistics. *Neurotoxicol Teratol.* 11: 145-151.
- Llorens J, Suñol C, Tusell JM, Rodríguez-Farré E.** 1991. Evidence for acute tolerance to the behavioral effects of lindane: Concomitant changes in regional monoamine status. *Neurotoxicology.* 12: 697–706.
- Llorens J, Tusell JM, Suñol C, Rodríguez-Farré E.** 1992. Repeated lindane exposure in the rat results in changes in spontaneous motor activity at 2 weeks postexposure. *Toxicol Lett.* 61: 265-274.
- Lohmann R, Breivik K, Dachs J, Muir D.** 2007. Global fate of POPs: Current and future research directions. *Environ pollut.* 150: 150-165.
- Lombardi G, Dianzani C, Miglio G, Canonico PL & Fantozzi R.** 2001. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. *Br J Pharmacol.* 133: 936-944.
- Lopez-Espinosa MJ, Vizcaino E, Murcia M, Fuentes V, Garcia AM, Rebagliato M et al.** 2010. Prenatal exposure to organochlorine compounds and neonatal thyroid stimulating hormone levels. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 20: 579-588.
- Lopes FM, Schröder R, da Frota ML Jr, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F, Moreira JC, Fernandes Mda C, Klamt F.** 2010. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res.* 1337: 85-94.
- López-Gil X, Artigas F, Adell A.** 2009. Role of different monoamine receptors controlling MK-801-induced release of serotonin and glutamate in the medial prefrontal cortex: relevance for antipsychotic action. *Int J Neuropsychopharmacol.* 12: 487-499.
- Luhmann HJ & Prince DA.** 1991. Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol.* 65: 247-263.
- Lyng GD, Snyder-Keller A, Seegal RF.** 2007. Polychlorinated biphenyl-induced neurotoxicity in organotypic cocultures of developing rat ventral mesencephalon and striatum. *Toxicol Sci.* 97: 128-139.

---

**M**

---

- Macdonald RW, Harner T, Fyfe J.** 2005. Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data. *Sci Total Environ.* 342: 5-86.
- Malm O, Branches FJP, Akagi H, Castro MB, Pfeiffer WC, Harada M, Bastos WR, Kato H.** 1995. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. *Sci Total Environ.* 175: 141-50.
- Malm O.** 1998. Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon. *Environ Res* 78: 73-78.
- Marín R, Riquelme G, Godoy V, Díaz P, Abad C, Caires R, Proverbio T, Piñero S, Proverbio F.** 2008. Functional and structural demonstration of the presence of Ca-ATPase (PMCA) in both microvillous and basal plasma membranes from syncytiotrophoblast of human term placenta. *Placenta.* 29: 271-9.
- Mariussen E, Andersen JM & Fonnum F.** 1999. The effect of polychlorinated biphenyls on the uptake of dopamine and other neurotransmitters into rat brain synaptic vesicles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 161: 274-282.
- Mariussen E, Andersson PL, Tysklind M, Fonnum F.** 2001. Effect of polychlorinated biphenyls on the uptake of dopamine into rat brain synaptic vesicles: a structure-activity study. *Toxicol Appl Pharmacol.* 175: 176-183.
- Mariussen E & Fonnum F.** 2001. The effect of polychlorinated biphenyls on the high affinity uptake of the neurotransmitters, dopamine, serotonin, glutamate and GABA, into rat brain synaptosomes. *Toxicology.* 159: 11-21
- Mariussen E & Fonnum F.** 2006. Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: an update. *Crit Rev Toxicol.* 36: 253-89.
- Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL.** 1992. Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron.* 9: 259-270.
- Masson J, Sagne C, Hamon M, El Mestikawy S.** 1999. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev.* 51: 439-464
- Matthews JC, Beveridge MJ, Malandro MS, Rothstein JD, Campbell-thompson M, Verlander, Kilberg MS, Novak DA.** 1998. Activity and protein localization of multiple glutamate transporters in gestation day 14 vs day 20 rat placenta. *Am J Physiol Cell Physiol.* 274: 603-614.
- Mayer ML.** 2005. Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol.* 15: 282-288.
- Mayer ML.** 2011. Structure and mechanism of glutamate receptor ion channel assembly, activation and modulation. *Curr Opin Neurobiol.* 21: 283-290.

- McDonald JW & Johnston MV.** 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15: 41-70.
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR.** 1996. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem.* 66: 386-393.
- Meldrum BS.** 2000. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J Nutr.* 130:901S-909S.
- Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E.** 1997. Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience.* 79:323-327.
- Micheletti G, Lannes B, Haby C, Borrelli E, Kempf E, Warter JM, Zwiller J.** 1992. Chronic administration of NMDA antagonists induces D2 receptor synthesis in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 14:363-368
- Minamata Disease Municipal Museum.** 2001. Ten Things to Know about Minamata Disease. The Minamata Environmental Creation Development.
- Ministry for the Environment.** 2008. Section I- Mercury in the New Zealand Environment. <http://www.mfe.govt.nz/publications/waste/mercury-inventory-new-zealand-2008/page1-2.html>
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH.** 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12: 529-40.
- Moore KL.** 1973. The developing human: Clinical Oriented Embryology. W.B. Saunders Company.
- Moretto MB, Funchal C, Santos AQ, Gottfried C, Boff B, Zeni G, Pureur RP, Souza DO, Wofchuk S, Rocha JB.** 2005. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg<sup>2+</sup>. *Toxicology.* 214:57-66.
- Morimoto K, Miyatake R, Nakamura M, Watanabe T, Hirao T, Suwaki H.** 2002. Delusional disorder: molecular genetic evidence for dopamine psychosis. *Neuropsychopharma.* 26:794-801.
- Mukainaka Y, Tanaka K, Hagiwara T & Wada K.** 1995. Molecular cloning of two glutamate transporter subtypes from mouse brain. *Biochim Biophys Acta.* 1244: 233-237.
- Myers GJ, Marsh DO, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Tanner MA, Choi A, Cernichiari E, Choisy O, Clarkson TW.** 1995. Main neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish diet: outcome at six months. *Neurotoxicology.* 16: 653-664.
- Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O.** 2005. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta.* 26: 361-371.
- Myren M, Mose T, Mathiesen L, Knudsen LE.** 2007. The human placenta – An alternative for studying foetal exposure. *Toxicology in Vitro.* 21: 1332-1340.

---

**N**

---

- Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S.** 1993. Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for l-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem.* 268: 11868-11873.
- Nakanishi S.** 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function Source. *Science.* 258: 597-603.
- National Research Council.** 2000. Toxicological Effects of Methylmercury. The National Academy Press.
- Ndountse LT & Chan HM.** 2008. Methylmercury increases N-methyl-D-aspartate receptors on human SH-SY5Y neuroblastoma cells leading to neurotoxicity. *Toxicology* 249: 251-255.
- Ndountse LT & Chan HM.** 2009. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity. *Toxicol Lett.* 184: 50-5.
- Nedergaard M, Takano T & Hansen AJ.** 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci.* 3: 748-755.
- Netzeband JG, Conroy SM, Parsons KL, Gruol DL.** 1999. Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca<sup>2+</sup> in cerebellar granule neurons in culture. *J Neurosci.* 19: 8765–8777.
- Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP.** 2011. Neuropharmacology Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology.* 60:1017-1041.
- Nikolaus S, Antke C, Müller HW.** 2009. In vivo imaging of synaptic function in the central nervous system: II. Mental and affective disorders. *Behav Brain Res.* 204: 32-66.
- Nishi M, Hinds H, Lu, H P, Kawata, M, Hayashi, Y.** 2001. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci.* 21: 1-6.
- Niswender CM & Conn PJ.** 2010. Metabotropic Glutamate Receptors : Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50: 295-322.
- Njus D, Kelley PM, Hardabek GJ.** 1986. Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 853: 237-265.
- Noorlander CW, de Graan PN, Nikkels PG, Schrama LH, Visser GH.** 2004. Distribution of glutamate transporters in the human placenta. *Placenta.* 25: 489-495.
- Nordt SP & Chew G.** 2000. Acute lindane poisoning in three children. *J Emerg Med.* 18:51-3.
- Novak D, Quiggle F, Artime C, Beveridge M.** 2001. Regulation of glutamate transport and transport proteins in a placental cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281:C1014-C1022.

## O

---

- O'Brien RJ, Kamboj S, Ehlers MD, Rosen KR, Fischbach GD & Huganir RL.** 1998. Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron*. 21: 1067–1078.
- O'Kane RL, Martínez-López I, DeJoseph MR, Viñas JR, Hawkins RA.** 1999. Na<sup>+</sup>-dependent Glutamate Transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the Blood-Brain Barrier: a mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem*. 274:31891-5.
- Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N.** 1993. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 335: 252-266.
- Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N.** 1993. Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*. 53: 1009-1018.
- Olney JW.** 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 164: 719-721.
- Ortiz Martinez A, Martinez-Conde E.** 1995. The neurotoxic effects of lindane at acute and subchronic dosages. *Ecotoxicol Environ Saf*. 30: 101-105.

## P

---

- Pacyna EG, Pacyna JM, Sundseth K, Munthe J, Kindbom K, Wilson S, Steenhuisen F, Maxson P.** 2010. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atm Environm*. 44: 2487-2499.
- Padhi BK, Pelletier G, Williams A, Berndt-Weis L, Yauk C, Bowers WJ & Chu I.** 2008. Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicol Lett*. 176: 93-103.
- Påhlman S, Ruusal'ai, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T.** 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*. 14:135-144.
- Palmer RF, Blanchard S, Stein Z, Mandell D, Miller C.** 2006. Environmental mercury release, special education rates, and autism disorder: an ecological study of Texas. *Health & Place*. 12: 203-209.
- Patton AJ, Genever PG, Birch MA, Suva LJ & Skerry TM.** 1998. Expression of an *N*-methyl-D-aspartate-type receptor by human and rat osteoblasts and osteoclasts suggests a novel glutamate signaling pathway in bone. *Bone*. 22: 645-649.
- Peciña M, Mickey BJ, Love T, Wang H, Langenecker SA, Hodgkinson C, Shen PH, Villafuerte S, Hsu D, Weisenbach SL, Stohler CS, Goldman D, Zubieta JK.** 2012. DRD2 polymorphisms modulate reward and emotion processing, dopamine neurotransmission and openness to experience. *Cortex*. In Press

- Pedro Cuesta J, Rodríguez-Farré E & López-Abente G. 2009.** Spatial distribution of Parkinson's disease mortality in Spain, 1989-1998, as a guide for focused aetiological research or health-care intervention. *BMC Public Health* 9: 1-14.
- Pennie WD, Woodyatt NJ, Aldridge TC, Orphanides G. 2001.** Application of genomics to the definition of the molecular basis for toxicity. *Toxicol Lett.* 120: 353-8.
- Perera FP, Jedrychowski W, Rauh V, Whyatt RM. 1999.** Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ Health Perspect.* 107: 451-460.
- Pessah IN, Cherednichenko G & Lein PJ. 2010.** Minding the calcium store: Ryanodine receptor activation as a convergent mechanism of PCB toxicity. *Pharmacol Therap.* 125: 260-85.
- Piedrafita B, Erceg S, Cauli O, Felipo V. 2008.** Developmental exposure to polychlorinated, biphenyls or methylmercury, but not to its combination, impairs the glutamate-nitric oxidecyclic GMP pathway and learning in 3-month-old rats. *Neuroscience.* 154: 1408-1416.
- Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, Colao A, Lamberts S, Hofland LJ. 2007.** Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol.* 156: S13-S21.
- Placental Triage 101.** <http://showcase.netins.net/web/placenta/triage.php>
- Plaitakis A, Berl S, Yahr MD. 1982.** Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science.* 216: 193-6.
- Pomés A, Rodríguez-Farré E, Suñol C. 1993.** Inhibition of t-[35S]Butylbicyclophosphorothionate binding by convulsant agents in primary cultures of cerebellar neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 73: 85- 90.
- Pomés A, Rodríguez-Farré E, Suñol C. 1994.** Disruption of GABA-dependent chloride flux by cyclodienes and hexachlorocyclohexanes in primary cultures of cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 271: 1616-1623.
- Porciuncula LO, Rocha JB, Tavares RG, GhisleniG, ReisM, Souza DO. 2003.** Methylmercury inhibits glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport.* 14: 577-80.
- Porta M, Puigdomènech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fitó N, Llop S, López T. 2008.** Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: the international experience. *Environ Int.* 34: 546-61.
- Porta M, Ballester F, Gasull M, Bosch de Basea M, Puigdomènech E, Lopez-Espinosa MJ. 2009.** Los compuestos tóxicos persistentes: una introducción. En: Porta M, Puigdomènech E, Ballester F (eds.). Nuestra contaminación interna. Concentraciones de los compuestos tóxicos persistentes en la población española. *Catarata.* Pp: 19-39.
- Powers BE, Poon E, Sable HJK , Schantz SL. 2009.** Developmental Exposure to PCBs, MeHg, or Both: Long-Term Effects on Auditory Function. *Environ Health Persp.* 117: 1101-1107.



**Pramanik AK & Hansen RC.** 1979. Transcutaneous gamma benzene hexachloride absorption and toxicity in infants and children. *Arch Dermatol.* 115: 1224-5.

**Prohaska JR & Ganther HE.** 1977. Interactions between selenium and methylmercury in rat brain. *Chem Biol Interact.* 16: 155-67.

**Purcell WM, Doyle KM, Westgate C, Atterwill CK.** 1996. Characterisation of a functional polyamine site on rat mast cells: association with a NMDA receptor macrocomplex. *J Neuroimmunol.* 65: 49-53.

## Q

---

**Qiu Z, Sweeney DD, Netzeband JG, Gruol DL.** 1998. Chronic interleukin-6 alters NMDA receptor-mediated membrane responses and enhances neurotoxicity in developing CNS neurons. *J Neurosci.* 18: 10445-56.

## R

---

**Radice S, Chiesara E, Fucile S, Marabini L.** 2008. Different effects of PCB101, PCB118, PCB138 and PCB153 alone or mixed in MCF-7 breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 46: 2561-7.

**Ramon R, Murcia M, Ballester F, Rebagliato M, Lacasaña M, Vioque J, Llop S, Amurrio A, Aguinagalde X, Marco A, León G, Ibarluzea J, Ribas-Fitó N.** 2008. Prenatal exposure to mercury in a prospective mother – infant cohort study in a Mediterranean area, Valencia, Spain. *Sci Tot Environm.* 92: 0-9.

**Ramon R, Murcia M, Aguinagalde X, Amurrio A, Llop S, Ibarluzea J, Lertxundi A, Alvarez-Pedrrol M, Casas M, Vioque J, Sunyer J, Tardon A, Martinez-Arguelles B, Ballester F.** 2011. Prenatal mercury exposure in a multicenter cohort study in Spain. *Environ Int* 37: 597-604.

**Rao A & Craig AM.** 1997. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron.* 19: 801-812.

**Remesar X, Arola L, Palou A, and Alemany M.** 1980. Activities of enzymes involved in amino acid metabolism in developing rat placenta. *Eur J Biochem.* 110: 289-293.

**Reynolds IJ & Hastings TG.** 1995. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 15: 3318-27.

**Reynolds JD, Amory DW, Grocott HP, White WD, Newman MF.** 2002. Change in plasma glutamate concentration during cardiac surgery is a poor predictor of cognitive outcome. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 16:431-436.

**Reynolds JN & Racz WJ.** 1987. Effects of methylmercury on the spontaneous and potassium-evoked release of endogenous amino acids from mouse cerebellar slices. *Can J Physiol Pharmacol.* 65:791-8.

- Ribas-Fitó N, Cardo E, Sala M, Eulàlia de Muga M, Mazón C, Verdú A, Kogevinas M, Grimalt JO, Sunyer J.** 2003. Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics*. 111: 580-585.
- Ribas-Fitó N, Júlvez J, Torrent M, Grimalt JO, Sunyer J.** 2007. Beneficial effects of breastfeeding on cognition regardless of DDT concentrations at birth. *Am J Epidemiol*. 166:1198-1202.
- Richardson JR & Miller GW.** 2004. Acute exposure to aroclor 1016 or 1260 differentially affects dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 levels. *Toxicol Lett*. 148:29-40.
- Rivera S, Sanfeliu C, Suñol C, Rodríguez-Farré E.** 1991. Regional effects on the cerebral concentration of noradrenaline, serotonin and dopamine in suckling rats after a single dose of lindane. *Toxicology*. 69:43-54.
- Rivera S, Rosa R, Martínez E, Suñol C, Serrano MT, Vendrell M, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C.** 1998. Behavioral and monoaminergic changes after lindane exposure in developing rats. *Neurotoxicol Teratol*. 20: 155-160.
- Riquelme G.** 2011. Review: Placental syncytiotrophoblast membranes e domains , subdomains and microdomains. *Placenta*. 32:S196-S202.
- Romano C, Van den Pol AN, O'Malley KL.** 1996. Enhanced early developmental expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat brain: protein, mRNA splice variants, and regional distribution. *J Comp Neurol*. 367: 403-412.
- Rosa R, Sanfeliu C, Suñol C, Pomés A, Rodríguez-Farré E, Schousboe A, Frandsen A.** 1997. The mechanism for hexachlorocyclohexane-induced cytotoxicity and changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cultured cerebellar granule neurons is different for the gamma- and delta-isomers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 142:31-39.
- Rosa R, Sanfeliu C, Suñol C, Rodríguez-Farré E, Frandsen A, Schousboe A, Suñol C.** 1997b. Properties of Ryanodine Receptors in Cultured Cerebellar Granule Neurons: Effects of Hexachlorocyclohexane Isomers and Calcium. *J Neurosci Res*. 47:27-33
- Rudge CV, Sandanger T, Röllin HB, Calderon IM, Volpato G, Silva JL, Duarte G, Neto CM, Sass N, Nakamura MU, Odland JØ, Rudge MV.** 2012. Levels of selected persistent organic pollutants in blood from delivering women in seven selected areas of São Paulo State, Brazil. *Environ Int*. 40: 162-9.
- Rzeski W, Turks L & Ikonomidou C.** 2001. Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci*. 98: 6372-6377.

---

## S

- Saint-Amour D, Roy MS, Bastien C, Ayotte P, Dewailly E, Despres C, Gingras S, Muckle G.** 2006. Alterations of visual evoked potentials in preschool Inuit children exposed to methylmercury and polychlorinated biphenyls from a marine diet. *Neurotoxicology*. 27: 567-578.

- Sala M, Ribas-fit N, Verd A, Grimalt JO, Sunyer J.** 2001. Levels of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds in cord blood: exposure across placenta. *Health Care.* 43: 895-901.
- Sanfeliu C, Camón L, Martínez E, Solà C, Artigas F, Rodríguez-Farré E.** 1988. Regional distribution of lindane in rat brain. *Toxicology.* 49: 189-96.
- Sanfeliu C, Sebastià J, Crstòfol R, Rodríguez-Farré E.** 2003. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res.* 5: 283-306.
- Sarafian TA, Bredesen DE, Verity MA.** 1996. Cellular resistance to methylmercury. *Neurotoxicology.* 17:27-36.
- Schantz S, Widholm JJ, Rice, DC.** 2003. Effects of PCB Exposure on Neuropsychological Function in Children. *Env Health Perpect.* 111: 357-376.
- Schapira AHV.** 1999. Parkinson's disease. *BMJ* 318:311–314.
- Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M.** 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 16: 6125-6133.
- Schmidt S, Bruehl C, Hagemann G, Witte OW, Redecker C.** 2006. Impairment of functional inhibition in the contralateral cortex following perinatally acquired malformations in rats. *Experim neurol.* 201: 270-4.
- Seegal RF.** 1994. The neurochemical effects of PCB exposure are age-dependent. *Arch Toxicol Suppl.* 16: 128-137.
- Seegal RF.** 1996. Epidemiological and laboratory evidence of PCB-induced neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol.* 26: 709-737.
- Segal M.** 1993. GABA induces a unique rise of [Ca]<sub>i</sub> in cultured rat hippocampal neurons. *Hippocampus* 3: 229–238.
- Segovia G, Del Arco A, Mora F.** 1997. Endogenous glutamate increases extracellular concentrations of dopamine, GABA, and taurine through NMDA and AMPA/kainate receptors in striatum of the freely moving rat: a microdialysis study. *J Neurochem.* 69:1476-83.
- Semchuk KM & Love EJ.** 1995. Effects of agricultural work and other proxy-derived case-control data on Parkinson's disease risk estimates. *Am J Epidemiol.* 141:747-754.
- Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, Levey AI.** 1998. Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci.* 18:2697-708.
- Shakeel MK, George PS, Jose J, Jose J, Mathew A.** 2010. Pesticides and breast cancer risk: a comparison between developed and developing countries. *Asian Pac J Cancer Prev.* 11:173-80.

- Sharma H, Zhang P, Barber DS, Liu B.** 2010. Organochlorine pesticides dieldrin and lindane induce cooperative toxicity in dopaminergic neurons: role of oxidative stress. *Neurotoxicology*. 31:215-22.
- Sibley DR.** 1999. New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39: 313-41.
- Smart JL, Dobbing J, Adlard BP, Lynch a, Sands J.** 1973. Vulnerability of developing brain: relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on behavior and brain composition of adult rats. *J Nutr*. 103: 1327-38.
- Solà C, Cristòfol R, Suñol C, Sanfeliu C.** 2011. Primary cultures for neurotoxicity testing. En: Cell Culture Techniques. Eds: M. Aschner, C. Suñol, A. Bal-Price. *Neuromethods*. Vol 56: Cap 4, pp 87-104.
- Sriram K, Lin GX, Jefferson AM, Roberts JR, Chapman RS, Chen BT, Soukup JM, Ghio AJ, Antonini JM.** 2010. Dopaminergic neurotoxicity following pulmonary exposure to manganese-containing welding fumes. *Arch Toxicol*. 84:521-40.
- Staessen JA, Nawrot T, DenHond E, Thijs L, Fagard R, Hoppenbrouwers K, Koppen G, Nelen V, Schoeteres G, Vanderschueren D, VanHecke E, Verschaeve L, Vlietink R, Roes HA.** 2001. Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *Lancet*. 357: 1660-1669.
- Stavenes Andersen I, Voie OA, Fonnum F, Mariussen E.** 2009. Effects of methyl mercury in combination with polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants on the uptake of glutamate in rat brain synaptosomes: a mathematical approach for the study of mixtures. *Toxicol Sci*. 112: 175-184.
- Stewart PW, Lonky E, Reiman J, Pagano J, Gump BB & Darvill T.** 2008. The relationship between prenatal PCB exposure and intelligence (IQ) in 9 year old children. *Environ Health Perspect*. 116: 1416-1422.
- Stewart PW, Reihman J, Lonky E, Pagano J.** 2012. Issues in the interpretation of associations of PCBs and IQ. *Neurotoxicol Teratol*. 34: 96-107.
- Stockholm Convention** (2001) Stockholm Convention on persistent organic pollutants; <http://chm.pops.int/>,  
<http://chm.pops.int/Convention/tabid/54/language/enUS/Default.aspx#convtext>.
- Stringari J, Nunes AK, Franco JL, Bohrer D, Garcia SC, Dafre AL, et al.** 2008. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol*. 227:147-54.
- Sudakin DL.** 2007. Fatality after a single dermal application of lindane lotion. *Arch Environ Occup Health*. 62:201-3.
- Suñol C, Tusell JM, Gelpi E & Rodriguez-Farre E.** 1988. Regional concentrations of GABA, serotonin and noradrenaline in brain at onset of seizures induced by lindane (gamma-hexachlorocyclohexane). *Neuropharmacology*. 27:677-681.

**Suñol C, Babot Z, Fonfría E, Galofré M, García D, Herrera N, Iraola S, Vendrell I.** 2008. Studies with neuronal cells: From basic studies of mechanisms of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity. *Toxicol In Vitro*. 22:1350-1355.

**Sureda F, Copani A, Bruno V, Knöpfel T, Meltzger G, Nicoletti F.**1997. Metabotropic glutamate receptor agonists stimulate polyphosphoinositide hydrolysis in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol*. 338: R1–R2.

**Syversen T.** 1977. Effects of methyl mercury on in vivo isolated cerebral and cerebellar neurons. *Neuropathol Appl Neurobiol*.3:225-236.

**Swann JW, Le JT, Lam TT, Owens J, Mayer AT.** 2007. The impact of chronic network hyperexcitability on developing glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci*. 26: 975-991.

## T

---

**Takahashi M, Negishi T, Imamura M, Sawano E, Kuroda Y, Yoshikawa Y & Tashiro T.** 2009. Alterations in gene expression of glutamate receptors and exocytosis-related factors by a hydroxylated-polychlorinated biphenyl in the developing rat brain. *Toxicology*. 257: 17–24.

**Tanabe S & Kunisue T.** 2007. Persistent organic pollutants in human breast milk from Asian countries. *Environ Pollut*. 146: 400-13.

**Thapar A, O'Donovan M, Owen MJ.** 2005. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Hum Mol Genet*. 14(S2):R275-82.

**Thomas WE.** 1985. Synthesis of acetylcholine and c-aminobutyric acid by dissociated cerebral cortical cells in vitro. *Brain Research* 332:79-89.

**Tian YH, Kim SH, Lee SY & Jang CG.** 2011. Lactational and Postnatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls Induces Sex- Specific Anxiolytic Behavior and Cognitive Deficit in Mice Offspring. *Synapse*. 65:1032-41.

**Tilson HA, Shaw S, McLamb RL.** 1987. The effects of lindane, DDT, and chlordecone on avoidance responding and seizure activity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 88: 57-65.

**Tilson HA & Kodavanti PRS.** 1997. Neurochemical effects of polychlorinated biphenyls: an overview and identification of research needs. *Neurotoxicology*. 18: 727-743.

**Tomiya M, Fukushima T, Kawai J, Aoyama C, Mitsunashi S, Santa T, Imai K, Toyo'oka T.**2006. Alterations of plasma and cerebrospinal fluid glutamate levels in rats treated with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine. 633: 628-633.

**Tomiya M, Fukushima T, Watanabe H, Fukami G, Fujisaki M, Iyo M, Hashimoto K, Mitsunashi S, Toyo'oka T.** 2007. Alterations in serum amino acid concentrations in male and female schizophrenic patients. *Clin Chim Acta*. 380: 186-190.

- Tomita H, Hikiji M, Fujiwara Y, Akiyama K, Otsuki S.** 1995. Changes in dopamine D2 and GluR-1 glutamate receptor mRNAs in the rat brain after treatment with phencyclidine. *Acta Med Okayama.* 49: 61-68.
- Trasande L, Landrigan PJ, Schechter C.** 2005. Public Health and Economic Consequences of Methyl Mercury Toxicity to the Developing Brain. *Environm Health Perspect.* 113: 590-596.
- Trasande L, Schechter ACB, Haynes KA, Landrigan PJ.** 2006. Mental Retardation and Prenatal Methylmercury Toxicity. *Am J Ind Med.* 158: 153-158.
- Trejo-Acevedo A, Díaz-Barriga F, Carrizales L, Domínguez G, Costilla R, Ize-Lema I, Yarto-Ramírez M, Gavilán-García A, Jesús Mejía-Saavedra J, Pérez-Maldonado IN.** 2009. Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children. *Chemosphere.* 74: 974-80.
- Trotti D, Volterra A, Lehre KP, Rossi D, Gjesdal O, Racagni G, Danbolt NC.** 1995. Arachidonic acid inhibits purified and reconstituted glutamate transporter directly from the water phase and not via the phospholipid membrane. *J Biol Chem.* 270: 9890-9895.
- Tusell JM, Suñol C, Gelpí E, Rodríguez-Farré E.** 1987. Relationship between lindane concentration in blood and brain and convulsant response in rats after oral or intraperitoneal administration. *Arch Toxicol.* 60: 432-7.
- Tusell JM, Vendrell M, Serratosa J, Trullas R.** 1992. Lindane-induced convulsions in NMRI and OF1 mice: antagonism with (+)MK-801 and voltage-dependent calcium channel blockers. *Brain Res.* 593: 209-14.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB.** 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature.* 391:892-6.

## U

- UNEP (United Nations Environment Programme).** 1999. Guidelines for the Identification of PCBs and Materials Containing PCBs.
- UNEP (United Nations Environment Programme).** 2007a. Risk Profile: alfa-Hexaclorociclohexano. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: Persistent Organic Pollutants Review Committee, Third Meeting, Geneva 19–23 November 2007. UNEP/POPS/POPRC.3/20/Add.8.
- UNEP (United Nations Environment Programme).** 2007b. Risk Profile: beta Hexaclorociclohexano. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: Persistent Organic Pollutants Review Committee, Third Meeting, Geneva 19–23 November 2007. UNEP/POPS/POPRC.3/20/Add.9.
- UNEP (United Nations Environment Programme).** 2007c. Risk Management Evaluation: lindane. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: Persistent Organic Pollutants Review Committee, Third Meeting, Geneva 19–23 November 2007. UNEP/POPS/POPRC.3/20/Add.4.

**UNEP Chemicals Branch.** 2008. The Global Atmospheric Mercury Assessment: Sources, Emissions and Transport. UNEP-Chemicals, Geneva.

**Usiello, Baik JH, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E.** 2000. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*. 408: 199-203.

## V

---

**Vale C, Damgaard I, Suñol C, Rodriguez-Farre E, Schousboe A.** 1998a. Cytotoxic action of lindane in cerebellar granule neurons is mediated by interaction with inducible GABA(B) receptors. *J Neurosci Res*. 52: 286-294.

**Vale C, Damgaard I, Suñol C, Rodriguez-Farre E, Schousboe A.** 1998b. Cytotoxic action of lindane in neocortical GABAergic neurons is primarily mediated by interaction with flunitrazepam-sensitive GABA(A) receptors. *J Neurosci Res*. 52: 276-285.

**Vale C, Fonfría E, Bujons J, Messeguer A, Rodríguez-Farre E, Suñol C.** 2003. The organochlorine pesticides gamma-hexachlorocyclo-hexane (lindane), alpha-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA(A) and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience*. 117: 397-403.

**Vasseur P & Cossu-Leguille C.** 2006. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere* 62: 1033-1042

**Vendrell M, Pujol MJ, Tusell JM, Serratosa J.** 1992. Effect of different convulsants on calmodulin levels and proto-oncogene c-fos expression in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 14: 285-92.

**Vendrell I, Carrascal M, Vilaro MT, Abian J, Rodriguez-Farre E, Suñol C.** 2007. Cell viability and proteomic analysis in cultured neurons exposed to methylmercury. *Hum Exp Toxicol*. 26: 263-72.

**Vergo S, Johansen JL, Leist M, Lotharius J.** 2007. Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels. *Brain Res*. 1185: 18-32.

**Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, Singh N, Yunus M, Tian C, Schäffer A, Weber R.** 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs--a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res Int*. 18: 152-162.

**Vina JR, DeJoseph MR, Hawkins PA & Hawkins RA.** 1997. Penetration of glutamate into brain of 7-day-old rats. *Metab Brain Dis*. 12: 219-227.

**Vizcaino E, Grimalt JO, Lopez-Espinosa MJ, Llop S, Rebagliato M, Ballester F.** 2010. Maternal origin and other determinants of cord serum organochlorine compounds concentrations in infants from the general population. *Environ Sci Technol*. 44: 6488-6495.

Vizcaino E, Grimalt JO, Carrizo D, Lopez-Espinosa MJ, Llop S, Rebagliato M, Ballester F, Torrent M, Sunyer J. 2011. Assessment of prenatal exposure to persistent organohalogen compounds from cord blood serum analysis in two Mediterranean populations (Valencia and Menorca). *J Environ Monit.* 13: 422-32.

---

## W

---

Wania F & Mackay D. 1999. The evolution of mass balance models of persistent organic pollutant fate in the environment. *Environm pollut.* 100: 223-240.

Wang M, Wong AH, Liu F. 2012. Interactions between NMDA and dopamine receptors: A potential therapeutic target. *Brain Res.* In Press

Watanabe KH, Andersen ME, Basu N, Carvan MJ, Crofton KM, King KA, Suñol C, Tiffany-Castiglioni E, Schultz IR. 2011. Defining and modeling known adverse outcome pathways: Domoic acid and neuronal signaling as a case study. *Environ Toxicol Chem.* 30:9-21.

Weaver CD, Yao TL, Powers AC & Verdoorn TA. 1996. Differential expression of glutamate receptor subtypes in rat pancreatic islets. *J Biol Chem.* 271: 12977–1298.

Weiss B. 2000. Vulnerability of Children and the Developing Brain to Neurotoxic Hazards. *Environmental Health Perspectives.* 108: 375-381.

Wernicke C, Hellmann J, Finckh U, Rommelspacher H. 2010. Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells. *Pharmacol Rep.* 62: 649-63.

Woodruff TJ, Zota AR, Schwartz JM. 2011. Environmental Chemicals in Pregnant Women in the United States. *Environm Health Perspect.* 119:878-885.

Worlds Worst Toxic Pollution Problems 2011 Report. Available: <http://www.worstpolluted.org/files/FileUpload/files/2011/Worlds-Worst-Toxic-Pollution-Problems-2011-Report.pdf>

---

## X

---

Xie HR, Hu LS, Li GY. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chim Med J.* 123: 1086-1092.

---

## Y

---

Yokoo EM, Valente JG, Grattan L, Schmidt SL, Platt I, Silbergeld EK. 2003. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults. *Environ Health* 2: 8.

Yorifuji T, Tsuda T, Inoue S, Takao S, Harada M. 2010. Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of Minamata, Japan. *Environ Int.* 37: 907-13.



**Yuste R & Katz LC.** 1991. Control of postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron*. 6: 333-344.

## Z

---

**Zerangue N & Kavanaugh MP.** 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*. 383: 634-7.

**Zigmond R, Schwarzschild MA, Rittenhouse AR.** 1989. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Ann. Rev. Neurosci.* 12: 415-61.

**Zubieta JK, Huguelet P, Ohl LE, Koeppe RA, Kilbourn MR, Carr JM, Giordani BJ, Frey KA.** 2000. High vesicular monoamine transporter binding in asymptomatic bipolar I disorder: sex differences and cognitive correlates. *Am J Psychiatry*. 157: 1619-1628.