



Universitat de Barcelona



Mecanismes de neurotoxicitat in vitro dels compostos de mercuri i pesticides organoclorats: alteracions en la neurotransmissió per aminoàcids.

Tesi doctoral presentada per
Elena Fonfría i Subirós
Barcelona, 2002

La interessada:

ELENA FONFRÍA i SUBIRÓS

Vist-i-plau del tutor:

Dr. JORDI ALBERCH i VIÉ

Professor titular del Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Vist-i-plau de la directora:

Dra. CRISTINA SUÑOL ESQUIROL

Científic titular del Departament de Neuroquímica

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

CSIC – IDIBAPS

Aquest treball ha estat realitzat al Departament de Neuroquímica de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, IDIBAPS.

Les dades experimentals per al quart article d'aquesta memòria es van realitzar al National Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology and Neurotoxicology, Institut Karolinska, Estocolm, Suècia, sota la supervisió de la Dra. Sandra Ceccatelli. L'IDIBAPS concedí la beca per a l'estada de tres mesos.

Aquest treball ha estat realitzat amb l'ajut d'una beca predoctoral de l'IDIBAPS entre els anys 1999-2002 i ha estat finançat pels projectes:

“Evaluación de la neurotoxicidad selectiva y de los mecanismos de acción de xenobióticos ambientales en modelos neurales in vitro” (FIS 97/0656)

“Estrés oxidativo y transmisión nerviosa: ¿una encrucijada neurotoxicológica?” (FIS 00/1094)

“Papel de los aminoácidos glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) en la toxicidad neuronal en cultivos primarios de células granulares de cerebelo” (FIS 01/1318)

Voldria agrair:

A la Dra. Cristina Suñol, per tot el que m'ha ensenyat i no només al laboratori. Per ser un referent professional però també personal. Per guiar-me en aquesta etapa de creixement i per la direcció de la tesi. I perquè aquí ens cuideu molt bé: gràcies, Cristina.

Al Dr. Eduard Rodríguez-Farré, coordinador de l'equip de recerca "Mecanismes de neurotoxicitat i acció neurofarmacològica" de l'IDIBAPS, per acceptar-me al seu grup en la realització de la present tesi doctoral i per totes les oportunitats que he tingut de treballar i aprendre al seu costat.

Al Dr. Francesc Artigas, cap del Departament de Neuroquímica de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, per ser un de tants exemples on ser bon científic i bona persona són qualitats que van plegades.

Al Dr. Jordi Alberch per la tutoria d'aquesta tesi dins el programa de Neurobiologia de la Universitat de Barcelona i per la seva ajuda en els tràmits burocràtics.

A la Dra. Sandra Ceccatelli, per acollir-me al seu grup durant tres mesos a l'Institut Karolinska, per la seva ajuda i amabilitat. A l'Elisabetta Daré i al Michele Benelli, per ser coautors del treball realitzat, per la seva paciència i amicitat. A Ping Huang, Eric Sleeper, Mia Emgard, Roshan Tofighi, Maria Vittoria Vettori i a la resta de companys del Blue Group. I també als suecs Marià Pitarque i Laia, Cristina Rodríguez i Samer Al-Kassimi.

A la gent del laboratori, sense la qual no hauria disfrutat tant aquests quatre anys de feina. Al Dr Emili Martínez. Als sèniors, a tots els companys del departament i a les persones que des d'administració i serveis han fet també part de la tesi. I a tots els companys de l'IIBB amb els quals he passat moltes bones estones junts!

Als companys de grup, Dra. Rosa Cristòfol i Dra. Coral Sanfeliu, Dr Sergi Gassó, Jordi Sebastià i David Vilches, i als joves de pràctiques, pel seu recolzament i tot el què he après d'ells i amb ells.

Voldria agrair especialment tantes bones estones junt als companys d'esmorzar i molt més: Leticia Campa, Mercè Amargós, Analía Bortolozzi, Llorenç Díaz, Vicky Puig, Noemí Santana i Cecilia Scorza. I molt molt especialment a les companyes de laboratori i grup Iolanda Vendrell i Zoila Babot per aguantar-me també tot el dia a més de durant l'esmorzar i el dinar. I perquè aquesta tesi sense elles hauria estat diferent!

I finalment, agrair al Dr. Isaac Blanco haver-me introduït al món de la recerca en la meva primera etapa a la Universitat Autònoma de Barcelona. Gràcies també a la resta del grup en aquella època Dr. Jordi Ortiz i Jordi Capell per les bones estones dins i fora el laboratori.

Aquest treball va dedicat a totes aquelles persones que l'han fet possible. Als de casa. I a aquelles persones que em fan sentir com a casa quan n'estic lluny. Moltes gràcies a la família, als amics, a la colla de Sant Feliu, a la gent del laboratori, als companys de pis, a la gent de l'AENC, a la gent de D-Recerca, al precarios-sosial-club, al club, als viatgers i a en Jaco.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

El funcionament del cervell: neurociència i neurotoxicologia	1
La neurotransmissió per aminoàcids	3
La neurotransmissió inhibidora ràpida: el receptor GABA _A	3
El GABA com a neurotransmissor: síntesi i metabolisme	3
Classificació dels receptors GABA	3
El receptor GABA _A	5
La neurotransmissió inhibidora ràpida: el receptor de glicina	9
La glicina com a neurotransmissor: síntesi i metabolisme	9
El receptor de glicina	10
Característiques estructurals del canal de clorur dels receptors GABA _A i glicina	11
La neurotransmissió excitadora: el sistema glutamatèrgic	14
El glutamat com a neurotransmissor: síntesi i metabolisme	14
Classificació dels receptors i transportadors de glutamat	16
La neurotoxicitat deguda a glutamat	18
Els processos de mort cel·lular	19
Els pesticides organoclorats	23
El mercuri	27
Identitat, fons ambientals i transformació	27
Efectes en l'home	29
Bioacumulació i transformació	29
Efectes del metilmercuri en adults	30
Efectes del metilmercuri en neonats i infants	31
Avaluació de risc. Dades d'exposició humana	33
Alteracions cel·lulars i subcel·lulars al sistema nerviós central	37
Alteracions en l'estructura cel·lular	37

Alteracions en la neurotransmissió	37
Alteració de l'homeòstasi cel·lular	39
Apoptosi	41

<u>OBJECTIUS</u>	45
-------------------------	----

PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

Materials	49
Cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel	50
Flux de clorur	52
Generació de la hipòtesis farmacofòrica	53
Unió de benzodiazepines	54
Unió de GABA	55
Alliberament de GABA endogen	56
Captació de glutamat	56
Alliberament de glutamat endogen	57
Quantificació del glutamat i el GABA endògens alliberats	58
Tècnica del Western Blot per a la determinació de l'estat d'EAAT3	58
Translocació del factor iniciador de l'apoptosi (AIF) al nucli	60
Tinció de iodur de propidi	60
Assaig de la funcionalitat mitocondrial: MTT	61
Determinació del potencial de membrana mitocondrial	62
Determinació del calci intracel·lular	63
Assaig de viabilitat cel·lular: cèl·lules vives/mortes	63
Determinació de proteïnes	64
Anàlisi de les dades	64

RESULTATS

Resum de resultats 67

Article 1: The organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane (lindane), α -endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA_A and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. 69

Article 2: Mercury interaction with the GABA_A receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. 91

Article 3: Mercury compounds cause glutamate release and oligomerization of the neuronal glutamate transporter EAAT3 in cultured cerebellar granule cells. 107

Annex de resultats: Estudi de l'efecte citotòxic del metilmercuri i el clorur de mercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel: paper del mitocondri i del glutamat. 143

Article 4: Translocation of Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. 159

DISCUSSIÓ GENERAL 171

CONCLUSIONS 181

REFERÈNCIES 185

ABREVIACIONS

EC50	concentració efectiva 50%
IC50	concentració inhibidora 50%
PBS	solució salina tamponada amb fosfat
TTBS	solució salina tamponada amb Tris i Tween
EBSS	solució salina tamponada de Earle
N-DMEM	medi neuronal de cultiu modificat per Eagle
HEPES	àcid N-[2-hidroxiètil]piperazina-N'-[2-etanosulfònic]
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
MTT	bromur de 3-[4,5-dimetiltazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli
SDS	dodecilsulfat sòdic
DMSO	dimetilsulfòxid
GABA	àcid γ -aminobutíric
BIC	bicuculina
PTX	picrotoxina
STR	estricnina
AIF	factor iniciador de l'apoptosi
EAAT	transportador d'aminoàcids excitadors
DNA	àcid desoxiribonucleic
RNA	àcid ribonucleic
CM	clorur de mercuri
MM o MeHg	metilmercuri
DIDS	àcid 4,4'-diisotiocianat-estilbè,2,2'-disulfònic
DTT	ditiotreitòl
TCEP	tris-(2-carboxietil)fosfina
NEM	N-etilmaleïmida

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

El funcionament del cervell: neurociència i neurotoxicologia

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) va formular la teoria de la neurona, segons la qual el sistema nerviós està compost d'elements de senyalització individuals, les neurones, que contacten les unes amb les altres a punts especialitzats d'interacció anomenats sinapsis. Al sistema nerviós es donen majoritàriament dos tipus de neurotransmissió: química i elèctrica. La transmissió elèctrica es dona en casos especialitzats i és present en la comunicació entre altres cèl·lules de l'organisme com les cèl·lules cardíaques, el múscul llis i les cèl·lules epitelials del fetge. La transmissió química comprèn la síntesi del neurotransmissor al terminal nerviós presinàptic i el seu emmagatzematge en vesícules secretores, la regulació del seu alliberament a l'espai sinàptic existent entre la neurona pre i postsinàptica, la presència de receptors específics per al neurotransmissor en la membrana així com un sistema de finalització de l'acció del neurotransmissor alliberat (Holz i Fisher 1999).

Grups interconnectats de neurones duen a terme totes les funcions comportamentals del cervell: el processament de la informació sensorial, la programació de les respostes emocionals i motores, i l'emmagatzematge i gestió de la informació. A banda de les neurones al cervell hi trobem també un segon tipus cel·lular: la glia. Les cèl·lules glials possiblement no són essencials per al processament de la informació però juguen altres papers, com ser elements de suport (del grec glia, adhesiu), guiatge de la migració neuronal i els seus processos, formació de la mielina, captació de neurotransmissors i ions en la terminació correcta de la transmissió sinàptica, regulació de les propietats dels terminals sinàptics, formació de la barrera hematoencefàlica i també un paper tròfic envers les cèl·lules nervioses (Kandel 2000).

La toxicologia és l'estudi dels efectes adversos que causen compostos químics en organismes vius. Certs tòxics són específics per a neurones, o de vegades per a certs grups de neurones, resultant en el seu dany; i si la intoxicació és prou severa, en la seva mort. Es poden donar quatre tipus de dany neurotòxic, il·lustrats a la figura 1: neuronopatia o mort global de la neurona (amb proliferació astrocitària en resposta a la pèrdua neuronal); axonopatia si el lloc primari on s'origina el dany és a l'axò i aquest pot degenerar selectivament; mielinopatia si hi ha un dany selectiu a les cèl·lules glials

mielinitzants, i toxicitat en la neurotransmissió (Anthony et al. 2001). L'any 2001 la comissió de les Nacions Unides pels Drets Humans va declarar com a dret humà bàsic unes condicions de vida lliure de contaminants (McGinn 2002).

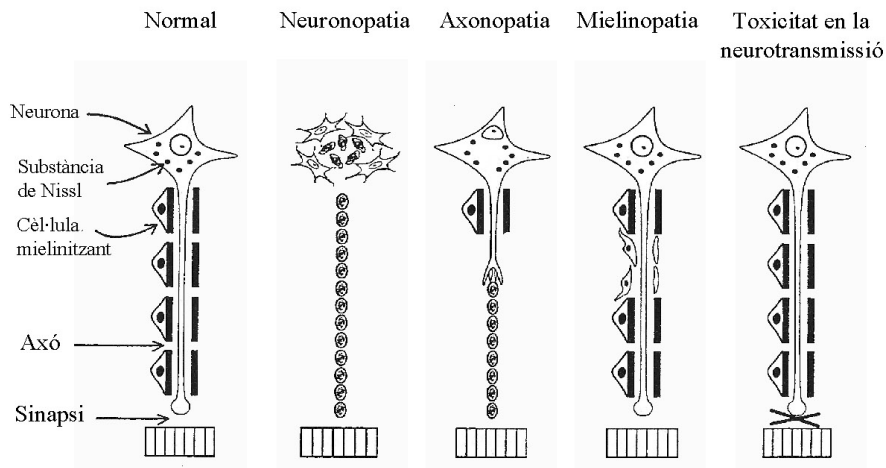


Figura 1.- Patorns de dany neurotòxic (Anthony et al. 1996).

El present treball descriu les accions de dos grups de compostos neurotòxics: els pesticides organoclorats i els compostos de mercuri. Els pesticides organoclorats tenen com a diana els processos de neurotransmissió. L'estudi s'ha centrat en la neurotoxicitat de lindà, α -endosulfà i dieldrin en la neurotransmissió inhibidora ràpida exercida pels aminoàcids GABA i glicina. Per la seva banda, els compostos de mercuri causen neurotoxicitat tant a través de l'alteració de processos de neurotransmissió com a nivell d'homeòstasi i viabilitat cel·lular. Metilmercuri i clorur de mercuri han estat estudiats en la seva alteració de la neurotransmissió inhibidora de l'aminoàcid GABA, l'alteració de la neurotransmissió excitadora de l'aminoàcid glutamat i l'alteració dels processos de senyalització intracel·lular, funcionalitat mitocondrial i rutes de mort que tenen lloc en la neuronopatia induïda per aquests compostos.

La neurotransmissió per aminoàcids

La neurotransmissió inhibidora ràpida: el receptor GABA_A

El GABA com a neurotransmissor: síntesi i metabolisme

L'àcid γ -aminobutíric (GABA) és el neurotransmissor inhibidor principal al sistema nerviós central de mamífers, descobert l'any 1950 per Roberts i Arapawa. L'alliberament de GABA al solc sinàptic és estimulat per la despolarització de neurones presinàptiques, difon pel solc sinàptic fins arribar als receptors postsinàptics i la seva acció finalitza amb la captació per part dels terminals nerviosos presinàptics i les cèl·lules glials del voltant (Olsen i DeLorey 1999).

A partir de glucosa, piruvat o altres aminoàcids, l' α -cetoglutarat és transaminat cap a L-glutamat per la α -oxoglutarat transaminasa. L'àcid glutàmic decarboxilasa (GAD) catalitza aleshores la descarboxilació de l'àcid glutàmic cap a GABA. En el pas següent, el GABA és metabolitzat cap a semialdehid succínic per la GABA-transaminasa. Per a conservar la disponibilitat de GABA, aquesta transaminació es dona lloc generalment en presència d' α -cetoglutarat com a acceptor del grup amino donant lloc a L-glutamat. D'aquesta manera, una molècula de GABA és metabolitzada només en presència del seu precursor. El semialdehid succínic pot ser oxidat cap a àcid succínic per la semialdehid succínic deshidrogenasa, i al seu torn l'àcid succínic pot tornar a entrar al cicle de Krebs, tancant el cicle. L'expressió de GAD sembla ser exclusiva de les neurones que utilitzen GABA com a neurotransmissor. Així doncs, la localització de GAD és un excel·lent marcador per a neurones GABAèrgiques (Olsen i DeLorey 1999).

Classificació dels receptors GABA

S'han descrit fins al moment dos tipus diferents de receptors per a GABA, anomenats GABA_A i GABA_B. Aquests receptors són diferents en les seves propietats farmacològiques, electrofisiològiques i bioquímiques, però comuns en la seva acció inhibidora. A la Taula 1 es mostra la classificació proposada per la revista Trends in Pharmacological Sciences (2001), amb les seves característiques farmacològiques i estructurals. Al receptor GABA_A, a banda dels llocs de reconeixement de GABA i benzodiazepines hi ha diversos llocs al·lostèrics addicionals que reconeixen barbitúrics i

esteroids neuroactius endògens i sintètics. La picrotoxinina i el TBPS actuen a un lloc al·lostèric dins el porus del canal de clorur i en regulen negativament l'activitat del canal. La regulació al·lostèrica negativa exercida pels derivats de la γ -butirolactona també involucra el lloc de la picrotoxinina, mentre que s'ha proposat que la modulació positiva d'aquest compostos ocorre en un lloc diferent. Anestèsics intravenosos i volàtils, alcohols i metalls també exerceixen una influència moduladora en l'activitat del receptor GABA_A. Els receptors GABA poden ser diana terapèutica per al tractament del dolor, l'epilèpsia, l'espasticitat i malalties psiquiàtriques. Per a revisió, veure Macdonald i Olsen (1994), Marshall et al. (1999), Mehta i Ticku (1999), Olsen i DeLorey (1999) i Sieghart (1995).

Nomenclatura	GABA _A		GABA _B
	lloc de GABA	lloc de benzodiazepines	
Agonistes selectius	Isoguvacina muscimol THIP àcid piperidina-4-sulfònic	Flunitrazepam zolpidem abecarnil ZK93423	L-Baclofen CGP27492 CGP35024
Agonistes inversos	--	DMCM Ro194603	--
Antagonistes selectius	Bicuculina SR95531	Flumazenil ZK93426	2-Hydroxy-S-(-)-saclofen CGP35348 CGP55845 CGP64213 SCH90511
Radiol·ligands	[³ H]Muscimol [³ H]SR95531	[³ H]Flunitrazepam (2 nM) [³ H]zolpidem (17 nM) [³ H]flumazenil (1.0 nM) [³ H]CGS8216	[³ H]L-Baclofen [³ H]CGP54626 [³ H]CGP64213
Efectors	Cl ⁻ intracel·lular	Modula el canal de Cl ⁻ acoblat al lloc de GABA	G _{i/o}

Taula 1.- Classificació dels receptors de GABA segons la revista Trends in Pharmacological Sciences (2001, suplement).

El receptor GABA_A

Els receptors GABA_A són estimulats per GABA, muscimol i isoguvacina i inhibits pels convulsivants bicuculina (competitivament) i picrotoxina (de manera nocompetitiva). Estudis d'unió, electrofisiologia i de comportament indiquen que compostos ansiolítics, anticonvulsivants, relaxants musculars i benzodiazepines hipnòtico-sedatives, així com barbitúrics, incrementen l'acció del GABA. D'altra banda, β -carboline ansio-gèniques o convulsivants, els convulsivants bicuculina i picrotoxina i alguns insecticides com lindà i dieldrin redueixen les accions del GABA en aquest receptor. Altres compostos, com per exemple els anestèsics halotà i enflurà, i l'antihelmíntic avermectina B_{1a} exerceixen part dels seus efectes farmacològics interaccionant amb el receptor GABA_A. Diversos experiments indiquen que aquests diferents compostos no interaccionen directament amb el lloc de reconeixement de GABA, sinó que la seva acció és deguda a la interacció en llocs al·lostèrics addicionals d'aquest receptor (Figura 2) (Sieghart 1995). Altres compostos que interaccionen també amb el receptor GABA_A són l'etanol, els neuroesteroids i metalls com el Zn⁺² (Mehta i Ticku 1999). Altres metalls pesats que també interaccionen amb el complex receptor-canal GABA_A són el mercuri, el coure i els lantànids. En el cas del mercuri hi ha una potenciació de la funció del GABA per clorur de mercuri, 100 μ M de clorur de mercuri produeix un augment de fins al 270% de l'acció induïda per GABA, i una inhibició per metilmercuri en neurones de gangli de l'arrel dorsal de rata (Narahashi et al. 1994). En el present treball, el segon objectiu plantejat va ser l'estudi de la interacció directa dels compostos de mercuri amb el receptor GABA_A, alterant-ne algun dels seus diferents llocs de reconeixement i els mecanismes implicats.

El GABA, mitjançant la seva unió al receptor GABA_A, incrementa la conductància de la membrana neuronal per a ions clorur. Puix que la concentració de clorur a l'interior de les neurones de mamífer és un ordre de magnitud inferior a l'extracel·lular (8 mM enfront de 134 mM, Vale i Sanes 2000) el gradient de clorur a través de la membrana força l'entrada de clorur dins la cèl·lula produint una acció inhibidora. En alguns casos especialment en teixit neuronal en desenvolupament i també en astròcits i oligodendròcits s'ha demostrat que el GABA produeix una acció excitadora causada per un alt clorur intracel·lular d'aquestes cèl·lules (Sieghart 1995).

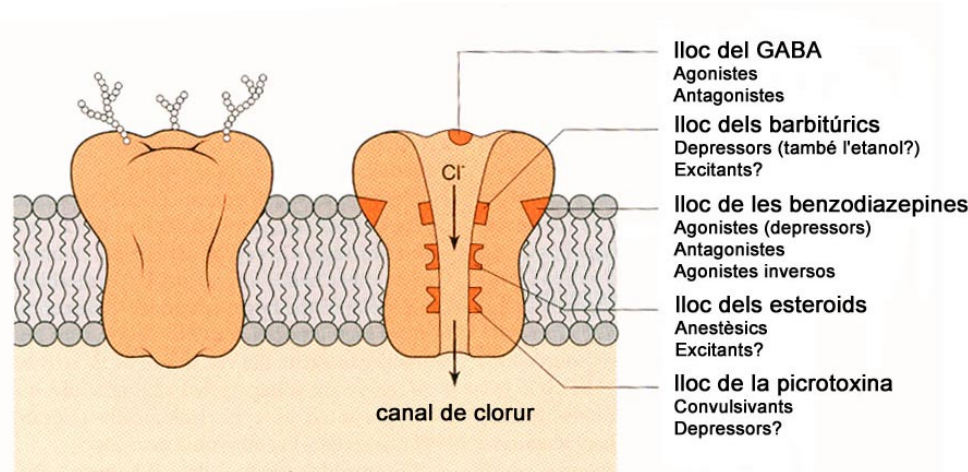


Figura 2-Model estructural del complex receptor GABA_A-canal de clorur. El tall transversal mostra les dianes de diferents compostos que influencien el receptor sense implicar una localització específica (Olsen i DeLorey 1999).

Per analogia als receptors nicotínics de l'acetilcolina, es creu que els receptors GABA_A nadius són heteropentàmers formats a partir de les subunitats: α (amb 6 subunitats descrites), β (amb 3 subunitats descrites), γ (amb 3 subunitats descrites), δ , ϵ , θ , π i ρ (amb tres subunitats descrites) (Cherubini i Conti 2001). Nayeem et al. (1994) van descriure una estructura quaternària de cinc subunitats per al receptor GABA_A sensible a benzodiazepines aïllat d'escorça cerebral de porc, possiblement de composició α, β, γ i probablement δ , mitjançant microscopia electrònica. L'engalament de les subunitats ρ dona lloc a un receptor insensible tant a bicuculina com a baclofen, anomenat primerament GABA_C. La nomenclatura actual de la IUPHAR però, es decanta per una classificació com a subtipus de receptor GABA_A anomenat GABA_{A0r}.

Ja que les diferents subunitats es troben expressades en diferents regions del cervell i cada subunitat determina diferències farmacològiques, la varietat farmacològica observada de receptors GABA_A pot ser composta a partir de les subunitats conegudes (Enz i Cutting 1998). Els gens que codifiquen per a les subunitats α , β i γ/ϵ es troben agrupats als cromosomes humans 4, 5, 15 o X. No només la localització dels gens per a aquestes subunitats suggereixen una possible coexpressió de les subunitats, ja que la majoria dels receptors GABA_A nadius presenten aquesta estequiometria, sinó que a més hi ha evidències de què aquestes agrupacions deriven d'un agrupament ancestral del gen $\alpha\beta\gamma$. Els gens per a les subunitats ρ_1 i ρ_2 es troben

separats de l'agrupament de gens que codifiquen per a la resta de les subunitats del receptor GABA_A, trobant-se en humans en el cromosoma 6 i en ratolins en el cromosoma 4 (Bormann 2000).

La seqüència i topologia genèriques per a les diferents subunitats GABA_A suggereixen un extrem N-terminal extracel·lular, amb llocs de glicosilació i un pont disulfur estructural, 4 segments transmembrana i un extrem C-terminal curt també extracel·lular. El llaç intracel·lular entre el segment transmembrana 3 i 4 es la zona de regulació cel·lular i ancoratge a la membrana. Les parets del canal de clor estan compostes pel segment transmembrana 2 de cadascuna de les subunitats que conformen el receptor (Macdonald i Olsen 1994) (Figura 3).

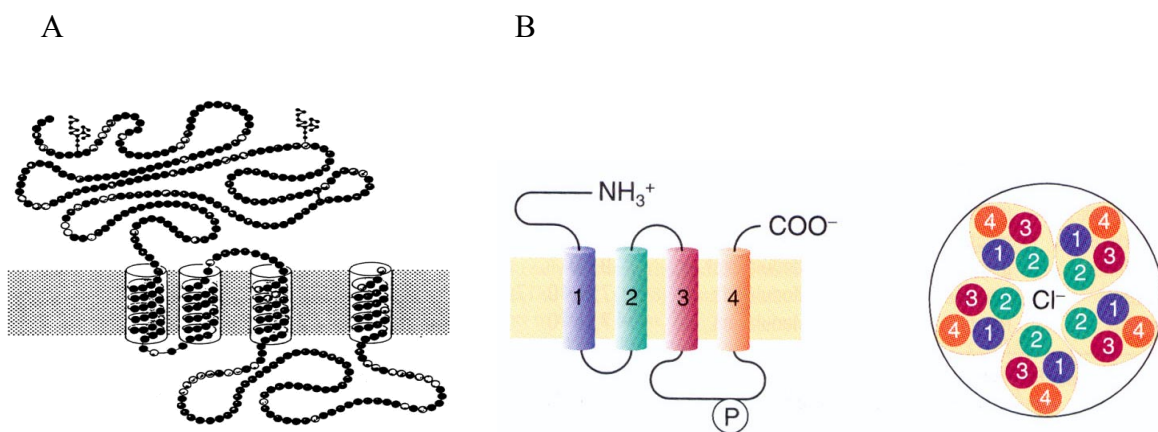


Figura 3.- (A) Seqüència i estructura topològica genèrica de les subunitats del receptor GABA_A. Es suggereix que l'extrem N-terminal és extracel·lular, amb lloc probable per a glicosilació en les posicions 10 i 110 (arboritzacions de cercles negres) i un pont disulfur conservat entre les posicions 138 i 152. Els quatre segments transmembrana estan representats pels quatre cilindres d' α -hèlix inserits en la membrana plasmàtica, amb l'extrem C-terminal extracel·lular al final de la quarta regió transmembrana. Entre el tercer i quart segment transmembrana s'hi trobaria un llarg domini intracel·lular (Macdonald i Olsen 1994). (B) Estructura proposada per al canal de clorur integral del receptor GABA_A. L'engalçament de cinc subunitats dóna lloc al canal de clorur format pels cinc segments transmembrana 2 aportats per cadascuna de les subunitats que formen el receptor (Bormann 2000).

Estudis de localització dels llocs de reconeixement per als diferents compostos que interaccionen al receptor GABA_A indiquen que el lloc d'afinitat per a GABA/muscimol està localitzat a cavall de les subunitats α i β . Per la seva banda la subunitat β

és el lloc d'unió proposat per al TBPS (t-butilbicciclofosforotinat, marcador del lloc d'unió de la picrotoxina). El lloc de reconeixement de les benzodiazepines es troba localitzat a cavall de les subunitats α i γ (Mehta i Ticku 1999), i la subunitat ρ no presenta sensibilitat a les benzodiazepines (Rudolph et al. 2001). La subunitat δ s'expressa conjuntament amb la subunitat $\alpha 6$ i seria responsable de la insensibilitat dels receptors $GABA_A$ a benzodiazepines. Ratolins deficients de la subunitat $\gamma 2$ no presenten resposta a benzodiazepines (Rudolph et al. 2001). La variant llarga d'aquesta subunitat, $\gamma 2L$, té un lloc de fosforilació que contribuiria a la sensibilitat a l'etanol, mentre que les subunitats α i δ modulen la sensibilitat del receptor als neuroesteroids (Cherubini i Conti 2001). A més, la subunitat γ és responsable de l'ancoratge i agrupament del receptor $GABA_A$ a la superfície de la cèl·lula (Essrich et al. 1998). S'ha suggerit quatre subunitats alternants α i β combinades amb una subunitat γ com a composició genèrica del receptor. Al cervell les composicions proposades han estat $\alpha 1\alpha 6\gamma 2S\gamma 2L\beta 2/3$, $\alpha 1\alpha 6\beta 2/3\gamma 2\delta$, $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 1\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2\delta$ i $\alpha 6\beta 2/3\delta$ (Mehta i Ticku 1999).

Els receptors $GABA_A$ són presents tant al sistema nerviós central com al sistema nerviós perifèric. La subunitat $\alpha 1$ és present predominantment al cervell, mentre que l'hipocamp en presenta nivells baixos. D'altra banda, les subunitats $\alpha 2-5$ són present predominantment a l'hipocamp mentre que el cervell pràcticament no se'n troba. L'escorça cerebral té uns nivells intermitjos de subunitat $\alpha 1-4$ i nivells baixos de subunitats $\alpha 5$. La subunitat $\alpha 6$ és present a les cèl·lules granulars de cervell, i pràcticament no s'expressa a l'hipocamp i a l'escorça cerebral (Mehta i Ticku 1999). Neurones que només expressen receptors $GABA_A$ contenint la subunitat $\alpha 3$ estan localitzades en el sistema reticular activant (sistemes noradrenèrgic, dopaminèrgic i serotoninèrgic) i en el cervell anterior basal (neurones colinèrgiques) (Rudolph et al. 2001). La distribució relativa de les subunitats $\beta 1$ i $\beta 3$ és la següent: hipocamp > escorça > cervell, mentre que per a la subunitat $\beta 2$ és cervell > escorça > hipocamp. L'mRNA de la subunitat $\gamma 1$ es troba expressat predominantment a l'amígdala i al septum, en contraposició de la resta de les subunitats γ que són expressades majoritàriament a l'escorça cerebral i cervell. La subunitat $\gamma 2$ és present de forma abundant en gairebé qualsevol regió del cervell. Hi ha també descrit que els nivells de la variant curta $\gamma 2S$ són més abundants que els nivells de la variant llarga $\gamma 2L$ a

l'hipocamp, escorça cerebral i bulb olfatori. En canvi, els nivells de $\gamma 2L$ són predominants en el col·licul inferior, la medul·la i el cerebel. La subunitat $\gamma 3$ és present majoritàriament a l'escorça cerebral i als nuclis basals. La subunitat δ és present predominantment al cerebel, mentre que se'n troben nivells baixos a l'hipocamp i a l'escorça. El tàlem conté nivells intermitjos de subunitat δ i nivells alts de la subunitat $\alpha 4$. El mRNA de la subunitat ϵ és present a l'amígdala, el tàlem i nuclis subtalàmics. Malgrat que varies isoformes de la subunitat ρ són localitzades a la retina també es troben expressades al col·licul superior, cèl·lules de Purkinje cerebelars i a l'hipocamp (Mehta i Ticku 1999). En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, es troben expressades les subunitats $\alpha 1$ i 6 , $\beta 2/3$, $\gamma 2$ i δ (Gao i Fritschy 1995, Nadler et al. 1996 i Thompson i Stephenson 1994,), amb un patró d'expressió similar al trobat en cèl·lules granulars de cerebels d'animals adults (Gao i Fritschy 1995).

La neurotransmissió inhibidora ràpida: el receptor de glicina

La glicina com a neurotransmissor: síntesi i metabolisme

L'aminoàcid glicina, proposat com a neurotransmissor l'any 1965, és reconegut com un dels neurotransmissors inhibidors principals al sistema nerviós central dels vertebrats, especialment a la medul·la espinal i implicat en el comportament motor. Com el GABA, la glicina inhibeix l'activitat elèctrica de les neurones per obertura d'un canal de clorur, però amb característiques farmacològiques diferents.

El precursor immediat de la glicina és la serina, que és convertida en glicina per l'activitat de l'enzim serinahidroximetiltransferasa. Com pel GABA, s'ha demostrat l'alliberament de glicina depenent de calci i l'existència de receptors postsinàptics específics. L'acció de la glicina és acabada per recaptació mitjançant un sistema de transport d'alta afinitat. El seu destí metabòlic no és clar, però pot ser convertida en moltes substàncies, malgrat que cap d'aquests mecanismes ha estat associat a les neurones (Olsen i DeLorey 1999).

El receptor de glicina

El receptor de glicina és activat pels aminoàcids β -alanina, taurina, L-alanina, L-serina i prolina, però no per GABA. Hi ha pocs antagonistes del receptor de glicina coneguts, un d'ells és l'alcaloide estricnina i menys selectivament l'esteroid RU 5135, ambdós amb afinitats de l'ordre nanomolar. A més d'actuar com a neurotransmissor inhibitori, la glicina també té un lloc de reconeixement al receptor NMDA del neurotransmissor excitatori L-glutamat. La regulació de l'activitat d'aquest receptor NMDA es dona a concentracions de glicina que són considerades més en un paper modulador que pas en un paper de neurotransmissió (Olsen i DeLorey 1999).

Per analogia amb el receptor nicotínic de l'acetilcolina s'ha proposat que el receptor de glicina és un pentàmer gairebé simètric format per la combinació de subunitats α i β que conformen un canal central permeable a clorur. Les subunitats del receptor de glicina tindrien també quatre segments transmembrana, i l'aportació de cinc segments transmembrana 2 per part de cinc subunitats conformaria el canal de clorur. A banda de receptors pentamèrics, Xue et al. (2001) descriuen la oligomerització formant homotrímers. En l'actualitat s'han clonat quatre isoformes de la subunitat α i només una per a la subunitat β . En ser expressat en oòcits de *Xenopus*, la subunitat $\alpha 1$ i la subunitat $\alpha 4$ formen canals homomèrics amb propietats similars a les dels canals nadius: oberts per glicina, taurina i β -alanina i bloquejats per estricnina i picrotoxinina. Les subunitats $\alpha 2$ i $\alpha 3$ poden formar canals homomèrics però aquests no són activats per taurina o β -alanina. D'altra banda, les subunitat β és incapaç de formar canals funcionals de glicina per sí mateixa (Jentsch et al. 2002), malgrat que és aquesta subunitat la que ancoraria el receptor a la membrana mitjançant les proteïnes anomenades gefirines (Kneussel i Betz 2000). En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, els corrents evocats per glicina són similars als evocats en talls de teixit de cerebel. Wahl et al. (1994) van descriure l'expressió de receptors de glicina funcionals en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. L'expressió d'aquests receptors en cèl·lules granulars de cerebel cultivades sembla estar regulada pel desenvolupament *in vitro*, trobant-se corrents màxims induïts per glicina entre els 4 i 7 dies *in vitro*, mentre que els de GABA són estables entre el dia 2 i el 15 (Virginio i Cherubini 1997). D'altra banda, Elster et al. (1998) descriuen l'existència de dos tipus de receptors, sensibles i insensibles a picrotoxinina, i l'expressió de les subunitats $\alpha 2/\beta$ en cultius primaris de cèl·lules

granulars de cerebel presenten els mateixos corrents induïts per glicina a 7 que a 17 dies *in vitro*.

La composició de subunitats dels receptors de glicina varia durant el desenvolupament. Receptors fetals de glicina són probablement homòmers de $\alpha 2$. En canvi, es creu que els receptors adults contenen 3 subunitats $\alpha 1$ i dues subunitats β . S'han trobat nivells baixos de l'mRNA d' $\alpha 3$ en medul·la postnatal, suggerint que aquesta forma pot estar present en una petita proporció dels receptors de glicina adults (Jentsch et al. 2002). L'activitat dels receptors de glicina pot ser modulada al·lostèricament per molts compostos, alguns dels quals tenen llocs específics de reconeixement en les subunitats que formen el receptor. És el cas del zenc, alguns alcohols i anestèsics, la picrotoxinina, alguns antagonistes del receptor serotoninèrgic 5HT₃, la cocaïna i alguns anticonvulsivants (Legendre 2001).

La localització immunohistoquímica de la subunitat α així com autoradiografies per a l'antagonista [³H]estricnina mostren que la majoria dels llocs de reconeixement es troben a la medul·la espinal i una petita però significativa població es troba també en regions cerebrals més rostrals. En teixit no neuronal no es troba ni unió de [³H]estricnina ni mRNA per a la subunitat α . Per la seva banda, l'mRNA per a la subunitat β és abundant en moltes regions cerebrals i fins i tot en teixit no neural (Olsen i DeLorey 1999).

Característiques estructurals del canal de clorur dels receptors GABA_A i glicina

La neurotransmissió inhibidora ràpida és duta a terme pels aminoàcids GABA i glicina al sistema nerviós central de mamífers. La unió de GABA i glicina als respectius receptors ionotròpics GABA_A i de glicina produeix un flux de clorur cap a l'interior de la cèl·lula a través d'un canal estructural de clorur acoblat als receptors. A més de la seva especificitat pels corresponents agonistes i antagonistes competitiu, el receptor GABA_A i el receptor de glicina presenten característiques farmacològiques diferents en quant a la seva sensibilitat a antagonistes no competitiu que s'unirien a la zona del canal (veure apartats anteriors). Es creu que la formació de receptors-canal s'aconsegueix amb l'engalzament de cinc subunitats específiques de cadascun dels receptors. Cadascuna de les subunitats està composta per 4 segments transmembrana,

formant el canal de clorur la combinació de cinc segments transmembrana 2 (veure Figura 3A i 3B). La Taula 2 mostra l'alineament de les seqüències dels segments transmembrana 2 de subunitats dels receptors GABA_A i receptor de glicina.

		<u>Seqüència del segment M2</u>																			
<u>Receptor i subunitat</u>		<u>2'</u>	<u>6'</u>	<u>9'</u>	<u>13'</u>	<u>16'</u>															
nACh torpedo	α	K	M	T	L	S	I	S	V	L	L	S	L	T	V	F	L	L	V	I	V
GABA _A drosòfila	β	R	V	A	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	I	S	T	G	V	R
GABA _A ratolí	$\alpha 1$	R	T	V	F	G	V	T	T	V	L	T	M	T	T	L	S	I	S	A	R
GABA _A boví	$\alpha 1$	R	F	V	F	G	V	T	T	V	L	T	M	T	T	L	S	I	S	A	R
GABA _A boví	$\beta 1$	R	V	A	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	I	S	T	H	L	R
GABA _A ratolí	$\beta 2$	R	V	A	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	I	N	T	H	L	R
GABA _A humà	$\beta 3$	R	V	A	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	I	N	T	H	L	R
GABA _A humà	$\gamma 2$	R	T	S	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	L	S	T	I	A	R
GABA _A rata	$\gamma 2$	R	T	S	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	L	S	T	I	A	R
GABA _A rata	δ	R	V	S	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	L	M	V	S	A	R
GABA _A humà	$\rho 1$	R	V	P	L	G	I	T	T	V	L	T	M	S	T	I	I	T	G	V	N
GABA _A rata	$\rho 1$	R	V	P	L	G	I	T	T	V	L	T	M	S	T	I	I	T	G	V	N
GABA _A humà	$\rho 2$	R	V	S	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	I	I	T	G	V	N
GABA _A rata	$\rho 2$	R	V	S	L	G	I	M	T	V	L	T	M	S	T	I	I	T	G	V	N
glicina humà	$\alpha 1$	R	V	G	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	Q	S	S	G	S	R
glicina rata	$\alpha 1$	R	V	G	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	Q	S	S	G	S	R
glicina humà	$\alpha 2$	R	V	A	L	G	I	T	T	V	L	T	M	T	T	Q	S	S	G	S	R
glicina humà	β	R	V	P	L	G	I	F	S	V	L	S	L	A	S	E	C	T	T	L	A
glicina rata	β	R	V	P	L	G	I	F	S	V	L	S	L	A	S	E	C	T	T	L	A

Taula 2.-Aminoàcids comuns als segments M2 que formen el canal de clorur en el receptor GABA_A i glicina, ressaltats en blau. Es mostra també la subunitat α del receptor nicotínic de l'acetilcolina per a la seva comparació. Extret dels alineaments de seqüències de Betz (1990), Buhr et al. (2001), ffrench-Constant et al. (1993), Pribilla et al. (1994) i Zhorov i Bregestovski (2000). S'han destacat en negreta els aminoàcids que es creu estan encarats a l'interior del canal, 2', 6', 9' 13' i 16' segons Zhorov i Bregestovski (2000).

L'estequiometria proposada per al receptor GABA_A sensible a bicuculina és de dues subunitats α , dues subunitats β i una subunitat $\gamma/\delta/\epsilon$. La picrotoxinina és un antagonista potent tant al receptor GABA_A heteromèrics com als receptors GABA_A $\rho 1$ homomèrics. En canvi, receptors GABA_A $\rho 1/\rho 2$ nadius o receptors GABA_A $\rho 2$ homomèrics són força insensibles a picrotoxinina (Bormann 2000). Receptors de glicina formats homomèricament per subunitats α són sensibles a picrotoxinina, mentre que la coexpressió de les subunitats α i β resulta en receptors insensibles a picrotoxinina com també ho són els receptors de glicina nadius (Olsen i DeLorey 1999). Utilitzant la tècnica de mutagènesi dirigida, French-Constant et al. (1993) van descriure la importància de l'alanina en posició 2' de la subunitat β del receptor GABA_A de drosòfila (Veure Taula 2). Una mutació puntual en aquesta alanina provoca la pèrdua de sensibilitat a picrotoxinina i ciclodiens. Aquesta mutació es dona en alta freqüència en poblacions de drosòfila i podria ser la responsable del 60% dels casos de resistència a insecticides.

Zhorov i Bregestovski l'any 2000 van realitzar l'anàlisi computacional d'estructura-funció per a la picrotoxinina basant-se en les dades farmacològiques de què es disposava. La picrotoxinina és molt potent en la inhibició de canals de clorur acoblats a glicina quan aquests estan compostats per subunitats $\alpha 1$ o $\alpha 2$, però aquesta sensibilitat es perd en dos i tres ordres de magnitud respectivament en formar heteròmers amb la subunitat β . Mutant-se aquesta subunitat β , que té una prolina en posició 2' i una fenilalanina en la posició 6' pels aminoàcids presents a la subunitat $\alpha 1$ (una glicina en posició 2' i una treonina en posició 6', veure la Taula 2), es recupera la sensibilitat a picrotoxinina. Semblantment, la subunitat $\rho 1$ del receptor GABA_A de rata sensible a picrotoxinina que té una treonina en posició 6', perd la sensibilitat si forma heteròmer amb una subunitat $\rho 1$ mutada de treonina a metionina en la posició 6', de manera similar com ho és un heteròmer $\rho 1+\rho 2$, on la subunitat $\rho 2$ expressa metionina en la posició 6'. Així mateix, associacions de subunitats de rata $\alpha 1+\beta 2+\gamma 2$ de receptor GABA_A sensibles a picrotoxinina, perden aquesta sensibilitat en mutar treonina per fenilalanina en qualsevol de les subunitats que expressen treonina en la posició 6' (canvi d'aminoàcid que presenta la subunitat β del receptor de glicina, insensible a picrotoxinina, veure Taula 2). Aquestes dades van permetre identificar computacionalment un anell capaç de formar enllaços d'hidrogen format per treonines que es trobaven en el mateix pla seccional (les treonines en posició 6' de cadascuna de

les subunitats que conforma el receptor GABA_A o glicina) a més d'una regió hidrofòbica a l'alçada de les alanines 2' (Zhorov i Bregetovski 2000).

Amb posterioritat al model computacional proposat, l'any 2001 Shan et al. van descriure la treonina en posició 6' al segon segment transmembrana de les subunitats humanes $\alpha 1$ i β del receptor de glicina com a cabdal per a conferir sensibilitat a picrotoxinina en els receptors de glicina (Shan et al. 2001). Per la seva banda Buhr et al. (2001) van descriure l'alanina en posició 2' i els dos residus adjacents 1' i 3' residus en la subunitat humana $\beta 3$ del receptor GABA com a punt clau per a la sensibilitat a picrotoxinina en el receptor GABA_A (Veure Taula 2). Ratra et al. també l'any 2001 descriuen la selectivitat en la composició dels receptors depenent de la subunitat β per a la potència, especificitat i toxicitat selectiva de pesticides organoclorats al receptor GABA_A humà (Ratra et al. 2001).

En el present treball hem mesurat l'activitat dels pesticides organoclorats i picrotoxinina al receptor de glicina i, per comparació amb les seves activitats respecte al receptor GABA_A, hem proposat un model de farmacòfor que conté els requeriments estructurals que determinarien la unió d'aquests compostos al canal de clorur produint el bloqueig de la funció de GABA i glicina.

La neurotransmissió excitadora: el sistema glutamatèrgic

El glutamat com a neurotransmissor: síntesi i metabolisme

Els aminoàcids glutamat i aspartat són els principals neurotransmissors excitatoris del sistema nerviós central de mamífers. Glutamat i aspartat són aminoàcids no essencials per a l'organisme que no creuen la barrera hematoencefàlica i, així, són sintetitzats al cervell a partir de la glucosa i una gran varietat d'altres precursors. No s'ha demostrat un mecanisme de captació vesicular per a l'aspartat enfeblint la seva classificació com a neurotransmissor. En talls de teixit d'hipocamp la reducció de glucosa redueix l'alliberament de glutamat en resposta a altes concentracions de potassi i n'incrementa l'alliberament d'aspartat, suggerint que en pertorbar-se el cicle dels àcids tricarbòxílics l'aspartat pot esdevenir disponible de forma preferencial per al seu alliberament en la transmissió sinàptica (Dingledine i McBain 1999). El glutamat té un

paper clau en el metabolisme intermediari, contribueix en gran mesura a la síntesi de proteïnes i pèptids complexos i a banda de ser el principal neurotransmissor excitador del sistema nerviós central és el precursor del GABA, principal neurotransmissor inhibitor (Olney i Ludoph 2000).

Els enzims de síntesi i degradació de glutamat i aspartat s'han localitzat en els dos tipus cel·lulars majoritaris del cervell, neurones i glia. L'àcid glutàmic es troba en un mateix conjunt metabòlic amb l'àcid α -cetoglutàric i la glutamina. Una gran part del glutamat alliberat dels terminals nerviosos és recaptat cap a les cèl·lules gials, on és convertit a glutamina. La glutamina aleshores és reciclada cap als terminals nerviosos, on contribueix a la fracció utilitzada com a neurotransmissor de glutamat i GABA (del qual el glutamat n'és precursor). Hi ha poques evidències del metabolisme extracel·lular del glutamat al sistema nerviós central (Dingledine i McBain 1999).

El glutamat és sintetitzat i emmagatzemat en vesícules sinàptiques dels terminals nerviosos. La síntesi de la fracció de glutamat utilitzada com a neurotransmissor possiblement implica dues vies de síntesi principals. En la conversió de glutamina a glutamat hi intervé l'acció enzimàtica de la glutaminasa al compartiment mitocondrial neuronal. La formació de glutamat en les neurones també pot donar-se per un procés de transaminació a partir de l'aminoàcid aspartat. El glutamat sintetitzat de nou és emmagatzemat a altes concentracions dins les vesícules sinàptiques. Després del seu alliberament al solc sinàptic per part del terminal nerviós, el glutamat és captat per les cèl·lules gials mitjançant els transportadors d'aminoàcids excitadors 1 i 2: EAAT1 (GLAST en la nomenclatura antiga) i EAAT2 (GLT-1 en la nomenclatura antiga) i convertit a glutamina (Dingledine i McBain 1999). Alternativament algunes neurones contenen el transportador neuronal EAAT3 (EAAC1 en la nomenclatura antiga) i poden recaptar el glutamat directament, però la seva localització somato-dendrítica el fa poc probable d'estar implicat en la finalització de la neurotransmissió (Palacín et al. 1998). A més del reciclatge metabòlic del glutamat alliberat per les neurones, els astròcits regulen el metabolisme energètic de les neurones del voltant (Sonnewald et al. 2002).

Classificació dels receptors i transportadors de glutamat

Actualment hi ha 6 famílies moleculars de receptors de glutamat, dividida en dos tipus. Cada una de les dues divisions principals de receptors de glutamat, ionotròpics i metabotròpics, comprèn tres grups funcionals definits de receptors. Aquests tipus de receptors estan compostats per nombroses subunitats individuals, cadascuna codificada per un gen diferent. Els receptors ionotròpics es classifiquen funcionalment en receptors NMDA, AMPA i kainat (Taula 3). Els gens codificants per a les subunitats dels receptors NMDA són NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2C, NR2D i NR3A. Per al receptor AMPA s'ha identificat 4 gens, GluR1, GluR2, GluR3 i GluR4, codificants per a les subunitats que el conformen. Codificant el receptor de kainat trobem els gens GluR5, GluR6, GluR7, KA1 i KA2. Hi ha clonats 8 receptors metabotròpics del glutamat (mGluR1 – mGluR8), i es classifiquen en tres famílies segons el seu mecanisme d'acció. Mentre que el grup I (mGluR1 i mGluR5) estimula l'activitat fosfolipasa C específica de fosfoinosítids i l'alliberament de calci dels reservoris citoplasmàtics, la família II (mGluR2 i mGluR3) i possiblement també la III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 i mGluR8) inhibeixen l'adenilat ciclase (Dingledine i McBain 1999).

El receptor-canal NMDA presenta tres propietats excepcionals: el receptor controla un canal catiònic d'alta conductància a calci així com també a sodi i a potassi, la obertura del canal requereix glicina extracel·lular com a cofactor (en condicions normals la presència de glicina al medi extracel·lular és suficient per permetre el funcionament eficient del receptor) i finalment és un receptor únic entre els canals dependents de lligand ja que depèn del voltatge de la membrana (per tal de desbloquejar el canal ocupat per Mg^{+2} en condicions despolaritzants) a més del transmissor químic. El complex receptor-canal NMDA presenta una obertura i un tancament del canal lents en resposta a glutamat i el corrent generat és principalment degut a l'influx de calci. Les reaccions bioquímiques postsinàptiques depenent de calci que es donen en activar-se el receptor NMDA són importants per a les vies de transducció de senyal que contribuiran a modificacions duradores en la sinapsi. Aquestes modificacions es creuen importants en els processos d'aprenentatge i memòria (Kandel i Siegelbaum 2000).

	NMDA		AMPA	Kainat
Nomenclatura	lloc del glutamat	lloc de la glicina		
Agonistes selectius	NMDA L-aspartat D,L(tetrazol-5-yl) glicina	glicina D-serina R-(+)-HA966 (agonista parcial)	AMPA (S)-5-fluoro-willardiina	ATPA LY339434 (S)-5-iodo-willardiina (2S,4R)-4-metil-glutamat (SYM2081) àcid domoic (excepte GluR7 homomèrics) kainat
Antagonistes selectius	D-AP5 CGS19755 CGP37849 LY233053	5,7-diclor-kinurenat MNQX L689560	NBQX LY293558 GYKKI53655 (LY300168, no competitiu) ATPO	LY294486
Bloquejants del canal	Mg ⁺² dizolcipina (MK801) ketamina fenciclidina	-	poliamines (intracel·lulars) argiotoxina i jorotoxina (extracel·lulars) Tots selectius de subtipus.	poliamines intracel·lulars (selectiu de subtipus)
Radiolligands	[³ H]CPP [³ H]CGS19755 [³ H]CGP39653 [³ H]dizolcipina (canal)	[³ H]glicina [³ H]L689560 [³ H]MDL105519	[³ H]AMPA [³ H]CNQX	[³ H]kainat [³ H](2S,4R)-4-metilglutamat
Efectors	Na ⁺ , K ⁺ i Ca ⁺² intracel·lulars	cal l'ocupació per a l'activació del receptor	Na ⁺ i K ⁺ intracel·lulars (Ca ⁺² selectiu de subtipus)	Na ⁺ i K ⁺ intracel·lulars (Ca ⁺² selectiu de subtipus)

Taula 3.- Classificació dels receptors de glutamat segons la revista Trends in Pharmacological Sciences (2001, suplement).

Actualment hi ha clonats cinc transportadors de glutamat d'alta afinitat diferents anomenats transportadors d'aminoàcids excitadors (EAAT): EAAT1 (conegut també com GLAST), EAAT2 (conegut també com GLT-1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 i EAAT5. Aquests cinc transportadors clonats comparteixen una homologia en la seva seqüència d'aminoàcids d'un 50-60% i amb altres transportadors d'aminoàcids neutres del 30-40 %. L'EAAT1 és el principal transportador de glutamat al cerebel, l'orella interna, els òrgans circumventriculars i la retina. EAAT2 és el principal transportador de glutamat al cervell, predominant en totes les àrees excepte en aquelles en què predomina l'EAAT1. Ambdós transportadors mostren una estricta localització glial. Per la seva banda l'EAAT3 es troba tant en neurones glutamatèrgiques com no glutamatèrgiques i també en alguns astròcits i oligodendròcits. L'EAAT4 s'expressa majoritàriament a les neurones de Purkinje cerebelars. L'EAAT5 és detectable en immunoblots de retina i el seu mRNA presenta un fort marcatge en retina i no presenta senyal a cervell. Per a revisió veure Danbolt (2001), Gegelashvili i Schousboe (1998) i Palacín et al. (1998).

Els transportadors glials EAAT1 i EAAT2 són reconeguts com els finalitzadors de la neurotransmissió glutamatèrgica en captar el glutamat alliberat al solc sinàptic. El transportador de glutamat EAAT3 mostra una localització neuronal però no és clara la seva importància fisiològica, ja que es troba localitzat a soma i neurites de neurones glutamatèrgiques i no glutamatèrgiques, i els models de supressió de la seva expressió en ratolins resulten només en una lleugera neurodegeneració en aquells estudis en què es produeix (Palacín et al. 1998).

La neurotoxicitat deguda a glutamat

El glutamat i l'aspartat poden mediar toxicitat en la seva acció excitadora. Glutamat i aspartat són excitotoxines, especialment quan el metabolisme energètic es troba compromès, en dany isquèmic, trauma, activitats epileptiformes i en desordres neurodegeneratius com l'esclerosi lateral amiotròfica, el neurolatrisme, l'atròfia olivopontocerebelar i en la corea de Huntington. En condicions patològiques l'activació excitotòxica de receptors per part del glutamat endogen és l'element desencadenant que porta a la degeneració neuronal (Dingledine i McBain 1999). Aquesta activació patològica ha estat relacionada amb una reversió de la funció dels transportadors, que

aporten glutamat al medi en comptes de mediar la seva captació (Rossi et al. 2000). Estudis fisiològics han demostrat que una excitació postsinàptica neuronal excessiva per part del glutamat i els seus anàlegs porta a una despolarització de la membrana postsinàptica incrementant la permeabilitat a la membrana i induint un influx de Na^+ i Cl^- mediat per receptor així com també l'influx d'aigua. L'entrada massiva d'aigua provoca les lesions morfològiques característiques d'inflament dendrític i somàtic postsinàptic i vacuolització. L'entrada de calci inicia una cascada d'alteracions metabòliques intracel·lulars causant la disfunció mitocondrial i la depleció d'energia cel·lular, disrupció del citoesquelet i una excessiva producció de radicals lliures. Antagonistes que bloquegen els receptors de glutamat protegeixen contra aquest efecte excitotòxic. Paradoxalment, el bloqueig dels receptors de glutamat per aquests antagonistes pot tenir també conseqüències neurotòxiques. Així, tant una hiperactivació com un hipoactivació dels receptors de glutamat pot resultar en la mort neuronal (Olney i Ludoph 2000).

Els processos de mort cel·lular

L'apoptosi és un procés actiu caracteritzat per canvis bioquímics i morfològics amb el requeriment d'energia i síntesi de proteïnes, factors que la distingeixen del procés de necrosi (taula 4) (Nicotera et al. 1998). Les cèl·lules apoptòtiques presenten antigens per a ser fagocitades en sistemes *in vivo* (Savill i Fadok 2000), i si aquest procés no es dona, en condicions *in vitro* podem estar davant d'una necrosi, en aquest cas secundària al procés de mort en fases finals d'apoptosi. Una altra forma de mort cel·lular organitzada és l'anomenada mort cel·lular programada que és un esdeveniment que té lloc durant el desenvolupament tant en organismes unicel·lulars com multicel·lulars (Jacobson et al. 1997).

En desordres neurodegeneratius l'apoptosi té lloc en motoneurons espinals en l'esclerosi lateral amiotròfica, en les neurones de la pars compacta de la substància negra, del locus coeruleus, motoneurons del vague dorsal i de ganglis simpàtics en la malaltia del Parkinson, en les interneurons espinoses mitjanes del caudat-putamen en la malaltia de Huntington i en neurones entorrinals, hipocampals i corticals en la malaltia d'Alzheimer (Honig i Rosenberg 2000).

	Característiques patològiques	
	Apoptosi	Necrosi
Patró de mort	cèl·lules individuals	grups de cèl·lules
Canvis en la forma cel·lular	trencament cel·lular	inflament i llisi
Canvis en la membrana plasmàtica	preservació de la membrana, superfície amb protuberàncies	trencament primerenc
Canvis en els orgànuls	involució i contracció	inflament i disfunció
Canvis en el nucli	condensació i fragmentació	trencament i picnosi
Trencament del DNA	internucleosomal, extrems 3' lliures	degradació difosa i aleatòria
Degradació cel·lular	fagocitosi sense infiltració ni inflamació	inflamació amb invasió de macròfags.

Taula 4.- Característiques patològiques d'apoptosi i necrosi (Honig i Rosenberg 2000).

Dues vies clàssiques de senyalització depenent de caspases: els receptors de mort i l'alliberament del citocrom c mitocondrial.

Malgrat que la mort cel·lular pot estar provocada per una gran varietat d'estímuls, la manera en què les senyals apoptòtiques es transmeten a la maquinària de mort cel·lular es poden classificar en dues grans categories: depenent de receptor i depenent de disfunció mitocondrial.

Una d'aquestes vies de senyalització inclou l'activació de "receptors de mort" a la superfície de la cèl·lula. Els receptors de mort són un subtipus especialitzat de la superfamília del receptor del factor de necrosi tumoral (TNR-F), que inclou Fas/CD95, el receptor 1 TNR-F1 i el receptor de mort 3 (DR3). Posterior a l'agregació del receptor pel lligand, proteïnes intracel·lulars com FADD/MORT1, TRADD i RAIDD causen l'estimulació de la caspasa 8 per activació autoproteolítica i inicia la cascada de caspases portant a la mort cel·lular. En aquesta via de senyalització no hi intervé el mitocondri (Joza et al. 2001).

Mentre que els receptors de mort responen a senyals provinents de lligands solubles o de les cèl·lules del voltant, una via alternativa a la mort cel·lular depèn de la

disfunció mitocondrial i és iniciada en resposta a estímuls intrínsecs cel·lulars primaris. Una varietat d'estímuls intracel·lulars incloent dany en el DNA, glucocorticoids, perturbacions en l'homeòstasi redox o l'homeòstasi del calci, generació de ceramida i pèrdua de senyal de factors tròfics així com la presència de caspases actives i altres proteïnes proapoptòtiques de la família Bcl-2 poden determinar la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i l'alliberament al citosol d'efectors proapoptòtics mitocondrials. Aquest alliberament pot ser degut a una permeabilització de la membrana o bé a la formació de l'anomenat porus de permeabilització mitocondrial, un megacanal que causaria l'entrada de soluts i aigua al mitocondri, causant-ne l'inflament, la dissipació del potencial de membrana mitocondrial i l'alliberament dels factors proapoptòtics. Un d'aquests efectors és el citocrom c, que estimula l'acoblament d'un complex ternari anomenat apoptosoma mitocondrial. Aquest complex consisteix en el citocrom c, apaf-1 i la caspasa 9. El citocrom c, component cel·lular que en condicions normals és part de la cadena de transferència d'electrons i està implicat en la respiració mitocondrial causa l'agregació de l'apaf 1 que al seu torn activa la caspasa 9 (Green i Reed 1998, Joza et al. 2001 i Kaufmann i Hengartner 2001).

Les caspases són una família de proteïnes amb activitat proteolítica que semblen ser màxim responsables de la proteòlisi que és duta a terme en l'apoptosi neuronal. A més de tenir una cisteïna al centre actiu, la característica distintiva és que requereixen d'un residu d'aspartat a la posició P1 del substrat a ser trencat. Diferències en la preferència dels residus d'aminoàcids en les posicions P2-P4 determinarà l'especificitat de les caspases (Gorman et al. 1998). Els precursors de les caspases són expressats constitutivament en les cèl·lules, però la maquinaria de mort només es dispara en resposta a estímuls apoptòtics. Hi han un gran nombre de treballs que aporten evidències per al model d'activació de caspases en cascada. Sistemes proteolítics complexes sovint inclouen una combinació de proteases reguladores, cofactors, llindars i cooperacions que convergeixen en un control de la proteasa efectora, que serà la que realment dugui a terme la proteòlisi de les proteïnes dianes (Thornberry i Lazebnik 1998). D'aquesta manera, les caspases iniciadores en els processos apoptòtics són la caspasa 8 per la via de senyalització de receptor i la caspasa 9 per a la via de l'activació del citocrom c. Al seu torn aquestes caspases activen les caspases efectores: caspasa 3, 6 i 7 (Honig i Rosenberg 2000). Aquestes caspases efectores duren a terme el trencament de proteïnes estructurals i de citoesquelet (fodrina, laminina nuclear B1 i β -actina),

proteïnes relacionades amb el metabolisme i l'apoptosi (proteïna retinoblastoma, proteïna kinasa C- δ , subunitat catalítica de la proteïna kinasa dependent de DNA, proteïnes d'unió a l'element de regulació de l'esterol 1 i 2, el component de 70 KDa implicat en el processament del RNA, la fosfolipasa A2 cel·lular, l'inhibidor de la DNAsa activada per caspases, Bcl-2 i Bcl-xL), enzims de reparació de dany cel·lular (poli-(ADP-ribosa) polimerasa o PARP) i proteïnes de funció desconeguda com la hungtintina, relacionada amb la malaltia de Hungtinton (Gorman et al. 1998). Per a revisió veure Stroh i Schulze-Osthoff (1998). Una funció important de les caspases efectores és l'activació de la DNAsa dependent de caspases. Aquesta DNAsa serà l'encarregada de la fragmentació del DNA en els processos apoptòtics dependent de caspases (Enari et al. 1998).

Una nova via de senyalització cel·lular sense implicació de caspases: alliberament del factor AIF mitocondrial

El factor iniciador de l'apoptosi (AIF) és una flavoproteïna mitocondrial que es transloca cap al nucli en condicions apoptòtiques que danyen el mitocondri i indueix una condensació de la cromatina independent de caspases i una fragmentació del DNA en talls d'alt pes molecular al voltant de 50 kilobases (Susin et al. 1999), essent necessària la interacció directa amb el DNA per a la seva activitat apoptogènica (Ye et al. 2002). Aquest any 2002 ha estat descrita amb una resolució de 1.8 Å i 2Å l'estructura cristal·logràfica de l'AIF tant per a la proteïna humana com la de ratolí, respectivament (Mate et al. 2002 i Ye et al. 2002). Aquesta proteïna és codificada per un sol gen localitzat al cromosoma X i es troba constitutivament expressada en sistema nerviós central i diferents teixits perifèrics com el teixit cardíac, múscul esquelètic, moll de l'os, colon, duodè, fetge i epiteli (Daugas et al. 2000).

A més dels seus efectes apoptòtics nuclears, assajos *in vitro* en sistemes lliures de cèl·lules han demostrat que l'AIF pot induir la permeabilització de les membranes mitocondrials i produir l'alliberament del citocrom c (Susin et al. 1999). D'altra banda, en fibroblast d'embrions de ratolí tractats amb estaurosporina, la neutralització de l'AIF utilitzant anticossos contra AIF només evita l'apoptosi si es bloqueja simultàniament la via de senyalització apoptosoma/caspasa-3/DNAsa activada per caspasa 3 mitjançant microinjecció de l'inhibidor de la DNAsa activada per caspasa 3 (Susin et al. 2000).

Així, aquestes dades indiquen la coexistència de dues vies separades i redundants en la implicació del mitocondri en l'apoptosi: una que utilitza l'AIF i l'altre basada en l'activació de caspases mediada per l'apoptosoma. Pel què fa al sistema nerviós central compostos oxidants, toxines naturals i l'NMDA en condicions d'isquèmia cerebral *in vivo* i en cultius primaris gials i neuronals provoquen la translocació d'AIF cap al nucli (Braun et al. 2002, Yu et al. 2002 i Zhang et al. 2002).

Una de les característiques diferencials de les vies dependents i independent de caspases és el tipus de condensació de la cromatina induïda i el tipus de fragmentació del DNA. Mentre que l'AIF indueix una condensació perifèrica amb fragments superiors a les 50 kilobases, la DNAsa dependent de caspases indueix el trencament de la cromatina en grànuls desestructurats (karyorrexis) i una fragmentació en oligonucleòtids del DNA (Zamzami i Kroemer 1999).

Els pesticides organoclorats

L'agència de protecció mediambiental dels Estats Units (EPA), defineix com a pesticida qualsevol substància o barreja de substàncies utilitzades per a prevenir, destruir, repel·lir o mitigar qualsevol pesta. El sector de fertilitzants i pesticides va representar el 7% del conjunt del sector químic l'any 1996 (McGinn 2002). Els pesticides organoclorats continuen utilitzant-se pel seu baix preu i efectivitat en insectes especialment en països en desenvolupament. Malgrat les restriccions i consegüent disminució del seu ús, a Europa l'ús acumulat estimat per al període 1970-1996 és de 235.000 tones de lindà, estimant-se que l'ús a l'any 1996 va ser d'un terç al que es va produir l'any 1970 (Breivik et al. 1999).

La classificació estructural dels insecticides organoclorats comprèn els diclorfeniletans (DDT i metabòlits), els ciclodienos (aldrin, dieldrin, heptaclor, clordà i endosulfà), l'hexaclorbenzè, els hexaclorciclohexans (incloent l'isòmer γ o lindà) i la família del mírex (Ecobichon 2001). La seva persistència al medi ambient és molt elevada, i es poden trobar nivells detectables de pesticides en l'entorn que ens envolta. Al riu Ebre l'any 1999, la presència global dels isòmers del lindà, els ciclodienos i de DDT i els seus metabòlits era de (mitjana \pm desviació estàndard): 3.38 ± 3.29 , 1.03 ± 0.39 i 3.10 ± 1.28 ng/l, respectivament. Cap de les mostres preses al llarg del curs del riu excedeix els 100 ng/l per a lindà fixat per la unió europea. Degut al contingut de

ciclodien però, el riu Ebre està moderadament contaminat seguint la classificació de la Organització Mundial de la Salut (Fernández et al. 1999). Les anàlisis del contingut de lindà, aldrin i α -endosulfà en peixos dels rius de l'Empordà, Fluvià i Muga, fet l'any 1999 eren de (mitjana geomètrica, entre parèntesi 95% d'interval de confiança): 2.5 (1.8-3.5), 0.5 (0.4-0.6) i 0.7 (0.4-1.1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ pes humit, respectivament (Mateo et al. 1999). A través de l'exposició ambiental els pesticides organoclorats arriben a l'home, i en l'actualitat es troben presents en la llet humana a tot el món, tant en àrees rurals com urbanes, en països en tots els nivells de desenvolupament. Dades de 2001 en una regió agrícola d'Almeria i de la ciutat de Granada descriuen els nivells de lindà, aldrin, dieldrin i α -endosulfà en llet materna (colostre, llet de transició i llet madura). Els nivells de lindà van ser de fins 1.8 ng/ml, els d'aldrin de fins a 4.7 ng/ml, els de dieldrin de fins 5.6 ng/ml i els d' α -endosulfà de fins a 0.4 ng/ml a Almeria i Granada (Campoy et al. 2001).

Malgrat diferències en la seva estructura, en general els pesticides organoclorats produeixen símptomes similars d'hiperactivitat neuronal, excepte els isòmers α , β i δ de l'hexaclorociclohexà que produeixen depressió del sistema nerviós. El DDT es caracteritza per incoordinació motora i tremolors que progressen cap a convulsions i per la seva banda el lindà (γ -hexaclorociclohexà), l'aldrin, el dieldrin, l'endrin i compostos relacionats produeixen un quadre clínic amb convulsions com a símptoma majoritari. El grau d'estimulació del sistema nerviós sembla estar relacionat directament amb la concentració d'aquests insecticides al teixit nerviós, i la recuperació ocorre en disminuir per sota d'un cert llindar, bé per l'excreció fora de l'organisme o bé per la distribució en altres teixits, com el teixit adipós (Smith 1991). En rates s'observa una bona correlació entre la concentració de lindà present en cervell, la concentració present en sang i el seu efecte convulsivant, tant en resposta a una administració oral o intraperitoneal. La dosi efectiva 50 és de 84 mg/kg i 131 mg/kg per a administració oral i intraperitoneal, respectivament, trobant-se una concentració efectiva 50 de 5.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ de lindà en teixit cerebral i 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lindà en sang (Tusell et al. 1987). La ingestió aguda de lindà (86 mg/kg) en humans provoca nàusees, vòmits i convulsions amb una recuperació completa a les 72 hores. Per als ciclodien les convulsions serien el primer símptoma d'intoxicació, cursant també amb confusió, incoordinació motora i hiperexcitabilitat, essent possible una recuperació total al cap d'uns mesos (Bloomquist 2002). El tractament d'intoxicacions en humans inclou tractaments per a l'eliminació del tòxic de

l'organisme i el tractament amb barbitúrics o benzodiazepines (ambdós tipus de molècules amb llocs de reconeixement al receptor GABA_A) que promoguin un efecte anticonvulsivant sense ser sedatiu. Dosis no-convulsivants dels insecticides organoclorats incrementen la susceptibilitat dels animals a convulsionar en respostes a altres tòxics o per electro-xoc. La patologia no inclou canvis morfològics en el sistema nerviós central d'animals d'experimentació ni fins i tot a aquelles dosis, agudes o repetides, suficients per matar l'animal. Els canvis ocorreguts semblen reflectir estadis terminals i no són suficients per causar la mort o tenir utilitat diagnòstica (Smith 1991).

Els insecticides organoclorats actuen alterant el flux d'ions a través de les membranes així com canals, receptors i sistemes enzimàtics associats. El DDT i els seus anàlegs actuen a l'axó nerviós produint l'obertura de canals de sodi, mentre que els ciclodiens, mírex i lindà actuen a les terminals sinàptiques (Smith 1991). A nivell molecular s'ha descrit que el lindà i els ciclodiens inhibeixen de manera competitiva la unió de tert-butilbiciclofosforotriat (TBPS) al lloc de reconeixement de la picrotoxinina al receptor GABA_A (Llorens et al. 1990, Matsumoto et al. 1988, Obata et al. 1988, Pomés et al. 1993 i Pomés et al. 1994a), essent la seva potència endrin = α -endosulfà > heptaclor epòxid > dieldrin = lindà > aldrin (Eldefrawi i Eldefrawi 1987 i Pomés et al. 1993).

Consistent amb l'acció convulsivant al lloc de reconeixement de la picrotoxinina, aquests compostos inhibeixen el flux de clorur induït per GABA (Ikeda et al. 1998, Nagata et al. 1996, Pomés et al. 1994a, Pomés et al. 1994b i Woodward et al. 1992), essent la seva potència endrin > α -endosulfà > isobenzà > heptaclor epòxid > dieldrin > toxafè > aldrin > lindà (Eldefrawi i Eldefrawi 1987, Huang i Casida 1996 i Obata et al. 1988). S'obtenen bones correlacions de la potència en el bloqueig del flux de clorur, el desplaçament de la unió dels lligands al lloc de la picrotoxinina i la letalitat aguda (Bloomquist 2002).

El lindà modifica la unió de TBPS al receptor GABA_A sense modificar ni la unió de GABA ni la de les benzodiazepines en aquest receptor (Abalis et al. 1985 i Vale et al. 1997). A banda de bloquejar el canal de clorur associat al receptor GABA_A, el lindà també bloqueja els canals de clorur associats als receptors GABA_A ρ homomèrics (Woodward et al. 1992) i inhibeix la unió de TBPS a canals de clorurs depenent de

voltatge (Matsumoto et al. 1988). El bloqueig al receptor GABA_A per part del lindà i α -endosulfà depèn de la combinació de subunitats del receptor GABA_A que donarà lloc al canal de clorur. Ambdós compostos són molt potents en el desplaçament de la unió d'etinilbicicloortoato al lloc de reconeixement de la picrotoxinina en receptors GABA_A $\beta 3$ homomèrics (0.5 i 0.9 nM per a α -endosulfà i lindà, respectivament) i són menys potents en receptors GABA_A $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (16 i 21 nM per a α -endosulfà i lindà, respectivament). En receptors GABA_A nadius els dos compostos mostren diferències en les seves potències, mentre la IC₅₀ de α -endosulfà és de 7.3 nM, la de lindà és de 306 nM. Aquests resultats indiquen que la subunitat $\beta 3$ del receptor GABA_A conté la diana per als pesticides organoclorats, mentre que la resta de subunitats en determina l'especificitat i la seva toxicitat selectiva (Ratra et al. 2001). Tant el lindà com l' α -endosulfà inhibeixen la unió al lloc de la picrotoxinina amb la mateixa potència a diferents regions cerebrals (escorça frontal, cerebel, cervell mig i pons i medul·la), indicant que la composició de subunitats per a formar el receptor GABA_A en aquestes diferents regions no és selectiva per a l'acció del lindà i l' α -endosulfà (Llorens et al. 1990, Huang i Casida 1997 i Ratra et al. 2001,).

Bloomquist (1992) va descriure que els ciclodienos i la picrotoxinina però no el lindà mostren una toxicitat incrementada en mamífers quan són injectats intracranealment respecte a una injecció intraperitoneal, suggerint que altres canals de clorur a més del receptor GABA_A poden ser diana per als insecticides organoclorats. Suñol et al. (1998) va descriure que el lindà també bloqueja el flux de clorur induït per glicina, essent el receptor de glicina possible diana per a aquests compostos.

En el primer estudi de la present memòria es profunditza en els efectes dels insecticides organoclorats a nivell de canals de clorur acoblats a lligand, descrivint-se els efectes en el flux de clorur del receptor de glicina, menys estudiat a la literatura, i la seva comparació amb el receptor GABA_A. Aquests dos receptors són els principals responsables de la inhibició sinàptica ràpida al sistema nerviós central de mamífers, i comparteixen característiques estructurals pel què fa a la topologia de les subunitats que els conformen i als canals de clor integrals dels receptors. A més, el treball proposa una descripció 3D d'aquests requeriments estructurals que podria explicar les accions diferencials dels compostos en ambdós receptors-canal.

El mercuri

No es disposa de cap evidència per la qual el mercuri, en qualsevol quantitat, sigui beneficiós per a cap forma de vida (Clarkson 1991). Metall conegut des de l'antigor, Paracels (1493-1541) utilitzava el mercuri per al tractament de la sífilis, exposant la superfície de pell afectada a vapors de mercuri. Aviat se n'adonà però que una mica massa de mercuri també matava al pacient, d'aquí el seu famós "La dosi fa el verí". Així, es podria dir que el mercuri va jugar un paper clau en establir el principi bàsic de la toxicologia moderna i l'avaluació de risc (Clarkson 2002). Contemporani a Paracels, Andrés de Laguna va descriure que els tremolors presentats per dones que s'aplicaven cremes contenint mercuri també s'observaren en els seus infants (de Laguna 1555). Els efectes del mercuri en la salut humana i ambiental són de plena actualitat, com demostren informes dels anys 2000 i 2001 de països com Brasil, consumidor de mercuri per a l'extracció d'or en mineria, i la regió NAFTA que compren Canadà, Estats Units i Mèxic, on es pateix contaminació mediambiental (de Freitas et al. 2001 i Pilgrim et al. 2000).

Identitat, fonts ambientals i transformació

El mercuri existeix en tres estats, metàl·lic o elemental (Hg^0), mercuriós (Hg_2^{+2}) i mercúric (Hg^{+2}), i pot formar compostos organometàl·lics. Per a les anàlisis d'exposició en humans, s'utilitzen mostres d'orina, sang, llet materna i cabell.

Tal i com recull el document sobre l'estratègia per a la recerca sobre mercuri per al període 2001-2005 de l'agència de protecció del medi ambient nord-americana (EPA), el mercuri és alliberat a l'aire provenint de fonts antropogèniques i de la desgasificació natural de l'escorça terrestre, és transportat i dipositat en el sòl o en l'aigua, convertit a metilmercuri en els cossos aquàtics, consumit pels peixos i aleshores acumulats en mamífers, inclosos els humans, que mengen peix (US Environmental Protection Agency (EPA) 2000).

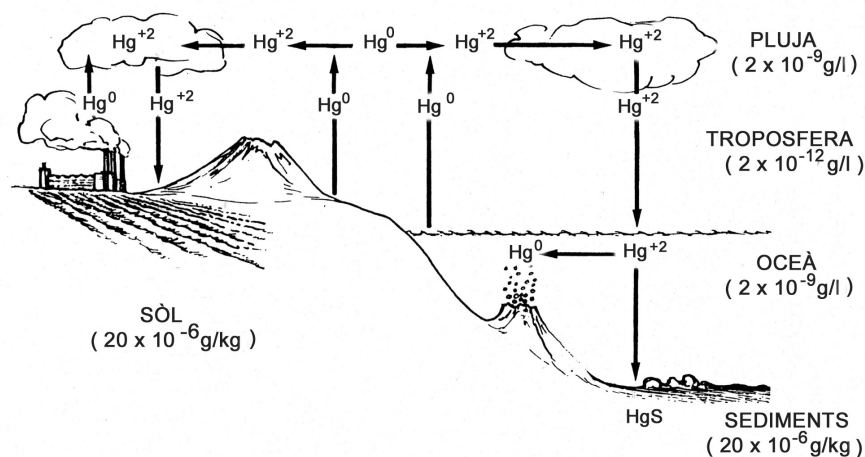


Figura 4.-Cicle global del mercuri. Extret de la monografia de la Organització Mundial de la Salut (WHO 1990).

El cicle global del mercuri (Figura 4) il·lustra la transformació del vapor de mercuri emès a l'atmosfera en les seves formes solubles, com Hg^{+2} , i posterior dipositació a través de les precipitacions, al sòl i a l'aigua. El vapor de mercuri té un temps de permanència en l'atmosfera d'entre 0.4 i 3 anys, mentre que les formes solubles tenen un temps de permanència de poques setmanes. El transport pel sòl i per l'aigua és doncs limitat, i es considera que la dipositació ocorre a poca distància.

La desgasificació de l'escorça terrestre allibera al mediambient unes 2700-6000 tones anuals, mentre que la mineria produeix al voltant d'unues 10.000 tones de mercuri per any, malgrat que cal considerar la variació interanual. Espanya produeix el 90 % del mercuri que s'obté a la Comunitat Europea i de les instal·lacions productores de la mina d'Almadén (Ciudad Real) n'ha sortit la tercera part del mercuri produït al llarg de la història a tot el món (<http://www.mayasa.es>). Altres fonts degudes a l'acció de l'home és la utilització de combustibles d'origen fòssil, la fusió de menes de sofre, la producció de ciment i la incineració de residus. Segons dades globals de mitjans del anys 1990, les tones de mercuri alliberades a l'atmosfera derivades de l'acció humana són 1475 tones degudes a l'ús de combustibles fòssils, 193 tones emprades en la producció de metalls, 133 tones emprades per les indústries cimenteres, 109 tones en l'eliminació de residus i 325 tones utilitzades en altres usos industrials; essent el total de les emissions de 2.235 tones (McGinn 2002). Avui en dia el mercuri continua utilitzant-se en la producció de sosa càustica i clor i és àmpliament utilitzat en la indústria elèctrica per a la fabricació de làmpades, controladors, rectificadors, bateries i endolls, així com en odontologia. Les pèrdues ambientals també es poden donar degut al seu ús continuat en pintures

permanents i antifúngiques, en el tractament de llavors de gramínies i en l'extracció d'or. Tràgicament famós, en l'accident de les mines d'Aznalcóllar l'any 1998 es vessaren 30 tones de mercuri entre d'altres metalls cap al parc natural de Doñana al sud d'Espanya (Grimalt et al. 1999). El 2 d'agost de 2002 el govern espanyol va imposar una multa de 45 milions d'euros per aquest vessament de metalls (Mardones 2002).

El risc d'exposició a mercuri inorgànic per a la població general es troba en les amalgames dentals (amalgames 1:1 en mercuri: plata, estany, coure i zenc) i cremes emblanquidores de la pell (contingut de mercuri del 3 al 10 %) prohibides a la Comunitat Europea, Nord-Amèrica i la majoria dels països africans. Els efectes de les amalgames dentals continua obert ja que els estudis epidemiològics realitzats són inconclusius. En l'actualitat hi ha més de 1.500 treballs sobre mercuri i amalgames dentals recollits a la base de dades Medline.

Pel què fa al metilmercuri el major risc per a la població general es troba en el consum de peix a través de la dieta. L'aire i l'aigua depenent del seu nivell de contaminació poden contribuir de manera significativa a la incorporació diària de mercuri total. En la majoria dels aliments, el mercuri es troba present en la forma inorgànica i per sota del límit de detecció (20 µg mercuri / kg de pes fresc). Una altra compost orgànic de mercuri que és de risc per a la població general és l'etilmercuri (thimerosal) afegit com a antisèptic en les vacunes d'ús comú (Clarkson 2002).

Efectes en l'home

Bioacumulació i transformació

El vapor de mercuri difon ràpidament a través de la barrera hematoencefàlica i el metilmercuri necessita de la conjugació amb compostos que contenen grups sulfhidril per al seu pas a través de la barrera hematoencefàlica (Simmons-Willis et al. 2002 i Warfvinge 2000). Per la seva banda el Hg^{+2} no permea fàcilment la barrera hematoencefàlica, i en exposicions a sals de Hg^{+2} altres teixits sistèmics són diana principal en la seva toxicitat (Zheng 2002). Els compostos de mercuri poden patir quatre tipus de transformació metabòlica: oxidació de Hg^0 , reducció de Hg^{+2} , metilació de Hg^{+2} i demetilació de CH_3Hg^+ . La oxidació de vapors de Hg^0 a Hg^{+2} no és prou ràpida per a prevenir del pas de Hg^0 a través de la barrera hematoencefàlica, la placenta, i altres

teixits, però la seva oxidació un cop als teixits en permetrà la seva l'acumulació. Warfvinge (2000) descriu l'acumulació de mercuri al cervell en fetus i adults de mones després d'exposicions perllongades a vapor de mercuri. El metilmercuri pateix demetilació a l'organisme. Així, s'ha trobat a cervell quantitats importants de Hg^{+2} en exposicions perllongades a metilmercuri en mones (50 μg metilmercuri/kg pes corporal durant temps superiors als 6 mesos) (Vahter et al. 1995). En un estudi fet en 17 i 12 habitants de Groenlàndia i Dinamarca, respectivament, la concentració de mercuri total en cervell correlaciona positivament amb l'edat mentre que el metilmercuri presenta una correlació negativa amb l'edat. Aquests resultats indiquen una acumulació en el temps de mercuri a cervell i una lenta transformació de metilmercuri a mercuri inorgànic (Pedersen et al. 1999). En totes les espècies animals estudiades el sistema nerviós és diana per a metilmercuri, que permea fàcilment la barrera hematoencefàlica i també la placenta, essent els fetus de més alt risc que no pas els adults.

Hipòtesis recents relacionen el contingut de mercuri en l'organisme l'Alzheimer i l'autisme (Bernard et al. 2001 i Hock et al. 1998).

Efectes del metilmercuri en adults

Dues grans epidèmies revelaren el metilmercuri com a agent neurotòxic: la ocorreguda a la badia de Minamata, al Japó, i la ocorreguda a l'Iraq. Els residents de la badia de Minamata, al Japó, tenien una dieta consistent bàsicament en peix de la badia i resultaren exposats a quantitats massives de metilmercuri en produir-se un vessament industrial l'any 1956 cap a les aigües de la badia. Una segona epidèmia ocorregué l'any 1965 a Niigata deguda a la contaminació del riu Agano. Peixos procedents d'aquestes dues zones presentaven uns nivells de mercuri després dels vessaments de 11 i 10 $\mu g/g$ respectivament (Wade et al. 1993). A finals de novembre de 1999, hi havia identificats 2.263 casos a Minamata, 1.368 persones moriren i 895 pacients encara eren vius. A Niigata hi havia 690 casos recollits, dels quals 338 persones moriren i 352 eren encara vius. El síndrome de la malaltia de Minamata consisteix en alteració sensorial a les parts distals de les extremitats, seguit d'atàxia, desequilibri, constricció bilateral concèntrica del camp visual, alteració de la postura i la parla, debilitat muscular, tremolor, anormalitat del moviment ocular i alteració de l'oïda. Desordres mentals i alteració de l'olfacte i el gust també es troben presents ocasionalment (Eto 2000). A Iraq durant l'hivern del anys 1971-1972 es produïren més de 459 morts i una hospitalització de

6.530 persones d'un total estimat de 50.000 afectats. Aquesta intoxicació va ser deguda al consum de gra tractat amb pols de metilmercuri com a pesticida barat. El primer símptoma clínic fou paraestèsia, essent l'atàxia el símptoma clínic principal. En exposicions suficientment elevades també es donà sordesa, disàrtria i mort (Myers et al. 2000). Les concentracions de metilmercuri en el gra tractat van ser d'entre 4.8-14.6 µg/g, amb una mitjana de 9.1 µg/g. D'entre els afectats, mostres de sang de 93 iraquians contenien mercuri a uns nivells entre 1-50 µg/l. La freqüència i la severitat dels símptomes es va correlacionar amb les concentracions de mercuri en sang. Les morts es produïren en nivells de mercuri superiors a 30 µg/l en orina (Wade et al. 1993).

Les manifestacions clíniques en adults correlacionen amb danys evidents en neurones de l'escorça visual i les neurones granulars del cerebel. La degeneració massiva de les neurones granulars cerebelars provoca atàxies marcades (Anthony et al. 2001), essent aquest tipus cel·lulars diana específica pel metilmercuri (Korogi et al. 1994). En un individu intoxicat accidentalment als 8 anys d'edat, els símptomes neurològics van ser de somnolència, sordesa, demència, quadriparesi, ceguesa i convulsions. Aquest individu morí als 29 anys i en les anàlisis del contingut de mercuri en diferents regions cerebrals es troben uns nivells de mercuri superiors a 1 µg/g de teixit humit en l'escorça occipital, l'escorça frontal i el cerebel (Davis et al. 1994).

Kales i Goldman a febrer d'enguany revisen els casos d'exposició humana ocupacional i mediambiental on s'ha analitzat mercuri en sang o orina. Dels casos recollits, hi ha una correlació estadísticament significativa entre el consum de peix moderat i els nivells de mercuri en sang. Malgrat això, no hi ha una associació entre alts nivells de mercuri en sang (superiors a 15 µg /l) i un patró específic d'alteracions de la salut. En un 98% dels casos, els nivells de mercuri en orina foren inferiors a 10 µg/l (Kales i Goldman 2002).

Efectes del metilmercuri en neonats i infants

L'exposició prenatal a metilmercuri pot ser la causa de trastorns severos en el desenvolupament del sistema nerviós central (Myers et al. 2000). S'han identificat 64 casos de malaltia de Minamata fetal. En aquests casos les lesions en cervell en desenvolupament són menys localitzades i hi ha present una hipoplàsia i una aturada en el desenvolupament cerebral més que una destrucció específica de neurones en zones

selectives com ocorre en cervell adult (Eto 2000). Estudis d'exposició in utero en primats també han mostrat un desenvolupament social anormal (Anthony et al. 2001). Exposicions in utero de 15 infants iraquians mostraren els mateixos efectes en el seu desenvolupament que els trobats a Minamata (Wade et al. 1993).

S'han realitzat diferents estudis (al Perú, Canadà, Nova Zelanda, illes Seychelles i illes Faroës) sobre els efectes neurològics en infants. Al Perú els nivells de mercuri trobats en cabells materns (131 dones) estaven entre 1.2 i 30 µg/g, amb una mitjana geomètrica de 8.3 µg/g. No es van trobar anormalitats en el desenvolupament dels infants. A l'estudi fet al Canadà, el contingut de mercuri en cabell matern va ser de 6 µg/g i en un 6% de les mares (estudi de 234 dones) els nivells eren superiors als 20 µg/g. Es va observar to muscular i reflexes anormals en 5 dels 13 nens que patiren exposicions elevades (de 13 a 24 µg/g en cabell matern), però no es va trobar una dosi-resposta consistent per a aquestes efectes i no hi va haver efectes entre les nenes. A més a més no es van observar associacions entre els nivells de mercuri en cabells materns i els resultats neurològics en els infants. En un tercer estudi fet a Nova Zelanda es va observar una lleugera disminució en els test d'intel·ligència a 6 anys d'edat en 15 infants de mares que presentaven un contingut de mercuri al cabell de 13 a 15 µg/g durant l'embaràs. A les illes Seychelles es va fer un estudi rigorós exhaustiu en 700 mares amb els respectius infants. El 75% de les dones estudiades realitzaven de 10-14 menges de peix setmanals i la mitjana de contingut de mercuri en cabell durant l'embaràs va ser de 6.6 µg/g. No es va trobar cap efecte neurològic associat amb l'exposició a metilmercuri entre els infants, que van ser seguits fins als 29 mesos d'edat. Un altre macro-estudi va ser fet a les illes Faroës, on l'exposició a metilmercuri es dona per consum de carn de balena. L'anàlisi de 917 infants de set anys d'edat no va trobar cap anormalitat clínica o neurofisiològica associada a l'exposició a mercuri. En aquests infants es va observar una disminució en l'habilitat en tests neuropsicològics associats a una exposició de mercuri prenatal a nivells de mercuri en cabell matern inferiors a 10 µg/g (Egeland i Middaugh 1997).

Els nivells mínims (concentració de mercuri en cabells matern durant la gestació) als quals es van observar efectes severos són de 404 µg de mercuri/g i els nivells més elevats pels quals no s'han observat efectes severos són 399 µg de mercuri/g en la intoxicació iraquiana (WHO 1990). Evidències en el retard psicomotor (retard en

l'assoliment de fites en el desenvolupament, convulsions i reflexes alterats) es van observar en la intoxicació d'Iraq a nivells de metilmercuri en cabells materns inferiors als associats a efectes severes. L'extrapolació de les dades suggereixen que el retard motor incrementa per sobre de la freqüència habitual a nivells de 10-20 µg de mercuri/g en cabell matern (WHO 1990).

Avaluació de risc. Dades d'exposició humana

El metilmercuri és una neurotòxic acumulatiu que es bioconcentra en la cadena alimentària, i és encara tema de debat el dany per a la salut associat al consum de metilmercuri a través de la dieta, principalment en menges de peix i marisc. Les exposicions a altes dosis de metilmercuri ocorregudes al Japó i a Iraq demostraren la importància de la neurotoxicitat i els seus efectes sobre la salut. Els efectes del sistema nerviós fetal humà aparentment succeeixen a nivells d'exposició menors a aquells que afecten el sistema nerviós adult.

El metilmercuri creua la barrera hematoencefàlica i també la placenta. Els nivells en el cordó umbilical són proporcionals però lleugerament superiors que els nivells en sang materna. Els nivells en el cervell fetal són unes 5-7 vegades superiors que els corresponents nivells en sang materna. La relació cervell-sang en humans i altres primats adults es troba aproximadament en el mateix rang. El metilmercuri també s'acumula en cabell en creixement. Les concentracions en cabell són proporcionals a les concentracions simultànies que existeixen en sang però unes 250 vegades més altes, així com també són proporcionals a l'òrgan diana, el cervell (Clarkson 2002).

Segons l'estudi elaborat per l'acadèmia nacional de ciència nord-americana (NAS) durant l'any 2001 60.000 nadons podrien néixer amb danys neurològics causats per intoxicació de metilmercuri (Schrope 2001). La dada és tema de polèmica ja que resultats preliminars d'un estudi recent fet l'any 1999 als Estats Units (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES 1999) apunten a què els nivells de mercuri en infants i dones en edat fèrtil són, en conjunt, inferiors als considerats perillosos. El contingut de mercuri en sang trobat va ser de 1.2 ng/g per a dones entre 16 i 49 anys i de 0.3 ng/g en nens d'entre 1 i 5 anys (2001). Enguany, un estudi fet en 119 dones a Suècia mostra una acumulació de mercuri a la placenta. El mercuri total a la placenta és de 1.3 µg/kg, essent el metilmercuri un 60% de la quantitat total. Malgrat

que una bona part del mercuri en sang materna quedi retingut a la placenta, els autors apunten que una fracció substancial de mercuri pot arribar al fetus (Ask et al. 2002).

L'agència de protecció del mediambient nord-americana (EPA) elabora una dosi de referència per a tòxics no carcinogènics. La interpretació general d'aquesta dosi de referència és la concentració de tòxic que pot ser consumida diàriament durant tota la vida sense derivar-se'n efectes adversos sobre la salut. Basant-se en les dades iraquianes, on es va produir una intoxicació aguda elevada, l'any 2000 l'EPA va establir una dosi de referència de 0.1 µg/kg/dia com a nivell científicament justificat per a protegir la salut humana dels efectes adversos del metilmercuri (Environmental Protection Agency 2000).

La dosi de referència adoptada per la EPA va provocar múltiples crítiques en la comunitat científica, ja que es basaren també en un macroestudi danès fet en nens monolingües de set anys de les illes Faroès (Atlàntic Nord), on la població consumidora de peix tenia grans quantitats de mercuri en la ingesta però també grans quantitats de bifenils policlorats (PCBs) (Grandjean i White 1999 i Kaiser 2000). Malgrat que els autors es van defensar sobre la solvència de l'estudi i es va fer un reanàlisi de l'estudi a l'any 2001 (Davidson et al. 2001), aquests resultats contrasten amb un segon macroestudi dut a terme en 700 nens bilingües de cinc anys i mig d'edat de les illes Seychelles (Oceà Índic), on no es trobà cap dany en el desenvolupament neurològic dels infants (Kaiser 2000). Els nivells de mercuri en el cabell de les mares dels nadons/infants fou similar en ambdós estudis 6.8 i 4.5 µg/g per a l'estudi de les illes Seychelles i les illes Faroès, respectivament (Mahaffey 1998), amb una concentració mínima de mercuri de 1 µg/g per als efectes trobats en els infants de les illes Faroès (Budtz-Jorgensen et al. 2000).

A Catalunya, el contingut de mercuri en cabells de nens de la província de Tarragona determinat l'any 1996 va ser de 0.77 µg/g de mitjana, amb valors de fins 1.93 µg/g en nens amb 4 ingestes de peix a la setmana (Batista et al. 1996). En aquest estudi de Batista et al. una mostra de 233 escolars d'entre 6 i 16 anys fou analitzada a tres poblacions: Flix, Tarragona i Tortosa. El lloc de residència, el sexe i la freqüència de consum de peix i marisc van afectar significativament els nivells de mercuri. Per a la mostra de Tortosa es disposà de 63 nens i presentaren un nivell de mercuri de 0.97 µg/g,

mentre que a Tarragona (100 nens) i Flix (70 nens) els nivells foren de 0.83 i 0.57 µg/g respectivament. La ingesta de peix de 3 (25 nens) o 4 (5 nens) cops per setmana va donar lloc a uns nivells de mercuri > 1.25 µg/g respecte a nens que no en menjaven (5 nens, 0.45 µg/g). Pel que fa al sexe, els nens (79 individus) presentaven uns nivells de mercuri de 0.54 µg/g, pràcticament la meitat que les nenes (154 individus), 0.92 µg/g. No van tenir influència variables com l'edat, el nombre d'amalgames dentals, el color dels cabells o l'ocupació dels pares. Els autors no mencionen cap anormalitat neurològica en aquests infants escolaritzats.

La mitjana en contingut de mercuri en cabell és entre 0.27 i 34.2 µg /g en poblacions d'Alaska, Albània, Brasil, Corea, Espanya, Estats Units, illes Faroes, Ghana, Itàlia, Indonèsia, Japó, Malàisia, illes Maldives, Papua Nova Guinea, illes Seychelles, Suècia, Tanzània, República Txeca, Xile i Xina; trobant-se nivells de fins a 71.9 µg/g en indígenes de Papua Nova Guinea amb alt consum de peix a la seva dieta (Adimado i Baah 2002, Babi et al. 2000, Barbosa et al. 2001, Batista et al. 1996 i Mahaffey 1998). Pel que fa al contingut de mercuri mesurat en cervell, dades recents de la província de Tarragona indiquen una quantitat total de mercuri inferior a 0.05 µg/g de teixit humit en mostres obtingudes de d'autòpsies realitzades en 78 individus. D'altres estudis descriuen la presència de mercuri al cervell no superior a 0.1 µg/g en teixits obtinguts en autòpsies (García et al. 2001). En un estudi fet en 17 habitants de Groenlàndia i 12 habitants de Dinamarca, la concentració cervell va ser de 0.174 µg mercuri /g de cervell i 0.004 µg mercuri/g de cervell, respectivament (Pedersen et al. 1999). S'han arribat a trobar concentracions de mercuri de fins a 1.97 µg/g en algunes zones cerebrals en un individu que presentava greus símptomes neuropatològics intoxicat accidentalment per metilmercuri als Estats Units (Davis et al. 1994).

L'acadèmia nacional de ciència nord-americana (NAS), després d'un estudi de revisió de 18 mesos de durada sobre la dosi de referència elaborada per la EPA, va ratificar la dada de 0.1 µg metilmercuri/kg/dia (Kaiser 2000). La dada establerta per la EPA és cinc vegades inferior a la de la recomanada per la Organització Mundial de la Salut (0.47µg metilmercuri/kg/dia) i a la permesa al Japó (0.43 µg metilmercuri/kg/dia) (Kawaguchi 1998 i WHO 1990). La dosi de referència per al metilmercuri establerta per la EPA correspon a unes concentracions en cabell de 1.1 µg mercuri/g (Budtz-Jorgensen et al. 2000).

El consum per part de dones adultes (60 kg) de 350 g setmanals de peix contenint 0.25 µg mercuri/g excediria el límit recomanat per la EPA (0.1 µg/kg/dia). Tant a la Unió Europea com als Estats Units, els límits permesos per a la comercialització dels peixos és de 1µg mercuri/g teixit (Egeland i Middaugh 1997 i Storelli i Marcotrigiano 2001), deu vegades inferior al trobat en peixos de a badia de Minamata i Niigata després dels vessament industrial (Wade et al. 1993). Els nivells de mercuri en peixos de consum humà als Estats Units, com el llobarro, l'halibut, el verat, el lluç de riu i la tonyina, es troba entre 0.2 i 0.3 µg mercuri/g teixit (Egeland i Middaugh 1997). Al Mediterrani, dades de 2001, el peix espasa presenta uns nivells de 0.5 µg mercuri/g teixit i la tonyina de 1.0 µg mercuri/g teixit (Storelli i Marcotrigiano 2001). A Espanya, els nivells trobats en peixos pescats als rius Gállego i Cinca l'any 1996 foren d'entre 0.25 i 4.41 µg mercuri/g teixit (Raldúa i Pedrocchi 1996). Nivells molts més baixos foren trobats entre els anys 1992 i 1995 en els mercats de Guipúscoa, entre 0.05 i 0.031 µg mercuri/g teixit. Un grup de 8417 voluntaris de la regió van participar en l'estudi d'ingesta de peix i ingesta de mercuri a través de la dieta. La mitjana diària d'ingesta de peix va ser de 88.6 g i 55 g diaris per a homes i dones, respectivament. Considerant que del total del mercuri trobat als peixos un 90% es troba en la forma de metilmercuri, el total ingerit seria de 6.2 i 3.4 µg metilmercuri/dia per a homes i dones, respectivament. Segons l'índex establert per la EPA, un 25% dels homes i un 15% de les dones estarien excedint aquest límit, però cap dels individus va superar el límit establert per la Organització Mundial de la Salut (Sanzo et al. 2001). En un estudi realitzat l'any 1993, Catalunya estaria en una posició intermitja pel què fa a la ingesta de metalls pesats a través de la dieta respecte el conjunt d'Espanya i la resta de comunitats autònomes espanyoles (Moreiras Tuni i Cuadrado Vives 1993). En mostres preses a la província de Tarragona entre el novembre de 1992 i 1993, el contingut de mercuri en peixos, moluscs i crustacis va ser d'entre 1 i 1819 µg de mercuri /kg de pes humit. La meitat de les mostres es van considerar com a contaminades per mercuri degut a fonts antropogèniques. Peixos i crustacis van presentar els nivells més alts de mercuri mentre que els moluscs van mostrar els nivells més baixos (Schuhmacher et al. 1994)

En relació al contingut de mercuri en organismes aquàtics l'any 2001 l'agència nord-americana FDA (U.S. Food and Drug Administration) feu la recomanació de suprimir les ingestes de peix predadors situats a nivells alts en la cadena alimentària,

com el peix espasa i el tauró en dones gestants (McGinn 2002). Per altra banda, peixos i mariscs són font d'àcids grassos poliinsaturats omega-3, i tenen un alt contingut en proteïnes i antioxidants com el seleni i la vitamina E i un contingut baix en greixos saturats. Els àcids grassos poliinsaturats omega-3 són importants per al desenvolupament cerebral i retinal, la maduració de l'escorça visual i el desenvolupament motor i poden ajudar a regular el son en infants, suggerint-se com a complement en la dieta durant l'embaràs (Egeland i Middaugh 1997). Recentment s'han trobat nivells elevats de mercuri i seleni en indígenes del Brasil. Mentre que el mercuri provindria exclusivament dels peixos consumits, el seleni es troba en peixos i també en les nous i fruits de la regió. La complexació equimolar del mercuri amb el seleni i la seleproteïna P explicaria alts nivells de mercuri de l'ordre de 5-10 µg/g en cabells en individus de totes les edats (4-56 anys) (Soares et al. 2002). Els propis antioxidants de peix i marisc, com el seleni i la vitamina E, podrien protegir contra els efectes potencials d'exposicions de metilmercuri en dosis baixes i poden ser l'explicació a les diferències trobades en els estudis poblacionals realitzats (Egeland i Middaugh 1997).

Alteracions cel·lulars i subcel·lulars al sistema nerviós central

Alteracions en l'estructura cel·lular

El metilmercuri té com a diana components del citoesquelet, i en especial els microtúbols. La fragmentació dels microtúbols i la dissolució de la xarxa neuronal s'ha observat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel a concentracions de metilmercuri de 0.5-1 µM. En el model *in vitro* aquests efectes precedeixen la mort apoptòtica de les neurones. La integritat de la funció dels microtúbols és crítica pel desenvolupament del sistema nerviós i participa en la proliferació cel·lular, la migració de cèl·lules postmitòtiques per a formar l'escorça cerebral i cerebel·lar, l'extensió i estabilització de neurites i el transport axodendrític, processos que es troben alterats en exposicions a compostos de mercuri (Castoldi et al. 2001).

Alteracions en la neurotransmissió

Els compostos de mercuri alteren els sistemes GABAèrgic, dopaminèrgic, serotoninèrgic, adrenèrgic, noradrenèrgic, glutamatèrgic i colinèrgic (Bernard et al. 2001 i Castoldi et al. 2001), actuant a nivell de receptors i de transportadors. En el

present treball s'ha estudiat els efectes dels compostos de mercuri en la neurotransmissió GABAèrgica: l'alteració de la modulació al·lostèrica del receptor GABA_A, i glutamatèrgica: el transport de glutamat en neurones, alliberament, captació i afectació del transportador neuronal.

Els compostos de mercuri modifiquen les respostes inhibidores mediades pel receptor GABA_A. Arakawa et al. (1991) va descriure una estimulació de les corrents induïdes per GABA a les neurones de l'arrel del gangli dorsal per clorur de mercuri i no per metilmercuri. D'altra banda, Yuan i Atchison (1997) descriuen que el metilmercuri bloqueja tant els potencials i corrents postsinàptics inhibidors com les respostes evocades per l'agonista del receptor GABA_A muscimol en talls de teixit d'hipocamp CA1. A més a més Allan i Baier (1992) trobaren que els compostos de mercuri inhibeixen el flux de clorur induït per GABA en microsacs corticals. Komulainen et al. (1995) descriuen que el metilmercuri incrementa la unió de [³H]flunitrazepam en absència de GABA en membranes de cervell de rata.

Els receptors nicotínics i muscarínics (Bondy i Agrawal 1980 i Castoldi et al. 1996), receptors d'NMDA (Rajanna et al. 1997b), receptors adrenèrgics (Rajanna et al. 1997a) i receptors de dopamina (Bondy i Agrawal 1980 i Scheuhammer i Cherian 1985) han estat descrits com a diana per concentracions micromolar de compostos de mercuri. El metilmercuri (10 µM), disminueix la unió de [³H]nicotina i [³H]pilocarpina a receptors nicotínics i muscarínics, respectivament. El clorur de mercuri és més efectiu que el metilmercuri en el bloqueig de la unió de [³H]QNB als receptors muscarínics colinèrgics de membranes corticals i de la unió de [³H]espiroperidol a receptors de dopamina estriatals. Mentre que la funcionalitat dels receptors colinèrgics es troba afectada, les respostes a dopamina no mostra variació en exposicions a metilmercuri en una línia cel·lular de neuroblastoma (Sirois i Atchison 1996). El clorur de mercuri (2-40 nM) bloqueja les respostes mediades per kainat i glutamat en neurones hipocampals de rata. Així mateix s'ha trobat una marcada inhibició de unió de [³H]AMPA a membranes sinàptiques de cervell de rata (Kiskin et al. 1986).

Ambdós compostos de mercuri, clorur de mercuri i metilmercuri causen alteració en el transport d'aminoàcids i neurotransmissors; així, el transport de glutamat, noradrenalina, dopamina, acetilcolina, i serotonina és alterat per concentracions

micromolars de metilmercuri i clorur de mercuri (Aschner et al. 2000, Dave et al. 1994, Gassó et al. 2000, Hare et al. 1990, Maekawa et al. 2000 i Sirois i Atchison 1996,).

Tant el clorur de mercuri com el metilmercuri inhibeixen la captació de glutamat en astròcits en cultiu a concentracions de rang μM i incrementen l'alliberament de [^3H]D-aspartat prèviament carregat (Albrecht et al. 1993, Allen et al. 2001b, Aschner et al. 1993, Aschner et al. 2000, Brookes 1988 i Dave et al. 1994). A més, el mercuri disminueix el llindar per a la neurotoxicitat del glutamat presumiblement inhibint la captació de glutamat. Cultius organotípics derivats de cerebel de rates neonates toleren 100 μM de glutamat i 1 μM de clorur de mercuri si l'exposició als dos compostos es realitza per separat, però no si és conjunta (Matyja i Albrecht 1993). El clorur de mercuri desacobla la captació de glutamat de l'antiport d'hidroxils i a 10 μM és capaç d'inhibir el 60% dels transportadors de glutamat d'alta afinitat EAAT1, EAAT2 i EAAT3 (Nagaraja i Brookes 1996 i Trotti et al. 1997). Per a revisió veure Danbolt (2001).

En cultius d'astròcits el clorur de mercuri és més potent inhibint el transport de glutamat que la captació de 2-deoxiglucosa (índex de la utilització de glucosa i reflex de la funció de la Na^+ , K^+ -ATPasa i l'hexokinasa), indicant una alteració selectiva del transport de glutamat a concentracions a les quals no compromet altres funcions vitals per a la cèl·lula (Brookes 1988). Altres autors també descriuen la inhibició de la Na^+ , K^+ -ATPasa per clorur de mercuri i per metilmercuri (Albrecht i Hilgier 1994, Aschner et al. 1991 i Magour 1986). El clorur de mercuri també inhibeix el cotransport de Na^+ - K^+ - Cl^- amb una constant d'inhibició per al transportador humà de 43 μM (Jacoby et al. 1999). La desregulació iònica podria contribuir als efectes del metilmercuri a nivell de membrana, així com ser la base dels efectes del metilmercuri en l'inflament astrocitari (Aschner et al. 2000).

Alteració de l'homeòstasi cel·lular

El calci juga un paper crític en el funcionament i la mort cel·lular en el sistema nerviós central. Increments en el calci intracel·lular produeixen una activació d'enzims degradatius, com fosfolipases, proteases i endonucleases, produint una disfunció mitocondrial i una pertorbació de la organització del citoesquelet (Choi 1995 i Orrenius

i Nicotera 1994). Concentracions de metilmercuri 0.25-1 μM bloquegen diversos subtipus de canals de calci en les neurones granulars de cerebel en cultiu, sense que s'hagin adscrit a un subtipus específic (Sirois i Atchison 2000). L'exposició de 0.2-5 μM metilmercuri durant 30 minuts produeix un increment bifàsic en el calci intracel·lular, que comprèn una primera fase petita deguda a l'alliberament de calci dels reservoris intracel·lulars i una segona fase que requereix l'influx de calci extracel·lular (Marty i Atchison 1997). Per bé que no té un efecte immediat, la desregulació de l'homeòstasi del calci contribueix a la pèrdua de la viabilitat neuronal en les cèl·lules granulars de cerebel (Marty i Atchison 1998). Compostos que eviten un increment en el calci intracel·lular, inhibidors de la Ca^{+2} -ATPasa del reticle endoplasmàtic, de canals de calci i de l'intercanviador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ són capaços d'evitar parcialment els efectes citotòxics de metilmercuri i de clorur de mercuri en cèl·lules granulars de cerebel cultivades (Gassó et al. 2001 i Marty i Atchison 1998), mentre que el bloqueig de l'estimulació en la fosfolipasa 2 induïda per mercuri no té cap efecte en la viabilitat cel·lular (Verity et al. 1994). El compost bloquejant de canals de calci flunarizina a concentracions de 50 μM és capaç d'evitar la mort de neurones cerebelars cultivades produïda per metilmercuri, i *in vivo* evita l'aparició de símptomes neurològics en rates tractades durant 12 dies amb 5 mg metilmercuri /kg/dia i 50 mg flunarizina /kg/dia (Sakamoto et al. 1996).

Les espècies reactives de l'oxigen i nitrogen són considerades iniciadores del dany peroxidatiu, essent el cervell especialment vulnerable. Antioxidants o segrestants de radicals d'oxigen i nitrogen s'han mostrat efectius en els efectes deleteris del metilmercuri tant en estudis *in vitro* com *in vivo*. La generació per part de metilmercuri d'espècies reactives de l'oxigen, però no la lipoperoxidació, sembla ser un esdeveniment crucial cap a determinar la progressió de dany i mort cel·lular en neurones (Castoldi et al. 2001). Yee i Choi (1996) suggeriren alteracions en el transport d'electrons a la regió ubiquinol:citocrom c oxidoreductasa, afectant el complex III del mitocondri, com a mecanisme d'acció del clorur de mercuri. Aquesta alteració mitocondrial podria ser la font dels radicals lliures produïts. *In vivo*, nivells alts de mercuri en cervell s'han associat amb increments de superòxids i peròxid d'hidrogen en ratolins tractats amb 2.5 mg clorur de mercuri/kg durant 3 dies. A més, als 7 dies d'exposició es trobaren nivells reduïts de la superòxid dismutasa, indicant l'alteració de les defenses redox del cervell (Nayeem et al. 1994). *In vivo* els efectes del metilmercuri

i el clorur de mercuri poden ser revertits per l'antioxidant Trolox, anàleg de la vitamina E soluble en aigua. Les rates tractades, presentant apoptosi en les cèl·lules granulars de cerebel, mostren un increment en l'activitat catalasa i un decrement en l'activitat glutatió peroxidasa, mantenint els mateixos nivells de glutatió en múscul esquelètic (Usuki et al. 2001). Així mateix, la deferoxamina inhibeix l'increment de les espècies reactives de l'oxigen produïdes per metilmercuri tant *in vivo* com *in vitro* (LeBel et al. 1992). *In vitro*, la citotoxicitat del metilmercuri és reduïda per antilipoperoxidants però només completament evitada per alguns agents antioxidants com el glutatió i l'n-propilgallat, tant en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de rata, en el neuroblastoma SH-SY5Y i en astròcits i neurones humanes cultivades (Gassó et al. 2001 i Sanfeliu et al. 2001). La selectiva vulnerabilitat de les neurones al mercuri s'ha relacionat amb l'absència o presència reduïda de mecanismes cel·lulars protectors com les metal·lotioneïnes, el glutatió, l'hemoxygenasa i altres proteïnes d'estrès oxidatiu (Sarafian et al. 1996).

En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel 0.5-1 μ M metilmercuri durant 10 hores indueix tant una fosforilació com una síntesi de proteïnes anormal i un increment en els nivells d'inositol fosfat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel (Sarafian 1993 i Sarafian i Verity 1990). Utilitzant anàlisis en gels en dues dimensions Yagame et al. (1994) va descriure una alteració diferencial en el patró de fosforilació de les 24 espècies proteïques principals al cervell de la rata en resposta a 10 mg metilmercuri/kg/dia durant 7 dies. La incidència d'una major fosforilació afecta el funcionament de les proteïnes cel·lulars. Així, trobem efectes de la fosforilació en la neurotoxicitat del mercuri en el receptor GABA_A, on l'increment en l'activitat de la proteïna kinasa A per proteïnes G estaria mitjançant els efectes inhibidors del clorur de mercuri com ha estat proposat per Huang i Narahashi (Huang i Narahashi 1997a i Huang i Narahashi 1997b) i en la fosforilació de la proteïna tau (Olivieri et al. 2000).

Apoptosi

En humans exposats a metilmercuri s'observa una degeneració selectiva de les cèl·lules granulars al cerebel (Korogi et al. 1994). El mecanisme, però, segons el qual aquestes neurones degeneren no està clarament establert. Rates tractades amb metilmercuri (4 mg/kg per via oral durant 10 dies alterns) desenvolupen símptomes

neurollògics d'atàxia i espasticitat en caminar. Les cèl·lules selectivament afectades són les granulars de cerebel, trobant-se intactes les fibres mielinitzades del glomèrul sinàptic de la capa granular així com les cèl·lules de Purkinje. El patró de lesions histopatològiques comprèn picnosi i trencament nuclear, fragmentació del DNA amb extrems 3' lliures i una morfologia de les cèl·lules clarament apoptòtica (Nagashima et al. 1996). Usuki et al. (2001) troben també fragmentació del DNA amb extrems 3' lliures i apoptosi en cèl·lules granulars de cerebel en tractar rates amb 2mg/kg per via oral durant 8 dies amb metilmercuri o amb clorur de mercuri. Aquests signes apoptòtics es donen a una concentració de metilmercuri en cerebel de $9.7 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ i de clorur de mercuri de $0.20 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ i són revertits per l'antioxidant Trolox, anàleg soluble en aigua de la vitamina E. En cultius primaris madurs de cèl·lules granulars de cerebel, concentracions de $1 \mu\text{M}$ metilmercuri durant 24h provoca una condensació nuclear i fragmentació del DNA en fragments d'alt pes molecular (Dare et al. 2000), que va ser evitat per agents antioxidants (Ahlbom et al. 2000). A concentracions de $0.3 \mu\text{M}$ durant 72 hores ja s'observen els canvis morfològics típics de l'apoptosi en cèl·lules granulars de cerebel, acompanyat de fragmentació del DNA en talls d'alt pes molecular (Kunimoto 1994).

La mort cel·lular per apoptosi no sempre és observada en cèl·lules granulars de cerebel en resposta a metilmercuri. El tractament de cultius amb $5\text{-}10 \mu\text{M}$ de metilmercuri durant 1 hora causa una disfunció de l'activitat mitocondrial, una desenergització del mitocondri i una llisi de la membrana plasmàtica (Castoldi et al. 2000). L'apoptosi s'observa en tractaments de $0.5\text{-}1 \mu\text{M}$ a partir de les 6 hores, observant-se també un trencament del citoesquelet. Aquestes concentracions no comprometen la viabilitat cel·lular a curt termini (Castoldi et al. 2000). Limke i Atchison (2002), descriuen l'obertura del porus de transició mitocondrial en resposta a concentracions de calci intracel·lular elevades que al seu torn causarien la pèrdua del potencial mitocondrial a concentracions de metilmercuri entre 0.2 i $0.5 \mu\text{M}$ durant 24 h. Un increment de calci intracel·lular a concentracions de metilmercuri de 0.5 i $1 \mu\text{M}$ en temps inferiors a una hora són capaços de produir una pèrdua de viabilitat retardada de les cèl·lules granulars de cerebel (Marty i Atchison 1998). Malgrat la implicació del calci intracel·lular, la utilització de bloquejants de canals de calci protegeixen les cèl·lules granulars de cerebel en menor grau respecte a l'acció dels antioxidants (Gassó et al. 2001). El conjunt d'aquests estudis indiquen un possible paper clau del mitocondri

en la senyalització cel·lular en l'apoptosi de cèl·lules granulars de cerebel en cultiu primari madur causades pels compostos de mercuri.

D'altra banda, també s'han descrit efectes dels compostos de mercuri en la viabilitat de cèl·lules granulars de cerebel en desenvolupament. En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, la pèrdua de viabilitat deguda a un tractament de 2 μM de metilmercuri durant 24 h pot ser parcialment evitada amb la coaplicació de concentracions del factor I de creixement semblant a la insulina (IGF-I) superiors a 5 ng/ml. Aquesta protecció indicaria que metilmercuri i IGF-I podrien estar actuant sobre la mateixa via de supervivència/mort en la via d'apoptosi depenent de receptors de mort (Bulleit i Cui 1998). Comparant els efectes del metilmercuri i el clorur de mercuri en cultius reagregats (que contenen neurones i glia) madurs i immadurs, s'observa una toxicitat incrementada dels dos compostos en cultius immadurs de l'ordre nM, així com una certa especificitat del metilmercuri per a la toxicitat en neurones al rang μM en un estadi madur del cultiu (Monnet-Tschudi et al. 1996). Durant el desenvolupament les cèl·lules granulars externes en divisió migren fins a la seva localització final a la capa interna granular. Utilitzant cultius organotípics que mimetitzen la migració que es duu a terme *in vivo*, Kunitomo i Suzuki (1997) descriuen la taxa d'aquesta migració en un 50.9 i un 18.7 % per tractament amb 3 i 10 μM metilmercuri, respectivament, durant 3 dies mentre que els controls presenten una migració del 70.3%. Segons els autors, seria com a resultat d'aquesta disminució en la migració que apareixen cèl·lules apoptòtiques que presenten una gran quantitat de DNA fragmentat amb extrems 3' lliures.

Les cèl·lules granulars del cerebel no són les úniques que pateixen apoptosi en ser exposades a compostos de mercuri. Shenker et al. (2000) van descriure dues rutes d'apoptosi diferent depenent de la forma química del mercuri. Així, tractament de limfòcits humans amb 1.25-5 μM de metilmercuri o 25 μM de metilmercuri fins a 16 h produeixen una cascada de senyalització intracel·lular que inclou l'increment del calci intracel·lular, la generació d'espècies reactives de l'oxigen, una disminució del potencial de membrana mitocondrial i una disminució del pH intracel·lular. Aquest estrès oxidatiu acompanyat d'uns nivells reduïts de glutatió, porta a l'activació de caspases efectores: a través de la caspasa 3 en el clorur de mercuri i a través de l'alliberament de citocrom c en el cas del metilmercuri.

La mort apoptòtica es pot donar per tres rutes principals de mort: depenent de receptors de mort o per alteració mitocondrial. Una disfunció mitocondrial comporta la permeabilització de la membrana externa mitocondrial i un alliberament al citoplasma de proteïnes que en condicions normals tenen una localització restringida al mitocondri, com el citocrom c, el factor iniciador de l'apoptosi (AIF), acinus, l'endonucleasa mitocondrial G i el segon activador mitocondrial de caspases (SMAC) (Gorman et al. 2000 i Joza et al. 2001). La translocació del citocrom c al citosol és l'element clau desencadenant de l'activació de caspases efectores que porten a terme la fase degradativa de proteïnes i de DNA. Nogensmenys però, una condensació de les proteïnes i un trencament del DNA pot ser induït per altres factors, com el factor inductor de l'apoptosi (Gupta 2001). La translocació nuclear del factor AIF és suficient per a induir el trencament del DNA i la condensació nuclear de manera independent a l'activació de les caspases (Susin et al. 1999). En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel exposicions a metilmercuri o peròxid d'hidrogen indueixen apoptosi, condensació nuclear i una fragmentació del DNA sense activar la maquinària de les caspases (Dare et al. 2000). Per la seva banda, l'agent disruptor de microtúbols allibera citocrom c al citosol i activa caspases produint apoptosi, condensació nuclear i fragmentació de DNA (Gorman et al. 1999).

En el cinquè objectiu del present treball ens vam plantejar la determinació de la localització subcel·lular del factor iniciador de l'apoptosi (AIF) cel·lular en cèl·lules granulars de cerebel exposades metilmercuri. Així mateix, es va assajar l'agent disruptor de microtúbols colchicina i l'agent oxidant peròxid d'hidrogen per tal d'esbrinar i comparar les vies de senyalització intracel·lular que porten a la mort neuronal en resposta a aquests agents neurotòxics.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

La present tesi s'inclou dins els projectes de recerca: FIS 97/0656, FIS 00/1094 i FIS 01/1318. Objectius generals d'aquests projectes són: (a) l'estudi de les modificacions generades en la neurotransmissió glutamatèrgiques excitadora i GABAèrgica inhibidora per agents neurotòxics; (b) la identificació i caracterització de les interrelacions entre estrès oxidatiu i neurotransmissió i (c) l'elucidació de la interacció existent entre els sistemes de neurotransmissió glutamatèrgica i GABAèrgica i el seu paper en els mecanismes de toxicitat neuronal.

Els objectius específics del present treball han estat:

a.- Estudiar els efectes dels pesticides organoclorats γ -hexaclorciclohexà (lindà), α -endosulfà i dieldrin en els receptors ionotròpics inhibidors del cervell de mamífers: el receptor GABA_A i el receptor de glicina. Els pesticides organoclorats γ -hexaclorciclohexà (lindà), α -endosulfà i dieldrin són agents neurotòxics que en mamífers indueixen un síndrome d'hiperexcitabilitat acompanyat per convulsions (Suñol et al. 1989, Bloomquist 1992 i Bloomquist 2002). Aquests policlorcicloalcans actuen com a antagonistes no-competitius als receptors GABA_A, reduint el flux de Cl⁻ induït per GABA (Obata et al. 1988, Pomés et al. 1993, Pomés et al. 1994b, Ikeda et al. 1998, Suñol et al. 1998 i Nagata et al. 1996). El receptor de glicina sensible a estriçnina també regula les respostes inhibidores mediades pel flux de Cl⁻ al sistema nerviós central i la seva disrupció pot portar a un síndrome d'hiperexcitabilitat (Legendre 2001). L'objectiu del treball ha estat estudiar els efectes del lindà, α -endosulfà i dieldrin en els canals associats amb els receptors de glicina en cultius de cèl·lules granulars de cerebel en comparació amb el receptor GABA_A i elucidar les característiques estructurals d'aquests compostos que en determinen la seva especificitat. El model utilitzat han estat cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, que expressen de manera funcional tant el receptor GABA_A com el receptor de glicina (Pomés et al. 1993, Pomés et al. 1994a, Suñol et al. 1994 i Wahl et al. 1994 i Carlson et al. 1998).

b.- Estudiar els mecanismes de modulació que exerceixen els compostos de mercuri sobre el receptor GABA_A. Tant el clorur de mercuri com el metilmercuri actuen sobre els corrents induïts per GABA en diferents models *in vitro* (Arakawa et al. 1991, Allan i

Baier 1992, Huang i Narahashi 1996 i Yuan i Atchison 1997). El metilmercuri incrementa la unió de benzodizepines en membranes cerebrals de rata *in vitro* i en diferents regions cerebrals després d'una administració aguda de metilmercuri *in vivo* (Corda et al. 1981 i Komulainen et al. 1995). El model d'estudi escollit són les cèl·lules granulars de cerebel en cultiu primari, ja que aquest tipus cel·lular és una diana específica per als compostos de mercuri *in vivo* en humans i en animals d'experimentació (Korogi et al. 1994 i Nagashima et al. 1996). A més a més les cèl·lules granulars de cerebel en cultiu expressen el receptor GABA_A funcional i amb característiques pròpies del receptor *in situ* (Cupello i Robello 2000). L'objectiu del treball ha estat estudiar l'efecte dels compostos de mercuri en el llocs de reconeixement del receptor GABA_A i en les interaccions al·lostèriques que exerceixen aquests diferents llocs de reconeixement.

c.-Investigar els efectes dels compostos de mercuri en la neurotransmissió glutamatèrgica neuronal: alliberament de glutamat i efectes en el transport i en el transportador de glutamat (EAAT3) en neurones diana, utilitzant cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. El glutamat és el principal aminoàcid excitador en el sistema nerviós central de mamífers, i una desregulació en la seva neurotransmissió determina la mort neuronal per excitotoxicitat. Relacionats amb el transport de glutamat en l'actualitat es coneixen cinc transportadors d'alta afinitat. Els transportadors glicals (EAAT1 i EAAT2) són els encarregats de la recaptació del glutamat del solc sinàptic, mentre que és desconeguda la funció del transportador neuronal EAAT3 (Palacín et al. 1998). Els transportadors EAAT1, EAAT2 i EAAT3 tenen una modulació redox de la seva funció (Trotti et al. 1998) i mostren homomultimerització en resposta a condicions oxidants espontànies i induïdes per agents químics (Haugeto et al. 1996). Les cèl·lules granulars de cerebel són neurones glutamatèrgiques i expressen el transportador neuronal EAAT3 al soma i a les dendrites tant *in vivo* com en cultiu primari (Furuta et al. 1997 i Numakawa et al. 2001). Els compostos de mercuri alteren el transport de glutamat en cultius primaris d'astròcits i en preparacions purificades dels transportadors glicals i neuronal (Albrecht et al. 1993, Trotti et al. 1997 i Allen et al. 2001). L'objectiu de l'estudi ha estat la caracterització de l'acció dels compostos de mercuri sobre el transport de glutamat en les neurones granulars del cerebel.

d.- Estudiar les alteracions induïdes pels compostos de mercuri clorur de mercuri i metilmercuri en la viabilitat cel·lular de neurones diana. Implicació del mitocondri i de l'excitotoxicitat. Els compostos de mercuri són agents neurotòxics que causen pèrdua de la viabilitat neuronal. La presència excessiva de glutamat al solc sinàptic causa també mort neuronal. Aquests agents indueixen un increment massiu del calci intracel·lular a través de canals de calci dependents de voltatge i dels receptors ionotròpics de glutamat, respectivament (Sattler i Tymianski 2000 i Sirois i Atchison 2000). L'entrada de calci deguda a glutamat comporta la pèrdua de viabilitat neuronal i la generació d'espècies reactives d'oxigen que determina afectació mitocondrial (Atlante et al. 2001). Semblantment, els efectes dels compostos de mercuri inclouen l'increment de calci intracel·lular, la generació d'espècies reactives d'oxigen i l'afectació del mitocondri (LeBel et al. 1992, Yee i Choi 1996 i Gassó et al. 2001). L'objectiu del treball ha estat l'estudi de les alteracions en la viabilitat cel·lular i les implicacions del mitocondri i de l'excitotoxicitat en neurones glutamatèrgiques diana per als compostos de mercuri clorur de mercuri i metilmercuri.

e.- Estudiar una nova via de senyalització intracel·lular de mort neuronal induïda per exposicions a metilmercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Recentment s'ha descrit que els agents colchicina, metilmercuri i peròxid d'hidrogen causen apoptosi en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, caracteritzada per condensació nuclear i fragmentació del DNA en talls d'alt pes molecular (Bonfoco et al. 1995, Gotz et al. 1999 i Dare et al. 2000). Nogensmenys però, només el tractament amb colchicina causa l'activació de caspases, implicant que altres factors a banda de la DNAsa activada per caspases són responsables del trencament del DNA en els altres dos models. El factor iniciador de l'apoptosi (AIF) és una proteïna mitocondrial que també participa en la fase de degradació de l'apoptosi produint talls de DNA d'alt pes molecular (Kaufmann i Hengartner 2001). L'objectiu del treball ha estat l'estudi de la via de senyalització de l'AIF, la seva translocació del mitocondri cap al nucli, com a possible esdeveniment clau de la condensació de la cromatina en cèl·lules granulars de cerebel exposades a metilmercuri i a l'agent oxidant peròxid d'hidrogen.

PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS

Materials

Per als cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, els ratolins NMRI van ser comprats a Iffa Credo (St. Germain-sur-l'Arbestre, França) i les rates Sprague-Dawley a B&K (Estocolm, Suècia). Les plaques de cultiu es van obtenir de CoStar (Corning Science Products, Acton, MA, EEUU) i NUNC Ltd. (Roskilde, Alemanya). El sèrum fetal boví es va obtenir de Gibco (Glasgow, Regne Unit) i el Dulbecco's Modified Eagle Medium de Biochrom (Berlín, Alemanya). La poli-L-lisina, uridina, 5-fluoro-2'-deoxiuridina i citosina-1- β -arabino-furanòsid van ser comprats a SIGMA Chemical Co (St Louis, MO, EEUU).

El $^{36}\text{Cl}^-$ utilitzat va ser de NEN, Life Sciences Products, Inc (MA, EEUU). $[^3\text{H}]\text{GABA}$, D-[2,3- ^3H]aspartat i $[^3\text{H}]\text{flunitrazepam}$ d'Amersham, (Life Sciences, Buckinghamshire, Regne Unit). El còctel líquid de centelleig Optiphase "Hisafe" 2 utilitzat provenia de Wallac Oy, (Turku, Finlàndia).

L'anticòs policlonal contra el factor iniciador de l'apoptosi (AIF) de ratolí, fet en cabra, va ser comprat a Santa Cruz Biotechnology (CA, EEUU). L'anticòs secundari anti-cabra conjugat amb fluoresceïna tiocianat, fet en conill, que es va utilitzar en la localització immunohistoquímica del factor AIF va ser comprat a SIGMA Chemical Co (St Louis, MO, EEUU). L'antisèrum contra EAAT3 de rata, fet en conill, es va obtenir de Biotrend Chemicals (Alemanya). L'anticòs secundari anti-conill conjugat amb fosfatasa alcalina, fet en burro, va ser comprat a Jackson Laboratories Inc (Pennsylvania, EEUU). Per al revelat de la senyal d'aquest anticòs secundari es van utilitzar els reactius Immun-Star HPR Chemiluminiscent de BioRad (Múnic, Alemanya). Els marcadors de pes molecular utilitzats per al Western blot en l'article 3 van ser comprats a BioRad (Munic, Alemanya) i les membranes per al blotting eren de nitrocel·lulosa de Schleicher & Schuell (Alemanya).

Les columnes per a l'anàlisi del glutamat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) s'han comprat a Teknokroma (Espanya), i l'acetoneitril i el metanol

utilitzat en grau d'anàlisi per a aquest tipus d'assaig a Merck (Darmstaad, Alemanya). L'o-ftaldialdehid provenia de SIGMA Chemical Co (St Louis, MO, EEUU).

El GABA, la glicina, el glutamat, el iodur de (-)metilbicuculina, la picrotoxinina, l'estricnina, la colchicina, la queleritrina, la flunarizina, el forbol 12-miristat 13-acetat (PMA), el db-cAMP (N⁶,2'-O-dibutiriladenosina 3':5' monofosfat cíclic), l'àcid 4,4'-diisotiocianat-estilbè-2,2'-disulfònic (DIDS), el còctel d'inhibidors de proteases, el peròxid d'hidrogen, l'N-etilmaleïmida, el ditiotreitòl, l'n-propilgallat, la vitamina E, la catalasa, el trietilestany, el trimetilestany, el bromur de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli (MTT), el clorur de mercuri i el metilmercuri van ser comprats a SIGMA Chemical Co (St Louis, MO, EEUU). En l'estudi de la translocació del factor AIF, s'utilitzà una solució d'hidròxid de metilmercuri 1M en H₂O comprat a Novakemi AB (Estocolm, Suècia). L' α -endosulfà va ser comprat a Cromlab SL (Barcelona, Espanya) i dieldrin i γ -hexaclorociclohexà van ser comprats a LGC (Teddington Middlesex, Regne Unit). El diazepam va ser donat per Prodesfarma (Espanya). KN 93 (N-[2-[[[3-(4-clorfenil)-2-propenil]metilamino]metil]fenil]-N-(2-hidroxiètil)-4-metoxi-benzè-sulfonamida) va ser comprat a RBI (Natick, MA, EEUU). El iodur de propidi, la rodamina 123, l'acetoximetilester de fluo-3, l'acetoximetilester de calceïna i el tris-(2-carboxiètil)fosfina (TCEP) va ser obtingut de Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EEUU). L'àcid dihidrokaínic es va comprar a Ocean Procedure International (Shelburne, Canadà). Els altres reactius d'ús comú al laboratori han estat obtinguts de les cases comercials SIGMA Chemical Co (St Louis, MO, EEUU) i Merck (Darmstaad, Alemanya).

Cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel

Aquest procediment està basat en el treball d'Schousboe et al. (1989). Per tal de treballar amb animals d'experimentació, s'ha realitzat el curs de formació de personal investigador usuari d'animals per a experimentació i altres finalitats científiques d'acord amb les normes de la federació europea d'associacions de ciències dels animals de laboratori (FELASA).

A- cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de ratolí

Els ratolins utilitzats van ser manipulats seguint el protocol 407/99 de la Universitat de Barcelona. Aquest protocol va ser elaborat seguint les directrius de la Unió Europea i aprovat per la Generalitat de Catalunya.

Una camada de 10 cries NMRI de 7 dies es sacrifiquen per decapitació. Els cerebels són disseccionats i es dissocien per tripsinització suau a 37° amb agitació seguit per trituració en una solució de DNAsa (0.004% pes/volum) contenint inhibidor de tripsina (0.05% pes/volum). Les cèl·lules es resuspenen en medi neuronal DMEM (neuronal Dulbecco's Modified Eagle Medium, contenint 25 mM KCl, 31 mM glucosa i 0.2 mM glutamina i suplementat amb p-aminobenzoat, insulina, penicil·lina i un 10% de sèrum fetal boví) i es sembren a una densitat de 1.6×10^6 cèl·lules /ml en plaques de cultius (de 6 cm de diàmetre o plaques de 6, 24 o 48 pous), prèviament recobertes amb poli-L-lisina per tal de millorar-ne l'adhesivitat. Un cop incubats durant 16-18 h en la solució de poli-L-lisina (10 mg/l), els pous i plaques són rentats amb solució salina estèril (135 mM NaCl, 7.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mM KH_2PO_4 , ajustat a pH 7.4) abans del seu ús. Entre 36 i 48 h les cèl·lules en cultius són tractades amb una barreja de 5 μM 5-fluoro-2'-deoxiuridina i 20 μM uridina per tal d'evitar la proliferació glial. Les cèl·lules s'utilitzen als 7-9 dies in vitro d'estar en atmosfera humida 5%CO₂ / 95 % aire a 36.8 °C.

B- cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de rata

Les rates utilitzades van ser manipulades d'acord amb la regulació de l'Institut Karolinska per la cura i ús dels animals de laboratori.

Dues camades de 8 cries Sprague-Dawley de 7 dies es sacrifiquen per decapitació. Es disseccionen els cerebels i es capolen amb un tallador de teixit McIlwain (Histo-Lab, Gothenburg, Suècia). Les cèl·lules es dissocien mitjançant tripsinització i es sembren a una densitat de 1.6×10^6 cèl·lules /ml en plaques o en cobreobjectes de vidre per a les anàlisis al microscopi, prèviament recobertes amb poli-L-lisina (10 mg/l i posteriorment rentades amb aigua estèril). Les cèl·lules són mantingudes en cultiu en medi neuronal DMEM (neuronal Dulbecco's Modified Eagle Medium, contenint 25 mM KCl, 31 mM glucosa i 0.2 mM glutamina i suplementat amb 50 U/ml penicil·lina,

50 µg/ml estreptomina i un 10% de sèrum fetal boví). A les 42 hores s'afegeix 10 µM de citosina-1-β-arabino-furanòsid per tal d'evitar la proliferació de cèl·lules gials. Els cultius s'utilitzen un cop madurs, als 7 dies in vitro d'estar en atmosfera humida 5%CO₂ / 95 % aire a 36.8 °C.

Flux de clorur

El flux de clorur es va determinar mitjançant l'assaig de captació de ³⁶Cl⁻ (Pomés et al. 1994, Vale et al. 1999 amb modificacions i Kardos i Guidotti 1988).

Els cultius van ser rentats i el medi de cultiu va ser reemplaçat per una solució salina tamponada contenint (en mM): 116 NaCl, 0.8 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 1 NaHPO₄, 15.2 NaHCO₃, i 5.5 glucosa ajustada a pH 7.4. Després de 30 minuts de pre-incubació en atmosfera humida 5 % CO₂ / 95 % aire a 36.8 °C, les cèl·lules van ser preincubades per un període addicional de 10 minuts a temperatura ambient. Els cultius van ser incubats 7 segons amb solució tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.4) contenint ³⁶Cl⁻ (0.2-0.7µCi/ml) en presència o absència dels agonistes GABA o glicina, els compostos de mercuri i/o el bloquejant de canals de clorur DIDS. Els antagonistes dels receptors GABA_A i glicina, els policlorcicloalcans, els compostos de mercuri i el DIDS, en aquells assajos que foren utilitzats, foren presents durant la preincubació (10 minuts) i la incubació (7 segons). La inhibició del flux de clorur per antagonistes i policlorcicloalcans va ser feta utilitzant 100 µM de GABA i 300 µM de glicina. Els controls contenien tampó o 0.2% dimetilsulfòxid (DMSO; volum/volum). A aquesta concentració, el DMSO no va modificar la captació de ³⁶Cl⁻. Cada pou va ser rentat tres vegades amb 1 ml de tampó fred.

Les cèl·lules foren disgregades en 0.2 N NaOH i es van mesurar alíquotes per a la determinació de radioactivitat i el contingut de proteïna. La radioactivitat va ser determinada per comptatge líquid de centelleig. El contingut de proteïnes al pou va ser mesurat mitjançant un micro-test utilitzant el mètode de Bradford adaptat a plaques de microtitració, amb albúmina de sèrum boví com estàndard (Bradford 1976).

La captació basal de $^{36}\text{Cl}^-$ en absència dels agonistes va ser determinada en cada experiment i restada de tots els pous de cultiu per tal d'obtenir la captació neta de $^{36}\text{Cl}^-$. En el primer article de la present tesi, els valors de la captació neta de $^{36}\text{Cl}^-$ van ser utilitzats en els càlculs per a calcular el percentatge de la captació màxima de clorur; i els valors de la captació de clorur van ser normalitzats a les respostes obtingudes a 100 μM de GABA i 300 μM de glicina, que van donar respostes màximes.

Generació de la hipòtesi farmacofòrica

Tots els càlculs computacionals van ser duts a terme utilitzant el programa Catalyst, versió 4.6 (Accelrys Inc, Burlington, MA, EEUU), treballant en un terminal Silicon Graphics Octane2 sota entorn IRIX 6.5. La generació de la hipòtesis farmacofòrica es va realitzar utilitzant el mòdul HipHop com a implement de Catalyst. Breument, aquesta aproximació tracta d'identificar les característiques comunes presents en un conjunt de compostos actius. Dins el programa, les molècules són descrites com un conjunt de funcions químiques distribuïdes en l'espai tridimensional. Es considera la flexibilitat molecular de cada compost per al mostreig de l'espai conformacional per tal d'obtenir un nombre de conformacions (màxim de 255) que són accessibles a la molècula donat un rang d'energia de 20 Kcal/mol. Els models farmacofòrics són descrits com un conjunt de característiques distribuïdes en l'espai tridimensional. El tipus de característiques considerades segons l'estructura de les molècules van ser regions hidrofòbiques i donadors/acceptors d'enllaç d'hidrogen. Els centres hidrofòbics van ser representats com a centroids amb esferes de tolerància. Els donadors/acceptors d'enllaços d'hidrogen van ser representats per centroids amb punts de projecció, cadascun amb les respectives esferes de tolerància. Es van generar diverses hipòtesis considerant diferents conjunts de molècules (mínim de dues molècules) en la seva generació i el programa les va ordenar segons la seva bonesa. De manera addicional, la inspecció visual de l'ajust de cada conjunt de molècules a la hipòtesi generada així com la consideració de les dades experimentals van ser utilitzades per a l'elecció del millor model farmacofòric.

Unió de benzodiazepines

La unió de benzodiazepines a cèl·lules granulars de cerebel intactes en cultiu va ser determinat segons Vale et al. (1997), amb modificacions, utilitzant 1.3-2.0 nM de [³H]flunitrazepam. L'assaig d'unió va ser dut a terme en una solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3). Quan s'especifica, l'assaig d'unió es va realitzar en presència d'un tampó baix de clorur (136 mM glucuronat sòdic, 5.4 mM KHSO₄, 0.8 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄, 1.0 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES i 9 mM glucosa ajustat a pH 7.3). La unió no específica es va determinar en presència de 20 µM diazepam. Prèviament a la incubació amb el radiolligand, les plaques de 24 pous van ser rentades tres vegades amb 0.5ml per pou d'una solució salina tamponada contenint (en mM): 116 NaCl, 0.8 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 1 NaH₂PO₄, 15.2 NaHCO₃, i 5.5 glucosa ajustada a pH 7.3 i preincubada amb la solució salina tamponada amb HEPES durant el temps indicat. L'assaig d'unió es va dur a terme al pou de cultiu en presència del tampó HEPES, [³H]flunitrazepam ([³H]FNZ) i els diferents compostos. Després de 30 minuts d'incubació a 25°C sense agitació, es va afegir tampó fred i ràpidament es va aspirar el medi d'incubació, essent les cèl·lules rentades tres vegades amb tampó fred. Les cèl·lules van ser disgregades durant la nit en 0.2N NaOH, i es van utilitzar diferents alíquotes per al comptatge de la radioactivitat i les anàlisis del contingut de proteïna. La radioactivitat va ser determinada per comptatge líquid de centelleig i les proteïnes van ser determinades amb l'ajut d'un micro-test utilitzant el mètode de Bradford amb albúmina de sèrum boví com a estàndard (Bradford 1976). El control basal específic d'unió de [³H]flunitrazepam (en absència de compostos), al llarg dels experiments va ser de 85.4 ± 6.5 fmol/mg proteïna (n=32 experiments, cadascun amb 3-5 replicats). Quan els compostos van ser dissolts en DMSO, la concentració final de DMSO en tampó HEPES va ser igual o inferior a 0.05%.

La unió de benzodiazepines a membranes obtingudes de cultius de cèl·lules granulars de cerebel es va fer segons Harris et al. (1993), amb modificacions. Les cèl·lules van ser sembrades en plaques de petri de 6 cm de diàmetre i recollides en tampó Tris-citrat (50 mM Tris, ajustat a pH 7.4 amb citrat a saturació) contenint 500 µM TCEP, homogeneïtzades amb un Polytron durant 15 segons i centrifugades a 20.000

g durant 20 minuts. El pellet va ser resuspès en el tampó i tornat a centrifugar. Aquest procés de rentat va se repetit un total de 5 vegades. L'últim pellet va ser resuspès en tampó Tris-citrat contenint 200 mM NaCl (tampó per a l'assaig d'unió). Alíquotes de l'assaig d'unió (500 µl) en quadruplicat van ser incubades amb agitació en presència de 1.4-2 nM de [³H]flunitrazepam durant 60 minuts a 0-4 °C, en tampó Tris-citrat contenint 200 mM NaCl. Les incubacions van ser acabades per filtració ràpida al buit a través de filtres Whatman GF/B seguit de tres rentats de 2 ml amb tampó fred utilitzant un aparell manual Brandel M-24R. Els filtres van ser introduïts en vials d'escintil·lació amb 5 ml de còctel Optiphase "Hisafe"2. La unió no específica va ser determinada en presència de 20 µM de diazepam. La unió de [³H]flunitrazepam va ser determinada utilitzant 30 µg de proteïna per alíquota d'assaig d'unió.

Tots els experiments van ser fets simultàniament amb un experiment paral·lel on es va determinar l'increment de la unió de [³H]flunitrazepam induït per GABA, que va ser utilitzat com a control positiu. Excepte si s'especifica el contrari, els agents químics utilitzats conjuntament amb els compostos de mercuri no van modificar l'increment d'unió de [³H]flunitrazepam induït per GABA. La pre-incubació dels cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel amb els diferents agents es va fer com segueix: 10 minuts pels antagonistes del receptor GABA_A, 30 minuts agents antioxidants, NEM i DIDS, i 3 hores 30 minuts per a la colchicina i els agents que afecten l'estat de la fosforilació.

Unió de GABA

La unió de GABA va ser realitzada en membranes tractades amb Triton X-100 després de patir un cicle de congelació/descongelació, seguint un protocol descrit prèviament (Vale et al. 1997, amb modificacions). Les cèl·lules van ser cultivades en plaques de petri de 6 cm de diàmetre i recollides en tampó Tris-citrat (50 mM Tris, ajustat a pH 7.1 amb citrat a saturació), homogeneïtzades amb un Polytron durant 15 segons i centrifugades a 48.000 g durant 20 minuts. El pellet va ser resuspès en aigua destil·lada, homogeneïtzat i centrifugat a 48.000 g durant 20 minuts. Aquest segon pellet va ser resuspès en 0.05% Triton x-100 durant 10 minuts a 0-4 °C, homogeneïtzat i centrifugat a 48.000 g durant 20 minuts, rentat dues vegades amb solució tampó per eliminar el Triton X-100 i congelat durant la nit. Al dia següent i abans de fer l'assaig d'unió, les membranes van ser descongelades, homogeneïtzades i centrifugades a

Procediments experimentals

48.000g durant 20 minuts. Les membranes es van resuspendre en tampó Tris-citrat. Alíquotes per a l'assaig d'unió (500 µl) en triplicat o quadruplicat van ser incubades per agitació en presència de 3 nM [³H]GABA durant 20 minuts a 0-4° C. Les incubacions van ser finalitzades per centrifugació a 10.000 g durant 15 minuts. El pellet va ser resuspès en 0.2 N NaOH i comptat per a radioactivitat. La unió no-específica va ser determinada en presència de 1 mM GABA. La unió de [³H]GABA va ser determinada utilitzant 50-70 µg de proteïna per alíquota d'assaig d'unió.

Alliberament de GABA endogen

Per a l'assaig d'alliberament de GABA endogen es van utilitzar cultius de cèl·lules granulars de cerebel mantingudes 9 dies in vitro en plaques de 12 pous. Les cèl·lules van ser mantingudes en solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3) durant 5 min i el medi (0.5 ml/pou) va ser canviat cada 2 minuts com segueix: dues vegades amb tampó HEPES, una vegada amb un tampó contenint una alta concentració en K⁺ (solució salina tamponada amb HEPES amb 55 mM KCl i 86 mM NaCl) i una vegada amb solució salina tamponada amb HEPES. Els cultius van ser exposats aleshores a tampó HEPES o compostos de mercuri, 10 µM clorur de mercuri o 30 µM metilmercuri, durant 30 minuts a 25 °C (en les mateixes condicions que en l'assaig d'unió de [³H]flunitrazepam). Els cultius són rentats amb solució salina tamponada amb HEPES per tal d'eliminar els compostos de mercuri i es realitza una segona estimulació amb un medi alt en K⁺ (exposició una vegada a solució salina tamponada amb HEPES, una vegada a 55 mM K⁺ i una vegada a solució salina tamponada amb HEPES). Els aminoàcids endògens alliberats van ser analitzats en cada fracció segons Suñol et al. (1988), amb modificacions.

Captació de glutamat

La captació d'aminoàcids excitadors en cèl·lules granulars de cerebel intactes va ser assajat utilitzant D-[2,3-³H]aspartat (3 nM; 81 nCi/ml) en una solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3). Les cèl·lules cultivades (en plaques de 24 pous) van ser rentades tres vegades amb solució salina

tamponada HEPES i l'assaig de captació va tenir lloc en el pou de cultiu (0.5ml/pou) en presència del tampó HEPES, D-[2,3-³H]aspartat i els diferents compostos. Després de 10 minuts d'incubació a 36 °C, el medi d'incubació va ser xuclat ràpidament i les cèl·lules van ser rentades tres vegades amb tampó. La captació específica va ser determinada per substracció de la captació obtinguda en presència d'1 mM de glutamat (inferior al 10% del total). El tampó baix en clor es va preparar substituint NaCl, KCl i MgCl₂ per glucoronat sòdic, KHSO₄ i MgSO₄ respectivament. En els casos en els que està indicat, les cèl·lules van ser pre-incubades amb ditiotreitòl (DTT) durant 30 min a 25°C per tal de permetre la seva incorporació dins la cèl·lula, seguit de tres rentats amb tampó abans de realitzar-se l'assaig de captació en absència de DTT. La catalasa va estar present tant durant la preincubació (5 min) com en l'assaig de captació. Les cèl·lules es van disgregar en 0.2N NaOH durant la nit, i es van utilitzar alíquotes per a comptar la radioactivitat i per mesurar el contingut de proteïnes. La radioactivitat va ser determinada per comptatge líquid de centelleig (amb el còctel Optiphase "Hisafe 2") i les proteïnes van ser determinades mitjançant un micro-test utilitzant el mètode de Bradford (Bradford 1976), amb albúmina de sèrum boví com a estàndard.

Alliberament de glutamat endogen

Per a l'alliberament de glutamat endògens es van utilitzar cultius en paral·lel als assajos de captació de glutamat. Cèl·lules granulars de cerebel en cultiu (crescudes en plaques de 24 pous) van ser rentades tres vegades amb solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3) i incubades amb tampó HEPES (0.5 ml/pou) en absència o presència dels diferents compostos: clorur de mercuri, metilmercuri, L-tPDC i N-etilmaleïmida. Després de 10 minuts a 36 °C el medi d'incubació va ser recollit per a l'anàlisi del glutamat endogen alliberat. En determinar el contingut de glutamat intracel·lular, les cèl·lules van ser rascades ràpidament en 25 mM àcid perclòric fred, recollides i homogeneïtzades. El glutamat va ser determinat per anàlisis de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i determinació fluorimètrica del derivat obtingut amb o-ftaldialdehid (Suñol et al. 1988, amb modificacions). El tampó baix en clorur va ser preparat substituint el NaCl, KCl i MgCl₂ per glucoronat sòdic, KHSO₄ i MgSO₄ respectivament en la solució salina tamponada amb HEPES. El tampó baix en sodi va ser preparat substituint el NaCl per LiCl i el tampó sense calci va

ser preparant ometent el CaCl_2 . La composició iònica de les diferents solucions salines tamponades amb HEPES no va alterar la osmolaritat del medi d'incubació, determinada utilitzant un microosmòmetre (Advanced Instruments Inc, Sydney, Austràlia).

Quantificació del glutamat i GABA endògens alliberats

El glutamat i GABA endògens alliberats al medi d'incubació (articles 2 i 3 de la present memòria) van ser determinats mitjançant anàlisis de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb detecció fluorimètrica del derivat pre-columna obtingut amb o-ftaldialdehid, segons (Suñol et al. 1988) amb modificacions. 100 μl de mostra, diluïda si és necessari, són derivatitzats amb 15 μl d'o-ftaldialdehid i s'analitzen 80 μl de la barreja. La detecció fluorimètrica es realitza a una longitud d'ona d'excitació de 360 nm, i una longitud d'ona d'emissió de 450 nm, després del pas per una columna de fase reversa C_{18} (5 μm de tamany de partícula, 10 x 0.4 cm). La fase mòbil per a la determinació de glutamat consisteix en un tampó 100 mM acetat sòdic, 5.5 mM de trietilamina ajustat a pH 5.5 amb àcid ortofosfòric, i contenint un 9.9 % d'acetonitril, a flux 0.8 ml/min. Un cop eluïts aspartat i glutamat, es realitza un gradient fins al 70% d'acetonitril per tal de reduir el temps d'anàlisi de cada punxada a 30 minuts. La fase mòbil per a la determinació de GABA consisteix en un tampó 100 mM acetat sòdic, 5.5 mM de trietilamina ajustat a pH 3.15 amb àcid ortofosfòric, i contenint un 28.6% d'acetonitril, a flux 0.8 ml/min.

Tècnica de Western Blot per a la determinació de l'estat de EAAT3

Les cèl·lules granulars de cerebel es van cultivar en plaques de 6 pous i van ser tractades durant 10 minuts a 36 °C en les mateixes condicions en les que es va fer l'assaig de captació i alliberament de glutamat (veure article 3). Les cèl·lules van ser incubades en una solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl_2 , 1.2 mM CaCl_2 , 1 mM NaH_2PO_4 , 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3), 30 μM clorur de mercuri, 100 μM metilmercuri o 3 mM de N-etilmaleïmida en presència o absència de 500 μM TCEP. En els casos en què s'ha indicat, les cèl·lules van ser pre-incubades amb 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de catalasa durant 5 minuts a 36 °C abans de la incubació conjunta amb els compostos de mercuri. Al final de la incubació, les cèl·lules van ser rentades ràpidament amb tampó fosfat en gel (200 mM

Na_2HPO_4 i 200 mM NaH_2PO_4 , ajustat a pH 7.4) contenint inhibidors de proteases (còctel comercial: 1.04 mM AEBSF, 0.8 μM apoprotinina, 21 μM leupeptina, 36 μM bestatina, 15 μM pepstatina A i 14 μM E-64), i immediatament rascades i homogeneïtzades amb un Polytron durant 7 segons. Alternativament, les cèl·lules es van cultivar en plaques de 10 cm de diàmetre i van ser recollides (en tampó fosfat contenint els inhibidors de proteases) i homogeneïtzades. Alíquotes de l'homogenat van ser incubades amb (1) 2% SDS durant 2 h a 4°C o (2) tampó HEPES o 100 μM metilmercuri durant 10 min a 36°C.

Els homogenats cel·lulars crus es van analitzar per electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida en un gel separador fet de 8% de poliactilamida i un gel de compactació fet de 4% de poliactilamida. El volum final carregat va ser de 60 μl , contenint homogenat cel·lular (al voltant de 7 μg de proteïna) i tampó de càrrega (concentracions finals: 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol i 0.1% de blau de bromofenol. Marcadors de pes molecular pretenyits (de 43.8 fins 218 kDa, Kaleidoscop, BioRad, Alemanya) van ser carregats en el mateix volum final que les mostres. L'electroforesi es va deixar durant la nit a un voltatge constant d'aproximadament 20 V, amb el tanc d'electroforesi refredat amb un bany d'aigua-gel. Un cop separades, les proteïnes van ser transferides en membranes de nitrocel·lulosa (Schleicher & Schuell, Alemanya) a una intensitat de corrent constant de 300 mA durant 2 h. Tots els passos següents es van fer en solució salina tamponada amb Tris i Tween (TTBS: 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.01% Tween 20) i en agitació constant. Les membranes van ser bloquejades durant 1 hora a temperatura ambient en TTBS contenint un 5% de llet en pols no grassa i un 5% de sèrum de cabra. Les membranes van ser incubades durant 4 h a temperatura ambient amb un anticòs primari contra EAAT3 diluït 1:1000 en TTBS + 10% sèrum de cabra. Després de ser rentats en TTBS, les membranes van ser incubades durant 2 h a temperatura ambient amb un anticòs secundari conjugat amb fosfatasa alcalina diluït 1:20000. Finalment, les membranes van ser rentades, revelades amb reactius Immun-Star HRP Chemiluminiscent (BioRad, Alemanya) i exposades a un film Kodak Biomax MR.

Translocació del factor iniciador de l'apoptosi (AIF) al nucli

A dia 7 en cultiu, les cèl·lules granulars de cerebel de rata són exposades als diferents agents neurotòxics per addició directa al medi condicionat, a les concentracions i temps indicats. Les cèl·lules van ser fixades en 100% de metanol durant 30 minuts a -20°C , rentades amb solució salina tamponada amb fosfat (PBS: 8 mM Na_2HPO_4 , 2.1 mM NaH_2PO_4 , 135 mM NaCl , 8 mM KCl , ajustat a pH 7.4) i incubades amb un anticòs policlonal contra AIF de cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU) a 4°C durant la nit. L'anticòs es va utilitzar a una dilució 1:200 en una solució contenint un 1% d'albumina de sèrum boví en PBS suplementat amb un 0.3% Triton X-100, 0.01% NaN_3 i 0.02% de bacitranid. Un cop rentats, els cobreobjectes van ser incubats amb un anticòs secundari de conill anti-cabra conjugat amb fluoresceïna tiocianat (SIGMA, St Louis, MO, EEUU) durant 1 hora a temperatura ambient. La dilució de treball va ser 1:60 en PBS. Seguit de tres rentats amb PBS, les cèl·lules van ser tenyides amb iodur de propidi (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) a temperatura ambient durant 5 minuts. Aleshores els cobreobjectes van ser rentats amb PBS i muntats en portaobjectes de vidre amb PBS/glicerol (1/9 volum/volum) contenint un 0.1 % (pes/volum) de fenilendiamina. Les mostres van ser analitzades en un equip de microscopia confocal Bio-Rad 1024 (Bio-Rad laboratories, Hemel-Hempstead, Regne Unit), acoblat a un microscopi Nikon Eclipse 800 (Nikon, Japó). El solapament i quantificació de l'àrea de co-localització versus la tinció de iodur de propidi (% de co-localització) es va realitzar amb l'ajut del programa Bio-Rad Image Pro Plus (Bio-Rad laboratories, Hemel-Hempstead, Regne Unit), calculant el percentatge de la senyal fluorescent co-localitzada versus la senyal nuclear vermella.

Tinció de iodur de propidi

El iodur de propidi és un colorant fluorescent que entra dins les cèl·lules amb membrana danyada i augmenta la seva fluorescència en intercalar-se als àcids nucleics. El nucli de les cèl·lules mortes queda doncs tenyit de fluorescència vermella. La tinció de iodur de propidi s'ha utilitzat amb dues finalitats diferents: com a marcador nuclear en cèl·lules permeabilitzades (en la translocació del factor AIF) i com assaig de dany neuronal (en l'assaig de viabilitat de l'annex de resultats i en els treballs de l'efecte dels compostos de mercuri en el receptor GABA_A i en la neurotransmissió glutamatèrgica).

Per tal de marcar els nuclis, les cèl·lules fixades i permeabilitzades van ser tenyides amb iodur de propidi (2.5 µg/ml en PBS) a temperatura ambient durant 5 minuts després de la immunohistoquímica contra el factor AIF.

En l'assaig de dany neuronal, el protocol seguit va ser el descrit per Rosa et al. (1997). El iodur de propidi, a una concentració final de 7.5 µM va ser addicionat conjuntament amb els compostos de mercuri en tampó HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.4), 500 µl de volum d'assaig. En els casos indicats, es va realitzar l'assaig amb un tampó HEPES baix en clor (el tampó baix en clor es va preparar substituint NaCl, KCl i MgCl₂ per glucoronat sòdic, KHSO₄ i MgSO₄ respectivament. La senyal fluorescent va ser quantificada en acabar l'exposició als agents en un lector de fluorescència (Cytofluor, Millipore, Bedford, MA, EEUU, amb filtres d'excitació i emissió de 530 i 645 nm respectivament; SpectraMax GeminiXs de Molecular Devices, CA, EEUU, a una longitud d'ona d'excitació de 530 nm i d'emissió de 617 nm). El percentatge relatiu de la tinció de iodur de propidi va ser calculada per a cada pou com segueix: $(F/F_{max}) \times 100$, on F es la fluorescència de cada pou i F_{max} la fluorescència mitjana dels pous tractats amb 0.5% (volum/volum) Triton X-100.

Assaig de funcionalitat mitocondrial: MTT

Per a la determinació dels efectes de mercuri en la citotoxicitat a cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel s'ha utilitzat l'assaig de reducció del bromur de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli (MTT). L'MTT és reduït a formazan, precipitat blau insoluble en aigua, pels mitocondris de les cèl·lules vives. L'MTT és captat per les cèl·lules mitjançant un procés d'endocitosi i un cop reduït a formazan, aquest s'acumula als lisosomes i és transportat a la superfície cel·lular mitjançant un procés d'exocitosi (Liu et al. 1997).

Les cèl·lules granulars de cerebel cultivades en plaques de 24 pous, van ser rentades tres vegades amb solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3), tractades amb solució HEPES durant 10 minuts a 36 °C (en els casos indicats, es va realitzar l'assaig amb un tampó HEPES baix en clor preparat

Procediments experimentals

per substitució de NaCl, KCl i MgCl₂ per glucoronat sòdic, KHSO₄ i MgSO₄ respectivament). Posteriorment al tractament, les cèl·lules van ser rentades i incubades a la foscor durant 15 min a 36°C amb 250 µl / pou d'una solució d'MTT (concentració 250 µg/ml). A continuació es retira curosament la solució d'MTT i s'incuben les cèl·lules durant la nit a 36 °C i foscor en presència de SDS (250 µl/pou, SDS al 5%). Es transfereixen 200 µl de la solució d'SDS a una placa de 96 pous i s'afegeixen 10 µl d'isopropanol. Els blancs es van realitzar en cèl·lules incubades amb la solució salina tamponada HEPES en comptes de amb la solució d'MTT. Es realitza la lectura de la densitat òptica del formazan format a 560 nm en un escàner iEMS Reader MF de Labsystems (Hèlsinki, Finlàndia). Els resultats s'expressen com a mesura de la funció mitocondrial, referits al percentatge dels valors control després de restar els blancs.

Determinació del potencial de membrana mitocondrial

La rodamina (rodamina 123, Molecular Probes, Oregon , EEUU) és un fluoròfor catiònic permeable a la membrana plasmàtica que és ràpidament segrestat pels mitocondris actius sense induir citotoxicitat.

Les cèl·lules granulars de cerebel cultivades en plaques de 24 pous van ser rentades tres vegades i posteriorment tractades amb solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3) o en els casos indicats, es va realitzar l'assaig amb un tampó HEPES baix en clor (el tampó baix en clor es va preparar substituint NaCl, KCl i MgCl₂ per glucoronat sòdic, KHSO₄ i MgSO₄ respectivament) en presència dels diferents agents neurotòxics durant 10 minuts a 36 °C. Les cèl·lules van ser rentades i incubades a la foscor durant 30 min a 36 °C amb 250 µl / pou d'una solució de rodamina 123 (concentració final 10 µM). Després de tres rentats, es realitza la lectura amb un lector SpectraMax GeminiXs de Molecular Devices (Califòrnia, EEUU) a les longituds d'ona de 355 nm (excitació) i 538 nm (emissió). Els resultats van ser expressats com a percentatge dels valors control després de restar els blancs.

Determinació de calci intracel·lular

L'acetoximetilester de fluo-3 (Molecular Probes, Oregon, EEUU) és un derivat ester del fluo-3 no fluorescent i permeable a la membrana cel·lular. Un cop desesterificat per les esterases cel·lulars, el fluo-3 impermeable a la membrana plasmàtica donarà lloc a fluorescència en unir-se a ions de Ca^{+2} .

Les cèl·lules granulars de cerebel cultivades en plaques de 24 pous van ser rentades tres vegades i posteriorment tractades amb solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl_2 , 1.2 mM CaCl_2 , 1 mM NaH_2PO_4 , 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3) o en els casos indicats, es va realitzar l'assaig amb un tampó HEPES baix en clor (el tampó baix en clor es va preparar substituint NaCl, KCl i MgCl_2 per glucoronat sòdic, KHSO_4 i MgSO_4 respectivament) en presència dels diferents agents neurotòxics durant 10 minuts a 36 °C. Les cèl·lules van ser rentades i incubades a la foscor durant 1 h a 36 °C amb 250 μl /pou d'una solució d'acetoximetilester (concentració final 15 μM , contenint 0.5% de dimetilsulfòxid i 0.08% d'àcid plurònic F-127). Seguidament es renta amb solució salina tamponada HEPES i es realitza l'assaig amb els diferents agents durant 10 min a 36 °C i es llegeix la placa amb un escàner SpectraMax GeminiXs de Molecular devices (Califòrnia, EEUU) a les longituds d'ona de 485 nm (excitació) i 530 nm (emissió). Els resultats són expressats com a concentració de calci intracel·lular, segons la fórmula $[\text{Ca}^{+2}]_i = K_D \cdot (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$, on K_D és 320 nM (Weaver, Jr. et al. 1998), F la fluorescència del pou, F_{max} la fluorescència màxima obtinguda després d'una incubació amb el ionòfor de Ca^{+2} A23187 (10 μM en solució salina tamponada HEPES) a cadascun dels pous, i F_{min} la fluorescència mínima obtinguda després de segrestar tota la fluorescència amb 5 mM CuSO_4 en 0.9% NaCl (pes/volum).

Assaig de viabilitat cel·lular: cèl·lules vives/mortes

Per a aquest assaig de viabilitat cel·lular s'ha utilitzat una doble tinció amb calceïna i iodur de propidi en cèl·lules vives. La calceïna és un fluoròfor estable al rang de pH intracel·lular, impermeable a la membrana plasmàtica. La càrrega d'acetoximetilester de calceïna dins la cèl·lula donarà lloc a calceïna per desesterificació de la molècula per part de les esterases intracel·lulars, generant una fluorescència verda.

Procediments experimentals

El iodur de propidi és un fluoròfor que entra dins les cèl·lules amb membrana danyada i augmenta la seva fluorescència en intercalar-se en els àcids nucleics, donant una fluorescència vermella.

Els cultius de cèl·lules granulars de cerebel crescuts en plaques de 24 pous van ser rentats tres vegades amb solució salina tamponada amb HEPES (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES i 9 mM glucosa, ajustada a pH 7.3) o en els casos indicats, amb un tampó salí HEPES baix en clor (el tampó baix en clor es va preparar substituint NaCl, KCl i MgCl₂ per glucorinat sòdic, KHSO₄ i MgSO₄ respectivament) i incubats a la foscor durant 10 min a 36 °C amb 500 µl / pou d'una solució contenint els diferents agents assajats, l'acetoximetilester de calceïna (concentració final de 0.5 µM) i el iodur de propidi (concentració final de 7.5 µM). Immediatament després de la incubació i sense rentar la placa, es van enregistrar imatges de microscopia de fluorescència mitjançant el programa AnalySIS ColorView (Olympus, Tokio, Japó) acoblat a un microscopi Olympus IX70 (Tokio, Japó). L'encavalcament de les imatges per a calceïna i iodur de propidi es van realitzar amb el programa AnalySIS (Olympus, Tokio, Japó).

Determinació de proteïnes

Per a la determinació de proteïnes s'ha utilitzat el kit comercial "Bio-Rad protein assay ©", basat en el mètode de terminació de Bradford (1976). Una solució àcida de Coomassie Brilliant Blue G-250 canvia el seu màxim d'absorbància de 465 a 595 nm quan s'uneix a proteïnes. L'absorbància del complex format és relativament estable entre els 15 i 60 minuts. Les mostres es dilueixen, i als 30 minuts d'addicionar el reactiu es mesuren a 595 nm en un lector iEMS Reader MF de Labsystems (Hèlsinki, Finlàndia). Posteriorment s'interpolen en una recta patró feta entre 1 i 10 µg d'albumina de sèrum boví, preparada en cada experiment.

Anàlisi de les dades

Les dades són expressades en mitjana ± SEM. Les dades de concentració resposta han estat ajustades a corbes sigmoidees utilitzant el programa informàtic GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EEUU). Els programes per a

la realització dels gràfics científics han estat Excel (Microsoft Corporation, Washington, EEUU) i GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc San Diego, CA, EEUU). Per a les anàlisi estadístiques s'ha utilitzat les anàlisis de la varianza d'un i dos factors seguides dels test de Dunnett, Bonferroni, Tuckey o PLSD (Fisher's protected least significant difference) mitjançant els programes Stat View (Abacus Concepts, CA, EEUU) i GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc San Diego, CA, EEUU). Un valor de $p < 0.05$ ha estat considerat com a significació estadística.

RESULTATS

RESUM DE RESULTATS

Els resultats obtinguts al llarg de la present tesi doctoral són recollits en forma d'articles o annex de resultats:

Article 1: **The organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane (lindane), α -endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA_A and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells.** C. Vale, E. Fonfría, J. Bujons, A. Messeguer, E. Rodríguez-Farré i C. Suñol. Article en revisió a la revista Neuroscience. En aquest article es mostra el bloqueig del flux de clorur per part dels tres pesticides organoclorats als receptors GABA_A i glicina. A partir de les relacions estructura-funció dels compostos, s'ha generat una hipòtesi farmacofòrica tridimensional que mostra els requeriments estructurals subjacents a l'activitat biològica dels compostos.

Article 2: **Mercury interaction with the GABA_A receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells.** E. Fonfría, E. Rodríguez-Farré i C. Suñol. Article publicat a la revista Neuropharmacology 41 (2001): 819-833. Els compostos de mercuri interaccionen de forma directa en el receptor GABA_A, modulant de forma positiva el lloc de reconeixement de les benzodiazepines sense alterar el lloc de reconeixement del GABA. Aquesta modulació és exercida per oxidació de les cisteïnes extracel·lulars de les subunitats que conformen el receptor GABA_A.

Article 3: **Mercuric compounds cause glutamate release and oligomerization of the neuronal glutamate transporter EAAT3 in cultured cerebellar granule cells.** E. Fonfría, M.T. Vilaró, E. Rodríguez-Farré i C. Suñol. Article en preparació. Els compostos de mercuri produeixen una inhibició de la captació de glutamat acompanyada d'un alliberament de glutamat massiu i una oligomerització del transportador neuronal EAAT3 en neurones glutamatèrgiques granulars de cerebel en cultiu. Aquests efectes són mediats per processos oxidatius però no per l'estrès metabòlic cel·lular. El transportador funcionant en mode revers o com a porus podria estar al darrera de l'homeòstasi anormal del glutamat extracel·lular.

Annex de resultats: **Estudi de l'efecte citotòxic dels compostos de mercuri en cultius de cèl·lules granulars de cerebel de ratolí: paper del mitocondri i del glutamat.** E. Fonfría, E. Rodríguez-Farré i C. Suñol. Els compostos de mercuri provoquen una disfunció mitocondrial tant a nivell de viabilitat del mitocondri com a nivell del potencial de membrana mitocondrial. Aquesta disfunció mitocondrial és de ràpida aparició, prèvia a la pèrdua de viabilitat neuronal i està regulada per mecanismes d'oxidació/reducció extracel·lular i d'homeòstasi iònica.

Article 4: **Translocation of Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress.** E. Fonfría, E. Dare, M. Benelli, C. Suñol i S. Ceccatelli. *European Journal of Neuroscience*, en premsa. El metilmercuri i el peròxid d'hidrogen alliberen el factor mitocondrial AIF capaç d'induir apoptosi de manera independent a l'activació de caspases en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Així mateix, la colchicina també indueix la relocalització del factor AIF, indicant el seu efecte tòxic a través de dues vies paral·leles: la translocació nuclear d'AIF i l'activació de caspases degut a l'alliberament al citosol del citocrom c.

The organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane (lindane), α -endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA_A and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells.

C. Vale, E. Fonfría, J. Bujons, A. Messeguer, E. Rodríguez-Farré and C. Suñol

Article en revisió a la revista Neuroscience

The organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane (lindane), α -endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA_A and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells.

C. Vale^{a,1}, E. Fonfría^a, J. Bujons^b, A. Messeguer^b, E. Rodríguez-Farré^a and C. Suñol^{a*}

^aInstitut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona. Department of Neurochemistry. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, IDIBAPS. Rosselló 161, 6th floor. 08036 Barcelona. Spain.

^bInstitut de Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona. Department of Organic Biological Chemistry. CSIC. Jordi Girona 18-26. 08034 Barcelona. Spain.

*Corresponding author: Cristina Suñol. Department of Neurochemistry. Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC (IDIBAPS). Rosselló 161, 6th floor. 08036 Barcelona. Spain. Telephone nr.: +34 93 3638318. Fax nr.: +34 93 3638301. e-mail: csenqi@iibb.csic.es

¹Present address: Facultad de Medicina and Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Castilla la Mancha. Campus Universitario. 02071 Albacete. Spain.

Section Editor: Dr. J. Paul Bolam, MRC Anatomical and Neuropharmacology Unit, Mansfield Road, Oxford, OX1 3TH, UK

Abbreviations: BIC, bicuculline; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMSO, dimethylsulfoxide; GABA, γ -aminobutyric acid; HEPES, N[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]; PTX, picrotoxinin; STR, strychnine.

RUNNING TITLE

Lindane and cyclodienes block GABA_A and glycine receptor

ABSTRACT

The neurotoxic organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane, α -endosulfan and dieldrin induce in mammals a hyperexcitability syndrome accompanied by convulsions. They reduce the GABA-induced Cl^- flux. The strychnine-sensitive glycine receptor also regulates Cl^- flux inhibitory responses. We studied the effects of these compounds on Cl^- channels associated with glycine receptors in cultured cerebellar granule cells in comparison to the GABA_A receptor. Both GABA (EC_{50} : 5 μM) and glycine (EC_{50} : 68 μM) increased $^{36}\text{Cl}^-$ influx. This increase was antagonized by bicuculline and strychnine, respectively. Lindane inhibited with similar potency both GABA_A (IC_{50} : 6.1 μM) and glycine (5.0 μM) receptors. α -Endosulfan and dieldrin inhibited the GABA_A receptor (IC_{50} values: 0.4 μM and 0.2 μM , respectively) more potently than the glycine receptor (IC_{50} values: 3.5 μM and 3 μM , respectively). Picrotoxinin also inhibited the glycine receptor, although with low potency ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). A 3D pharmacophore model, consisting of five hydrophobic regions and one hydrogen bond acceptor site in a specific three-dimensional arrangement, was developed for these compounds by computational modelling. We propose that the hydrogen bond acceptor moiety and the hydrophobic region were responsible for the affinity of these compounds at the GABA_A receptor whereas only the hydrophobic region of the molecules was responsible for their interaction with the glycine receptors. In summary, these compounds could produce neuronal hyperexcitability by blocking glycine receptors besides the GABA_A receptor. We propose that two zones of the polychlorocycloalkane pesticide molecules (a lipophilic zone and a polar zone) differentially contribute to their binding to GABA_A and glycine receptors.

Keywords: GABA_A receptor, inhibitory glycine receptor, chloride channels, neuronal cultures, neurotoxicity, 3D pharmacophore model.

INTRODUCTION

The amino acids γ -aminobutyric acid (GABA) and glycine are the major inhibitory neurotransmitters in the mammalian nervous system. They mediate fast inhibitory synaptic transmission by activating two pharmacologically distinct receptors that gate chloride channels: GABA_A and strychnine-sensitive glycine receptors. GABA_A and glycine receptors share a common transmembrane topology and significant sequence homology, being members of the same receptor superfamily (Bormann et al., 1987; Betz 1990). The GABA_A receptor is an oligomeric protein that has separate but allosterically interacting binding sites for GABA, benzodiazepines and for picrotoxinin-like convulsants. There is a high multiplicity of subunit combinations in GABA_A receptors in mammals, with nineteen subunits cloned to date (α 1-6; β 1-3; γ 1-3; ϵ ; δ ; θ ; π , and ρ 1-3) (Macdonald and Olsen 1994; Sieghart et al., 1999; Cherubini and Conti, 2001; Rudolph et al., 2001). Inhibitory glycine receptors are pentameric protein complexes composed of α 1-3 and β subunits that constitute a ligand-gated ion channel permeable for chloride ions (Langosch et al., 1990; Legendre 2001; Xue et al., 2001).

Strychnine-sensitive inhibitory glycine receptors are distributed throughout the central nervous system. The strength of glycinergic inhibition governs the rhythmic output of mammalian motor systems and glycine receptor deficits are linked to human pathologies such as hereditary hyperekplexia or startle syndrome (Legendre 2001). The neurotoxic organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane (lindane) and the cyclodiene related compounds dieldrin and α -endosulfan induce in mammals a hyperexcitability syndrome that can progress until the production of convulsions (Suñol et al., 1989; Bloomquist, 1992, 2002). Different studies have shown that lindane and cyclodienes interact with the GABA_A receptor. They inhibit the binding of *t*-[³⁵S]butylbicyclophosphorothionate ([³⁵S]TBPS) to the picrotoxinin recognition site and inhibit the GABA-induced Cl⁻ flux following activation of GABA_A receptors, without modifying the benzodiazepine and GABA recognition sites (Abalis et al., 1985;1986; Obata et al., 1988; Woodward et al., 1992; Pomés et al., 1993; 1994; Huang and Casida, 1996; Ikeda et al., 1998; Vale et al., 1997; Suñol et al., 1998; Bloomquist, 2002). Lindane also blocks chloride channels composed of homomeric ρ GABA_A receptors (Woodward et al., 1992) and voltage-dependent chloride channels (Matsumoto et al., 1988). All these findings suggest that other chloride channels besides the GABA_A

receptor could serve as target for these compounds. In a preliminary study we have found that lindane also blocked the Cl⁻ flux induced by glycine (Suñol et al., 1998).

Therefore, in order to gain more insight into the mechanism of neurotoxicity of polychlorocycloalkane insecticides we wished to investigate and compare the effect of lindane, α -endosulfan and dieldrin on chloride channels associated with GABA_A and glycine receptors. Computational studies were performed to establish a 3D pharmacophore hypothesis for the identification of the minimum requirements for lindane, α -endosulfan and dieldrin recognition of GABA_A and glycine receptor channels. Primary cultures of cerebellar granule cells, which express both GABA_A and glycine receptors, were used through the study.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Seven-day-old NMRI mice were obtained from Iffa Credo (St.-Germain-sur-l'Arbreste, France). Plastic tissue culture dishes and multiwell plates were purchased from CoStar (Corning Science Products, Acton, MA), and NUNC Ltd. (Roskilde, Denmark). Foetal calf serum was obtained from Gibco (Glasgow, UK) and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) was from Biochrom (Berlin, Germany). ³⁶Cl⁻ was from NEN, Life Sciences Products, Inc. (MA, USA). Liquid scintillation cocktail Optiphase "Hisafe" 2 was from Wallac Oy (Turku, Finland). (-)-Bicuculline methiodide, GABA, glycine, picrotoxinin and strychnine were from SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). α -Endosulfan was from Cromlab SL (Barcelona, Spain) and dieldrin and γ -hexachlorocyclohexane were from LGC (Teddington Middlesex, UK). Polychlorocycloalkanes were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a final DMSO concentration of 0.2% v/v. All the other chemicals were of the purest grade available from commercial sources.

Cell cultures

Primary cultures of cerebellar granule cells were obtained from cerebella of 7- day-old mice following the method described by Schousboe et al. (1989). In brief, cells were

dissociated by mild trypsinization at 37 °C, followed by trituration in a DNase solution (0.004% w/v) containing a soybean trypsin inhibitor (0.05 % w/v). The cells were suspended in DMEM containing 25 mM KCl, 31 mM glucose, and 0.2 mM glutamine supplemented with *p*-amino benzoate, insulin, penicillin and 10% foetal calf serum. The cell suspension was seeded in 24-multiwell plates precoated with poly-L-lysine and incubated for 7-9 days in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 36.8 °C. A mixture of 5 μM 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 20 μM uridine was added before 48 hours in culture to prevent glial proliferation.

Animal handling was accomplished according to an accepted protocol (407/99, University of Barcelona, Generalitat de Catalunya, Spain) following EU guidelines. The University of Barcelona has the statement of compliance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare / National Institutes of Health (OLAW/NIH, A 5224-01).

Cl⁻ flux

Cl⁻ flux was determined by the ³⁶Cl⁻ uptake assay in intact cellular cultures (Pomés et al., 1994; Vale et al., 1999 with modifications, Kardos and Guidotti, 1988). Briefly, cell cultures were rinsed and the culture medium was replaced with an Earle's Balanced Salt Solution containing (in mM): 116 NaCl, 0.8 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 1 NaH₂PO₄, 15.2 NaHCO₃, and 5.5 glucose, adjusted to pH 7.4. After 30 min of preincubation in a humidified 5% CO₂/95 % air atmosphere at 36.8 °C, the cells were preincubated for an additional period of 10 minutes at room temperature. Cultures were incubated 7 sec with HEPES buffer (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES, and 9 mM glucose, adjusted to pH 7.4) containing ³⁶Cl⁻ (0.2-0.7 μCi/ml) without/with the agonists GABA or glycine. GABA_A and glycine receptor antagonists and polychlorocycloalkanes, when used, were present during the preincubation (10 min) and incubation (7 sec) time. Inhibition of Cl⁻ flux by antagonists and polychlorocycloalkanes was performed using 100 μM GABA and 300 μM glycine. Controls contained buffer or 0.2% DMSO (v/v). At this concentration, DMSO did not modify ³⁶Cl⁻ uptake. Each well was rinsed three times with 1 ml ice-cold buffer. Cells were collected in 0.2 N NaOH and aliquots were measured for determination of radioactivity and protein content. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Well protein content was measured by a micro-test using the Bradford method

adapted to microtiter plates, with bovine serum albumin as a standard. Basal $^{36}\text{Cl}^-$ uptake in the absence of agonists was determined in each experiment and subtracted from all culture wells to obtain the net $^{36}\text{Cl}^-$ uptake. Net $^{36}\text{Cl}^-$ uptake values were used in the calculations of percentage of maximum Cl^- uptake.

Analysis of data and statistics

The data were expressed as means \pm S.E.M. Cl^- uptake values were normalized to the responses obtained at 100 μM GABA and 300 μM glycine, which gave maximum responses.

Concentration-response data were fit by non-linear regression analysis to sigmoid curves using a three- or four-parameter logistic equation (Prism program, GraphPad Software, San Diego, CA). Two-way analysis of variance followed by the Bonferroni test was used to assess whether significant differences existed. $p < 0.05$ was considered to be significant.

Computational Methods

All computations were accomplished using the program Catalyst, version 4.6 (Accelrys Inc., Burlington, MA) running on a Silicon Graphics Octane2 workstation operating under IRIX 6.5. Pharmacophore hypothesis generation was performed using the module HipHop as implemented in Catalyst. Briefly, this approach tries to identify common features present in a set of active compounds. Within the software, molecules are described as a set of chemical functions distributed in the 3D space. Molecular flexibility is taken into account for each compound by sampling the conformational space in order to specify the number (maximum of 255) of conformations which are accessible to the molecule within a given energy range (20 Kcal/mol). Pharmacophore models are described as a set of features distributed in 3D space. The types of features taken into account considering the structure of the molecules were hydrophobic centres and hydrogen bond donor/acceptors. The hydrophobic centres were represented as centroids with tolerance spheres. The hydrogen bond donor/acceptors were represented by centroids with projection points, both with their respective tolerance spheres. We generated several hypotheses by considering different training sets (minimum of two

molecules per training set) and the software ranked them according to fit quality and uniqueness criteria. Additionally, visual inspection of the fit of each training set molecule to the hypotheses as well as consideration of the experimental data were used to choose the best pharmacophore model.

RESULTS

GABA- and glycine-induced Cl⁻ flux in primary cultures of cerebellar granule neurons

In primary cultures of cerebellar granule cells both GABA and glycine induced a concentration-dependent Cl⁻ influx. Figure 1A shows the concentration response curves for both inhibitory neurotransmitters. Log EC₅₀ values for GABA- and glycine-induced Cl⁻ flux were -5.33 ± 0.14 (n = 3) and -4.17 ± 0.06 (n = 4), which correspond to EC₅₀ values of 5 μM and 68 μM, respectively.

Figure 1 B shows that GABA-induced Cl⁻ flux was inhibited by the competitive GABA_A receptor antagonist bicuculline (100 μM), but not by the glycine receptor antagonist strychnine (20 μM) in primary cultures of cerebellar granule cells. Contrarily, bicuculline (100 μM) failed to reduce the Cl⁻ flux induced by glycine whereas the glycine receptor antagonist strychnine (20 μM) inhibited glycine-induced Cl⁻ flux. Strychnine was highly potent on glycine receptor in cultured cerebellar granule cells with an IC₅₀ value against the glycine-induced Cl⁻ flux of 60 nM (data not shown). Figure 1B also shows that the non-competitive GABA_A receptor antagonist picrotoxinin, which acts as a Cl⁻ channel blocker, inhibited 50% of the GABA-induced Cl⁻ flux at around 10 μM and completely blocked the Cl⁻ flux at concentrations ≥ 100 μM. The glycine-induced Cl⁻ flux was inhibited by picrotoxinin in a concentration-dependent manner; however, picrotoxinin concentrations > 100 μM were needed to inhibit Cl⁻ flux by 50% in primary cultures of cerebellar granule cells.

Figure 1

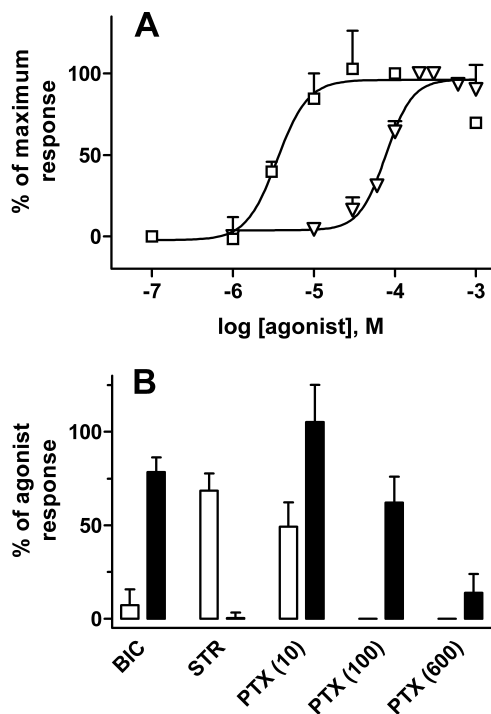


Figure 1.- GABA- and glycine-induced Cl⁻ flux in primary cultures of cerebellar granule cells.

(A) Concentration-response curves for the agonists GABA (□) and glycine (∇). Cultures were incubated with ³⁶Cl⁻ and GABA or glycine for 7 sec. ³⁶Cl⁻ uptake was normalized to maximum response produced by each agonist, after subtracting basal ³⁶Cl⁻ uptake (1.5 ± 0.2 nmol/mg protein) in absence of agonists to obtain net Cl⁻ uptake. Maximum Cl⁻ uptake induced by GABA and glycine accounted for 175 ± 14 % and 221 ± 18 % of basal Cl⁻ uptake, respectively. Data shown are the mean ± S.E.M. of 3 - 4 independent curves; each point of the individual curves was determined in 3-4 culture wells. Concentration-response data were fit using a four parameter logistic equation: $Y = Y_o + (Y_{max} - Y_o)/(1 + 10^{(\log EC50 - X) \times slope})$, where X is the log concentration of agonist and Y is the percentage of maximum net uptake.

(B) Effect of the antagonists bicuculline (100 μM; BIC), strychnine (20 μM; STR) and picrotoxinin (10, 100 and 600 μM; PTX) on Cl⁻ flux induced by 100 μM GABA or 300 μM glycine. Cultures were preincubated with buffer or antagonists for 10 minutes and incubated for 7 sec with ³⁶Cl⁻ and GABA (white bars) or glycine (black bars) in the absence or in the presence of antagonists. Data shown are means ± S.E.M. of 4-8 culture wells. Results are expressed as percentage of the response induced by 100 μM GABA or 300 μM glycine.

Effects of γ -hexachlorocyclohexane, α -endosulfan and dieldrin on GABA- and glycine-induced Cl⁻ flux

Figure 2 and Table I show the effect of the organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane (lindane), α -endosulfan and dieldrin on GABA- and glycine-induced Cl⁻ flux. Two-way analysis of variance of IC₅₀ data represented on table I revealed statistically significant differences for the receptor type ($F_{1,17} = 20.53$; $p = 0.0003$) and the neurotoxic polychlorocycloalkane pesticide ($F_{2,17} = 13.04$; $p = 0.0004$), as follows. Lindane inhibited both glycine- and GABA-induced Cl⁻ flux with similar potency (Figure 2A, table I). Figures 2B and 2C show the concentration-response curves for the inhibitory effect of α -endosulfan and dieldrin on glycine- and GABA-induced Cl⁻ flux. Both compounds inhibited with higher potency the GABA- than the glycine-induced Cl⁻ flux (Table I). Furthermore, α -endosulfan and dieldrin were more potent than lindane at the GABA_A receptor. No differences were found among the IC₅₀ values of the three neurotoxic pesticides against the glycine receptor (Table I).

Table I. Log IC₅₀ values for the inhibition of GABA- and glycine-induced Cl⁻ flux by polychlorocycloalkane pesticides in primary cultures of cerebellar granule cells.

	GABA _A receptor		Glycine receptor	
	Log IC ₅₀	IC ₅₀ , μ M	Log IC ₅₀	IC ₅₀ , μ M
γ -hexachlorocyclohexane (lindane)	-5,21 \pm 0,06 (3)	6.1	-5,30 \pm 0,06 (5)	5.0
α -endosulfan	-6,40 \pm 0,13 (3) ††	0.4	-5.46 \pm 0.22 (3) *	3.5
dieldrin	-6,61 \pm 0,20 (4) ††	0.2	-5,52 \pm 0,22 (5) **	3.0

Values are expressed as mean \pm S.E.M. of log IC₅₀ from different experiments (n), using 6–8 concentrations per curve in triplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ with respect to GABA_A receptor for the neurotoxic pesticides; †† $p < 0.01$ with respect to lindane, at the GABA_A receptor; Bonferroni's multiple comparison test after two-way analysis of variance.

Figure 2

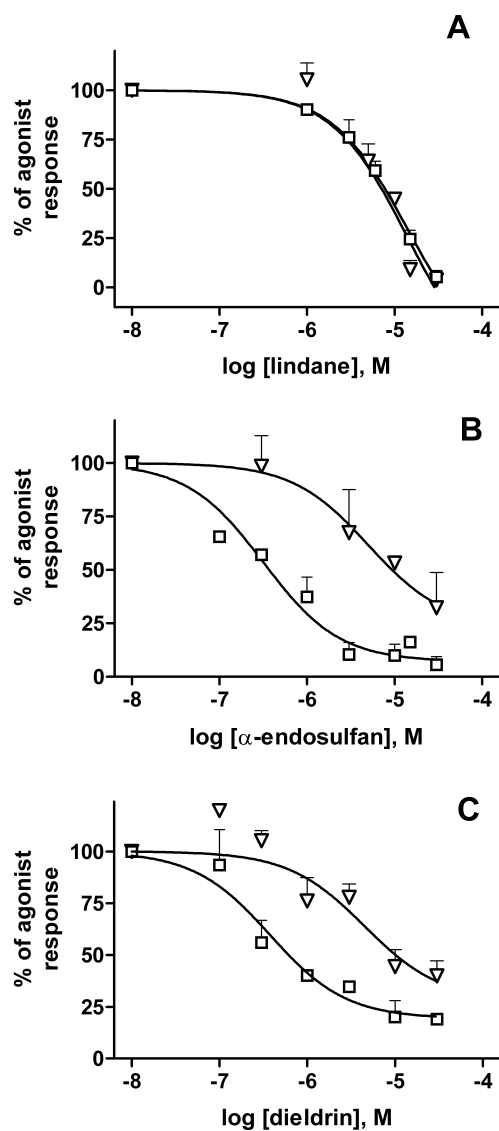


Figure 2.- Inhibition by the polychlorocycloalkane insecticides lindane (A), α -endosulfan (B) and dieldrin (C) of GABA- and glycine-induced Cl^- flux.

Cultures were preincubated with buffer or polychlorocycloalkanes for 10 minutes and incubated for 7 sec with $^{36}\text{Cl}^-$ and agonists (\square 100 μM GABA, or ∇ 300 μM glycine) in presence of different polychlorocycloalkane concentrations. Results are expressed as percentage of net $^{36}\text{Cl}^-$ uptake of agonist response (GABA or glycine) (mean \pm S.E.M. of 3-5 experiments; each point of the individual curves was determined in 3-4 culture wells). Concentration-response data were fit using a three parameter logistic equation (one site competition curve): $Y = Y_0 + (100 - Y_0)/(1 + 10^{(X - \log \text{EC}_{50})})$, where X is the log concentration of polychlorocycloalkane and Y is the percentage of net uptake in response to agonist.

3D Pharmacophore Model

In order to correlate the observed Cl⁻ flux inhibition elicited by the channel antagonists considered in this study with their structure, a common feature analysis on picrotoxinin, lindane, α -endosulfan, dieldrin and its stereoisomer endrin was performed. Although endrin was not included in the Cl⁻ flux inhibition studies described above, it was incorporated into the generation of the pharmacophore hypothesis. Endrin is a polychlorocycloalkane pesticide, it shows similar potency to that of α -endosulfan or dieldrin in the inhibition of GABA dependent chloride flux in cultured neurons (Pomés et al., 1993; 1994) and, like dieldrin and α -endosulfan, it partially inhibited glycine dependent chloride flux at high concentrations (Suñol et al., 1998). Figure 3 shows the chemical structure of these compounds.

From the different hypotheses generated, the best one was obtained from a training set constituted by α -endosulfan, dieldrin and endrin. This pharmacophore model consisted of five hydrophobic regions (H1-H5) and one hydrogen bond acceptor site (HBA) in a specific three-dimensional orientation (Figure 4, Table II). The three compounds in the training set can simultaneously align four chlorine atoms and the *gem*-dichloromethylene group with the five hydrophobic centers. Likewise, they can arrange an oxygen atom (the thiocarbonylic oxygen of α -endosulfan and the epoxide oxygen atoms of dieldrin and endrin) with the centroid of the hydrogen bond acceptor site (Figure 4). By contrast, lindane can only be aligned with the hydrophobic regions of the model, while picrotoxinin fits only partially to the hydrophobic and the hydrogen bond acceptor sites (Figure 4). According to this model both the hydrophobic regions and the hydrogen bond acceptor centre are necessary to efficiently block the chloride flux through the GABA-dependent channels. On the other hand, the model suggests the absence of a hydrogen bond acceptor site in the glycine-gated channels with the geometry shown in the pharmacophore model of Figure 4. Overall, this pharmacophore hypothesis shows a good qualitative correlation with the experimental results observed for each of the compounds.

Figure 3

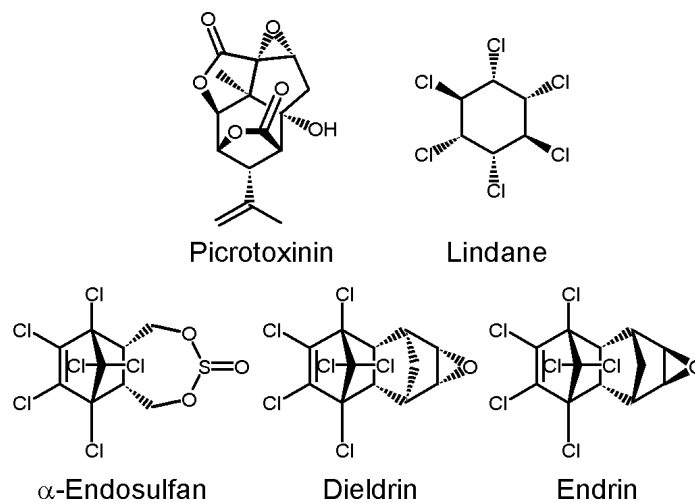


Figure 3.- Structures of the compounds considered for the generation of the pharmacophore model.

Table II.- Distance matrix (in Å) for the features of the pharmacophore model shown in Figure 4.

	H2	H3	H4	H5	HBAc	HBApp
H1	3.3	3.2	5.5	5.6	6.2	8.8
H2		4.7	3.4	5.5	7.1	10.0
H3			4.8	3.2	6.6	9.2
H4				3.4	7.0	9.9
H5					6.1	8.8
HBAc						3.0

Figure 4

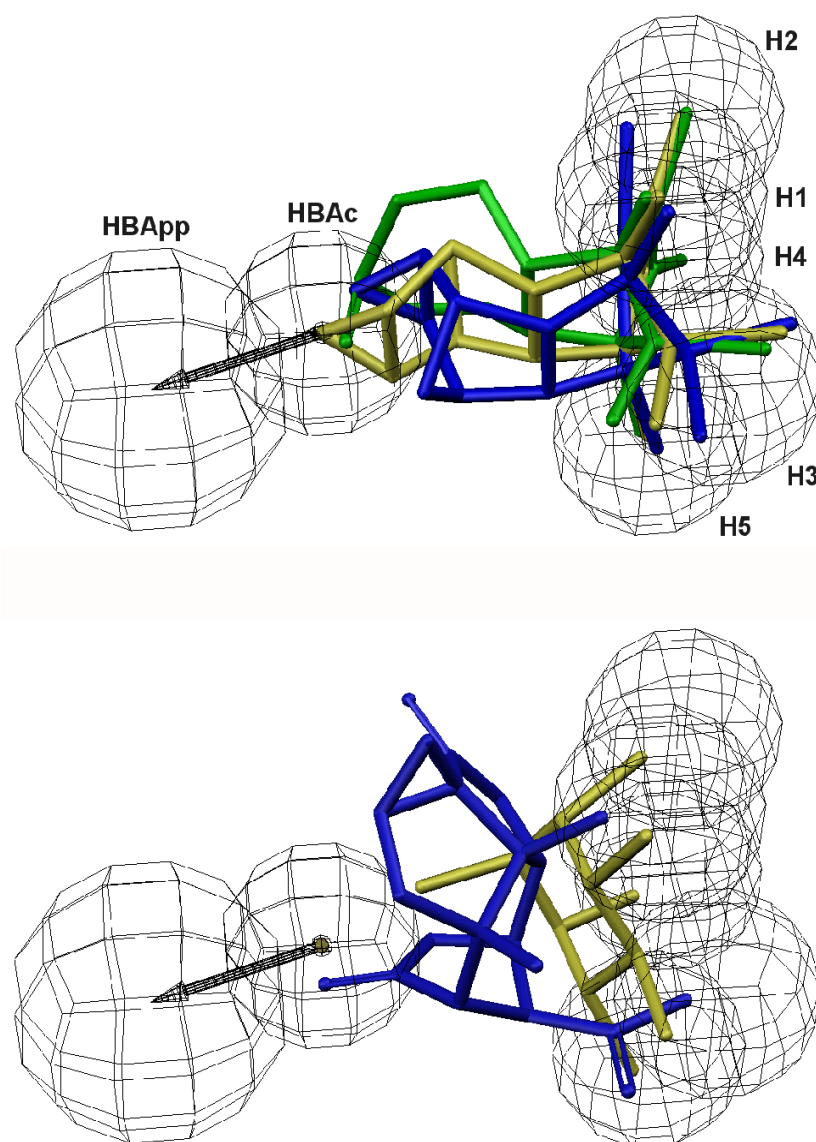


Figure 4.- Graphical representation of the proposed pharmacophore model. Each pharmacophoric feature is labelled as H1-H5 for the hydrophobic centers, HBAc or HBApp for the hydrogen bond acceptor centroid or projected point. Best fit of the compounds included in the training set (upper panel), α -endosulfan (green), dieldrin (yellow) and endrin (blue), and (lower panel) of lindane (yellow) and picrotoxinin (blue) are shown.

DISCUSSION

The present results support and extend previous findings demonstrating that cerebellar granule cells in culture express both GABA_A and strychnine-sensitive glycine receptors that are functionally active. GABA_A and glycine receptors are oligomeric proteins, each subunit having four transmembrane segments (M1 to M4). The Cl⁻ channel in both the GABA_A and the glycine receptor is formed by the alignment of the M2 domains from the receptor subunits.

In the present work picrotoxinin showed a stronger inhibition of the GABA_A-induced Cl⁻ flux than the glycine-induced Cl⁻ flux. According to a model proposed by Zhorov and Bregestovski (2000) picrotoxinin binds to the cytoplasmic half of the pore and this binding is stabilized by hydrogen bonds as well as by an interaction with a hydrophobic ring of amino acid residues within the M2 segment. Threonine residues donate hydrogen bonds and proline and alanine residues in the pore-facing of the M2 segments support hydrophobicity. Experimental data are in agreement with this model (Pribilla et al., 1992; French-Constant et al., 1993; Buhr et al., 2001; Shan et al., 2001). A conserved threonine residue in the M2 segment is present in most GABA_A receptor subunits as well as in the α subunit of the glycine receptor, whereas this residue is lacking in the β subunit of the glycine receptor (Pribilla et al., 1992; Zhorov and Bregestovski, 2000; Shan et al., 2001).

Both heteromeric GABA_A receptors and homomeric α glycine receptors, but not heteromeric $\alpha\beta$ glycine receptors, are supposed to have five threonine residues facing the Cl⁻ channel lumen at the same sectional level of the receptor. Primary cultures of cerebellar granule cells constitutively express α , β and γ GABA_A receptor subunits in a pattern resembling that found in adult animal, and α and β glycine receptor subunits (Thompson and Stephenson, 1994; Gao and Fritschy, 1995; Kaneda et al., 1995; Nadler et al., 1996; Carlson et al., 1998; Elster et al., 1998). The presence of the β subunit of the glycine receptor should confer less sensitivity to picrotoxinin against the glycine-induced Cl⁻ flux in primary cultures of cerebellar granule cells. The reduced potency of picrotoxinin in the glycine receptor relative to that in the GABA_A receptor found in this work is in agreement with picrotoxinin forming hydrogen bonds with a different number of threonine residues in both GABA_A and glycine receptors expressed in

cultured cerebellar granule cells. Our results are also in agreement with the findings for picrotoxinin inhibition of glycine-induced currents in cultured cerebellar granule cells using whole-cell patch-clamp recordings (Virginio and Cherubini, 1997; Elster et al., 1998).

It has been demonstrated that the subunit composition of the GABA_A receptor determines the pharmacology of benzodiazepines (Rudolph et al., 2001), but there are few studies with regard to the pharmacology of non-competitive GABA_A receptor antagonists related to receptor subunit composition. Ratra et al. (2001) have reported that α -endosulfan and lindane displayed a similar and very high potency in recombinant β 3 homooligomeric GABA_A receptors, whereas α -endosulfan was more potent than lindane in native GABA_A receptors (Abalis et al., 1986; Obata et al., 1988; Pomés et al., 1993; 1994; Huang and Casida, 1996; this work). Other authors found that lindane showed similar potencies in GABA_A receptors composed of different α , β and γ subunits (Nagata et al., 1996; Maskell et al., 2001). These findings suggest that receptor subunit composition may determine the sensitivity and selectivity of polychlorocycloalkane toxicity.

In the present work we found that lindane blocked with similar potency GABA_A and glycine receptors whereas α -endosulfan and dieldrin were more potent at inhibiting GABA_A than glycine-gated Cl⁻ channels in cultured cerebellar granule cells. Here we also found that both α -endosulfan and dieldrin molecules fit to a pharmacophore model containing a hydrophobic zone and a hydrogen bond acceptor site, whereas lindane fit only to the hydrophobic zone. This would conform to a model where the hydrophobic zone would increase the probability of the compound to interact with the ring composed of non-polar amino acid residues in the channel lumen, a feature common to GABA_A and glycine receptors, whereas the hydrogen bond acceptor zone would increase the probability of the compound to interact with the ring composed of threonine residues (lacking in glycine receptor β subunits). By analogy with the model proposed for the interaction of PTX with GABA_A and glycine receptors, the molecules with a hydrogen bond acceptor zone would be more potent at the GABA_A receptor than at the glycine receptor. Thus, α -endosulfan and dieldrin conformed to a pharmacophore hypothesis having a hydrogen bond acceptor zone and were more potent at the GABA_A than at the glycine receptor (table I), suggesting that this part of the molecule determines the high affinity of these compounds for the

GABA_A receptor. Endrin, which also fit to the same model, is highly potent at the GABA_A receptor (Abalis et al, 1986; Pomés et al., 1993; 1994). In the same way, the pharmacophore model shows that α -endosulfan, dieldrin, and lindane shared a hydrophobic zone. This part of the molecule would contribute to the binding of the polychlorocycloalkane pesticides to the lipophilic ring of both GABA and glycine receptors. The pharmacophoric features included in this hypothesis are not necessarily the only conditions that a molecule must have to be a good inhibitor of the receptors considered. Other factors like the steric limitations imposed by the structure of the channel are difficult to be taken into account in the absence of three-dimensional data of the channel. This could justify, for example, the differential activity at the GABA_A receptor observed for the isomers of lindane, α -, β - and δ -hexachlorocyclohexane, which show a similar degree of hydrophobicity as lindane, but a relatively different molecular shape. It has been suggested that hexachlorocyclohexane isomers could bind to different sites at the GABA_A receptor (Nagata et al., 1996; Aspinwall et al., 1997).

In summary, in this work we show that α -endosulfan, dieldrin and lindane inhibited the glycine-induced Cl⁻ flux. The studied organochlorine pesticides displayed similar potencies at the glycine receptor in comparison with their different potencies at the GABA_A receptor. We propose that two parts of the polychlorocycloalkane pesticide molecule differentially contribute to its binding to GABA and glycine receptors: the lipophilic part being common for both receptors and the polar part being determinant for the increased affinity of α -endosulfan, dieldrin and endrin at the GABA_A receptor in relation to the glycine receptor. In this way, the similar interaction of lindane with both GABA_A and glycine receptor would agree with a contribution of chloride channels other than the GABA_A receptor to the in vivo toxicity of lindane, as suggested by Bloomquist (1992; 2002). More experimental data including different organochlorine pesticides and their activity on the GABA_A and glycine receptors would be necessary to test the predictive capacity of this model. However, this model provides information regarding pharmacophoric features for the interaction of compounds with GABA_A and glycine receptor operated channels whose crystallographic structures are not yet known.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant numbers 00/1094 and 01/1318 from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministry of Health, Spain), Grant number SAF 2001-2286 from CICYT (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Spain) and Grant numbers 2001SGR00210, 2001SGR00356 and 2001SGR00355 from CIRIT (Generalitat de Catalunya, Spain). F. Fonfría is recipient of a predoctoral fellowship from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). The authors acknowledge the Center de Supercomputació de Catalunya for allowing the use of their computing facilities and the access to the program Catalyst 4.6.

REFERENCES

- Abalis, I.M., Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T., 1985. High affinity stereospecific binding of cyclodiene insecticides and γ -hexachlorocyclohexane to γ -aminobutyric acid receptors of rat brain. *Pestic. Biochem. Physiol.* 24, 95-102.
- Abalis, I.M., Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T., 1986. Effects of insecticides on GABA-induced chloride influx into rat brain microsacs. *J. Toxicol. Environ. Health* 18, 13-23.
- Aspinwall, L.S., Bermudez, I., King, L.A., Wafford, K.A., 1997. The interactions of hexachlorocyclohexane isomers with human γ -aminobutyric acid A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1557-1564.
- Betz, H., 1990. Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5, 383-392.
- Bloomquist, J.R., 1992. Intrinsic lethality of chloride-channel-directed insecticides and convulsants in mammals. *Toxicol. Letters* 60, 289-298.
- Bloomquist, J.R., 2002. Agents affecting chloride channels. In: Massaro, E.J. (Ed.), *Handbook of Neurotoxicology*, vol I. Humana Press, New jersey, pp 65-77.
- Bormann, J., Hamill, O.P., Sakmann, B., 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J. Physiol.* 385, 243-286.
- Buhr, A., Wagner, C., Fuchs, K., Sieghart, W., Sigel, E., 2001. Two novel residues in M2 of the gamma-aminobutyric acid type A receptor affecting gating by GABA and picrotoxin affinity. *J. Biol. Chem.* 276, 7775-7781.
- Carlson, B.X., Elster, L., Schousboe, A., 1998. Pharmacological and functional implications of developmentally-regulated changes in GABA_A receptor subunit expression in the cerebellum. *Eur. J. Pharmacol.* 352, 1-14.
- Cherubini, E., Conti, F., 2001. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* 24, 155-62.
- Elster, L., Banke, T., Kristiansen, U., Schousboe, A., Wahl, P., 1998. Functional properties of glycine receptors expressed in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. *Neuroscience* 84, 519-528.
- French-Constant, R.H., Rocheleau, T.A., Steichen, J.C., Chalmers, A.E., 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363, 449-451.
- Gao, B., Fritschy, J.M., 1995. Cerebellar granule cells in vitro recapitulate the in vivo pattern of GABA_A-receptor subunit expression. *Dev. Brain. Res.* 88, 1-16.

- Huang, J., Casida, J.E., 1996. Characterization of [³H]ethynylbicycloortho-benzoate ([³H]EBOB) binding and the action of insecticides on the gamma-aminobutyric acid-gated chloride channel in cultured cerebellar granule neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 1191-1196.
- Ikeda, T., Nagata, K., Shono, T., Narahashi, T., 1998. Dieldrin and picrotoxinin modulation of GABA(A) receptor single channels. *Neuroreport* 9, 3189-3195.
- Kaneda, M., Farrant, M., Cull-Candy, S.G., 1995. Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. *J. Physiol.* 485, 419-435.
- Kardos, J., Guidotti, A., 1988. Desensitization of GABA-stimulated ³⁶Cl-influx in cerebellar granule cells. In *Chloride channels and their modulation by neurotransmitter and drugs* (Biggio, G. and Costa, E. Eds.). Raven Press, New York, pp. 161-179.
- Langosch, D., Becker, C.M., Betz, H., 1990. The inhibitory glycine receptor: a ligand gated chloride channel of the central nervous system. *Eur. J. Biochem.* 194, 1-8.
- Legendre, P., 2001. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 760-793.
- Macdonald, R.L., Olsen, R.W., 1994. GABA_A receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* 17, 569-602.
- Maskell, P.D., Wafford, K.A., Bermudez, I., 2001. Effects of gamma-HCH and delta-HCH on human recombinant GABA_A receptors: dependence on GABA_A receptor subunit combination. *Br. J. Pharmacol.* 132, 205-212.
- Matsumoto, K., Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T., 1988. Action of polychlorocycloalkane insecticides on binding of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate to Torpedo electric organ membranes and stereospecificity of the binding site. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 95, 220-229.
- Nadler, L.S., Raetzman, L.T., Dunkle, K.L., Mueller, N., Siegel, R.E., 1996. GABA_A receptor subunit expression and assembly in cultured rat cerebellar granule neurons. *Dev. Brain. Res.* 97, 216-225.
- Nagata, K., Huang, C.S., Hamilton, B.J., Carter, D.B., Narahashi, T., 1996. Differential effects of hexachlorocyclohexane isomers on the GABA receptor subunits expressed in human embryonic kidney cell line. *Brain Res.* 738, 131-137.
- Obata, T., Yamamura, H.I., Malatynska, E., Ikeda, M., Laird, H., Palmer, C.J., Casida, J.E., 1988. Modulation of γ -aminobutyric acid-stimulated chloride influx by bicycloorthocarboxylates, bicyclophosphorus esters, polychlorocycloalkanes and other cage convulsants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 802-806.

- Pomés, A., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C., 1993. Inhibition of $t[^{35}\text{S}]$ 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.
- Pribilla, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J., Betz, H., 1992. The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J.* 11, 4305-4311.
- Ratra, G.S., Kamita, S.G., Casida, J.E., 2001. Role of human GABA(A) receptor beta3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 233-240.
- Rudolph, U., Crestani, F., Mohler, H., 2001. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 188-94.
- Schousboe, A., Meier, E., Drejer, J., Hertz, L., 1989. Preparation of primary cultures of mouse (rat) cerebellar granule cells. In *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System.* (Shahar, A., de Vellis, J., Vernadakis, A. and Haber, B., Eds). Alan R Liss, New York, pp 203-206.
- Shan, Q., Haddrill, J.L., Lynch, J.W., 2001. A single beta subunit M2 domain residue controls the picrotoxin sensitivity of alphabeta heteromeric glycine receptor chloride channels. *J. Neurochem.* 76, 1109-1120.
- Sieghart, W., Fuchs, K., Tretter, V., Ebert, V., Jechlinger, M., Hoger, H., Adamiker, D., 1999. Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem. Int.* 34, 379-385.
- Suñol, C., Tusell, J.M., Gelpí, E., Rodríguez-Farré, E., 1989. GABAergic modulation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane)-induced seizures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 100, 1-8.
- Suñol, C., Vale, C., Rodríguez-Farré, E., 1998. Polychlorocycloalkane insecticide action on GABA-and glycine-dependent chloride flux. *Neurotoxicology* 19, 573-580.
- Thompson, C.L., Stephenson, F.A., 1994. GABA_A receptor subtypes expressed in cerebellar granule cells: a developmental study. *J. Neurochem.* 62, 2037-2044.
- Vale, C., Pomés, A., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C., 1997. Allosteric interactions between gamma-aminobutyric acid, benzodiazepine and picrotoxinin binding sites in primary cultures of cerebellar granule cells. Differential effects induced by gamma- and delta-hexachlorocyclohexane. *Eur. J. Pharmacol.* 319, 343-353.

- Vale, C., Vilaró, M.T., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C., 1999. Effects of the conformationally restricted GABA analogues, cis- and trans-4-aminocrotonic acid, on GABA neurotransmission in primary neuronal cultures. *J. Neurosci. Res.* 57, 95-105.
- Virginio, C., Cherubini, E., 1997. Glycine-activated whole cell and single channel currents in rat cerebellar granule cells in culture. *Dev. Brain Res.* 98, 30-40.
- Wahl, P., Elster, L., Schousboe, A., 1994. Identification and function of glycine receptors in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 62, 2457-2463.
- Woodward, R.M., Polenzani, L., Miledi, R., 1992. Effects of hexachlorocyclohexanes on gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by RNA from mammalian brain and retina. *Mol. Pharmacol.* 41, 1107-1115.
- Xue, H., Shi, H., Tsang, H., Savva, C.G., Sun, J., Holzenburg, A., 2001. A recombinant glycine receptor fragment forms homo-oligomers distinct from its GABA(A) counterpart. *J. Mol. Biol.* 312, 915-920.
- Zhorov, B.S., Bregestovski, P.D., 2000. Chloride channels of glycine and GABA receptors with blockers: Monte Carlo minimization and structure-activity relationships. *Biophys. J.* 78, 1786-1803.

Mercury interaction with the GABA_A receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells.

E. Fonfría, E. Rodríguez-Farré, C. Suñol

Neuropharmacology 41 (2001) 819-833



Pergamon

Neuropharmacology 41 (2001) 819–833

NEURO
PHARMACOLOGY

www.elsevier.com/locate/neuropharm

Mercury interaction with the GABA_A receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells

E. Fonfría^a, E. Rodríguez-Farré^b, C. Suñol^{a,*}

^a Department of Neurochemistry, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain

^b Department of Pharmacology and Toxicology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain

Received 29 March 2001; received in revised form 2 July 2001; accepted 2 August 2001

Abstract

Mercury compounds are neurotoxic compounds with a great specificity for cerebellar granule cells. The interaction of mercury compounds with proteins in the central nervous system may underlie some of their effects on neurotransmission. In this work we study the interaction of mercuric chloride (HgCl₂) and methylmercury (MeHg) with the GABA_A receptor in primary cultures of cerebellar granule cells. Both compounds increased, dose dependently, the binding of [³H]flunitrazepam to the benzodiazepine recognition site. EC₅₀ values for this effect were 3.56 and 15.24 μM for HgCl₂ and MeHg, respectively, after 30 min exposure of intact cultured cerebellar granule cells. The increase of [³H]flunitrazepam binding by mercury compounds was completely inhibited by the GABA_A receptor antagonists bicuculline and picrotoxinin, and by the organochlorine pesticide α-endosulfan. It was also partially inhibited by the anion transporter blocker DIDS, however this effect could be due to a possible chelation of mercury by DIDS. Intracellular events, like intracellular calcium, kinase activation/inactivation or antioxidant conditions did not affect [³H]flunitrazepam binding or its increase induced by mercury compounds. The sulfhydryl alkylating agent *N*-ethylmaleimide mimicked the effect of mercury compounds on [³H]flunitrazepam binding suggesting a common mechanism. We conclude that mercury compounds interact with the GABA_A receptor by the way of alkylation of SH groups of cysteinyl residues found in GABA_A receptor subunit sequences. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Mercuric chloride; Methylmercury; Benzodiazepine binding; GABA_A receptor; Cultured cerebellar granule cells; Neurotoxicity

1. Introduction

Mercury exists in several chemical forms, including elemental mercury (Hg⁰), inorganic mercury (mercuric chloride, HgCl₂) and organic mercury (methylmercury, CH₃HgCl, MeHg). All forms of mercury have toxic effects in a number of organs; in the brain, methylmercury (MeHg) was the causative of the neurological Minamata disease and the clinical manifestations of the Iraqi outbreak (Goyer, 1996). Magnetic resonance examination of patients suffering from Minamata disease revealed brain cortical and cerebellar atrophy with dif-

fuse loss of cerebellar granule cells, while Purkinje cells and brain stem neurones were intact (Korogi et al., 1994). Rats experimentally exposed to MeHg showed both clinical signs of neurologic dysfunction characterized by ataxic behaviour and degeneration of cerebellar granule cells with preservation of Purkinje cells (Nagashima, 1997). In vitro exposure of primary cultures of rat cerebellar granule cells to chronic low MeHg concentrations results in apoptosis (Castoldi et al., 2000).

According to the Mercury Research Strategy for the period 2001–2005 of the US Environmental Protection Agency (EPA), the route targeted for human health effects and exposure involves fish consumption where mercury is: released to the air, transported and deposited on land and water, converted to methylmercury in water bodies, consumed by fish, and then accumulated in mammals, including humans, that eat fish. The EPA's Refer-

* Corresponding author. Tel.: +34-93-363-8318; fax: +34-93-363-8301.

E-mail address: csenqi@iibb.csic.es (C. Suñol).

ence Dose of 0.1 micrograms per kilogram of body weight per day is a scientifically justifiable level for protecting human health from the adverse effects of methylmercury (EPA, 2000).

Although MeHg is the most important mercuric compound in terms of environmental exposure, metallic mercury is the most common form to which workers are exposed. Mercury concentration in the pituitary gland was found to be 40 times higher in a Swedish dental staff population with respect to controls (Nylander and Weiner, 1989). Elemental mercury and MeHg undergo biotransformation in tissues, being accumulated in the body to the more reactive mercuric inorganic compounds (HgCl_2) (Smith et al., 1994). Thus, MeHg and HgCl_2 represent the two main chemical forms of mercury compounds for the effects of mercury in the central nervous system.

Because of the high bonding affinity between mercury and sulphur, there is a focused interest in the interactions that occur between mercury compounds and the thiol group(s) of proteins, peptides and amino acids. Interaction of mercury compounds with proteins in the central nervous system may be the basis for some of the reported effects of mercury compounds on neurotransmission. In addition to the effect of mercury compounds on amino acid and neurotransmitter transport (Estevez et al., 1998; Aschner et al., 2000; Faro et al., 2000; Gassó et al., 2000; Maekawa et al., 2000), actions on receptors for specific neurotransmitters have also been reported. Muscarinic and nicotinic receptors (Bondy and Agrawal, 1980; Castoldi et al., 1996), NMDA receptors (Rajanna et al., 1997) and dopamine receptors (Bondy and Agrawal, 1980; Scheuhammer and Cherian, 1985) have been described as being inhibited by micromolar concentrations of mercury compounds. Mercury compounds also modify GABA_A receptor-mediated inhibitory responses. First, Arakawa et al. (1991) reported a stimulation of GABA-induced current in dorsal root ganglion neurones by mercuric chloride but not by methylmercury, this effect being mediated by protein kinases and protein Gs (Huang and Narahashi, 1997a,b). Yuan and Atchison (1997) reported that MeHg blocks both inhibitory postsynaptic potentials and currents as well as responses evoked by the GABA_A receptor agonist muscimol in hippocampal CA1 slices. In addition, Allan and Baier (1992) found that mercury compounds inhibited GABA-induced Cl^- flux in cortical microsacs. Komulainen et al. (1995) reported that MeHg marginally increased [^3H]flunitrazepam binding in the absence of GABA in rat brain membranes. Thus, a clear picture of the interaction of mercury compounds with the GABA_A receptor is not fully addressed in the literature.

The GABA_A receptor/ Cl^- ionophore complex is an oligomeric protein that has separate but allosterically interacting binding sites for the endogenous neurotransmitter GABA, for benzodiazepines and for picro-

toxinin-like convulsants. A wide spectrum of drugs, toxic agents and metals modify the GABA_A receptor function by directly interacting with these binding sites or with others not yet well described present in this receptor complex (Macdonald and Olsen, 1994; Sieghart, 1995; Mehta and Ticku, 1999). Primary cultures of cerebellar granule cells constitutively express functional GABA_A receptors. We have recently shown that primary cultures of cerebellar granule cells are a good in vitro model to study allosteric interactions between GABA, benzodiazepine and picrotoxinin recognition sites (Vale et al., 1997) and receptor-mediated neurotoxicity (Pomé et al., 1993; Vale et al., 1998).

The aim of the present study was to determine whether mercury compounds specifically interact with the GABA_A receptor. We used intact cerebellar granule cells as an in vitro model of the neuronal type selectively injured by mercury. We describe here that inorganic (HgCl_2) and organic (MeHg) mercury compounds increased [^3H]flunitrazepam binding at the benzodiazepine recognition site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells, this effect being GABA_A receptor and chloride channel mediated. Because of the importance of redox status for the function of ionotropic receptors such as the NMDA, GABA_A and glycine receptors (Gozlan and Ben-Ari, 1996), we also studied whether the effect of mercury compounds could be antagonized or mimicked by reducing, antioxidant or sulfhydryl alkylating agents. Furthermore, we studied cellular GABA_A modulatory systems known to be related to mercuric disturbance as kinase activities, microtubule network integrity and intracellular calcium homeostasis.

2. Methods

2.1. Materials

Seven-day-old NMRI mice were obtained from Iffa Credo (St.-Germain-sur-l'Arbreste, France). Plastic tissue culture dishes and multiwell plates were purchased from CoStar (Corning Science Products, Acton, MA), and NUNC Ltd. (Roskilde, Denmark). Foetal calf serum was obtained from Gibco (Glasgow, UK) and Dulbecco's modified Minimum Essential Medium (DMEM) was from Biochrom (Berlin, Germany). Radiochemicals were from Amersham, Life Sciences, Buckinghamshire, UK ([^3H]GABA 92 Ci/mmol, [^3H]flunitrazepam 88 Ci/mmol). Liquid scintillation cocktail Optiphase 'Hisafe'2 was from Wallac Oy (Turku, Finland). Diazepam was a gift from Prodesfarma (Spain). α -Endosulfan was from Cromlab S.L. (Barcelona, Spain). KN 93 (*N*-[2-[[[3-(4-chlorophenyl)-2-propenyl] methylamino] methyl] phenyl]-*N*-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzene-sulfonamide) was from RBI (Natick, MA, USA). Propidium iodide and TCEP (tris-(2-

carboxyethyl)phosphine) were obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Mercuric chloride, methylmercury, (–)-bicuculline methiodide, picrotoxinin, colchicine, dithiothreitol, *N*-ethylmaleimide, triethyltin, trimethyltin, *n*-propylgallate, vitamin E, chelerythrine, flunarizine, PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), db-cAMP (*N*⁶,2′-*O*-dibutyryladenine 3′:5′-cyclic monophosphate), DIDS (4,4′-diisothiocyanato-stilbene-2,2′-disulfonic acid), and GABA (γ -aminobutyric acid) were from SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals were of the purest grade available from commercial sources.

2.2. Cell culture

Primary cultures of cerebellar granule cells were obtained from cerebella of 7-day-old mice following the method described by Schousboe et al. (1989). In brief, cells were dissociated by mild trypsinization at 37°C, followed by trituration in a DNase solution (0.004% w/v) containing soybean trypsin inhibitor (0.05% w/v). The cells were suspended in a modified Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (25 mM KCl, 31 mM glucose and 0.2 mM glutamine) supplemented with *p*-aminobenzoate, insulin, penicillin, and 10% foetal calf serum. The cell suspension (1.6×10^6 cell/ml) was seeded in 12- or 24-multiwell plates or plastic tissue culture dishes (6 cm in diameter), precoated with poly-L-lysine, and incubated for 6–9 days in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 36.8°C. A mixture of 5 μ M 5-fluoro-2′-deoxyuridine and 20 μ M uridine was added before 48 h in culture to prevent glial proliferation.

Animals were handled in compliance with protocol number 407/99 of the University of Barcelona approved by the Generalitat de Catalunya, Spain, following EU guidelines. The University of Barcelona has the statement of compliance on file with the office of laboratory animal welfare (OLAW)/National Institutes of Health (NIH) with the following identification number A5224-01.

2.3. [³H]flunitrazepam ([³H]FNZ) binding

Benzodiazepine binding to intact cultured cerebellar granule cells was determined as previously described (Vale et al. (1997), with modifications) using 1.3–2.0 nM [³H]flunitrazepam. The binding assay was performed in HEPES-buffered saline solution (136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.4 mM MgCl₂, 1.0 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES and 9 mM glucose adjusted to pH 7.3). When specified, low Cl[–] binding buffer was used (136 mM sodium glucuronate, 5.4 mM KHSO₄, 0.8 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄, 1.0 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES and 9 mM glucose adjusted to pH 7.3). Non-specific binding was determined in the presence of 20 μ M diazepam. Prior to incubation with

the radioligand, the 24-multiwell plates were washed three times with 0.5 ml/well of Earle's Balanced Salt Solution (EBSS buffer: 116 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 15.2 mM NaHCO₃ and 5.5 mM glucose adjusted to pH 7.3) and preincubated with HEPES solution for the time indicated below. The binding reaction took place in the culture well in the presence of the HEPES buffer, [³H]flunitrazepam, and drug solutions. After 30 min incubation at 25°C without shaking, cold buffer was added and rapidly removed by suction, and cells were rinsed three times with cold buffer. Cells were disaggregated in 0.2 N NaOH overnight, and aliquots were used to count radioactivity and protein content. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting (with cocktail Optiphase 'Hisafe'2) and proteins were determined by a micro-test using the Bradford method, with bovine serum albumin as a standard. Specific basal control [³H]flunitrazepam binding (in the absence of drugs) along this work accounted for 85.4±6.5 fmol/mg protein (*n*=32 experiments, each with 3–5 replicates). When drugs were dissolved in DMSO, the final DMSO concentration in HEPES buffer was ≤0.05%.

Benzodiazepine binding to membranes obtained from cultured cerebellar granule cells was determined as described by Harris et al. (1993) (with modifications). Cells were cultured in dishes (6 cm of diameter) and harvested in 50 mM Tris–citrate buffer (pH 7.4) containing 500 μ M TCEP, homogenized with a Polytron for 15 s and centrifuged at 20,000g for 20 min. The pellet was resuspended in the buffer and recentrifuged. This washing procedure was repeated for a total of five times. The last pellet was resuspended in 50 mM Tris–citrate buffer (pH 7.4) containing 200 mM NaCl (binding buffer). Binding assay aliquots (500 μ l) in quadruplicate were incubated by shaking in the presence of 1.4–2 nM [³H]flunitrazepam for 60 min at 0–4°C, by using 50 mM Tris–citrate (pH 7.4) containing 200 mM NaCl as the binding buffer. Incubations were terminated by rapid filtration under vacuum through Whatman GF/B filters with three 2 ml washes of ice-cold buffer by using a Brandel M-24R manifold. The filters were placed into scintillation vials with 5 ml of cocktail Optiphase 'Hisafe'2. Non-specific binding was determined in the presence of 20 μ M diazepam. [³H]flunitrazepam binding was determined by using 30 μ g protein per binding assay aliquot.

All the experiments were simultaneously run with a parallel experiment that determined the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by GABA, which was used as a positive control. Except when stated in the results section, drugs used in conjunction with mercury compounds did not modify the GABA-induced increase of [³H]flunitrazepam binding. Preincubation of primary cultures of cerebellar granule cells with drugs was performed as follows: GABA_A receptor antagonists 10 min;

antioxidant agents, sulfhydryl alkylating agent and channel blocker 30 min; and phosphorylation agents and colchicine 3 h 30 min.

2.4. [³H]GABA binding

[³H]GABA binding was performed using Triton X-100-treated freeze-thawed membranes as previously described (Vale et al., 1997, with modifications). Cells were cultured in 6 cm diameter dishes and harvested in 50 mM Tris–citrate buffer (pH 7.1), homogenized with a Polytron for 15 s and centrifuged at 48,000g for 20 min. The pellet was resuspended in distilled water, homogenized and centrifuged at 48,000g for 20 min. This second pellet was resuspended in 0.05% Triton X-100 for 10 min at 0–4°C, homogenized and centrifuged at 48,000g for 20 min, rinsed twice with buffer solution to eliminate Triton X-100 and frozen overnight. On the following day and before performing the binding assay, membranes were thawed, homogenized and centrifuged at 48,000g for 20 min. Membranes were suspended in 50 mM Tris–citrate. Binding assay aliquots (500 µl) in triplicate or quadruplicate were incubated by shaking in the presence of 3 nM [³H]GABA for 20 min at 0–4°C. Incubations were terminated by centrifugation at 10,000g for 15 min. The pellet was recovered with 0.2 N NaOH and counted for radioactivity. Non-specific binding was determined in the presence of GABA 1 mM. [³H]GABA binding was determined using 50–70 µg protein per binding assay aliquot.

2.5. Cellular functionality and cell viability

Cultured cerebellar granule cells of 9 days in vitro grown on 12-well plates were maintained in HEPES buffered saline (5 min) and the medium (0.5 ml/well) was changed every 2 min as follows: twice with HEPES buffer, once with high K⁺ medium (HEPES buffer with 55 mM KCl and 86 mM NaCl) and once with HEPES buffer. The cultures were then exposed to HEPES buffered saline or mercury compounds for 30 min (same conditions as in the flunitrazepam binding assays), rinsed with HEPES buffered saline to remove mercury compounds and a second stimulation with high K⁺ medium was performed (once HEPES buffer, once 55 mM K⁺ and once HEPES buffer). Endogenous aminoacids released to the medium were analysed in each fraction by HPLC analysis and fluorimetric determination of the *o*-phthaldialdehyde derivative (Suñol et al., 1988, with modifications).

The propidium iodide assay was performed as described in Rosa et al. (1997) to assess for cell damage. Propidium iodide (final concentration of 7.5 µM) was added in conjunction with mercury compounds diluted in HEPES buffer. Fluorescence was quantified in a Cytofluor 2350 (Millipore, Bedford, MA) fluorescence scan-

ner with 530 nm excitation and 645 nm emission filters after 30 min of exposure. Relative percentage of propidium iodide staining was calculated for each well as follows: $((F - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min})) \times 100$, where F is the well fluorescence, F_{\max} the mean fluorescence of the wells treated with 0.2% (v/v) Triton X-100 and F_{\min} the mean fluorescence of the control wells in the absence of mercury compounds.

2.6. Data analysis

Data are means \pm sem. Results are expressed as specific binding (fmol/mg protein) or as percentage of specific basal [³H]flunitrazepam binding in HEPES buffer. Concentration–response curves were fitted to sigmoid curves and statistical analyses were performed using the Graph Pad Prism program (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, USA). Analysis of variance (one-way and two-way) followed by the Dunnett's and Tuckey's test, respectively, was used.

3. Results

3.1. Effects of mercuric chloride and methylmercury on allosteric interactions between GABA and benzodiazepine recognition sites

We previously reported that GABA induces a rise in [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of rat cerebellar granule cells as a result of the allosteric interactions between GABA_A receptor recognition sites (Vale et al., 1997). Fig. 1 shows that GABA induced an increase of [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. This positive allosteric modulation between GABA and benzodiazepine sites was modified by mercuric chloride and methylmercury in a concentration-dependent manner (Fig. 1). Both mercury compounds enhanced the basal value of [³H]flunitrazepam binding. EC₅₀ values for GABA-induced increase of [³H]flunitrazepam binding did not differ significantly. EC₅₀ values (95% confidence intervals) were: 3 µM (1.5–6.1), 2.4 µM (0.9–6.1), 2.7 µM (1.5–5) and 0.7 µM (0.3–2) for HEPES buffer saline, 1, 3 and 5 µM HgCl₂ exposed cultures, respectively. However, maximum response for GABA was not modified (116.5 \pm 4.7 n =4, 130.3 \pm 12.4 n =3, 149.0 \pm 12.9 n =3, 110.1 \pm 9.0 n =2, 127.7 \pm 0.2 n =2, 108.4 and 115.6 fmol [³H]flunitrazepam bound/mg protein for control, 1, 3, 5 and 10 µM HgCl₂ and 30 and 60 µM MeHg, respectively). 10 and 3 µM methylmercury produced similar effects than those of 3 and 1 µM mercuric chloride, respectively (data not shown).

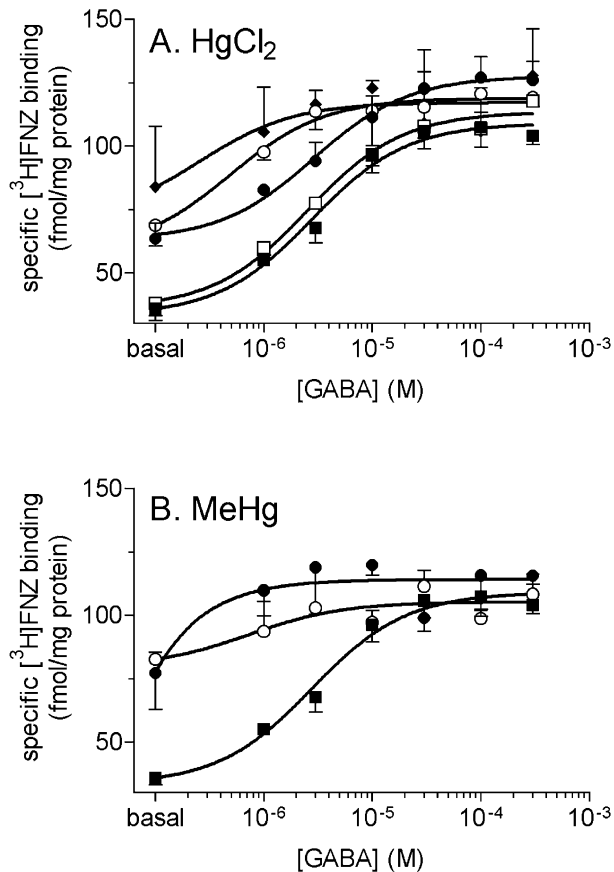


Fig. 1. Effect of mercury compounds on concentration–response curves for GABA-inducing increase of [³H]flunitrazepam binding. [³H]flunitrazepam binding was performed in intact cells at 25°C for 30 min in the presence of different concentrations of GABA and mercury compounds. (A) Effect of 1, 3, 5 and 10 μM HgCl₂. Symbols: control (■), 1 μM (□), 3 μM (●), 5 μM (○) and 10 μM (◆). (B) Effect of 30 and 60 μM methylmercury. Symbols: control (■), 30 μM (○) and 60 μM (●). Each point is the mean ± sem of 3 determinations from one representative experiment.

3.2. Effects of mercuric chloride and methylmercury on GABA and benzodiazepine recognition sites

In membranes obtained from primary cultures of cerebellar granule cells there was a statistically significant increase of [³H]flunitrazepam binding by 10 μM mercuric chloride (118.5±5.9%, *n*=4 experiments) and 30 μM methylmercury (117.2±1.4%, *n*=4 experiments) with respect to basal [³H]flunitrazepam binding (*p*<0.05 for both compounds after a significant ANOVA analysis, *F*(2,10)=7.593, *p*=0.01).

By using intact cultured cerebellar granule cells, both mercuric chloride and methylmercury increased the basal [³H]flunitrazepam binding (Fig. 2 and Table 1). This rise was concentration dependent, mercuric chloride being significantly more potent than methylmercury (EC₅₀ values were 3.56 and 15.24 μM, respectively, after 30 min of exposure; *p*<0.001). Table 1 also shows the EC₅₀ values for the effect of mercuric chloride and

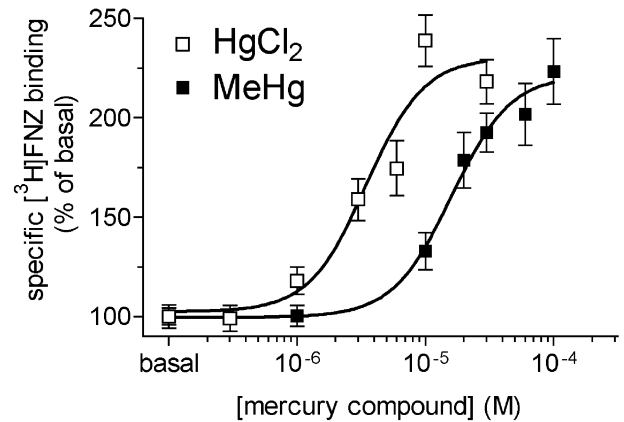


Fig. 2. Concentration–response curve for the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by mercuric chloride (□) and methylmercury (■). [³H]flunitrazepam binding was performed on intact cells at 25°C for 30 min in the presence of different concentrations of mercury compounds. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in the absence of mercury compounds. Each point is the mean ± sem of 9 determinations pooled from three separated experiments.

methylmercury on [³H]flunitrazepam binding after 4 h of metal exposure. Mercuric chloride had the same potency independently of the exposure time (3.56 and 3.16 μM at 30 and 240 min, respectively), however methyl mercury showed a significant higher effect at 4 h of exposure relative to 30 min (9.99 and 15.24 μM, respectively, *p*=0.001). Maximum increase of [³H]flunitrazepam binding was similar for both mercury compounds and exposure time. When [³H]flunitrazepam binding was performed in a low Cl⁻ buffer (1.6 mM Cl⁻), a 10% reduction of the basal binding was observed. Using this low Cl⁻ buffer, the effect of mercuric chloride on [³H]flunitrazepam binding was statistically reduced from 179.8±19.1 to 115.4±11.05% (*p*<0.05, *n*=4 experiments). [³H]flunitrazepam binding, either basal or in the presence of 10 μM mercuric chloride was completely abolished by 20 μM diazepam (data not shown). Furthermore, after 30 min of exposure to mercuric chloride and methylmercury, the amount of GABA present in the binding buffer was 0.8±0.02 and 0.7±0.03 μM, respectively (*n*=4).

We also tested the effect of other neurotoxic organometal compounds (trimethyltin and triethyltin) on [³H]flunitrazepam binding. No differences were found between control cells and those exposed to organotin compounds (specific [³H]flunitrazepam binding was 32.6±2.8, 30.2±1.6 and 32.9±3.3 fmol/mg protein for control cells, 100 μM trimethyltin and 100 μM triethyltin treated cells, respectively, *n*=4–5). Other divalent cations like Co²⁺ (2 mM) and Zn²⁺ (10 μM) did not modify [³H]flunitrazepam binding on primary cultures of mouse cerebellar granule cells (data not shown).

[³H]GABA binding to the GABA_A receptor in intact cultured cells can be masked by the binding of [³H]

Table 1

Parameters of mercuric chloride- and methylmercury-induced increase of [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of cerebellar granule cells

	Log EC ₅₀	EC ₅₀ , μM (95% confidence interval)	Maximum effect (% of control)
<i>HgCl</i> ₂			
30 min	-5.448±0.048	3.56 (2.24–5.75)	225.2±10.0
240 min	-5.500±0.040	3.16 (2.14–4.68)	222.9±10.0
<i>CH</i> ₃ <i>HgCl</i>			
30 min	-4.817±0.020**	15.24 (12.59–18.62)	218.8±11.6
240 min	-5.000±0.012*,**	9.99 (8.91–11.22)	277.6±30.2

Concentration–response curves were analysed by the Graph Pad Prism program. Results are expressed as mean ± sem of 3 experiments, each point curve in triplicate. Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds ($F(1,8)=289.69$, $p<0.0001$) and time of exposure ($F(1,8)=12.51$, $p=0.008$) without interaction between compounds and time. * $p<0.05$, 240 min exposure to methylmercury vs. 30 min exposure to methylmercury; ** $p<0.001$, methylmercury vs. mercuric chloride at the same exposure time (Tukey's test)

GABA to its transport site, which is an energy- and Na⁺, Cl⁻ dependent process (Enna and Snyder, 1975). For this reason we performed the [³H]GABA binding assay to the GABA_A receptor using membranes obtained from primary cultures of cerebellar granule cells and Tris–citrate buffer as a binding assay buffer. Concentrations of mercury compounds that produced maximum effect on [³H]flunitrazepam binding (10 μM for mercuric chloride and 30 μM for methylmercury) did not produce any significant effect on [³H]GABA binding (Fig. 3). Using this membrane preparation both the agonist muscimol (10 μM) and the antagonist bicuculline (100 μM) produced a statistically significant ($p<0.01$) inhibition of [³H]GABA binding. (Fig. 3; one-way analysis of variance; $F(4,31)=40.37$, $p<0.0001$).

3.3. Inhibition of the effects of mercury compounds on [³H]flunitrazepam binding by GABA_A receptor antagonists

Fig. 4A shows that bicuculline, picrotoxinin and the organochlorine pesticide α-endosulfan completely inhibited ($p<0.01$) the effect of mercuric chloride and

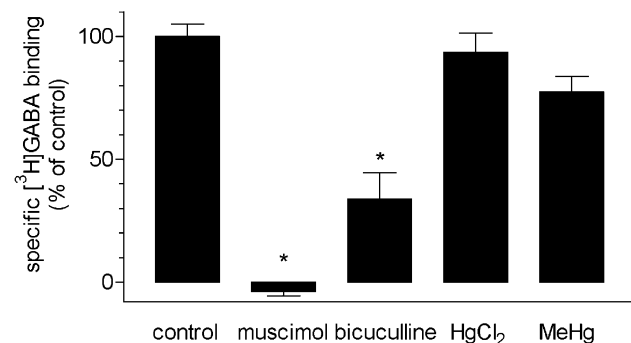


Fig. 3. Effect of mercury compounds on [³H]GABA binding. [³H]GABA binding was performed in membranes obtained from cultured cerebellar granule cells at 4°C for 20 min. * $p<0.01$ vs. control. Results are expressed as percentage of specific binding. Results are mean ± sem of 6–8 determinations pooled from 2 experiments.

methylmercury on [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of cerebellar granule cells. Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds ($F(2,27)=9.48$, $p=0.0008$) and for GABA_A receptor antagonists ($F(3,27)=23.68$, $p<0.0001$). Fig. 4B shows that bicuculline, picrotoxinin and α-endosulfan inhibited the effect of GABA on [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of cerebellar granule cells, in agreement with their antagonist action at the GABA_A receptor. Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for GABA ($F(1,14)=50.91$, $p<0.0001$) and for GABA_A receptor antagonists ($F(3,14)=11.17$, $p=0.0005$). Furthermore, bicuculline decreased the basal [³H]flunitrazepam binding to 80.1±6.2% ($n=3$), however this reduction was not statistically significant.

3.4. Effects of ion channel blockers on mercury compound-induced increase of [³H]flunitrazepam binding

Flunarizine (1 and 5 μM), a Ca²⁺/Na⁺ channel blocker which have neuroprotectant effects (Pauwels et al., 1991) did not modify the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by mercury compounds in primary cultures of cerebellar granule cells (Table 2).

To study the relevance of possible Cl⁻ cotransport on the effects induced by mercury compounds on [³H]flunitrazepam binding, we exposed cultured cerebellar granule cells to the anion transport blocker DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid). Fig. 5A shows that DIDS completely inhibited ($p<0.01$) the effect of both mercuric chloride and methylmercury on [³H]flunitrazepam binding when DIDS was present in conjunction with mercury compounds. Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds ($F(2,24)=25.45$, $p<0.0001$) and for DIDS ($F(1,24)=49.55$, $p<0.0001$). In a second series of experiments, primary cultures of cerebellar granule cells were preincubated with DIDS and subsequently rinsed with HEPES buffer before [³H]flunitrazepam binding was

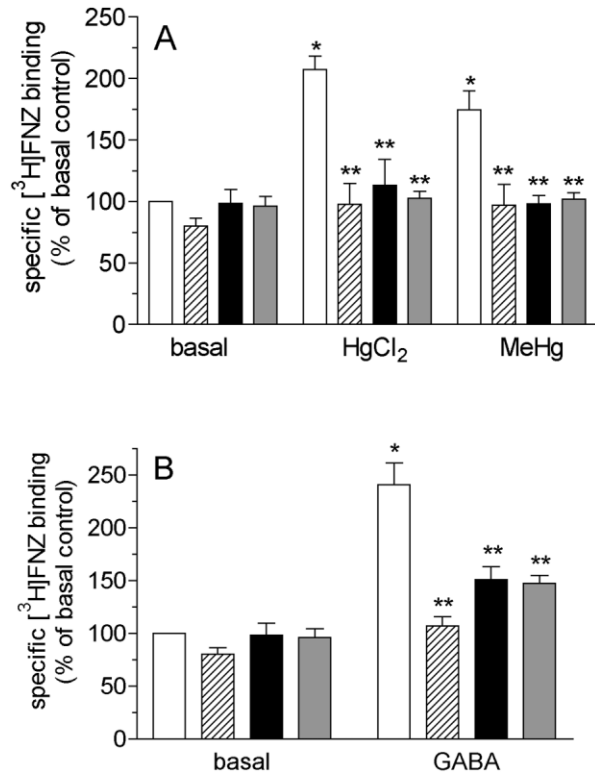


Fig. 4. Effect of GABA_A receptor antagonists. (A) Effect of 100 μ M bicuculline (striped bars), 200 μ M picrotoxinin (black bars) or 10 μ M α -endosulfan (grey bars) on the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by 10 μ M mercuric chloride or 30 μ M methylmercury. Plain bars represent [³H]flunitrazepam binding in the absence of GABA_A receptor antagonists. * p <0.01 vs. corresponding basal binding values in the absence of mercury; ** p <0.01 vs. corresponding mercury compounds in the absence of GABA_A receptor antagonists. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in HEPES buffered saline (control). Results are means \pm sem of 3–4 experiments, each with 4–8 replicates. (B) Effect of 100 μ M bicuculline (striped bars), 200 μ M picrotoxinin (black bars) and 10 μ M α -endosulfan (grey bars) on the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by 100 μ M GABA. * p <0.01 vs. corresponding basal binding values in the absence of GABA; ** p <0.01 vs. GABA in the absence of GABA_A receptor antagonists. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in HEPES buffered saline (control). Results are means \pm sem of 3–4 experiments, each with 4–8 replicates.

performed in the presence of mercury compounds. The pre-treatment with DIDS did not produce a significant prevention of the effects of mercury compounds on [³H]flunitrazepam binding, however a partial inhibition (60–70%) of the increase of [³H]flunitrazepam binding was observed (Fig. 5B). Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds ($F(2,12)=15.93$, $p=0.0004$) and for DIDS ($F(1,12)=13.87$, $p=0.0029$).

3.5. Effect of protein kinase activators and inhibitors on mercury compound-induced increase of [³H]flunitrazepam binding

We screened whether phosphorylation could underlie the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by

Table 2

Effect of flunarizine on mercuric chloride- and methylmercury-induced increase of [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of cerebellar granule cells

	[³ H]flunitrazepam binding (fmol/mg protein)		
	HEPES buffer	1 μ M flunarizine	5 μ M flunarizine
Basal	92.07 \pm 6.64 (4)	81.32 \pm 7.66 (4)	81.17 \pm 4.38 (4)
HgCl ₂ (10 μ M)	169.89 \pm 8.74 (3)*	184.68 \pm 13.75 (4)*	168.89 \pm 7.2(4)*
CH ₃ HgCl (30 μ M)	141.95 \pm 10.13 (8)*	161.03 \pm 11.29 (8)*	145.63 \pm 7.81 (8)*

Results are expressed as fmol/mg protein of specific binding (mean \pm sem, in parenthesis, number of determinations). Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds ($F(2,38)=94.30$ (p <0.0001) but not for flunarizine ($F(2,38)=1.29$). * p <0.01 with respect corresponding basal values

mercury compounds in primary cultures of cerebellar granule cells. Table 3 shows that activation of PKA (protein kinase A) by dibutyryl-cAMP or activation of PKC (protein kinase C) by phorbol-13-myristate-13-acetate (PMA) did not reduce the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by mercury compounds. In addition, inhibition of PKC or CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II) phosphorylation activity by exposing the cells to chelerythrine or KN 93 (*N*-[2-[[[3-(4-chlorophenyl)-2-propenyl] methylamino] methyl] phenyl]-*N*-(2-hydroxyethyl)-4-methoxy-benzene-sulfonamide), respectively, did not modify the effects of mercury compounds (Table 3). None of these compounds, whether they induced or inhibited phosphorylation, had any effect on flunitrazepam binding

3.6. Involvement of microtubules on mercury compound-induced increase of [³H]flunitrazepam binding

Colchicine was assayed to elucidate whether disruption of microtubules by colchicine could mimic the effect of mercury compounds on [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of cerebellar granule cells. Fig. 6 shows that 100 μ M colchicine neither modified the basal [³H]flunitrazepam binding nor the increase produced by mercury compounds in primary cultures of cerebellar granule cells. Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds ($F(2,9)=27.46$ (p <0.0001) but not for colchicine.

3.7. Effects of antioxidant agents on mercury compound-induced increase of [³H]flunitrazepam binding

The effects of three neuroprotective antioxidants, dithiothreitol (DTT), *n*-propyl gallate and vitamin E (α -

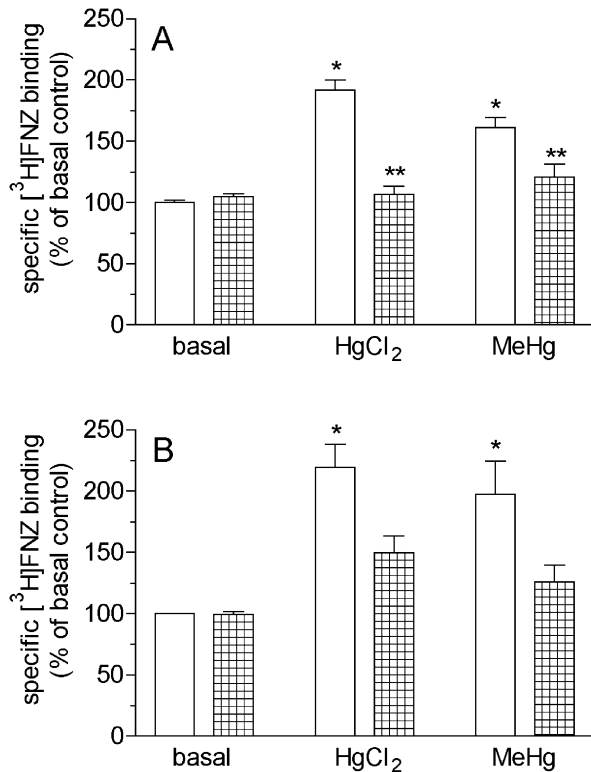


Fig. 5. Effect of the anion channel inhibitor DIDS. (A) Cerebellar granule cells were preincubated with HEPES buffer (plain bars) or 1 mM DIDS (squared bars) for 30 min and incubated for 30 min at 25°C with [³H]flunitrazepam with HEPES buffer or mercury compounds (10 μM mercuric chloride and 30 μM methylmercury) in the absence (plain bars) or the presence (squared bars) of DIDS. **p*<0.001 vs. corresponding basal binding values in the absence of mercury; ***p*<0.01 vs. corresponding mercury compounds in the absence of DIDS. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in HEPES buffered saline solution (control). Results are means ± sem of 5 determinations. (B) Cerebellar granule cells were preincubated with HEPES buffer (plain bars) or 1 mM DIDS (squared bars) for 30 min, rinsed and incubated with [³H]flunitrazepam with HEPES buffer or mercury compounds (10 μM mercuric chloride and 30 μM methylmercury) in the absence of DIDS. **p*<0.01 vs. corresponding basal binding values in the absence of mercury. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in HEPES buffered saline solution (control). Results are mean ± sem of 3 experiments each with 4–8 determinations.

tocopherol) on the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by mercury compounds were studied. When the cells were exposed to the cell-permeable reducing agent DTT in conjunction with mercury compounds a complete inhibition of the effect of 10 μM HgCl₂ and 30 μM MeHg on [³H]flunitrazepam binding was observed (mercury-induced specific [³H]flunitrazepam binding in the absence and in the presence of 3 mM DTT accounted, respectively, for 165.59±7.30 and 60.67±4.25 fmol/mg protein in the presence of HgCl₂ and for 117.21±18.18 and 57.29±2.83 fmol/mg protein in the presence of MeHg, *n*=5). To avoid the chelating

Table 3

Effect of kinase activators/inhibitors on mercuric chloride- and methylmercury-induced increase of [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of cerebellar granule cells

	Basal	HgCl ₂ (10 μM)	CH ₃ HgCl (30 μM)
<i>Kinase activation</i>			
HEPES buffer	83.44±8.01 (4)	158.51±6.75 (4)*	131.82±4.52 (8)*
1 mM db-cAMP	87.19±9.2 (4)	144.25±6.16 (4)*	151.59±11.67 (8)*
HEPES buffer	83.76±3.58 (7)	180.69±6.69 (8)*	147.54±5.71 (16)*
1 μM PMA	78.13±3.60 (8)	173.84±17.72 (8)*	142.79±3.44 (15)*
<i>Kinase inhibition</i>			
HEPES buffer	83.76±3.58 (7)	180.69±6.69 (8)*	147.54±5.71 (16)*
1 μM chelerythrine	92.75±6.07 (8)	174.16±6.07 (8)*	136.69±4.81 (16)*
10 μM KN 93	78.00±6.78 (8)	187.93±5.00 (8)*	162.84±7.02 (16)*

Results are expressed as fmol/mg protein of specific binding (mean ± sem, in parenthesis, number of determinations). Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds (*F*(2,26)=27.49, *p*<0.0001 for db-cAMP experiment; *F*(2,56)=153.3, *p*<0.0001 for PMA experiment; *F*(2,86)=160.0, *p*<0.0001 for kinase inhibition experiments). **p*<0.001 with respect corresponding basal values

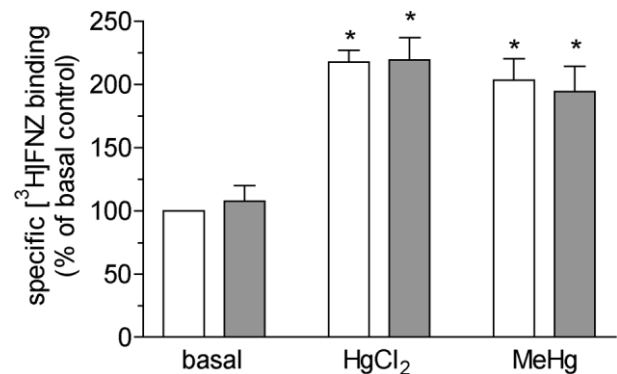


Fig. 6. Effect of colchicine on [³H]flunitrazepam binding. Cerebellar granule cells were preincubated with HEPES buffer (plain bars) or 100 μM colchicine (grey bars) for 3 h 30 min and incubated for 30 min at 25°C with HEPES buffer or mercury compounds (10 μM mercuric chloride and 30 μM methylmercury) plus [³H]flunitrazepam in the absence or the presence of colchicine. **p* 0.05 vs. corresponding basal binding values in the absence of mercury. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in HEPES buffered saline solution (control). Results are mean ± sem of 3 experiments each with 4–8 determinations.

effect of DTT on mercury compounds, we preincubated cerebellar granule cells with DTT for 30 min and rinsed the preparation before incubating the cells with [³H]flunitrazepam and mercury compounds. Under these experimental conditions, the effect of methylmercury on

[³H]flunitrazepam binding was not inhibited, however the effect of mercuric chloride was partially but statistically significantly ($p < 0.05$) reduced (Fig. 7A). Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds ($F(2,18) = 29.04$, $p < 0.0001$) and for DTT ($F(1,18) = 4.27$, $p = 0.05$).

Fig. 7B shows that antioxidant agents like *n*-propyl gallate and vitamin E did not reduce the effect of mercury compounds on [³H]flunitrazepam binding. Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for mercury compounds ($F(2,36) = 95.59$, $p < 0.0001$) but not for *n*-propyl gallate or vitamin E.

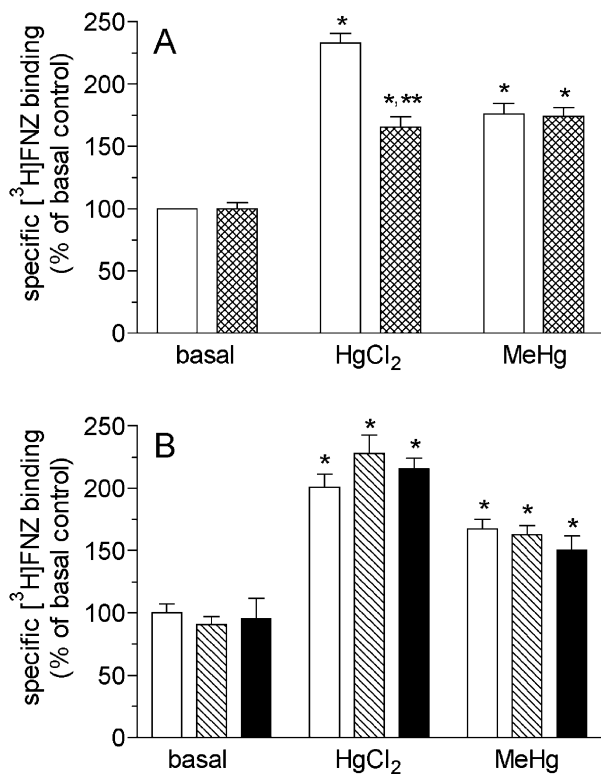


Fig. 7. Effects of reducing agents. (A) Effect of dithiothreitol, DTT. Cerebellar granule cells were preincubated with HEPES buffer (plain bars) or 3 mM DTT for 30 min (squared bars), rinsed and incubated with HEPES buffer or mercury compounds (10 μ M mercuric chloride and 30 μ M methylmercury) plus [³H]flunitrazepam in the absence of DTT. * $p < 0.05$ vs. corresponding basal binding values in the absence of mercury; ** $p < 0.05$ with respect mercuric chloride in the absence of DTT. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in HEPES buffered saline solution (control). Results are means \pm sem of 4 experiments each with 5 determinations. (B) Cerebellar granule cells were preincubated with HEPES buffer (plain bars), 50 μ M *n*-propyl gallate (striped bars) or 20 μ M vitamin E (black bars) and incubated with HEPES buffer or mercury compounds (10 μ M mercuric chloride and 30 μ M methylmercury) plus [³H]flunitrazepam in the presence of antioxidants. * $p < 0.05$ vs. corresponding basal binding values in the absence of mercury. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in HEPES buffered saline solution (control). Results are means \pm sem of 5 determinations.

3.8. Involvement of sulfhydryl group alkylation on mercury compound-induced increase of [³H]flunitrazepam binding

To determine whether blocking thiol groups could mimic the effect of mercury compounds we tested the effect of the irreversible sulfhydryl alkylating agent *N*-ethylmaleimide (NEM) on [³H]flunitrazepam binding. Fig. 8A shows that NEM significantly increased ($p < 0.05$) the basal [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. With respect to the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by

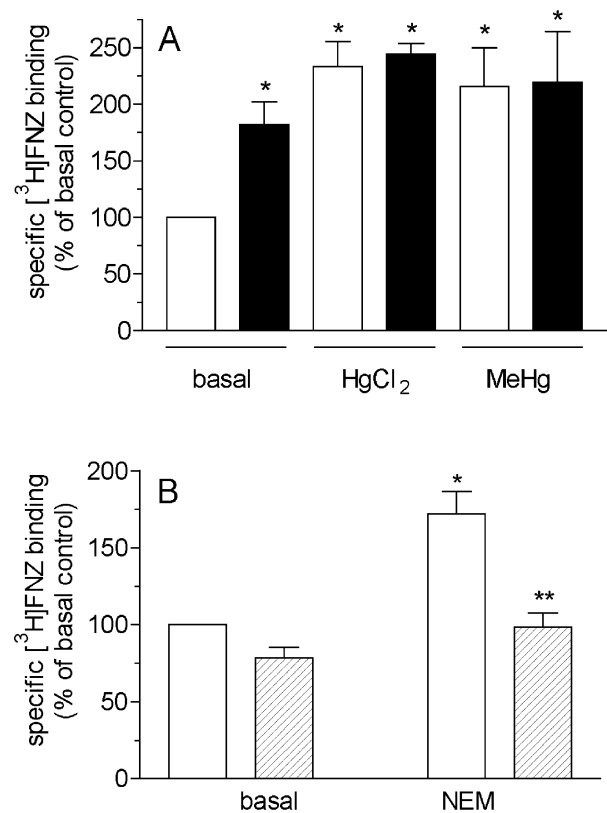


Fig. 8. Effect of *N*-ethylmaleimide, NEM, on [³H]flunitrazepam binding. (A) Cerebellar granule cells were preincubated with HEPES buffer (plain bars) or 30 mM NEM for 30 min (black bars), rinsed and incubated with HEPES or mercury compounds (10 μ M mercuric chloride and 30 μ M methylmercury) plus [³H]flunitrazepam in the absence of NEM. * $p < 0.05$ vs. corresponding basal binding value. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in the absence of both mercury compounds and NEM. Results are mean \pm sem of 2–4 experiments each with 4–8 determinations. (B) Effect of 100 μ M bicuculline (striped bars) on the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by 30 mM NEM. Plain bars represent [³H]flunitrazepam binding in the absence of the GABA_A receptor antagonist. * $p < 0.001$ vs. corresponding basal binding values in the absence of NEM; ** $p < 0.001$ vs. NEM in the absence of bicuculline. Results are expressed as percentage of basal [³H]flunitrazepam binding in the absence of bicuculline and NEM. Results are mean \pm sem of 4 experiments each with 3–4 determinations.

mercury compounds, NEM did not produce any additive effect. One-way analysis of variance revealed statistically significant differences ($F(5,15)=7.281$, $p=0.0041$).

Fig. 8B shows that bicuculline completely inhibited the effect of NEM on [3 H]flunitrazepam binding ($p<0.05$). Two-way analysis of variance showed statistically significant differences for NEM ($F(1,12)=24.26$, $p=0.0004$) and for bicuculline ($F(1,12)=25.98$, $p=0.0003$). In addition, NEM did not increase the maximum response elicited by GABA. About 100 μ M GABA increased [3 H]flunitrazepam binding by 195.9 ± 8.0 and $213.0\pm 13.9\%$ in the absence and in the presence of NEM, respectively ($n=4$ experiments).

3.9. Assessment of cell status and functionality after exposure to mercury compounds

Fig. 9 shows primary cultures of cerebellar granule cells exposed to mercuric chloride and methylmercury for 30 min at 25°C in the same conditions as those used in the binding assays. Mercury compounds, dose dependently, induced cell morphological changes and disorganization of the neuronal network (Fig. 9B and C, for

3 and 10 μ M HgCl₂, respectively, and Fig. 9E and F for 10 and 30 μ M MeHg respectively, with respect to Fig. 9A for control cultures). However, the intracellular lactate dehydrogenase activity was not reduced by 30 μ M MeHg treatment (data not shown) and protein content of primary cultures treated with 10 μ M HgCl₂ or 30 μ M MeHg differed by less than 10% from control cultures (percentages of μ g protein/well of HgCl₂ and MeHg treated cells with respect to control cells were 94.2 ± 1.9 and $92.5\pm 1.6\%$, respectively, $n=14$ experiments). Furthermore, the propidium iodide assay produced a DNA staining of 11.3 ± 5.0 and $11.6\pm 2.9\%$ for 10 μ M mercuric chloride and 30 μ M methylmercury, respectively, after 30 min of exposure to the mercury compounds ($n=7$, pooled from 2 experiments). When 10 μ M HgCl₂-treated cerebellar granule cells were preincubated with bicuculline (under conditions that inhibited the effects of mercury compounds on [3 H]flunitrazepam binding), the cultures also showed signs of disorganization (Fig. 9I), suggesting that the mercury-induced cell toxicity was not linked to the mercury-induced changes on GABA_A receptor. In this way, the effect of DIDS in conjunction with 10 μ M HgCl₂ (under conditions that inhibited the effects

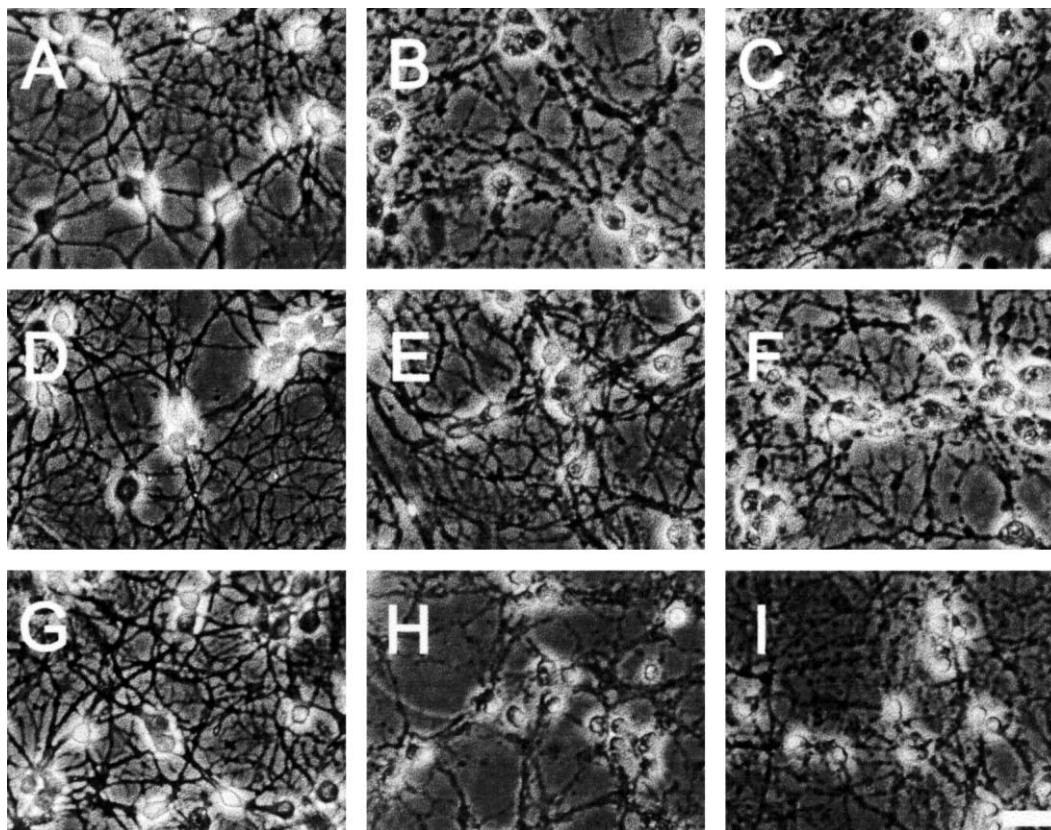


Fig. 9. Phase-contrast micrograph of cerebellar granule neurons cultured for 7 days *in vitro* in 24 well dishes. Cells were treated for 30 min at 25°C, at the same conditions of those used for the [3 H]flunitrazepam binding assays. (A) Control treatment with HEPES-buffered saline solution. (B) 3 μ M mercuric chloride exposure. (C) 10 μ M mercuric chloride exposure. (D) 100 μ M GABA exposure. (E) 10 μ M methylmercury exposure. (F) 30 μ M methylmercury exposure. (G) 3 mM DTT plus 10 μ M mercuric chloride exposure. (H) 1 mM DIDS plus 10 μ M mercuric chloride exposure. (I) 200 μ M bicuculline pre-treatment for 10 min followed by 10 μ M mercuric chloride plus 200 μ M bicuculline exposure. Bar indicates 2.5 μ m.

of mercury compounds on [^3H]flunitrazepam binding) produced a slight protection of mercury toxicity (Fig. 9H), suggesting multiple actions of DIDS on mercury effects. In contrast, the preincubation with DTT completely abolished the toxicity signs and DTT pre-treated cultured cells looked like control cells (Fig. 9G and A, respectively). About 30 min incubation with 100 μM GABA did not produce any sign of cellular toxicity (Fig. 9D), indicating that GABA-induced increase of [^3H]flunitrazepam binding and continuous GABA_A receptor activation did not produce any harm to neurones.

The changes in morphology of the primary neuronal cultures did not mean that cells had lost their neuronal function. Since primary cultures of cerebellar granule cells are mainly constituted by glutamatergic granule neurons, we determined the ability of these cells to release endogenous glutamate as a measure of neuronal functionality. To assess for the functionality of these cells under the conditions used for the binding experiments, we determined the K^+ -induced release of glutamate in sister cultures of cerebellar granule cells after exposure to 10 μM HgCl_2 or 30 μM MeHg for 30 min. Fig. 10 shows the amount of released endogenous glutamate after high K^+ stimulation before (Fig. 10A) and after (Fig. 10C) exposure to mercury compounds. One-way analysis of variance revealed a statistically significant difference of the glutamate content in the stimulated fraction vs. basal fractions ($F(2,26)=14.27$, $p=0.0008$ and $F(8,26)=65.15$, $p=0.0001$; before and after exposure to mercury compounds, respectively). All groups of cultured cerebellar granule cells, whether control, mercuric chloride or methylmercury treated cells, released similar amounts of glutamate under high K^+ depolarising conditions. Furthermore, cells exposed to mercuric chloride or methylmercury released significant amounts of endogenous glutamate to the medium during mercury compounds exposure ($F(2,8)=1793$, $p<0.0001$) (Fig. 10B).

4. Discussion

In this work we show that both inorganic (mercuric chloride, HgCl_2) and organic (methylmercury, MeHg) mercury compounds increased [^3H]flunitrazepam binding at the GABA_A receptor in primary cultures of mouse cerebellar granule cells, both in membranes and in intact cells. The observed effects also included an alteration of the profile for GABA-inducing increase of [^3H]flunitrazepam binding, without modification of the maximum response of GABA. Arakawa et al. (1991) and Huang and Narahashi (1996) have previously reported that mercuric chloride enhanced GABA_A receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurones. The finding that mercuric chloride enhanced [^3H]flunitrazepam binding in a concentration-dependent manner is in agreement

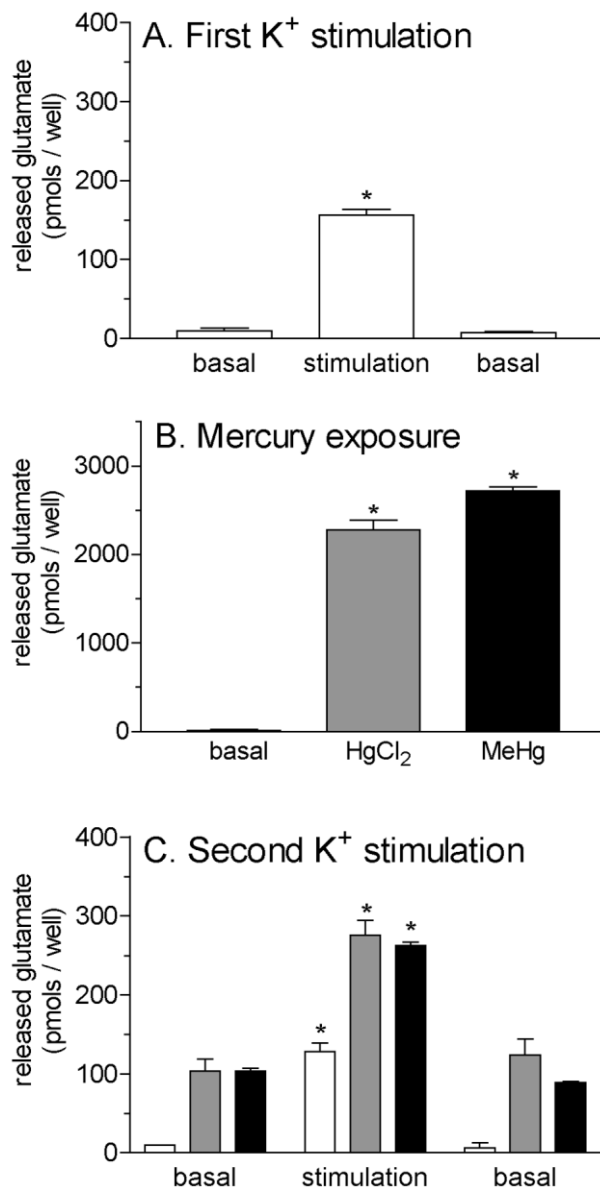


Fig. 10. Effect of mercury compounds on the release of endogenous glutamate. (A) Cultured cerebellar granule cells, maintained in HEPES buffered saline, were stimulated with 55 mM K^+ for 2 min. Media were collected and analysed by HPLC for glutamate content. $*p<0.001$ vs basal fractions. Results are mean \pm sem of 9 determinations, expressed as pmols/well of endogenous released glutamate. (B) Exposure of granule cerebellar cell to HEPES buffer (plain bar), 10 μM mercuric chloride (grey bar) or 30 μM methylmercury (black bar) for 30 min 25°C, in the same conditions as in [^3H]flunitrazepam binding assays, after the first stimulation with 55 mM K^+ . Media were collected and analysed by HPLC for glutamate content. $*p<0.001$ vs basal fraction. Results are mean \pm sem of 3 determinations, expressed as pmols/well of endogenous released glutamate. (C) After mercury compounds exposure, cerebellar granule cells were rinsed three times and stimulated with 55 mM K^+ for 2 min (second stimulation). Media were collected and analysed by HPLC for glutamate content. $*p<0.001$ vs. corresponding basal fractions. Results are mean \pm sem of 3 determinations, expressed as pmols/well of endogenous released glutamate.

with the findings showing an increase of GABA-induced currents. In addition, the concentrations of mercuric chloride used in the present work were similar to those used by Arakawa et al. (1991) and Huang and Narahashi (1996) and produced equivalent quantitative effects. We also found that methylmercury increased [³H]flunitrazepam binding in primary cultures of cerebellar granule cells. However, methylmercury differed with mercuric chloride in two aspects: (1) it was less potent (EC_{50} values were 15.24 and 3.56 μ M for methylmercury and mercuric chloride, respectively, after 30 min exposure, $p < 0.001$) and (2) its effect was time dependent (EC_{50} values were 15.24 and 9.99 μ M after 30 min and 4 h of exposure, respectively; $p = 0.001$). Similarly, Komulainen et al. (1995) reported an increase of [³H]flunitrazepam binding induced by methylmercury using rat cerebellar membranes.

We also show that the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by mercury compounds was inhibited by competitive (bicuculline) and non-competitive (picrotoxinin) GABA_A receptor antagonists. The organochlorine pesticide α -endosulfan had similar effects, according to its proposed action as a GABA_A receptor antagonist (Pomés et al. 1993, 1994; Huang and Casida, 1996; Suñol et al., 1998). The complete prevention of the effects of mercury compounds on [³H]flunitrazepam binding by GABA_A receptor antagonists shown in Fig. 4 suggests a specific interaction of mercuric chloride and methylmercury with the GABA_A receptor. This increase of [³H]flunitrazepam binding by mercury compounds was dependent on the presence of Cl⁻ ions in the binding buffer. Harris et al. (1993) reported that Cl⁻ ions increase the enhancement of [³H]flunitrazepam binding induced by inhalational anesthetics and barbiturates. Using membranes obtained from mouse cultured cerebellar granule cells, neither mercuric chloride nor methylmercury significantly inhibited [³H]GABA binding. Since we used concentrations of mercury compounds high enough to produce significant effects on [³H]flunitrazepam binding, the lack of effect on [³H]GABA binding suggests that mercury compounds were not directly acting on the GABA recognition site. We have previously reported that bicuculline and picrotoxinin inhibited the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by compounds acting at the GABA_A receptor whether they were interacting with the GABA or other different recognition sites (Vale et al., 1997). In this work we also observed that bicuculline might be blocking a tonic action of GABA on cerebellar granule cells, since 100 μ M bicuculline produced a slight reduction (20%) of [³H]flunitrazepam binding in the absence of added GABA (Fig. 4). A tonic benzodiazepine-sensitive GABAergic inhibition has been recently described in primary cultures of cerebellar granule cells (Leao et al., 2000). An increase of [³H]flunitrazepam binding by the GABA present in the medium (<0.9 μ M) in response to

mercury compounds was discarded. This concentration was not enough to produce a significant increase of [³H]flunitrazepam binding. The GABA concentration in the presence of GABA uptake inhibitors did not produce any effect (unpublished results).

LoPachin and Aschner (1999) suggest that activation of an anion exchange system (HCO₃⁻/Cl⁻) could underlie some of the effects of methylmercury on neuronal and glial membrane transporters. In this way, Rothstein and Mack (1991) reported a rapid activation of an anion exchange system (HCO₃⁻/Cl⁻) by methylmercury. Blocking non-GABA receptor-mediated chloride exchange by exposing cerebellar granule cells to DIDS (4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid), the effects of mercuric chloride and methylmercury on [³H]flunitrazepam binding were completely inhibited (Fig. 5A). Since the chemical structure of DIDS contains two isothiocyanate groups that might be chelating the mercury compounds, we removed DIDS and rinsed it thoroughly before incubating the cultured cells with [³H]flunitrazepam and mercury compounds. Even under this condition, the effects of mercuric chloride and methylmercury on [³H]flunitrazepam binding were partially inhibited (Fig. 5B). The inhibitory effects of DIDS shown in Fig. 5 can also be related to its irreversible block of anion channels (Schopfer and Salhany, 1995) and subsequent maintenance of Cl⁻ homeostasis and stabilization of the membrane potential and cell volume. Alternatively, DIDS may also be acting at the GABA_A receptor, since Maksay and van Rijn (1993) reported that DIDS inhibit [³H]TBOB (*t*-butylbicyclo-orthobenzoate) binding. In addition, the micrographs shown in Fig. 9 show that cell damage produced by HgCl₂ (Fig. 9C) was slightly ameliorated by DIDS (Fig. 9H), however not in the same way as DTT (Fig. 9G), suggesting that a partial chelation of HgCl₂ by DIDS could occur.

Other possible underlying mechanisms for the effects of mercury compounds at the GABA_A receptor were screened. Intracellular calcium, protein phosphorylation and microtubule assembly have been reported to be both altered by mercury compounds and to be of importance for the GABA_A receptor modulation (Sarafian and Verity, 1990; Sarafian, 1993; Whatley et al., 1994; Huang and Narahashi, 1997b; Cupello and Robello, 2000; Oliveri et al., 2000). None of the compounds used in this work to ascertain these mechanisms had any effect on the increase of [³H]flunitrazepam binding induced by mercury compounds nor on the coupling between GABA and benzodiazepine recognition sites in cultured cerebellar granule cells.

It has recently been shown that methylmercury produces microtubule and neuronal network fragmentation in cultured cerebellar granule cells, although cells were still viable (Castoldi et al., 2000). We also observed in this work that primary cultures of cerebellar granule cells were disorganized to some extent after exposure to mer-

cury compounds (Fig. 9). However, the low propidium iodide incorporation and the LDH assay as well as the fact that the neurons did respond to high K^+ stimulation and released endogenous glutamate (Fig. 10C), revealed that they were still alive and functional.

Mercuric chloride and methylmercury are acting as oxidant agents. The reducing agent DTT completely protected cultured cerebellar granule cells from being damaged by mercury compounds (Fig. 9G). DTT also completely reversed the effects of $HgCl_2$ and MeHg on [3H]flunitrazepam binding. However, DTT is a powerful chelating agent for mercury compounds. When the cells were preloaded with DTT and rinsed, to allow an intracellular antioxidant action, the effect of methylmercury on [3H]flunitrazepam binding was not reversed. However that of $HgCl_2$ was partially but significantly inhibited ($p < 0.05$). These results would suggest that $HgCl_2$ could be acting both in the outer and cytoplasmic domains of the GABA_A receptor and loaded DTT could be chelating the $HgCl_2$ incorporated into the cell. Christensen et al. (1988) reported mercuric chloride cellular uptake and its accumulation within lysosomes, in nucleus and cytoplasm. Alternatively, this partial inhibition of the effect of $HgCl_2$ by DTT could be due to DTT leakage into the medium and partial chelation of the $HgCl_2$ present in the medium. Other antioxidant agents, like *n*-propylgallate and vitamin E did not modify the effects of mercury compounds on [3H]flunitrazepam binding. All these results suggest that the modification of the GABA_A receptor induced by short exposure to mercury compounds was not due to oxidative stress or lipoperoxidation.

Finally, we tried the effect of NEM, as an irreversible alkylating agent, to see whether alkylation of sulfhydryl groups mimicked the effect of mercury compounds in [3H]flunitrazepam binding. Like mercury compounds, NEM by itself increased the [3H]flunitrazepam binding and this effect was inhibited by bicuculline in primary cultures of cerebellar granule cells (Fig. 8). Furthermore, the effect of NEM was not additive, respect to the maximum effect of GABA. Other authors have also found that NEM mimics the effect of mercury compounds at the dopamine D₂ receptor (Scheuhammer and Cherian, 1985) and at the GABA_A receptor by increasing GABA-inducing currents (Huang and Narahashi, 1996). We also found that NEM did not further increase the effect of 10 μM $HgCl_2$ and 30 μM MeHg on [3H]flunitrazepam binding, suggesting that mercury compounds and NEM share a common mechanism of alkylation of protein SH groups. Conserved cysteine residues are found in GABA_A receptor subunit sequences. At human α_1 subunit, cysteine180 residue is reported to define an important constraint to the receptor structure, in a region where some residues suggested to be involved in benzodiazepine modulation of GABA_A receptor function are located (Xue et al., 1999). The oxidation of cysteinyl

residues by mercury compounds also agrees with the different potency for $HgCl_2$ and MeHg observed in this work for the increase of [3H]flunitrazepam binding (3.56 and 15.24 μM , respectively). Mercuric chloride (Hg^{+2}) is more electrophilic than methylmercury (CH_3Hg^+) and is more likely to oxidize sulfhydryl groups of cysteinyl residues. Recently, Hisatome et al. (2000) have reported that Hg^{+2} blocks human skeletal Na^+ channels. The authors found that the potency of Hg^{+2} was dependent on the number of cysteinyl residues, its potency being reduced when cysteine was substituted by tyrosine.

In conclusion, the results shown in this work demonstrated that mercury compounds increased [3H]flunitrazepam binding to the GABA_A receptor in cultured cerebellar granule cells without inhibiting [3H]GABA binding. We suggest that this increase of benzodiazepine binding represents a modification of the GABA_A receptor conformation, since it was prevented by GABA_A receptor antagonists. Furthermore, we found that the alkylating agent NEM mimicked the effects of mercury compounds. We suggest that mercury alteration of the GABA_A receptor is due to cysteinyl oxidation at the peptidic sequence of the receptor subunits, which leads to an abnormal conformational state of the GABA_A receptor.

Acknowledgements

This research was supported by Grant number 00/1094 and 01/1318 from FIS (Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social) and Grant numbers 1999SGR00210 and 1999SGR00212 from CIRIT (Generalitat de Catalunya, Spain). E. Fonfría is recipient of a fellowship from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

References

- Allan, A.M., Baier, L.D., 1992. Effect of thiol group modification on ion flux and ligand binding properties of the GABA_A-benzodiazepine receptor chloride channel complex. *Synapse* 10, 310–316.
- Arakawa, O., Nakahiro, M., Narahashi, T., 1991. Mercury modulation of GABA-activated chloride channels and non-specific cation channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research* 551, 58–63.
- Aschner, M., Yao, C.P., Allen, J.W., Tan, K.H., 2000. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochemistry International* 37 (2-3), 199–206.
- Bondy, S.C., Agrawal, A.K., 1980. The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Archives of Toxicology* 46 (3-4), 249–256.
- Castoldi, A.F., Candura, S.M., Costa, P., Manzo, L., Costa, L.G., 1996. Interaction of mercury compounds with muscarinic receptor subtypes in the rat brain. *Neurotoxicology* 17 (3-4), 735–742.
- Castoldi, A.F., Barni, S., Turin, I., Gandini, C., Manzo, L., 2000. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *Journal of Neuroscience Research* 59, 775–787.

- Christensen, M., Mogensen, S.C., Rungby, J., 1988. Toxicity and ultrastructural localization of mercuric chloride in cultured murine macrophages. *Archives of Toxicology* 62 (6), 440–446.
- Cupello, A., Robello, M., 2000. GABA_A receptor modulation in rat cerebellum granule cells. *Receptors Channels* 7 (2), 151–171.
- Enna, S.J., Snyder, S.H., 1975. Properties of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions. *Brain Research* 100 (1), 81–97.
- Estevez, R., Camps, M., Rojas, A.M., Testar, X., Deves, X., Hediger, M.A., Zorzano, A., Palacin, M., 1998. The amino acid transport system y⁺L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB Journal* 12 (13), 1319–1329.
- Faro, L.R., Do Nascimento, J.L., San Jose, J.M., Alfonso, M., Duran, R., 2000. Intrastratial administration of methylmercury increases in vivo dopamine release. *Neurochemical Research* 25 (2), 225–229.
- Gassó, S., Suñol, C., Sanfeliu, C., Rodríguez-Farré, E., Cristófol, R.M., 2000. Pharmacological characterization of the effects of methylmercury and mercuric chloride on spontaneous noradrenaline release from rat hippocampal slices. *Life Sciences* 67, 1219–1231.
- Goyer, R.A., 1996. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, New York, pp. 691–737.
- Gozlan, H., Ben-Ari, Y., 1996. NMDA and GABA_A receptors, NO and redox modulation. *Trends in Pharmacological Science* 7, 187–189.
- Harris, B., Wong, G., Skolnick, P., 1993. Neurochemical actions of inhalational anesthetics at the GABA_A receptor complex. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 265 (3), 1392–1398.
- Hisatome, I., Kurata, Y., Sasaki, N., Morisaki, T., Morisaki, H., Tanaka, Y., Urashima, T., Yatsuhashi, T., Tsuboi, M., Kitamura, F., Miake, J., Takeda, S., Taniguchi, S., Ogino, K., Igawa, O., Yoshida, A., Sato, R., Makita, N., Shigemasa, C., 2000. Block of sodium channels by divalent mercury: role of specific cysteinyl residues in the P-loop region. *Biophysical Journal* 79, 1336–1345.
- Huang, J., Casida, J.E., 1996. Characterization of [³H]ethylbicycloorthobenzoate (³H]EBOB) binding and the action of insecticides on the γ -aminobutyric acid-gated chloride channel in cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 279 (3), 1191–1196.
- Huang, C.-S., Narahashi, T., 1996. Mercury chloride modulation of the GABA_A receptor-channel complex in rat dorsal root ganglion neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 140, 508–520.
- Huang, C.-S., Narahashi, T., 1997a. The role of G proteins in the activity and mercury modulation of GABA-induced currents in rat neurons. *Neuropharmacology* 36 (11/12), 1623–1630.
- Huang, C.-S., Narahashi, T., 1997b. The role of phosphorylation in the activity and mercury modulation of GABA-induced currents in rat neurons. *Neuropharmacology* 36 (11/12), 1631–1640.
- Komulainen, H., Keränen, A., Saano, V., 1995. Methylmercury modulates GABA_A receptor complex differentially in rat cortical and cerebellar membranes in vitro. *Neurochemical Research* 20 (6), 659–662.
- Korogi, Y., Takahashi, M., Shinzato, J., Okahima, T., 1994. MR findings in seven patients with organic mercury poisoning (Minamata disease). *American Journal of Neuroradiology* 15, 1575–1578.
- Leao, R.M., Mellor, J.R., Randall, A.D., 2000. Tonic benzodiazepine-sensitive GABAergic inhibition in cultured rodent cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 39, 990–1003.
- LoPachin, R.M., Aschner, M., 1999. Neuron-glial interactions as potential targets of neurotoxicant effect. In: Tilson, H.A., Harry, G.J. (Eds.), *Neurotoxicology*. Taylor and Francis, London, pp. 53–80.
- Macdonald, R.L., Olsen, R.W., 1994. GABA_A receptor channels. *Annual Review of Neuroscience* 17, 569–602.
- Maekawa, M., Satoh, S., Murayama, T., Nomura, Y., 2000. Involvement of Hg²⁺-sensitive sulfhydryl groups in regulating noradrenaline release induced by S-nitrosocysteine in rat brain slices. *Biochemical Pharmacology* 59 (7), 839–845.
- Maksay, C., van Rijn, C.M., 1993. Interconvertible kinetic states of t-butylbicycloorthobenzoate binding sites of the gamma-aminobutyric acid A ionophores. *Journal of Neurochemistry* 61 (6), 2081–2088.
- Mehta, A.K., Ticku, M.K., 1999. An update on GABA_A receptors. *Brain Research Reviews* 29, 196–217.
- Nagashima, K., 1997. A review of experimental methylmercury toxicity in rats: neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicologic Pathology* 25 (6), 624–631.
- Nylander, M., Weiner, J., 1989. Relation between mercury and selenium in pituitary glands of dental staff. *British Journal of Industrial Medicine* 46 (10), 751–752.
- Olivieri, G., Brack, C.H., Müller-Spahn, F., Stähelin, H.B., Herrmann, M., Renard, P., Brokhaus, M., Hock, C., 2000. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* 74, 231–236.
- Pauwels, P.J., Laysen, J.E., Janssen, P.A.J., 1991. Minireview: Ca²⁺ and Na⁺ channels involved in neuronal cell death. Protection by flunarizine. *Life Sciences* 48 (20), 1881–1893.
- Pomés, A., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C., 1993. Inhibition of t-[³⁵S]butylbicyclophosphorothionate binding by convulsant agents in primary cultures of cerebellar neurons. *Brain Research. Developmental Brain Research* 73 (1), 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 271 (3), 1616–1623.
- Rajanna, B., Rajanna, S., Hall, E., Yallapragada, P.R., 1997. In vitro metal inhibition of N-methyl-D-aspartate specific glutamate receptor binding in neonatal and adult rat brain. *Drug and Chemical Toxicology* 20 (1-2), 21–29.
- 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 Ca²⁺ homeostasis in cultured cerebellar granule neurons is different for the γ - and δ -isomers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142, 31–39.
- Rothstein, A., Mack, E., 1991. Actions of mercurials on cell volume regulation of dissociated MDCK cells. *American Journal of Physiology* 260 (1Pt1), C113–C121.
- Sarafian, T.A., Verity, M.A., 1990. Altered patterns of protein phosphorylation and synthesis caused by methyl mercury in cerebellar granule cell culture. *Journal of Neurochemistry* 55, 922–929.
- Sarafian, T.A., 1993. Methyl mercury increases intracellular Ca²⁺ and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry* 61, 648–657.
- Scheuhammer, A.M., Cherian, M.G., 1985. Effects of heavy metal cations sulfhydryl reagents and other chemical agents on striatal D₂ dopamine receptors. *Biochemical Pharmacology* 34 (19), 3405–3413.
- Schopfer, L.M., Salhany, J.M., 1995. Characterisation of the stilbene disulfonate binding site on band 3. *Biochemistry* 34 (26), 8320–8329.
- Schousboe, A., Meier, E., Drejer, J., Hertz, L., 1989. In: Shahar, A. et al. (Eds.), *A Dissection and Tissue Culture Manual for the Nervous System*. Liss, New York, pp. 203–206.
- Sieghart, W., 1995. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacological Reviews* 47 (2), 181–234.
- Smith, J.C., Allen, P.V., Turner, M.D., Most, B., Fisher, H.L., Hall, L.L., 1994. The kinetics of intravenously administered methylmercury in man. *Toxicology and Applied Pharmacology* 128 (2), 251–256.
- Suñol, C., Artigas, F., Tusell, J.M., Gelpí, E., 1988. High-performance

- liquid chromatography-fluorescence detection method for endogenous gamma-aminobutyric acid validated by mass spectrometric and gas chromatographic techniques. *Analytical Chemistry* 60, 649–651.
- Suñol, C., Vale, C., Rodríguez-Farré, E., 1998. Polychlorocycloalkane insecticide action on GABA- and glycine-dependent chloride flux. *Neurotoxicology* 19 (4-5), 573–580.
- US Environmental Protection Agency (EPA), 2000. The Mercury Research Strategy. Office of Research and Development, EPA, Washington DC, EPA /600/R-00/073, September 2000.
- Vale, C., Pomés, A., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C., 1997. Allosteric interactions between γ -aminobutyric acid, benzodiazepine and picrotoxinin binding sites in primary cultures of cerebellar granule cells. Differential effects induced by γ - and δ -hexachlorocyclohexane. *European Journal of Pharmacology* 319, 343–353.
- Vale, C., Damgaard, I., Suñol, C., Rodríguez-Farré, E., Schousboe, A., 1998. Cytotoxic action of lindane in cerebellar granule neurons is mediated by interaction with inducible GABA_B receptors. *Journal of Neuroscience Research* 52, 286–294.
- Whatley, V.J., Mihic, S.J., Allan, A.M., McQuilkin, S.J., Harris, R.A., 1994. γ -Aminobutyric acidA receptor function is inhibited by microtubule depolymerization. *Journal of Biological Chemistry* 269 (30), 19546–19552.
- Xue, H., Hang, J., Chu, R., Xiao, Y., Li, H., Lee, P., Zheng, H., 1999. Delineation of a membrane-proximal beta-rich domain in the GABA_A receptor by progressive deletions. *Journal of Molecular Biology* 285 (1), 55–61.
- Yuan, Y., Atchison, W.D., 1997. Action of methylmercury on GABA_A receptor-mediated inhibitory synaptic transmission is primarily responsible for its early stimulatory effects on hippocampal CA1 excitatory synaptic transmission. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282 (1), 64–73.

Mercury compounds cause glutamate release and oligomerization of the neuronal glutamate transporter EAAT3 in cultured cerebellar granule cells.

E. Fonfría, M.T. Vilaró, E. Rodríguez-Farré, C. Suñol.

Article en preparació

MERCURY COMPOUNDS CAUSE GLUTAMATE RELEASE AND OLIGOMERIZATION OF THE NEURONAL GLUTAMATE TRANSPORTER EAAT3 IN CULTURED CEREBELLAR GRANULE CELLS.

Elena Fonfría, Maria Teresa Vilaró, Eduard Rodríguez-Farré and Cristina Suñol*

Department of Neurochemistry, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC – IDIBAPS, c/Rosselló 161 6th floor, E-08036, Barcelona, Spain. Phone: +34 93 363 8318; fax: +34 93 363 8301

*Corresponding author:

Dr C. Suñol. e-mail: csenqi@iibb.csic.es

Abbreviations: DHK: dihydrokainic acid
L-tPDC: L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid
NEM: N-ethylmaleimide
TCEP: tris-(2-carboxyethyl)phosphine
DTT: dithiothreitol
DIDS: 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid
SDS: sodium dodecyl sulfate
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
TTBS: Tween- Tris-buffered saline

Abstract

The glutamatergic cerebellar granule neurons are selective target for mercury compounds in vivo. Five high-affinity glutamate transporters have been identified to date, with the neuronal transporter EAAT3 being expressed in cerebellar granule cells. In the present work both methylmercury and mercuric chloride caused an increase in the release of endogenous glutamate, up to 4 μ M glutamate, in parallel with an inhibition of glutamate uptake (IC_{50} values for the inhibition of [3 H]aspartate uptake were 11.9 μ M and 3.5 μ M for methylmercury and mercuric chloride, respectively) in cultured mice cerebellar granule cells. Furthermore, both mercury compounds produced trimerization of the neuronal EAAT3 transporter as revealed by immunoblotting. The effects of mercury compounds were mimicked by the sulphhydryl alkylating agent N-ethylmaleimide and completely prevented by using the impermeable reducing agent tris-(2-carboxyethyl)phosphine but not by catalase. The release of endogenous glutamate was independent of extracellular calcium but dependent on chloride ions. Our results suggest that glutamate transport inhibition and neuronal EAAT3 transporter oligomerization by mercury compounds is achieved by the oxidation of the extracellular cysteines in cultured cerebellar granule cells. Furthermore, glutamate release to the media seems to be related to the dysfunction caused on the EAAT3 transporter.

Keywords: cultured neurons, mercury compounds, glutamate transport, EAAT3

Running title: mercury and neuronal glutamate homeostasis

Introduction

Mercury is an important metal pollutant in the environment. Mercury exists in several chemical forms, including elemental mercury (Hg^0), inorganic mercury (mercuric chloride, HgCl_2) and organic mercury (methylmercury, CH_3HgCl , among other alkyl- or aryl-mercurials). Methylmercury can easily cross the barriers present at the blood-brain interface and at the placenta and, thus, it is a toxicant with high developmental neurotoxicological significance. In the brain, methylmercury was the causative of the neurological Minamata disease and the clinical manifestation of the Iraqi outbreak (Goyer 1996). Cerebellar neurodegeneration with loss of cerebellar granule cells was observed in patients suffering from Minamata disease, as well as in rats experimentally treated with methylmercury (Korogi et al. 1994; Nagashima et al. 1996; Yamashita et al. 1997). Methylmercury undergoes biotransformation, leading to the accumulation of the more reactive inorganic mercuric species in the brain and other tissues (Smith et al. 1994; Charleston et al. 1996). Thus, methylmercury and mercuric chloride represents the two main forms of mercury compounds for the effects of mercury in the CNS.

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian CNS, and its clearance from the synaptic cleft is the key event in finishing its neurotransmission. The uptake of glutamate is carried out by a high affinity Na^+/K^+ dependent system, with 5 transporters cloned to date (for revision, see Danbolt 2001). Glial (EAAT1 and EAAT2) and neuronal (EAAT3) glutamate transporters are highly influenced by the cellular redox status (Trotti et al. 1996; Trotti et al. 1997b; Trotti et al. 1998; Allen et al. 2001). The glial

transporters EAAT1 and EAAT2 are thought to be involved in glutamate neurotransmission termination by its clearance from the synaptic cleft (Palacin et al. 1998). The glutamate transporter EAAT3 (EAAC1) shows a mainly neuronal localization. However, its somato-dendritic localization in glutamatergic and non-glutamatergic neurons (Rothstein et al. 1994; Coco et al. 1997) and the mild effects in neurodegeneration in EAAT3 knockout models (Rothstein et al. 1996; Peghini et al. 1997) lead to an unknown physiologic role for this transporter. Recently, Rossi et al. (2000) suggested that glutamate release in ischemia comes mainly from neurons rather than from glia, probably by reversed operation of neuronal glutamate transporters. Increased levels of glutamate in the CSF were observed previous to degeneration of the cerebellar granular layer neurons in methylmercury treated rats (Yamashita et al. 1997).

The aim of the present work was to elucidate whether mercury affected the neuronal glutamate transport and the EAAT3 glutamate transporter in primary cultures of cerebellar granule cells, which in vivo are target cells for methylmercury neurotoxicity. Cerebellar granule cells are glutamatergic neurons expressing the neuronal glutamate transporter EAAT3 both in vivo and in vitro (Furuta et al. 1997; Numakawa et al. 2001). In this work we determined the effects of methylmercury and mercuric chloride on neuronal glutamate transport by measuring both the uptake of [³H]aspartate and the release of endogenous glutamate and by analyzing the status of the EAAT3 transporter in primary cultures of cerebellar granule cells.

Experimental procedures

Materials

Seven-day-old NMRI mice were from Iffa Credo (St.-Germain-sur-l'Arbrete, France). Plastic tissue culture dishes and multiwell plates were from CoStar (Corning Science Products, Acton, MA). Foetal calf serum was from Gibco (Glasgow, UK) and Dulbecco's modified Minimum Essential Medium (DMEM) was from Biochrom (Berlin, Germany). D-[2,3-³H]aspartate was from Amersham, Life Sciences, Buckinghamshire, UK (27 Ci/mmol). Liquid scintillation cocktail Optiphase "Hisafe" 2 was from Wallac Oy (Turku, Finland). Tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) was from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Dihydrokainic acid was from Ocean Procedure International (Shelburne, Canada). Mercuric chloride, methylmercury, glutamate, L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (L-tPDC), dithiothreitol (DTT), catalase, n-propylgallate, N-ethylmaleimide (NEM), 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and the protease inhibitor cocktail were from SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals were of the purest grade available from commercial sources.

Neuronal cultures

Primary cultures of cerebellar granule cells were obtained from cerebella of 7-day-old mice following the method described by Schousboe et al. (1989) In brief, cells were dissociated by mild trypsinization at 37 °C, followed by trituration in a DNase solution (0.004% w/v) containing soybean trypsin inhibitor

(0.05% w/v). The cells were suspended in a modified Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (25 mM KCl, 31 mM glucose and 0.2 mM glutamine) supplemented with p-aminobenzoate, insulin, penicillin, and 10% foetal calf serum. The cell suspension (1.6×10^6 cell/ml) was seeded in 24-multiwell plates (for the EAAT3 studies, in 6 well plates or in 10 cm diameter dishes) and incubated for 8 days in a humidified 5% CO₂ / 95% air atmosphere at 36.8 °C. A mixture of 5 μM 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 20 μM uridine was added before 48 h in culture to prevent glial proliferation.

Animals were handled in compliance with protocol number 407/99 of the University of Barcelona approved by the Generalitat de Catalunya, Spain, following EU guidelines.

Glutamate uptake

To measure glutamate uptake, cultured cells (grown in 24-multiwell plates) were washed three times with HEPES-buffered saline solution (HEPES buffer: 136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.4 mM MgCl₂, 1.0 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES and 9 mM glucose adjusted to pH 7.3) and incubated with HEPES buffer, D-[2,3-³H]aspartate (3 nM; 81 nCi/ml) and drug solutions for 10 min at 36°C. Specific uptake was determined by subtracting that obtained in the presence of 1 mM glutamate (<10% of total). A low chloride buffer was prepared by substituting NaCl, KCl and MgCl₂ by sodium glucuronate, KHSO₄ and MgSO₄, respectively. When indicated, cells were preincubated with dithiothreitol (DTT) for 30 min at 25 °C to allow for intracellular DTT incorporation, followed by three rinses with buffer before the uptake assay took place in the absence of DTT. Catalase was present both during the

preincubation (5 min) and the uptake assay. Cells were disgregated in 0.2 N NaOH overnight, and aliquots were used to count radioactivity and protein content. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting (with cocktail Optiphase "Hisafe"2) and proteins were determined by a micro-test using the Bradford method, with bovine serum albumin as a standard. Control D-[2,3-³H]aspartate uptake along this work accounted for 11.04 ± 0.70 pmol/mg (n = 20 experiments, each in triplicate). DPM values per well were in the range of 8200-14500 and counting efficiency was 43-47%.

Quantification of endogenous released glutamate

Cultured cells (grown in 24-multiwell plates) were washed three times with HEPES-buffered saline solution and incubated with HEPES buffer (0.5 ml/well) in the absence or the presence of drugs. After 10 min incubation at 36 °C, the incubation media were collected for the analysis of the endogenous released glutamate. When determining intracellular glutamate content, the cells were rapidly collected in cold 25 mM perchloric acid and homogenized. Experiments were performed in sister cultures of those used in the D-[2,3-³H]aspartate uptake assay. Glutamate was determined for each well by HPLC analysis and fluorimetric determination of the o-phthaldialdehyde derivative (Sunol et al. 1988, with modifications). Low chloride buffer was prepared as above and sodium free buffer was prepared by substituting NaCl by LiCl. Calcium free buffer was prepared by omitting CaCl₂. The ionic composition of the buffer solutions did not alter the osmolarity of the incubation medium as determined using a microosmometer (Advanced Instruments Inc, Sydney, Australia). When indicated, cells were preincubated with dithiothreitol (DTT) for 30 min at 25°C.

Propidium iodide staining

Membrane leakage was determined by measuring the propidium iodide incorporation in damaged cells in a fluorescence plate scanner reader, as described in Fonfria et al., (2001).

Immunoblotting

Cultured cells grown in 6 well plates were treated for 10 min at 36 °C in the same conditions as the glutamate uptake and release assays. Cells were incubated with HEPES-buffered saline solution, 30 µM mercuric chloride, 100 µM methylmercury or 3 mM NEM in the presence or the absence of 500 µM TCEP. When indicated, cells were preincubated with 20 µg/ml catalase for 5 min at 36°C before the incubation in conjunction with mercury compounds. At the end of the incubation, the cells were quickly rinsed with ice-cold phosphate buffer (0.2 M Na₂HPO₄ and 0.2 M NaH₂PO₄, adjusted to pH 7.4) containing protease inhibitors (commercial cocktail: 1.04 mM AEBSF, 0.8 µM aprotinin, 21 µM leupeptin, 36 µM bestatin, 15 µM pepstatin A and 14 µM E-64) and immediately scraped and homogenized with a Polytron for 7 s. Alternatively, cells grown in 10 cm diameter plastic dishes were harvested (in phosphate buffer containing protease inhibitors) and homogenized. Aliquots of the homogenate were incubated with either (1) 2% sodium dodecylsulfate (SDS) for 2 h at 4 °C or (2) HEPES buffer or 100 µM methylmercury for 10 min at 36 °C.

Crude cell homogenates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in 8% polyacrylamide separating gels with a 4% polyacrylamide stacking layer. Final volume loaded was 60 µl, which contained cell

homogenate (around 7 µg protein) and loading buffer (final concentration: 60 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 0.1% bromophenol blue). Pre-stained molecular weight markers (from 43.8 kDa to 218 kDa; Kaleidoscop, BIO-RAD, Germany) were loaded in the same final volume as samples. Electrophoresis was run overnight at a constant voltage of approximately 20 V, with the electrophoresis tank placed in an ice-water bath. Separated proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Germany) at a constant current intensity of 300 mA for 2 h. All subsequent steps were performed in Tris-buffered saline (TTBS; 200 M Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.01% Tween 20) and constant agitation. The membranes were blocked for 1h at room temperature in TTBS containing 5% non-fat dry milk and 5% normal goat serum (NGS). Blots were subsequently incubated for 4h at room temperature with primary antibody to EAAT3 (rabbit anti-rat EAAT3 antiserum, catalog number EAAC11-S, Biotrend Chemicals, Germany) diluted 1:1000 in TTBS + 10% NGS. After washing in TTBS, blots were incubated for 2 h at room temperature with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (donkey-anti rabbit IgG, Jackson Laboratories Inc., Pennsylvania, USA) diluted 1:20000. Finally, membranes were washed, developed with Immun-Star HRP Chemiluminiscent reagents (BIO-RAD, Germany) and exposed to a Kodak Biomax MR film.

Data analysis

Data are means ± SEM. Glutamate uptake results are expressed as percentage of control D-[2,3-³H]aspartate uptake in HEPES buffer. Glutamate release results are expressed as concentration of glutamate (µM) in the incubation

medium or as percentage of released glutamate with respect to total cell culture content. Concentration-response data were fit by non-regression analysis to sigmoid curves by using the Graph Pad Prism program (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, USA). Three independent curves were performed for each compound using 7 - 8 concentrations. Each point of the independent curves was determined in triplicate. Statistical analyses were performed using the Graph Pad Prism program (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, USA). Analysis of variance (one-way and two-way) followed by the Dunnett's or Tuckey's test was used. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Effect of mercury compounds on glutamate transport in cultured cerebellar granule cells

Figure 1A shows the inhibitory effects of mercuric chloride and methylmercury on [³H]aspartate uptake in primary cultures of cerebellar granule cells. Both mercuric chloride and methylmercury inhibited [³H]aspartate uptake in a concentration-dependent manner with log IC₅₀ values of -5.46 ± 0.04 (n = 3) and -4.90 ± 0.05 (n = 3), respectively. These values correspond to IC₅₀ values of 3.5 μM and 12.5 μM for mercuric chloride and methylmercury, respectively. Log IC₅₀ value for the glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (L-tPDC) was -4.34 ± 0.06 (n = 3) corresponding to an IC₅₀ value of 46.2 μM. The alkylating agent N-ethylmaleimide (NEM) also inhibited [³H]aspartate uptake in primary cultures of cerebellar granule cells. However, concentrations > 300 μM were needed and 3.5 mM NEM inhibited [³H]aspartate uptake by around 50%.

Figure 1.-

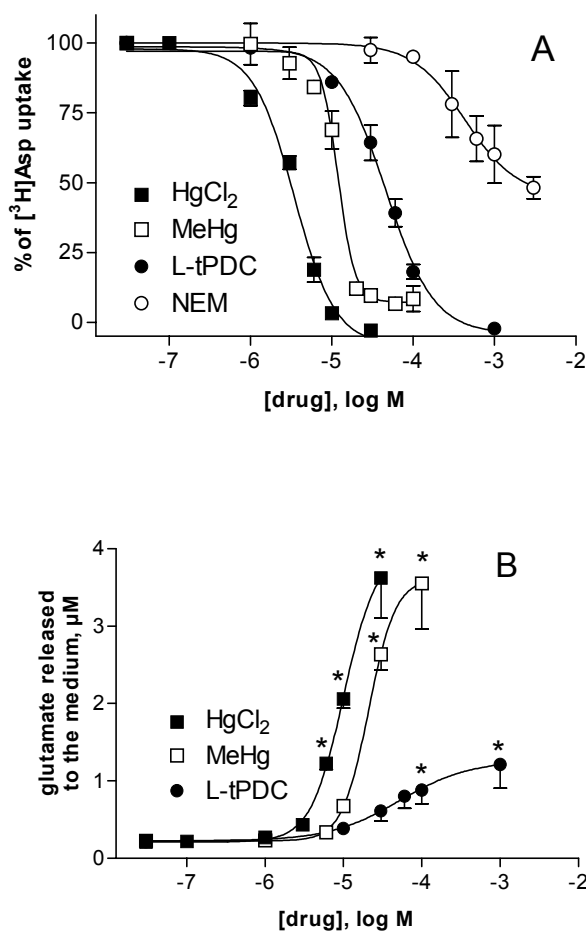


Figure 1.(A) [³H]aspartate uptake in primary cultures of cerebellar granule cells. Inhibition by mercuric chloride (■), methylmercury (□), L-tPDC (●) and NEM (○). Cells were incubated at 36 °C in the presence of the agents and [³H]aspartate for 10 minutes. Data are the mean ± SEM of 3 experiments; for each experiment, the points of the curves were determined in 3 culture wells. Results are expressed as percentage of the [³H]aspartate uptake in the absence of tested agents (B) Endogenous glutamate released to the medium in primary cultures of cerebellar granule cells. Cells were treated with mercuric chloride (■), methylmercury (□) and L-tPDC (●) for 10 minutes at 36 °C. Data are the mean ± SEM of 3 experiments; for each experiment, the points of the curves were determined in 3 culture wells. *p<0.05 vs. corresponding basal value.

Primary cultures of cerebellar granule cells contain a reduced proportion of astrocytes (~10%, Schousboe et al. 1989) that could express astrocytic glutamate transporters. We determined [^3H]aspartate uptake after blocking the glial glutamate transporter EAAT2 with dihydrokainate (DHK). Neuronal glutamate transport accounted for 69% of total [^3H]aspartate uptake was 12.2 ± 0.6 pmol/mg protein and 8.4 ± 1.0 pmol/mg protein in the absence and in the presence of 1 mM DHK, respectively; $n = 3$). Blocking the glial glutamate uptake did not modify the potency of mercury compounds. In the presence of 1 mM DHK, mercuric chloride and methylmercury inhibited [^3H]aspartate uptake with IC_{50} values of 2.6 μM and 13.4 μM , respectively (data not shown).

Exposure of primary cultures of cerebellar granule cells to mercury compounds or L-tPDC for 10 minutes at 36 °C resulted in the release of endogenous glutamate. 10 μM mercuric chloride and 30 μM methylmercury released $47.1 \pm 2.1\%$ and $43.1 \pm 0.8\%$, respectively, of endogenous glutamate, whereas 100 μM L-tPDC released $16.9 \pm 0.6\%$ and control cultures exposed to HEPES saline buffer released $2.8 \pm 0.1\%$ ($n = 3$). This amount of released glutamate by mercury compounds and L-tPDC accounted for concentrations of glutamate in the incubation medium ≥ 1 μM (cultured wells contained 0.5 ml of incubation medium along this study). Figure 1 B shows the concentration-dependent release of endogenous glutamate induced by these compounds. The lowest concentration that induced a significant increase of glutamate in the incubation medium was 6 μM for mercuric chloride, 30 μM for methylmercury and 100 μM for L-tPDC. Exposure of primary cultures of cerebellar granule cells to DHK did not produce a release of endogenous glutamate (0.24 ± 0.03 μM and 0.28 ± 0.03 μM , in the absence or the presence of 1 mM DHK, respectively, $n=3$). NEM

also produced an increase of extracellular glutamate (data not shown). Under the conditions used, cells treated with 30 μM mercuric chloride or 10 μM methylmercury did not significantly incorporated propidium iodide (< 15% with respect to Triton X-100 treated cells).

To assess whether the release of glutamate induced by mercury compounds in cultured cerebellar granule cells was due to exocytosis or to the inhibition/reversal of the glutamate transporter we determined the calcium and sodium dependence of glutamate release. The omission of Ca^{+2} , using a nominally free Ca^{+2} buffer, did not reduce the release of glutamate induced by mercury compounds. Glutamate concentration in the incubation medium was $2.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for cultures exposed to mercuric chloride and methylmercury, respectively, in HEPES buffer, and $2.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $2.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ for cultures exposed to mercuric chloride and methylmercury, respectively, in the absence of Ca^{+2} ions in the incubation medium (n=3). Furthermore, preincubation of the cultures for 30 min with riluzole (a glutamate release inhibitor, Jehle et al. 2000) did not prevent the release of glutamate induced by mercury compounds. Glutamate concentration in the incubation medium was $2.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for mercuric chloride and methylmercury, respectively, in the absence of riluzole and $2.2 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and $2.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ for mercuric chloride and methylmercury, respectively, in the presence of 100 μM riluzole (n=3). Neither the nominal absence of Ca^{+2} nor riluzole modified the extracellular level of glutamate in control cultures. Primary cultures of cerebellar granule cells released endogenous glutamate when Na^{+} was omitted from the incubation medium. However, the increase in the glutamate release induced by mercury compounds was not potentiated in the absence of Na^{+} in the medium.

Released glutamate to the medium in HEPES buffer accounted for 0.3 ± 0.01 μM , 2.1 ± 0.30 μM and 2.2 ± 0.2 μM for control, mercuric chloride, and methylmercury exposed cultures, respectively; and in the Na^+ -free buffer accounted for 1.90 ± 0.1 μM , 3.0 ± 0.3 μM and 2.8 ± 0.1 μM for control, mercuric chloride, and methylmercury, respectively ($n=3$). Two-way analysis of variance revealed statistically significant differences for the test compounds ($F_{2,12} = 33.86$, $p < 0.0001$) and for the ionic composition of the incubation medium ($F_{1,12} = 40.02$, $p < 0.0001$). The Tuckey's multiple comparison test revealed statistical significant differences for cultures exposed to mercury compounds ($p < 0.001$ for methylmercury and $p < 0.001$ for mercuric chloride) or with Na^+ -free medium ($p < 0.01$) with respect to control cultured cells incubated in HEPES saline buffer. No differences were found in cultured cells exposed to mercury compounds and incubated in the presence or the absence of Na^+ ions.

Effects of Cl^- on cultured cerebellar granule cells

Ion imbalance across the plasma membrane, i.e. during ischemic conditions, is a mechanism involved in non-vesicular glutamate release and intracellular Cl^- is increased when ischemia is performed in vitro (Inglefield and Schwartz-Bloom 1998; Rossi et al. 2000). Lowering extracellular Cl^- by using a low Cl^- buffer significantly reduced the effect of mercury compounds on glutamate release (figure 2B), but not on glutamate uptake (figure 2A). A complete reversion of the effect of mercuric chloride on glutamate release was observed, whereas the effect of methylmercury was partially, but significantly, reduced. This effect was mimicked by incubating the cells in HEPES buffer in the presence of 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS, a non-

specific blocker of Cl⁻ flux through anion channels). DIDS reduced the mercuric chloride-evoked release of glutamate from $3.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ to $0.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ($n = 3$) and the methylmercury-evoked release of glutamate from $2.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ to $0.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ($n = 3$). Picrotoxinin, which block the flux of Cl⁻ through the GABA_A receptor channel, did not modify the release of glutamate induced by mercury compounds (data not shown).

Figure 2.-

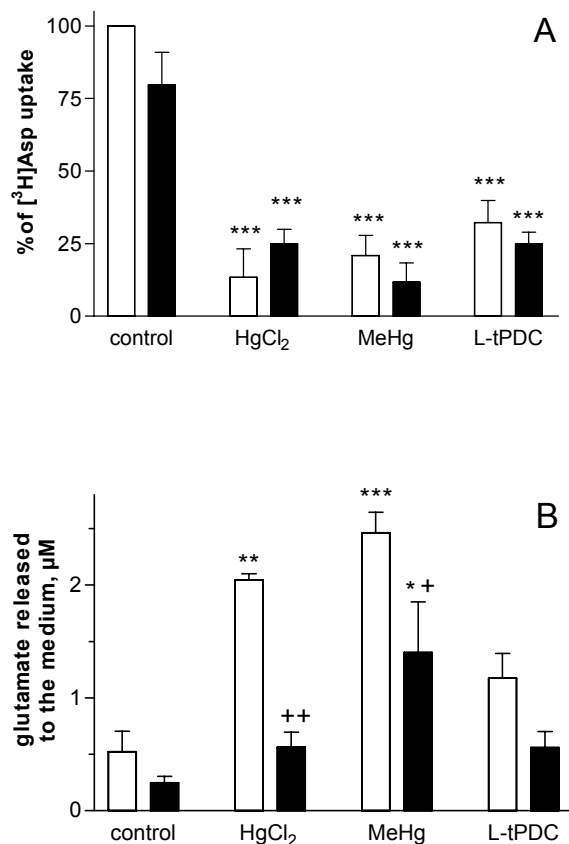


Figure 2. Effects of Cl⁻ ions on glutamate uptake and release in primary cultures of cerebellar granule cells exposed to mercury compounds and L-tPDC. (A) Inhibition of [³H]aspartate uptake by 10 μM mercuric chloride, 30 μM methylmercury and 100 μM L-tPDC in HEPES saline buffer (white bars) or in low Cl⁻ buffer (black bars). Data are mean ± SEM of 3 experiments, each performed in triplicate. Results are expressed as percentage of control [³H]aspartate uptake in HEPES buffer. ***p<0.001 vs. corresponding control values. (B) Endogenous glutamate released to the medium in response to 10 μM mercuric chloride, 30 μM methylmercury and 100 μM L-tPDC in HEPES buffer (white bars) or in low Cl⁻ buffer (black bars). Data are mean ± SEM of 3 experiments, each performed in triplicate. Results are expressed as μM of released glutamate. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs. corresponding control value. +p<0.05 and ++p<0.01 vs. the corresponding value in the presence of Cl⁻ ions for methylmercury and mercuric chloride, respectively.

Effects of oxidative status on glutamate uptake and release on cultured cerebellar granule cells

We tested the hypothesis that the effects of mercury compounds on glutamate transport were due to oxidative reactions, either by oxidation of protein SH groups of the glutamate protein transporter or/and by secondary oxidative reactions through the formation of reactive species. Different compounds were used to assess for a putative oxidative mechanism on the effects of mercury compounds. Tris-(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP, a non permeant reducing agent that does not complex with Hg^{+2} via mercaptide groups, Dieguez-Acuna and Woods 2000), dithiothreitol (DTT, a permeant reducing agent that complex with Hg^{+2} ; for this reason, the cells were preloaded with DTT to increase the reducing capability of the cells and rinsed before incubation with mercury compounds to avoid thiol complex formation), the antioxidant n-propylgallate and catalase. Figure 3A shows that only TCEP completely reverted the inhibitory effects of mercury compounds on [^3H]aspartate uptake. Furthermore, the inhibition produced by L-tPDC was not reverted by TCEP. Neither preloaded intracellular DDT nor propylgallate modified the inhibitory effects of mercury compounds or L-tPDC (fig. 3A). Catalase (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) did not also revert the effect of mercury compounds (data not shown). The reversion by TCEP of the inhibition of [^3H]aspartate uptake produced by mercury compounds was accompanied by a complete reversion of the effects of mercury compounds on glutamate release. Figure 3B shows that mercury compounds did not produce a release of glutamate in primary cultures of cerebellar granule cells in the presence of TCEP.

Figure 3.-

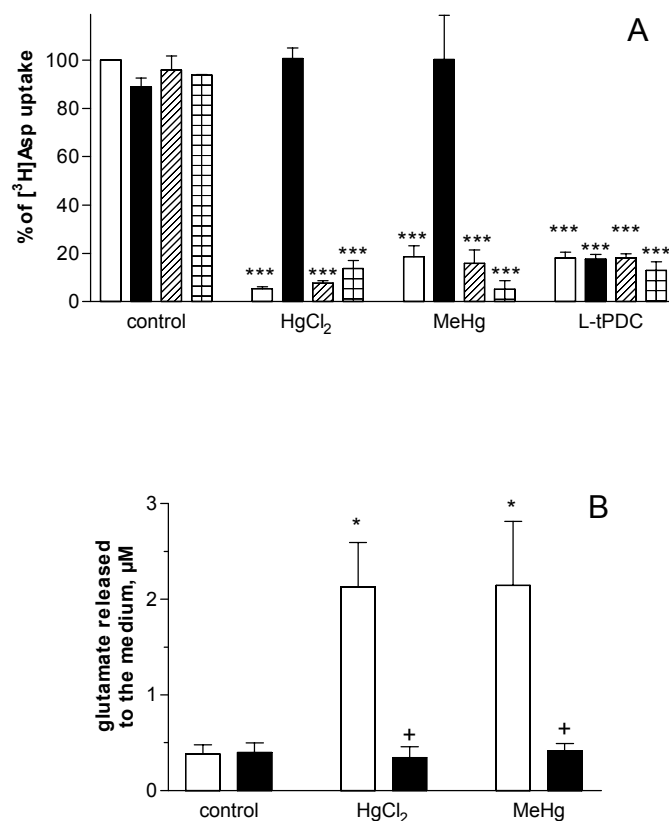


Figure 3.-Effects of antioxidants on glutamate uptake and release in primary cultures of cerebellar granule cells exposed to mercury compounds and L-tPDC. (A) Effect of 500 µM TCEP (black bars), 3 mM DTT (stripped bars) or 50 µM n-propylgallate (squared bars) on the inhibition of [³H]aspartate uptake induced by 10 µM mercuric chloride, 30 µM methylmercury and 100 µM L-tPDC. White bars represent the [³H]aspartate uptake in the absence of antioxidants agents. Data are mean ± SEM of 3-4 experiments, each in triplicate. Results are expressed as percentage of control [³H]aspartate uptake in HEPES saline buffer. ***p<0.001 vs. control values in the absence of antioxidant agents. (B) Effect of 500 µM TCEP (black bars) on the endogenous glutamate released to the medium in response to 10 µM mercuric chloride or 30 µM methylmercury. White bars represent the release of endogenous glutamate in the absence of TCEP. Data are mean ± SEM of 3 experiments, each performed in triplicate. Results are expressed as µM of glutamate released to the medium. *p<0.05 vs. control value in the absence of TCEP. +p<0.05 vs. the corresponding value in the absence of TCEP for methylmercury and mercuric chloride, respectively.

Oligomerization of the neuronal EAAT3 glutamate transporter in primary cultures of cerebellar granule cells

Immunoblots for the neuronal EAAT3 transporter are shown in figure 4. Cultured cerebellar granule cells were incubated with HEPES saline buffer, mercuric chloride or methylmercury for 10 min at 36 °C and immediately rinsed with phosphate buffer, harvested, homogenized and immunoblotted. In control conditions (HEPES saline buffer only) the antibody recognized two major bands (lane A1). The position of the band with the lowest molecular weight relative to the 43.8 kDa (not shown in the figure) and 83 kDa weight markers indicated a calculated apparent molecular weight of approximately 70 kDa. The higher band had a calculated apparent molecular weight of 140 kDa. Treatment with both mercury compounds led to the appearance of additional higher molecular weight bands, the most prominent with an apparent weight of 218 kDa (lanes A2 and A3 for mercuric chloride and methylmercury, respectively). In contrast, incubation of cultured cells with mercury compounds in the presence of the non-permeant reducing agent TCEP did not result in the appearance of the 218 kDa band (lanes A5 and A6). This band was also seen when the cells were treated with the sulphhydryl irreversible oxidant N-ethylmaleimide (NEM, lane A7). Furthermore, treatment with mercuric chloride also resulted in a certain broadening of the band at approximately 140 kDa (lane A2). This broadening was also prevented by TCEP (lane A5). However, the effects of mercury compounds (appearance of the 218 kDa band and broadening of the 140 kDa band) were not prevented by the antioxidant enzyme catalase (figure 4, lanes C3 and C4).

We tested whether spontaneous oxidation during the treatment period could contribute to the appearance of the 140 kDa band. Cells grown in 10 cm petri dishes were quickly harvested and homogenized, mixed with loading buffer containing 2% SDS and incubated for 2 h at 4 °C. In these conditions, only a band was observed at approx 70 kDa (figure 4, lane B1). When the cell homogenate was incubated for 10 min at 36 °C, the approximately 140 kDa band became prominent (lane B2). Inclusion of methylmercury during the incubation for 10 min at 36 °C, resulted in the appearance of the 218 kDa band (lane B3), as it occurred in intact cultured cells.

Figure 4.

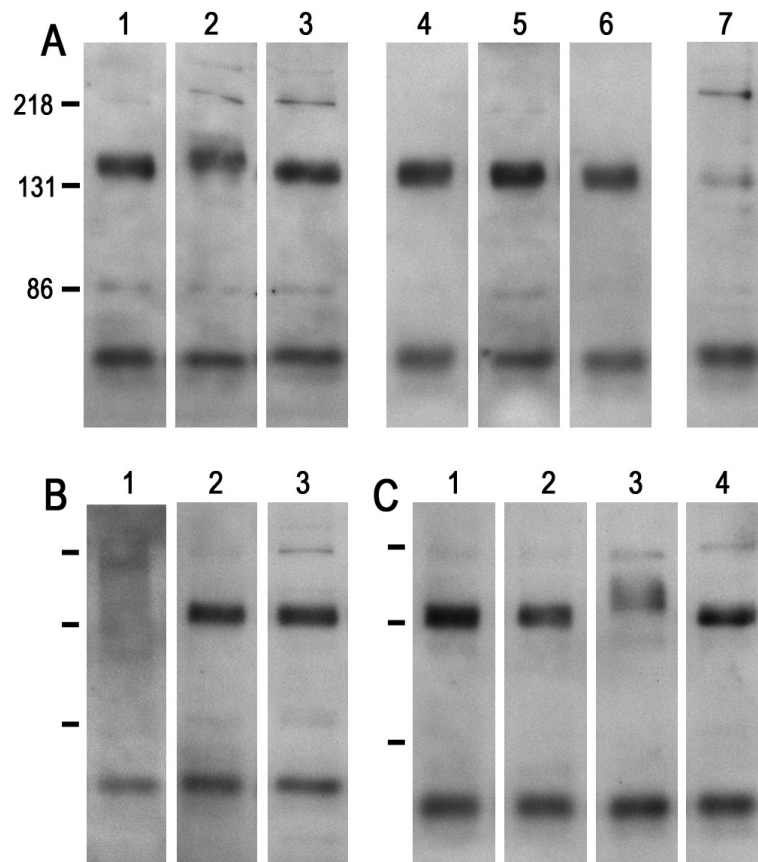


Figure 4.-Immunoblots for the neuronal glutamate transporter EAAT3. (A) Cultured cerebellar granule cells were exposed to HEPES saline buffer (control), 30 μ M mercuric chloride or 100 μ M of methylmercury for 10 min at 36 $^{\circ}$ C (control, lane 1; mercuric chloride, lane 2; methylmercury, lane 3). Lanes 4-6: same treatments in the presence of 500 μ M TCEP (control, lane 4; mercuric chloride, lane 5; methylmercury, lane 6). Lane 7 shows the exposure to the sulphhydryl alkylating agent NEM, 3 mM, at 36 $^{\circ}$ C for 10 min. Each lane is representative of at least three independent immunoblots. (B) Membranes obtained from primary cultures of cerebellar granule cells were harvested in phosphate buffer containing protease inhibitors and homogenized. Lane 1 shows incubation with 2% SDS for 2h at 4 $^{\circ}$ C. Lane 2 and 3 show HEPES saline buffer (control) and 100 μ M methylmercury incubation for 10 min at 36 $^{\circ}$ C, respectively. (C) Effect of catalase on EAAT3 electrophoretic mobility. Cultured cerebellar granule cells were preincubated with HEPES saline buffer (lane 1) or 20 μ g/ml catalase (lanes 2-4) for 5 min at 36 $^{\circ}$ C. Then they were incubated with HEPES saline buffer (lane 1 without catalase; lane 2 without catalase) and 30 μ M mercuric chloride (lane 3) or 100 μ M of methylmercury (lane 4) in the at 36 $^{\circ}$ C for 10 minutes. All the samples were immunoblotted as described in the experimental procedures section.

Discussion

Cultured cerebellar granule cells are composed by ≥ 90 % of glutamatergic neurons (Schousboe et al. 1989) and express the neuronal glutamate transporter EAAT3 in a somato-dendritic localization resembling the in vivo pattern (Furuta et al. 1997). Despite the general idea that the neuronal glutamate transporter EAAT3 is not involved in glutamatergic neurotransmission termination (Palacin et al. 1998), its kinetic range for glutamate translocation is compatible with the constant decay estimated for the glutamate clearance from the synaptic cleft (Bergles et al. 1999; Grewer et al. 2000).

In the present work, the competitive inhibitor of the glutamate uptake L-tPDC markedly inhibited the clearance of endogenous glutamate in primary cultures of cerebellar granule cells. The IC_{50} of L-tPDC for [3H]aspartate uptake found in this work was in agreement with those described in the literature using the same or different models of cultured cells (Bridges et al. 1999; Waagepetersen et al. 2001). The glutamate uptake inhibition obtained in this work was paralleled with a release of endogenous glutamate to the media. This glutamate present in the medium was of neuronal origin, since the inhibition of the glial (EAAT2) glutamate transporter with DHK did not contribute to the raise of endogenous glutamate in the media. The contribution of the glial glutamate transporter EAAT1 can not be evaluated with the current pharmacological tools (Bridges et al. 1999).

A clear action of mercuric chloride and methylmercury on the neuronal EAAT3 glutamate transporter was demonstrated in this work as both mercury

compounds produced changes in the EAAT3 immunoblot pattern and inhibited glutamate uptake in primary cultures of cerebellar granule cells. The IC₅₀ values of mercury compounds against neuronal glutamate uptake in cultured cerebellar granule cells were similar to those obtained against glial glutamate uptake in primary cultures of astrocytes (Aschner et al. 1993; 1994). Furthermore, these values were in agreement with those reported using reconstituted neuronal and glial glutamate transporters in a cell free assay (Trotti et al. 1997b). The sulphhydryl alkylating agent N-ethylmaleimide also inhibited glutamate uptake in cultured cerebellar granule cells as well as in purified rat brain transporters (this work; Trotti et al. 1997b). In this work, the effects of mercury compounds on glutamate uptake were prevented by the extracellular reducing agent TCEP. Redox modulation of the neuronal glutamate transporter has been demonstrated by determining both [³H]glutamate uptake and glutamate-evoked uptake currents in response to biological oxidants and to oxidative agents acting at cysteine residues (Trotti et al. 1997a). Eskandari et al. (2000) reported a pentameric assembly for the human glutamate transporter. This pentameric structure is susceptible to spontaneous and chemical oxidation leading to the formation of homomultimers that are resistant to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis (Haugeto et al. 1996). The neuronal EAAT3 glutamate transporter has an apparent molecular weight of approximately 69 – 70 kDa (Rothstein et al. 1994). A band at 70 kDa was observed in the immunoblots of homogenates from naive cultured cerebellar granule cells, indicating that the neuronal EAAT3 transporter is present as a monomer in primary cultures of cerebellar granule cells. The two bands of 70 and 140 kDa, observed in the immunoblots obtained from intact primary cell cultures incubated with HEPES buffer or from cell homogenates incubated with

phosphate buffer, agree with the molecular weight of a monomer and a dimer, respectively, of the glutamate transporter. The presence of this dimer band suggests that the neuronal EAAT3 glutamate transport dimerize in response to spontaneous oxidation as it has been reported for the glial glutamate transporters EAAT1 and EAAT2 (Haugeto et al. 1996). A specific band corresponding to three-times the molecular weight of the glutamate transporter, namely a glutamate transport trimer, appeared in methylmercury-treated cell homogenates. Furthermore, this trimerization seems to play a physiological role in mercury treated cells since the same band appeared after treatment of intact cells with both mercuric chloride and methylmercury and with the sulphhydryl alkylating agent NEM. The trimerization induced by mercury compounds, as well as the inhibition of glutamate uptake, was prevented by the non-permeant reducing agent TCEP. In contrast, catalase did not have any protective effect in the glutamate uptake or in the glutamate transporter oligomerization in primary cultures of cerebellar granule cells. However, this compound was effective in protecting glutamate uptake from methylmercury treatment in cultured astrocytes (Allen et al. 2001). Neither internal radical scavengers such as preloaded DTT or n-propylgallate prevented the inhibitory effects of mercury compounds on glutamate uptake. The neuronal EAAT3 glutamate transporter has 6 cysteine residues, two in transmembrane segments and one extracellular. All of these cysteine residues may be the target of mercury compounds, as suggested by Trotti et al (1997a), and both extracellular and intramembrane residues can be protected by the impermeable reducing agent TCEP. On the other hand the glial glutamate transporter EAAT2 has 9 cysteine residues in its sequence, three in transmembrane segments and one extracellular. Interestingly 3 of the 5 internal cysteines of the glial EAAT2 glutamate

transporter are located in the C-terminal and are missed in the neuronal EAAT3 glutamate transporter (Palacin et al. 1998). The lack of three internal cysteines in the C-terminal in the neuronal glutamate transporter EAAT3 with respect to the glial transporter EAAT2 could be the basis for the different effect of mercury compounds in neuronal and glial glutamate transporters. The fact that mercury compounds and NEM have a similar behavior on glutamate transport and that agents that prevent intracellular oxidation did not prevent the effects of mercury compounds, suggests a specific neuronal modulation of glutamate transport dependent on cysteine modification rather than reactive species generation. Our results further support a direct attack of mercury to the extracellular and/or intramembranal functional active cysteines of the EAAT3 transporter in cerebellar granule cells. Furthermore, mercuric chloride but not methylmercury also caused an abnormal electrophoretic mobility of the EAAT3 dimer that was prevented by TCEP. This differential effect of mercury compounds on the dimer formation might be caused by a simultaneous oxidation of a pair of cysteinyl residues that could present mercuric chloride (Hg^{+2}) vs. methylmercury (CH_3Hg^+) in plasma membrane carriers (Hisatome et al. 2000).

The inhibition of glutamate uptake by mercury compounds was accompanied by an increase in the glutamate content in the medium. The release of glutamate was concentration-dependent, and of greater extent than that elicited by L-tPDC. This mercury-induced glutamate rise was not due to cell membrane leakage, since cultured cerebellar granule cells exposed to 10 μM mercuric chloride or 30 μM methylmercury for 10 minutes at 36 °C did not significantly incorporate propidium iodide through the plasma membrane. Brookes (1992) did not find extracellular glutamate accumulation in spinal cord cultures exposed

to mercuric chloride despite the observed inhibition of glutamate uptake. The discrepancy with our results can be due to the different origin of the cells used. The cerebellar granule cells used in this work are glutamatergic cells and thus, are able to release endogenous glutamate. The release of glutamate up to micromolar concentrations into the incubation medium may be specific of cerebellar granule neurons. The non-permeant reducing agent TCEP fully prevented the glutamate release induced by mercury compounds, like it also prevented the inhibition of [³H]aspartate uptake and the appearance of the 218 kDa band on immunoblots for the neuronal EAAT3 transporter. These results suggest that mercury compounds produced the release of glutamate from cerebellar granule cells following disruption of the neuronal glutamate transporter and inhibition of the glutamate uptake in primary cultures of cerebellar granule cells.

The glutamate release induced by mercury compounds was neither calcium- nor sodium- dependent. Omission of calcium and treatment of cultures with the glutamate release inhibitor riluzole did not affect mercury-induced glutamate release, whereas the omission of sodium triggered endogenous glutamate release in a non-additive manner with mercury compounds. The calcium independence of the mercury-induced release of glutamate found in this work in cerebellar granule neurons supports previous findings in astrocytes (Aschner et al. 1994) and in mouse cerebellar slices (Reynolds and Racz 1987). This calcium independency together with the fact that riluzole did not prevent the release of glutamate is indicative of a non-vesicular origin of the released glutamate. [³H]noradrenaline and [³H]GABA release induced by mercury compounds was also found to be independent of the extracellular calcium

(Reynolds and Racz 1987;Gasso et al. 2000). The shuttle model of glutamate transporters suggests a sequential binding and translocation of three sodium, one proton, and one negatively charged glutamate ion followed by a counter-transport of one potassium to the exterior. A variant mechanism utilizes the cotransport of two sodium, one glutamate, and the tandem efflux of one potassium and one hydroxyl. However, because of the symmetry of the transporter, it could also occur an outward glutamate translocation depending on the electrochemical gradients (For review, see Gegelashvili and Schousboe 1998). L-tPDC is known to be transported through the glutamate transporter with a slow translocation speed (Rossi et al. 2000). In this way, reversion of the neuronal transporter may account for the glutamate present in the medium after L-tPDC treatment. The fact that the release of glutamate by mercury compounds was Ca^{+2} independent and that it was not synergic with the effect produced by the omission of Na^{+} ions in the extracellular medium suggest that reversion of the glutamate transporter by mercury compounds could be the underlying mechanism for the observed glutamate release.

The chloride concentration in neurons is tightly regulated to maintain a low intracellular concentration. Chloride ions flux through receptor- and voltage-operated ion channels as well as through different transporters. It has recently been reported that the Na^{+} - K^{+} - Cl^{-} cotransporter (NKCC) may mediate glutamate release in response to high extracellular K^{+} in astrocytes (Su et al. 2002) and functional interactions between the NKCC and $GABA_A$ receptor actions on glutamatergic presynaptic nerve terminals have been described (Jang et al. 2001). Mercury compounds interact with SH-groups of cysteine residues both in the $GABA_A$ receptor and in the transmembrane segments of the carrier NKCC

(Jacoby et al. 1999; Fonfria et al. 2001). Glutamate binding to the high-affinity glutamate transporters is coupled to a chloride flux resembling a glutamate-gated chloride channel (Slotboom et al. 2001). Because of the symmetry of the glutamate transport, this channel also open when heteroexchange occur through the neuronal glutamate transporter EAAT3 (Watzke and Grever 2001). We found that the release of glutamate induced by mercury compounds was significantly reduced by lowering Cl^- concentration in the incubation medium as well as by the addition of the chloride channel blocker DIDS. A possible mechanism explaining the chloride-dependence of mercury-induced glutamate release could involve altered glutamate transport. It might be that neuronal glutamate outward transport was unfavoured by reducing Cl^- influx. Glutamate release in ischemic conditions is mainly done by reversion of the glutamate transporters in hippocampal slices (Rossi et al. 2000), and glutamate and aspartate release is blocked by the chloride channel blocker tamoxifen in in vivo ischemic cerebral cortex (Phillis et al. 1998). In the same way, the chloride channel blocker furosemide, is able to reduce methylmercury- induced glutamate efflux in primary cultures of rat astrocytes (Aschner et al. 1993). Furthermore, depolarization of postsynaptic membranes by excessive excitation of the neuron by glutamate increases membrane permeability to ions (Na^+ and Cl^-) and water influx, which could underlie dendrosomal swelling and vacuolation (Olney and Ludoph 2000). In primary cultures of cerebellar granule cells this could lead to additional glutamate release because of the glutamatergic nature of these neurons. Alternatively, the glutamate present in the medium due to the inhibition of the glutamate uptake by mercury compounds may initiate a glutamate-release cascade in primary cultures of

cerebellar granule cells that could be reduced by exposing the cells to a low Cl⁻ medium.

In conclusion, our work demonstrates that extracellular glutamate homeostasis in primary cultures of cerebellar granule cells is mainly due to the neuronal glutamate transporter EAAT3. We propose that chemical oxidation of the extracellular and/or transmembranal cysteine residues of the neuronal EAAT3 glutamate transporter by mercury and NEM would lead to glutamate oligomerization. This oligomerization could be the causative of the glutamate uptake inhibition observed by the three compounds and hence of the changes on extracellular neuronal glutamate homeostasis. Reversion of the glutamate transporter is the most likely mechanism underlying glutamate release induced by mercury compounds. In this way, neuronal EAAT3 glutamate transporter could play a role on the neurotoxicity of mercury compounds and confer to cerebellar granule neurons an special vulnerability to mercury-induced neurodegeneration.

Acknowledgements

This work was supported by Grant numbers FIS 00/1094 and FIS 01/1318 (Ministry of Health, Spain) and Grant numbers 2001SGR00356 and 2001SGR00355 from CIRIT (Generalitat de Catalunya, Spain). E. Fonfría is recipient of a predoctoral fellowship from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

References

- Albrecht J., Talbot M., Kimelberg H. K. and Aschner M. (1993) The role of sulfhydryl groups and calcium in the mercuric chloride- induced inhibition of glutamate uptake in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res.* **607**, 249-254.
- Allen J. W., Mutkus L. A. and Aschner M. (2001) Methylmercury-mediated inhibition of 3H-D-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. *Brain Res.* **902**, 92-100.
- Aschner M., Du Y. L., Gannon M. and Kimelberg H. K. (1993) Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res.* **602**, 181-186.
- Aschner M., Mullaney K. J., Fehm M. N., Wagoner D. E., Jr. and Vitarella D. (1994) Astrocytes as potential modulators of mercuric chloride neurotoxicity. *Cell. Mol. Neurobiol.* **14**, 637-652.
- Aschner M., Yao C. P., Allen J. W. and Tan K. H. (2000) Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem. Int.* **37**, 199-206.
- Bergles D. E., Diamond J. S. and Jahr C. E. (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 293-298.
- Bridges R. J., Kavanaugh M. P. and Chamberlin A. R. (1999) A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. *Curr. Pharm. Des.* **5**, 363-379.
- Brookes N. (1992) In vitro evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology* **76**, 245-256.
- Charleston J. S., Body R. L., Bolender R. P., Mottet N. K., Vahter M. E. and Burbacher T. M. (1996) Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. *Neurotoxicology* **17**, 127-138.

Coco S., Verderio C., Trotti D., Rothstein J. D., Volterra A. and Matteoli M. (1997) Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 1902-1910.

Danbolt N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* **65**, 1-105.

Dieguez-Acuna F. J. and Woods J. S. (2000) Inhibition of NF-kappaB-DNA binding by mercuric ion: utility of the non- thiol reductant, tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), on detection of impaired NF-kappaB-DNA binding by thiol-directed agents . *Toxicol. In Vitro* **14**, 7-16.

Eskandari S., Kreman M., Kavanaugh M. P., Wright E. M. and Zampighi G. A. (2000) Pentameric assembly of a neuronal glutamate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8641-8646.

Fonfria E., Rodriguez-Farre E. and Sunol C. (2001) Mercury interaction with the GABA(A) receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **41**, 819-833.

Furuta A., Rothstein J. D. and Martin L. J. (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* **17**, 8363-8375.

Gasso S., Sunol C., Sanfeliu C., Rodriguez-Farre E. and Cristofol R. M. (2000) Pharmacological characterization of the effects of methylmercury and mercuric chloride on spontaneous noradrenaline release from rat hippocampal slices. *Life Sci.* **67**, 1219-1231.

Gegelashvili G. and Schousboe A. (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* **45**, 233-238.

Goyer R. A. (1996) Toxic effects of metals., in *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons.* (Klaassen C. D., ed.), pp. 691-737. McGraw-Hill.

Greuer C., Watzke N., Wiessner M. and Rauen T. (2000) Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9706-9711.

Haugeto O., Ullensvang K., Levy L. M., Chaudhry F. A., Honore T., Nielsen M., Lehre K. P. and Danbolt N. C. (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J. Biol. Chem.* **271**, 27715-27722.

Hisatome I., Kurata Y., Sasaki N., Morisaki T., Morisaki H., Tanaka Y., Urashima T., Yatsunami T., Tsuboi M., Kitamura F., Miake J., Takeda S., Taniguchi S., Ogino K., Igawa O., Yoshida A., Sato R., Makita N. and Shigemasa C. (2000) Block of sodium channels by divalent mercury: role of specific cysteinyl residues in the P-loop region. *Biophys. J.* **79**, 1336-1345.

Inglefield J. R. and Schwartz-Bloom R. D. (1998) Optical imaging of hippocampal neurons with a chloride-sensitive dye: early effects of in vitro ischemia. *J. Neurochem.* **70**, 2500-2509.

Jacoby S. C., Gagnon E., Caron L., Chang J. and Isenring P. (1999) Inhibition of Na⁺ - K⁺ - 2Cl⁻ cotransport by mercury. *Am. J. Physiol.* **277**, 684-292.

Jang I. S., Jeong H. J. and Akaike N. (2001) Contribution of the Na-K-Cl cotransporter on GABA(A) receptor-mediated presynaptic depolarization in excitatory nerve terminals. *J. Neurosci.* **21**, 5962-5972.

Jehle T., Bauer J., Blauth E., Hummel A., Darstein M., Freiman T. M. and Feuerstein T. J. (2000) Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1227-1234.

Korogi Y., Takahashi M., Shinzato J. and Okahima T. (1994) MR findings in seven patients with organic mercury poisoning (Minamata disease). *Am. J. Neuroradiol.* **15**, 1575-1578.

Nagaraja T. N. and Brookes N. (1996) Mercuric chloride uncouples glutamate uptake from the countertransport of hydroxyl equivalents. *Am. J. Physiol.* **271**, C1487-C1493.

Nagashima K., Fujii Y., Tsukamoto T., Nukuzuma S., Satoh M., Fujita M., Fujioka Y. and Akagi H. (1996) Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **91**, 72-77.

Numakawa T., Matsumoto T., Adachi N., Yokomaku D., Kojima M., Takei N. and Hatanaka H. (2001) Brain-derived neurotrophic factor triggers a rapid glutamate release through increase of intracellular Ca(2+) and Na(+) in cultured cerebellar neurons. *J. Neurosci. Res.* **66**, 96-108.

Olney J. W. and Ludoph A. C. (2000) Glutamic acid., in *Experimental and clinical neurotoxicology* (Spencer P. S. and Schaumburg H. H., eds.), pp. 604-609. Oxford University Press, Oxford.

Palacin M., Estevez R., Bertran J. and Zorzano A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* **78**, 969-1054.

Peghini P., Janzen J. and Stoffel W. (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J.* **16**, 3822-3832.

Phillis J. W., Song D. and O'Regan M. H. (1998) Tamoxifen, a chloride channel blocker, reduces glutamate and aspartate release from the ischemic cerebral cortex. *Brain Res.* **780**, 352-355.

Reynolds J. N. and Racz W. J. (1987) Effects of methylmercury on the spontaneous and potassium-evoked release of endogenous amino acids from mouse cerebellar slices. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**, 791-798.

Rossi D. J., Oshima T. and Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**, 316-321.

Rothstein J. D., Dykes-Hoberg M., Pardo C. A., Bristol L. A., Jin L., Kuncl R. W., Kanai Y., Hediger M. A., Wang Y., Schielke J. P. and Welty D. F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-686.

Rothstein J. D., Martin L., Levey A. I., Dykes-Hoberg M., Jin L., Wu D., Nash N. and Kuncl R. W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**, 713-725.

Schousboe A., Meier E., Drejer J. and Hertz L. (1989) Preparation of primary cultures of mouse (rat) cerebellar granule cells., in *A dissection and Tissue Culture Manual for the Nervous system*. (Shahar A., de Vellis J., Vernadakis A. and Haber B., eds.), pp. 203-206. Alan R Liss, New York.

Slotboom D. J., Konings W. N. and Lolkema J. S. (2001) Glutamate transporters combine transporter- and channel-like features. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 534-539.

Smith J. C., Allen P. V., Turner M. D., Most B., Fisher H. L. and Hall L. L. (1994) The kinetics of intravenously administered methyl mercury in man. *Toxicol Appl Pharmacol* **128**, 251-256.

Su G., Kintner D. B. and Sun D. (2002) Contribution of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter to high-[K(+)](o)- induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C1136-C1146.

Sunol C., Artigas F., Tusell J. M. and Gelpi E. (1988) High-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for endogenous gamma-aminobutyric acid validated by mass spectrometric and gas chromatographic techniques. *Anal. Chem.* **60**, 649-651.

Trotti D., Danbolt N. C. and Volterra A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 328-334.

Trotti D., Nussberger S., Volterra A. and Hediger M. A. (1997a) Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2207-2212.

Trotti D., Rizzini B. L., Rossi D., Haugeto O., Racagni G., Danbolt N. C. and Volterra A. (1997b) Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 1236-1243.

Trotti D., Rossi D., Gjesdal O., Levy L. M., Racagni G., Danbolt N. C. and Volterra A. (1996) Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J. Biol. Chem.* **271**, 5976-5979.

Waagepetersen H. S., Shimamoto K. and Schousboe A. (2001) Comparison of effects of DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) and L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-2,4-PDC) on uptake and release of [3h]D-aspartate in astrocytes and glutamatergic neurons. *Neurochem. Res.* **26**, 661-666.

Watzke N. and Grewer C. (2001) The anion conductance of the glutamate transporter EAAC1 depends on the direction of glutamate transport. *FEBS Lett.* **503**, 121-125.

Yamashita T., Ando Y., Sakashita N., Hirayama K., Tanaka Y., Tashima K., Uchino M., and Ando M. (1997) Role of nitric oxide in the cerebellar degeneration during methylmercury intoxication. *Biochim. Biophys. Acta* **1334**, 303-311.

Estudi de l'efecte citotòxic del metilmercuri i el clorur de mercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel: paper del mitocondri i del glutamat.

E. Fonfría, E. Rodríguez-Farré i C. Suñol. Annex de resultats

ANNEX DE RESULTATS

Estudi de l'efecte citotòxic del metilmercuri i el clorur de mercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel: paper del mitocondri i del glutamat.

E. Fonfría, E. Rodríguez-Farré i C. Suñol.

Antecedents

Els compostos de mercuri són agents neurotòxics que causen apoptosi i necrosi en cèl·lules granulars de cerebel *in vivo* i en cultiu primari (Castoldi et al. 2000, Usuki et al. 2001 i Nagashima et al. 1996). L'efecte dels compostos de mercuri inclou l'increment de calci intracel·lular i la generació d'espècies reactives de l'oxigen (Marty i Atchison 1998 i Gassó et al. 2001). Així mateix, la citotoxicitat observada per compostos de mercuri pot ser exacerbada en condicions prooxidants (Sorg et al. 1998 i Ahlbom et al. 2000) i és parcialment revertida per bloquejants de canals de calci i per antioxidants tant *in vivo* com *in vitro* (Gassó et al. 2001, Sakamoto et al. 1996 i LeBel et al. 1992).

El glutamat és el principal aminoàcid excitador del sistema nerviós central de mamífers, i una sobreestimulació dels seus receptors produeix excitotoxicitat mitjançant l'entrada massiva de calci dins la cèl·lula (Sattler i Tymianski 2000). La severitat de l'insult i la concentració de calci a l'interior cel·lular determinarà la mort excitotòxica per apoptosi o per necrosi (Choi 1995). S'ha hipotetitzat que la captació de calci per part del mitocondri, i no l'increment de calci intracel·lular *per se*, és l'element responsable

en la mort neuronal induïda per glutamat (Stout et al. 1998). En el procés de mort neuronal degut a glutamat es generen espècies reactives de l'oxigen i l'alliberament de factors mitocondrials (Atlante et al. 2001). L'exposició a glutamat i mercuri determina una sensibilitat creuada envers les respectives accions citotòxiques (Matyja i Albrecht 1993 i Miyamoto et al. 2001).

El mitocondri és un orgànul que juga un paper essencial en la senyalització intracel·lular de mort neuronal, i és el lloc principal de generació d'espècies reactives de l'oxigen (Gorman et al. 2000 i Fleury et al. 2002). A nivell mitocondrial, els compostos de mercuri actuen tant a nivell de generació d'espècies reactives d'oxigen, desenergització del mitocondri, obertura del porus mitocondrial i a nivell del complex III (Gassó et al. 2001, Limke i Atchison 2002, Yee i Choi 1996 i Castoldi et al. 2000).

L'objectiu del present estudi ha estat l'estudi de les alteracions en la viabilitat cel·lular per part dels compostos clorur de mercuri i metilmercuri i les implicacions del mitocondri i el glutamat en el dany citotòxic.

Procediments experimentals

Per als materials i mètodes utilitzats en aquest treball, veure l'apartat general de procediments experimentals de la present memòria. El model escollit per a l'estudi han estat cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel i s'han dut a terme estudis de viabilitat cel·lular, viabilitat mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial, mesura de calci intracel·lular i mesura d'entrada de clorur cap a l'interior de la cèl·lula.

Resultats

En la figura 1A es mostra l'efecte dels compostos de mercuri clorur de mercuri i metilmercuri sobre la funcionalitat mitocondrial de cèl·lules granulars de cerebel en cultiu primari. Ambdós compostos de mercuri van produir una inhibició depenent de concentració amb unes IC_{50} de $3.4 \mu\text{M}$ (95% interval de confiança: $1.4-8.4 \mu\text{M}$) i $5.8 \mu\text{M}$ (95% interval de confiança: $2.6-12.8 \mu\text{M}$) per a clorur de mercuri i metilmercuri, respectivament. Aquesta inhibició va ser mimetitzada per l'agent alquilant de grups sulfhidril N-etilmaleïmida ($IC_{50} = 14 \mu\text{M}$, 95% interval de confiança: $6.4-30.1 \mu\text{M}$) però no per l'inhibidor de la captació de glutamat àcid L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxílic (L-tPDC), que no va produir afectació en la funcionalitat mitocondrial. En la Figura 1 B es mostra l'efecte de l'agent reductor impermeable a la membrana plasmàtica tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP), capaç d'evitar la pèrdua de funcionalitat mitocondrial induïda pels compostos de mercuri. Per la seva banda l'enzim antioxidant catalasa no va protegir els efectes dels compostos de mercuri (dades no mostrades).

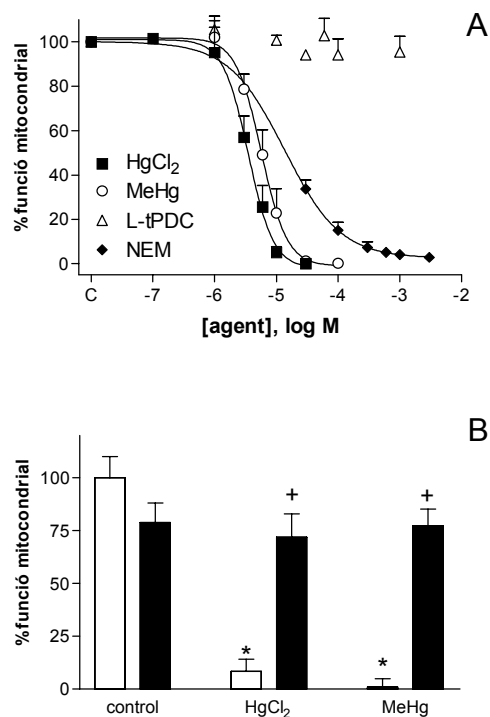


Figura 1.- Inhibició de la funció mitocondrial per part dels compostos de mercuri en cèl·lules granulars de cerebel. (A) Inhibició per clorur de mercuri (■), metilmercuri (○), L-tPDC (Δ) i N-etilmaleïmida (◆). Les cèl·lules van ser incubades a 36 °C en presència dels agents durant 10 minuts. Les dades són mitjanes ± SEM de 3 experiments, cada punt de la corba determinat en 3 pous de cultiu. Els resultats són expressats com a percentatge de la funció mitocondrial (B) Inhibició de la funció mitocondrial induïda per 10 μM de clorur de mercuri i 30 μM de metilmercuri en absència (barres blanques) o presència (barres negres) de 500 μM de l'agent reductor TCEP. Les dades són mitjanes ± SEM de 3 experiments, cadascun en triplicat. Els resultats són expressats en percentatge de funció mitocondrial. *p<0.05 vs el valor control i +p<0.05 vs el corresponent valor en absència de TCEP.

L'exposició de cèl·lules granulars de cerebel en cultiu, glutamatèrgiques, a L- α -TPDC produeix un augment del glutamat extracel·lular de fins 1 μ M, mentre que l'exposició a clorur de mercuri i metilmercuri produeix un increment de glutamat extracel·lular de fins 3 μ M (article 3 de la present memòria). Per tal d'esbrinar si els compostos de mercuri estaven causant disfunció mitocondrial a través d'un mecanisme excitotòxic, dependent de la concentració de glutamat present en el medi extracel·lular, es va co-aplicar els compostos de mercuri amb l'antagonista del receptor NMDA MK-801. La Figura 2 mostra com l'MK-801 no va ser capaç d'evitar la reducció de funcionalitat mitocondrial en resposta a compostos de mercuri.

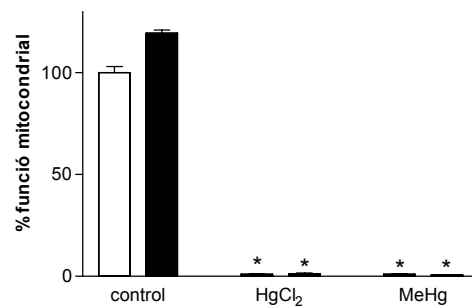


Figura 2.- Inhibició de la funció mitocondrial per part dels compostos de mercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Efecte de 10 μ M clorur de mercuri, 30 μ M metilmercuri en absència (barres blanques) o presència (barres negres) de 100 μ M MK-801. Les dades són mitjanes \pm SEM de 3 determinacions independents. Els resultats són expressats en percentatge de funció mitocondrial. * p <0.05 vs el valor control.

En la figura 3 es mostren els efectes dels ions clorur sobre la inhibició de la funcionalitat mitocondrial per clorur de mercuri i metilmercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Es va observar una reducció de l'efecte produït pel clorur de mercuri, però no per a metilmercuri, quan l'exposició als compostos de mercuri es realitzà en medi d'incubació de baix contingut en clorur (1.2 mM) (Figura 3A). En la figura 3B es mostra com aquest efecte va ser mimetitzat per l'agent bloquejant de canals de clorur àcid 4,4'-diisotiocianat-estilbè-2,2'-disulfònic (DIDS) però no per l'antagonista del receptor GABA_A picrotoxinina. D'altra banda, la omissió de calci i sodi en el medi d'incubació no va tenir cap efecte en la inhibició de la viabilitat mitocondrial induïda pels compostos de mercuri (dades no mostrades). A més a més de l'efecte protector d'un contingut baix d'ions clorur sobre la toxicitat dels compostos de mercuri, clorur de mercuri i metilmercuri van causar *per se* un augment del clorur intracel·lular ($p < 0.05$ per a ambdós compostos després d'una anàlisi de la variança significativa, $F_{2,23}=0.3265$, $p=0.0002$). L'entrada de clorur a l'interior cel·lular va ser de (mitjana \pm SEM): 1.23 ± 0.12 ($n=12$), 2.70 ± 0.38 ($n=6$) i 1.96 ± 0.15 ($n=6$) cpm $^{36}\text{Cl}/\mu\text{g}$ proteïna per a control, 10 μM clorur de mercuri i 30 μM metilmercuri, respectivament. L'increment de clorur intracel·lular induït per clorur de mercuri va ser evitat per l'agent bloquejant de canals de clorur DIDS (l'entrada de clorur a l'interior cel·lular va ser de (mitjana \pm SEM, $n=4$): 0.87 ± 0.12 i 1.70 ± 0.24 per a control i 10 μM clorur de mercuri, respectivament, i 0.87 ± 0.09 i 1.18 ± 0.14 cpm $^{36}\text{Cl}/\mu\text{g}$ proteïna en les mateixes condicions en presència d'1 mM DIDS. Anàlisi de la variança de dues vies mostren una diferència significativa per a clorur de mercuri ($p=0.0021$, $F_{1,12}=15.26$) però no per a DIDS ($p=0.1000$; $F_{1,12}=3.176$)).

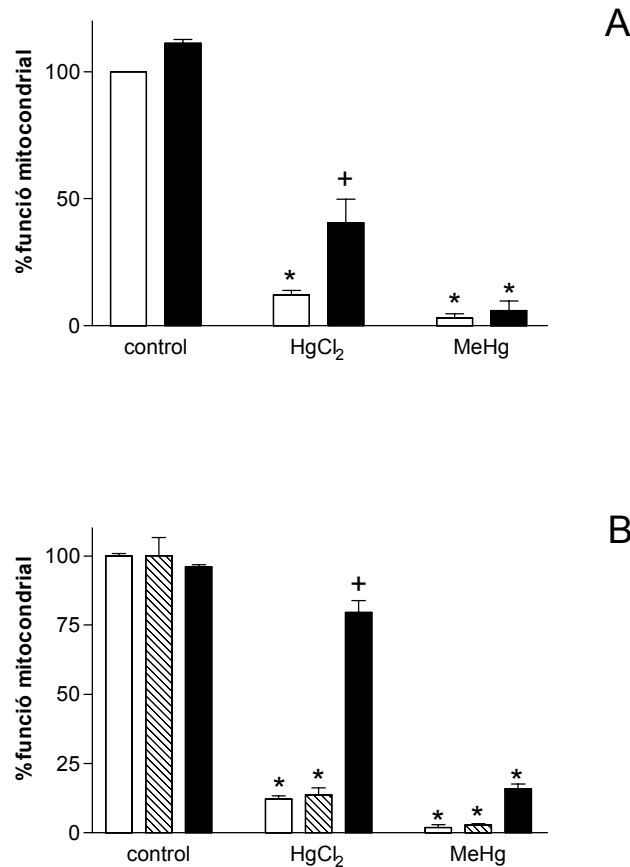


Figura 3.- Efecte dels ions clorur en la inhibició de la funcionalitat mitocondrial induïda per compostos de mercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. (A) Inhibició de la funció mitocondrial induïda per 10 μ M clorur de mercuri i 30 μ M de metilmercuri en tampó HEPES (barres blanques) o en tampó baix en clorur (barres negres). Les dades són mitjanes \pm SEM de 3 experiments, cadascun en triplicat. Els resultats són expressats en percentatge de funció mitocondrial. * p <0.05 vs el valor control i + p <0.05 vs el corresponent valor en presència d'ions clorur al tampó d'assaig. (B) Efecte de 200 μ M picrotoxinina (barres ratllades) i 500 μ M de DIDS (barres negres) en la inhibició de la funció mitocondrial induïda per 10 μ M clorur de mercuri i 30 μ M de metilmercuri. Les dades són mitjanes \pm SEM de 3 determinacions independents. Els resultats són expressats en percentatge de funció mitocondrial. * p <0.05 vs el valor control i + p <0.05 vs el corresponent valor de clorur de mercuri en absència de DIDS.

La figura 4 mostra la pèrdua de potencial de membrana mitocondrial de les cèl·lules granulars de cerebel en cultiu en ser exposades a clorur de mercuri i metilmercuri. La pèrdua del potencial de membrana mitocondrial induïda pels compostos de mercuri no va ser evitada en realitzar l'experiment amb un tampó baix en ions clorur (Figura 4). Per la seva banda, L-tPDC no va produir cap efecte en el potencial de membrana mitocondrial.

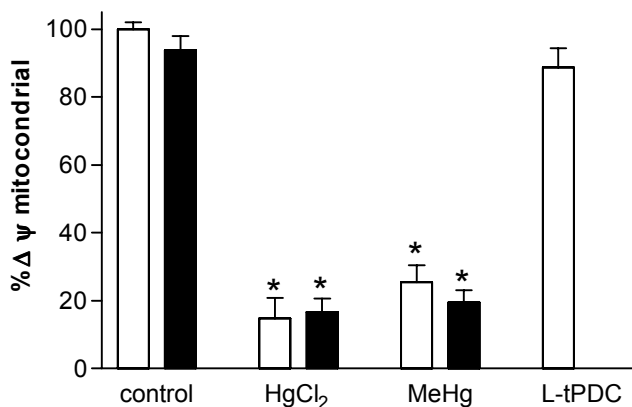


Figura 4.- Inhibició del potencial de membrana mitocondrial per part dels compostos de mercuri i L-tPDC en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Efecte de 10 μ M clorur de mercuri, 30 μ M metilmercuri i 100 μ M de L-tPDC en tampó HEPES (barres blanques) o en tampó baix en clorur (barres negres). Les dades són mitjanes \pm SEM de 3 determinacions independents. Els resultats són expressats en percentatge del potencial de membrana mitocondrial. * $p < 0.05$ vs el valor control.

El clorur de mercuri i el metilmercuri van produir un augment de calci intracel·lular (Figura 5). En realitzar l'assaig en un tampó baix en ions clorur, l'increment de calci intracel·lular induït per clorur de mercuri va ser evitat completament, mentre que la reversió va ser parcial per a l'efecte del metilmercuri. Per la seva banda, l'inhibidor del transport de glutamat L-tPDC no va induir un augment del calci intracel·lular en aquestes condicions experimentals (medi no despolaritzant).

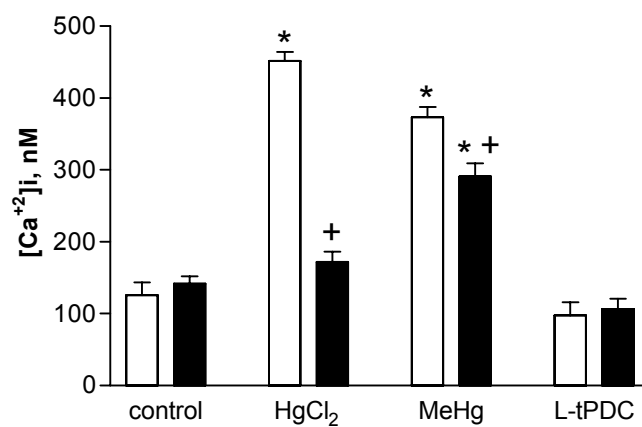


Figura 5.- Efecte dels compostos de mercuri i L-tPDC en el calci intracel·lular en cèl·lules granulars de cerebel en cultiu. Les cèl·lules són exposades a 10 μ M clorur de mercuri, 30 μ M metilmercuri o 100 μ M L-tPDC en tampó HEPES (barres blanques) o en tampó baix en clorur (barres negres). Les dades són mitjanes \pm SEM de 3 determinacions independents. Els resultats són expressats en nM de calci intracel·lular. * $p < 0.05$ vs el valor control i + $p < 0.05$ vs el corresponent valor en presència d'ions clorur al medi d'incubació.

En la figura 6 s'il·lustra el dany cel·lular neuronal en resposta a clorur de mercuri i metilmercuri, mitjançant doble tinció amb calceïna i iodur de propidi. El dany produït per clorur de mercuri (Figura 6 A: control; B: clorur de mercuri) va ser evitat completament per l'agent reductor impermeable a la membrana plasmàtica TCEP (Figura 6 E), però només parcialment en un tampó baix d'ions clorur (Figura 6 D). Per la seva banda, el metilmercuri produeix un menor grau de dany neuronal tal i com mostra una menor permeació a iodur de propidi (Figura 6 C). De forma similar als efectes de clorur de mercuri, el dany del metilmercuri van ser evitats completament per l'agent reductor TCEP (Figura 6 F).

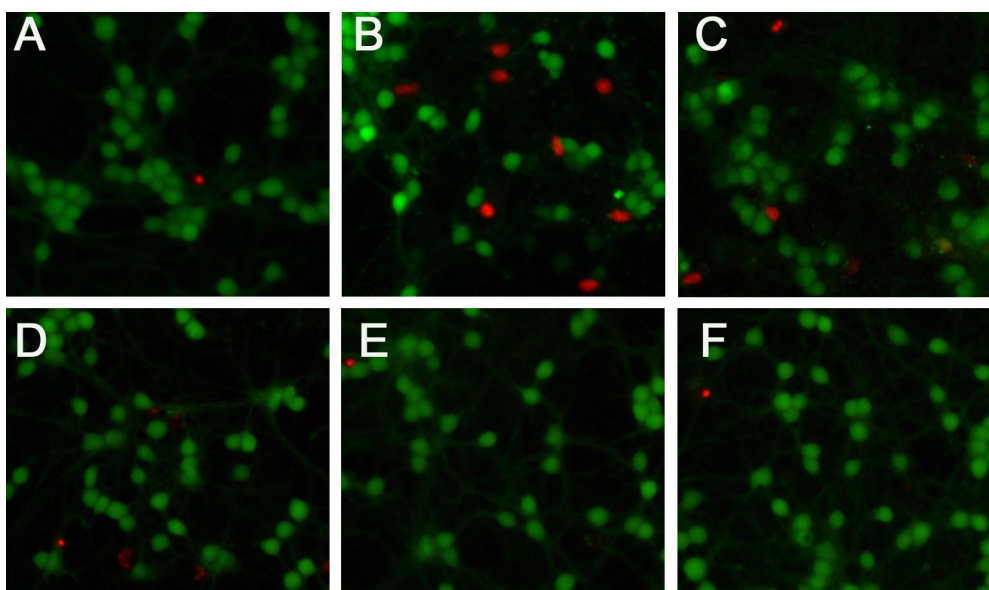


Figura 6.- Efecte del clorur de mercuri i metilmercuri en la viabilitat cel·lular de les cèl·lules granulars de cerebel en cultiu. Les cèl·lules cultivades van ser exposades als diferents agents en presència d'acetoximetilester de calceïna i iodur de propidi durant 10 minuts a 36 °C. La desesterificació de la calceïna a l'interior cel·lular dona senyal fluorescent verda, i la permeació de iodur de propidi en aquelles cèl·lules amb la membrana danyada marca els nuclis de color vermell. (A) control -tampó HEPES-, (B) 10 μ M clorur de mercuri, (C) 30 μ M metilmercuri, (D) 10 μ M de clorur de mercuri en un medi baix en ions clorur (1.2 mM), (E) 10 μ M de clorur de mercuri + 500 μ M TCEP i (F) 30 μ M metilmercuri + 500 μ M TCEP.

Discussió

Les cèl·lules granulars de cerebel són diana per als efectes dels compostos de mercuri *in vivo* en exposicions tan en humans com en animals d'experimentació, resultant en una mort apoptòtica d'aquestes neurones glutamatèrgiques (Korogi et al. 1994, Nagashima et al. 1996 i Usuki et al. 2001). L'alteració del mitocondri en neurones és un element clau en els processos de mort neuronal, i es troben en la literatura evidències d'afectació del mitocondri en cèl·lules granulars de cerebel per part de compostos de mercuri tals com la generació d'espècies reactives de l'oxigen i una desregulació en l'homeòstasi del calci intracel·lular (Sakamoto et al. 1996, Marty i Atchison 1998, Gorman et al. 2000, Gasso et al. 2001, Usuki et al. 2001 i Limke i Atchison 2002). En el present treball, els compostos de mercuri produeixen una disminució de la funcionalitat mitocondrial en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de ratolí. L'efecte similar de l'N-etilmaleïmida i la reversió per TCEP però no per catalasa suggereixen que els compostos de mercuri actuen sobre la funcionalitat mitocondrial mitjançant un mecanisme d'oxidació de proteïnes extracel·lulars i/o intramembrana.

La pèrdua de funcionalitat mitocondrial en resposta als compostos de mercuri és un esdeveniment primerenc a la mort neuronal, tal i com mostren les imatges de microscopia de fluorescència. 10 μ M de clorur de mercuri produeix una inhibició total de la funcionalitat mitocondrial però un dany cel·lular al voltant del 20 % (permeació a iodur de propidi). Per la seva banda 30 μ M de metilmercuri produeix una inhibició total de la funcionalitat mitocondrial i una afectació cel·lular al voltant del 10 %. De forma similar a la pèrdua de funcionalitat mitocondrial, el dany cel·lular ocorre mitjançant un mecanisme d'oxidació de proteïnes extracel·lulars.

L'augment de calci intracel·lular pot ser un esdeveniment anterior a l'afectació mitocondrial, tal i com suggereix la sobreactivació del receptor NMDA causant una entrada massiva de calci a l'interior de la cèl·lula i posterior mort de la neurona per excitotoxicitat (Sattler i Tymianski 2000). En aquest sentit, el ionòfor de calci A23187 va produir una disminució del 56.2 ± 3.2 % de la funció mitocondrial respecte el control (n=3 determinacions). Tant els compostos de mercuri com el L-TPDC produeixen un augment en el glutamat extracel·lular (veure l'article 3 de la present memòria). Aquest augment de glutamat no sembla causar la pèrdua de viabilitat mitocondrial per part dels compostos de mercuri per mecanismes d'excitotoxicitat, ja que L-TPDC no causa afectació mitocondrial ni incrementa el calci intracel·lular. A més a més, l'antagonista de receptors de glutamat tipus NMDA MK-801 no evita la pèrdua de viabilitat mitocondrial. Ambdós compostos de mercuri produeixen un increment de calci intracel·lular, que no va ser bloquejat per MK-801 (dades no mostrades). Recentment s'ha descrit que les cèl·lules granulars de cerebel no són vulnerables a la inhibició de la captació de glutamat i conseqüent increment en la concentració extracel·lular de glutamat, a menys que siguin exposats simultàniament a toxines mitocondrials (Garcia i Massieu 2001). En el cas dels compostos de mercuri sí que es donarien ambdós efectes: una desregulació del transport de glutamat (veure article 3 de la present memòria) i una afectació mitocondrial (aquest treball, article 4 de la present memòria).

A banda de l'increment del calci intracel·lular, ambdós compostos de mercuri indueixen un augment del clorur intracel·lular. Canals de clorur dependents de voltatge així com el receptor GABA_A i els transportadors de glutamat d'alta afinitat són proteïnes diana per als compostos de mercuri (Jacoby et al 1999, Aschner 2000, articles 2 i 3 de la present memòria). Així mateix, l'exposició de cèl·lules granulars de cerebel a clorur de mercuri en una solució tampó baixa en ions clorur produeix una reversió del

dany mitocondrial i neuronal i de l'augment de calci intracel·lular però no del potencial de membrana mitocondrial. Per al metilmercuri hi ha una reversió parcial dels seus efectes per un tampó baix en clorur en l'augment del calci intracel·lular però no de la funcionalitat ni del potencial de membrana mitocondrial. Així doncs, l'increment de clorur intracel·lular sembla ser un esdeveniment anterior a l'increment de calci intracel·lular i jugar un paper específic en les diferents toxicitats exercides per clorur de mercuri i metilmercuri. D'acord amb aquesta acció diferencial, en limfòcits T activats el clorur de mercuri causa un increment de calci intracel·lular amb una davallada del potencial mitocondrial sense alliberament de factors mitocondrials mentre que el metilmercuri a més de l'increment de calci intracel·lular i la disminució del potencial de membrana mitocondrial causa l'alliberament de citocrom c i l'activació de caspases iniciadores (Shenker et al. 2000).

En conclusió, els compostos de mercuri produeixen una pèrdua de la viabilitat mitocondrial primerenca a la pèrdua de viabilitat cel·lular mitjançant la oxidació de proteïnes extracel·lulars o intramembrana. Aquesta citotoxicitat no sembla estar relacionada amb excitotoxicitat deguda a glutamat, però sí amb una desregulació iònica neuronal tant dels ions calci com dels ions clorur. Els ions clorur juguen un paper clau en els efectes del clorur de mercuri, i en menor abast en els efectes del metilmercuri, i poden ser missatgers intracel·lulars de la toxicitat dels compostos de mercuri en les cèl·lules diana.

Llista de referències

- Ahlbom E., Gogvadze V., Chen M., Celsi G. i Ceccatelli S. (2000) Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14726-14730.
- Aschner M., Yao C. P., Allen J. W. i Tan K. H. (2000) Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem Int* **37**, 199-206.
- Atlante A., Calissano P., Bobba A., Giannattasio S., Marra E. i Passarella S. (2001) Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* **497**, 1-5.
- Castoldi A. F., Barni S., Turin I., Gandini C. i Manzo L. (2000) Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J Neurosci Res* **59**, 775-787.
- Choi D. W. (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* **18**, 58-60.
- Fleury C., Mignotte B. i Vayssiere J. L. (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**, 131-141.
- García O. i Massieu L. (2001) Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. *J Neurosci Res* **64**, 418-428.
- Gassó S., Cristòfol R. M., Selema G., Rosa R., Rodríguez-Farré E. i Sanfeliu C. (2001) Antioxidant compounds and Ca(2+) pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. *J Neurosci Res* **66**, 135-145.
- Gorman A. M., Ceccatelli S. i Orrenius S. (2000) Role of mitochondria in neuronal apoptosis. *Dev Neurosci* **22**, 348-358.
- Jacoby S. C., Gagnon E., Caron L., Chang J. i Isenring P. (1999) Inhibition of Na⁺ - K⁺ - 2Cl⁻ cotransport by mercury. *Am J Physiol* **277**, 684-292.
- Korogi Y., Takahashi M., Shinzato J. i Okahima T. (1994) MR findings in seven patients with organic mercury poisoning (Minamata disease). *Am J Neuroradiol* **15**, 1575-1578.
- LeBel C. P., Ali S. F. i Bondy S. C. (1992) Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* **112**, 161-165.

- Limke T. L. i Atchison W. D. (2002) Acute Exposure to Methylmercury Opens the Mitochondrial Permeability Transition Pore in Rat Cerebellar Granule Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **178**, 52-61.
- Marty M. S. i Atchison W. D. (1998) Elevations of intracellular Ca²⁺ as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol* **150**, 98-105.
- Matyja E. i Albrecht J. (1993) Ultrastructural evidence that mercuric chloride lowers the threshold for glutamate neurotoxicity in an organotypic culture of rat cerebellum. *Neurosci Lett* **158**, 155-158.
- Miyamoto K., Nakanishi H., Moriguchi S., Fukuyama N., Eto K., Wakamiya J., Murao K., Arimura K. i Osame M. (2001) Involvement of enhanced sensitivity of N-methyl-D-aspartate receptors in vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity. *Brain Res* **901**, 252-258.
- Nagashima K., Fujii Y., Tsukamoto T., Nukuzuma S., Satoh M., Fujita M., Fujioka Y. i Akagi H. (1996) Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. *Acta Neuropathol (Berl)* **91**, 72-77.
- Sakamoto M., Ikegami N. i Nakano A. (1996) Protective effects of Ca²⁺ channel blockers against methyl mercury toxicity. *Pharmacol Toxicol* **78**, 193-199.
- Sattler R. i Tymianski M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* **78**, 3-13.
- Shenker B. J., Guo T. L. i Shapiro I. M. (2000) Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ Res* **84**, 89-99.
- Simmons-Willis T. A., Koh A. S., Clarkson T. W. i Ballatori N. (2002) Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L- cysteine complex is a substrate for human LAT1 and LAT2 amino acid carriers. *Biochem J Pt*.
- Sorg O., Schilter B., Honegger P. i Monnet-Tschudi F. (1998) Increased vulnerability of neurones and glial cells to low concentrations of methylmercury in a prooxidant situation. *Acta Neuropathol (Berl)* **96**, 621-627.
- Stout A. K., Raphael H. M., Kanterewicz B. I., Klann E. i Reynolds I. J. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* **1**, 366-373.
- Usuki F., Yasutake A., Umehara F., Tokunaga H., Matsumoto M., Eto K., Ishiura S. i Higuchi I. (2001) In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett* **304**, 199-203.

Yee S. i Choi B. H. (1996) Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning.
Neurotoxicology **17**, 17-26.

Translocation of Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress.

E. Fonfría, E. Daré, M. Benelli, C. Suñol, S. Ceccatelli.

European Journal of Neuroscience, en premsa.

Translocation of Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress

E. Fonfría^{a, b¶}, E. Daré^{a¶}, M. Benelli^a, C. Suñol^b, S. Ceccatelli^{a,*}

^aInstitute of Environmental Medicine, Division of Toxicology and Neurotoxicology, Karolinska Institutet, S-171 77 Stockholm, Sweden

^bDepartment of Neurochemistry, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Rosselló 161, E-08036 Barcelona, Spain.

¶These authors contributed equally to the study.

*corresponding author: Dr. Sandra Ceccatelli, Fax number: +46 8 329041
Telephone number: +46 8 7287586, E-mail: Sandra.Ceccatelli@imm.ki.se

Running title: Release of AIF by oxidative stress inducers

Total number of pages: 10

Total number of figures: 2

Number of words in the Summary: 122

Number of words in the Introduction: 479

Number of words in the paper as a whole: 3232

Key words: rat, chromatin rearrangement, methylmercury, hydrogen peroxide.

Abbreviations

AIF, Apoptosis-Inducing Factor; CGC, cerebellar granule cells; PBS, phosphate-buffered saline; ROS, reactive oxygen species.

Abstract

We have previously shown that the neurotoxic compounds colchicine, methylmercury (MeHg) and hydrogen peroxide (H₂O₂) cause apoptosis in primary cultures of cerebellar granule cells (CGC), characterized by nuclear condensation and high-molecular weight DNA fragmentation. However, only colchicine triggers the activation of caspases, implicating that factors other than Caspase-Activated DNase (CAD) are responsible for DNA cleavage in the other two models. Here we report that the two agents that cause oxidative stress, MeHg (1 μM) and H₂O₂ (50 μM), induce translocation of Apoptosis-Inducing Factor (AIF) from the mitochondria to the nucleus in CGC. Our data suggest that, in absence of caspase activity, AIF translocation may be a key event leading to chromatin condensation and DNA degradation in CGC exposed to MeHg and H₂O₂.

Introduction

Apoptosis has been described in the nervous system during development and in several neurodegenerative conditions. Cell death by apoptosis is characterized by a cascade of morphological changes and biochemical events that lead to specific patterns of proteolytic cleavage and DNA fragmentation (see Kaufmann & Hengartner, 2001). In many cell models, mitochondria appear to act as regulators of apoptosis. Damage of the mitochondria can directly activate apoptosis or amplify receptor-mediated apoptotic pathways. Alterations of the permeability of the outer mitochondrial membrane result in the release of mitochondrial intermembrane space proteins. Several of these proteins, including cytochrome *c*, Apoptosis-Inducing Factor (AIF), endonuclease G and Second Mitochondrial Activator of Caspases (SMAC), participate in the degradation phase of apoptosis. Cytochrome *c* redistribution to the cytosol is a key event in the assembly of the complex called the apoptosome, which also involves Apaf-1, caspase-9 and can activate down-stream executor caspases.

Nuclear condensation and DNA degradation into high- and low-molecular weight fragments are major features of apoptosis. Following activation of caspases, Caspase-Activated DNase (CAD) cleaves DNA into oligonucleosomal DNA fragments. Active caspases also degrade nuclear scaffold proteins contributing to the nuclear apoptotic morphology. However, chromatin rearrangement and DNA cleavage can also be induced by other factors such as AIF, Acinus, mitochondrial endonuclease G and

acidic lysosomal DNases, which do not depend on caspase activation (see Gupta, 2001). AIF is a mitochondrial flavoprotein which, in healthy cells, is confined to the mitochondrial intermembrane space and has a NADH oxidase activity independent from its apoptogenic effects. Translocation of AIF from the mitochondria to the nucleus has been shown to promote apoptosis (Susin *et al.*, 1999) and seems to play a crucial role during caspase-independent apoptotic cell death (Bidere & Senik, 2001). When released from the mitochondria, AIF acts as a death effector, migrating to the nucleus and inducing chromatin condensation and large-scale DNA fragmentation in a caspase-independent manner (Daugas *et al.*, 2000). AIF appears to be involved in programmed cell death during development (Joza *et al.*, 2001) and its translocation during apoptosis has been shown in an increasing number of studies with both *in vitro* and *in vivo* models (Braun *et al.*, 2002; Granville *et al.*, 2001).

We have previously shown that neurotoxic agents, such as the microtubule-disrupting agent colchicine, the environmental pollutant methylmercury (MeHg) and the oxidative stress inducer hydrogen peroxide (H₂O₂) cause apoptosis in primary cultures of cerebellar granule cells (CGC) (Bonfoco *et al.*, 1995; Darè *et al.*, 2000; Götz *et al.*, 1999). These compounds induce nuclear condensation and large-scale (high-molecular weight) DNA fragmentation, but only colchicine causes the activation of caspases (Darè *et al.*, 2001; Gorman *et al.*, 1999). The factor(s) involved in caspase-independent chromatin degradation triggered by MeHg and H₂O₂ were not identified. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether AIF translocation from the mitochondria to the nucleus may occur in primary culture of rat CGC undergoing caspase-independent apoptosis.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals used were of analytical grade. Methylmercury (II) hydroxide was purchased from Novakemi AB (Stockholm, Sweden), as a 1 M solution in H₂O. H₂O₂, colchicine, poly-L-lysine, cytosine arabinoside, and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) was supplied by Biochrom KG (Berlin, Germany), and all other chemicals for cell culture were supplied by Life Technologies (Täby, Sweden).

Experimental animals

Animal experimentation was performed in accordance with the Karolinska Institutet regulations for the care and use of laboratory animals, which complies with the Guiding Principle in the Use of Animals in Toxicology adopted by the Society of Toxicology in 1989. Sprague-Dawley rats (B & K, Stockholm, Sweden) were kept in air-conditioned quarters, under a controlled photoperiod (14 h light: 10 h darkness) and with free access to food and tap water. Pregnant rats were checked twice daily, and at birth, litter size was adjusted to eight pups per litter. Day of birth was assigned as day 0 of life.

Preparation and culture of cerebellar granule cells

Primary cultures of CGC were prepared from pups on postnatal day 7 according to a method previously described (Götz *et al.*, 1999; Schousboe *et al.*, 1989). In each preparation, cells obtained from the cerebella of two litters (16 pups) were pooled together. Cells were plated at the density of 500,000 cells/cm² in wells containing poly-L-lysine coated coverslips for microscopic analysis and cultured in DMEM adjusted to 25 mM KCl and supplemented with 10 % inactivated fetal calf serum, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. Glial cell proliferation was prevented by adding cytosine arabinoside (10 µM final concentration) after 42 h. After one week in culture CGC acquired differentiated morphology. At day 7 in culture, cells were exposed to the various chemicals by adding the neurotoxic agents directly to the conditioned medium at the doses described in the text below.

Detection of AIF translocation into the nucleus

Immunocytochemistry was performed as described elsewhere (Darè *et al.*, 2001), using a goat anti-AIF polyclonal primary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA) diluted 1:200, and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-goat secondary antibody Sigma (ST. Louis MO, USA) diluted 1:60. At the end of the procedure, the cells were stained with PI (2.5 µg/ml in PBS) at room temperature for 5 minutes, washed with PBS and mounted onto glass slides with PBS/glycerol (1/9 = v/v) containing 0.1 % (w/v) phenylenediamine. The samples were analyzed in a Bio-Rad 1024 laser scanning confocal equipment (Bio-Rad Laboratories, Hemel-Hempstead, UK) attached to a Nikon Eclipse 800 upright microscope (Nikon Japan). The merging and quantification of merged area vs. PI staining (percentage of merging) was performed with the Bio-Rad Image Pro Plus software, calculating the percentage of

co-localized fluorescence signal versus the red nuclear signal. Data are means \pm SEM of 4-10 independent determinations, each one obtained measuring 10-20 cells present in the same microscopic field. Statistical analysis was carried out with the one-way analysis of variance (ANOVA)-Fisher's protected least significant difference (PLSD) test using Stat View program (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

Results

Primary cultures of rat CGC were allowed to differentiate *in vitro* for 7 days, then incubated with the selected neurotoxic agents. CGC exposed to MeHg or H₂O₂ and control cells were double-stained with an AIF antibody and PI to visualize the nuclear chromatin. Control cells showed AIF localized predominantly outside the nucleus, with a dot-like pattern characteristic of mitochondrial localization (Figure 1). Cells exposed to MeHg or H₂O₂ for 2.5 h did not show any difference in AIF distribution as compared to control cells (Figure 2). After 8-16 h of exposure, however, both MeHg and H₂O₂ had induced translocation of AIF into the nuclei, as shown by the co-localization of the AIF green fluorescent signals with the red fluorescence of PI (Figure 1). The quantification of the AIF translocation to the nucleus after 8-16 h exposure to MeHg or H₂O₂ revealed a significant increase mostly at the 8 h time point (Figure 2).

We also investigated AIF translocation in CGC exposed to colchicine, a stimulus inducing cytochrome *c* release and caspase activation (Gorman *et al.*, 1999). A statistically significant increase in the AIF nuclear pool was detectable already 2.5 h after exposure to the toxicant, a time point when most of the cells had not yet displayed chromatin condensation (Figure 1 and 2). However, the increase was more pronounced after exposure for 8 h (Figure 2).

Figure 1.-

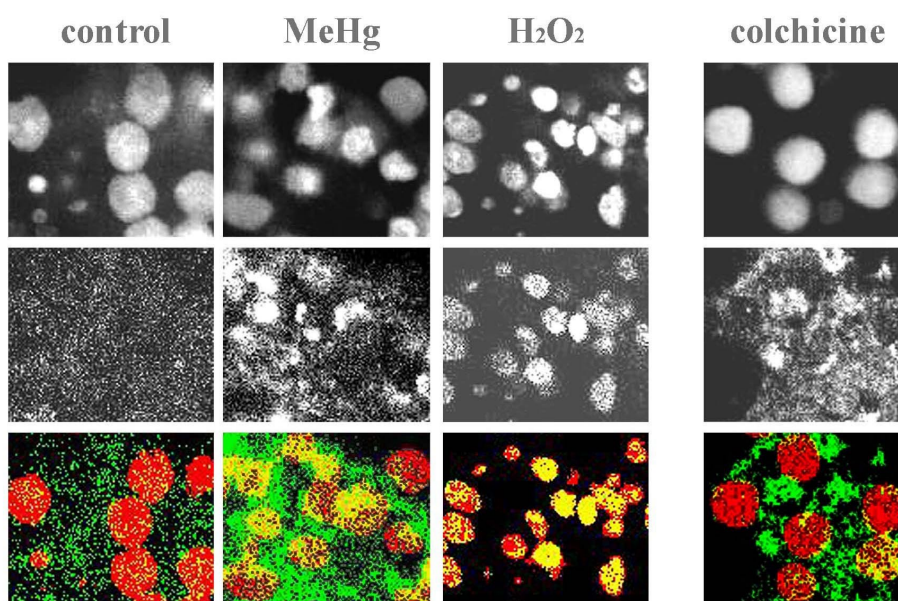


Figure 1. Confocal images of nuclear staining with PI (top panel) and immunostaining with an antibody specific for AIF (middle panel). The bottom panel displays merging (yellow) of PI (red) and AIF (green) fluorescence signals, indicating AIF translocation to the nucleus. In control cells the AIF green fluorescence is localized in the mitochondria, whereas in cells exposed to the neurotoxicants it diffuses into the cytoplasm and translocates to the nucleus. From left, control, MeHg, hydrogen peroxide (16 h); colchicine (2.5 h).

Figure 2.-

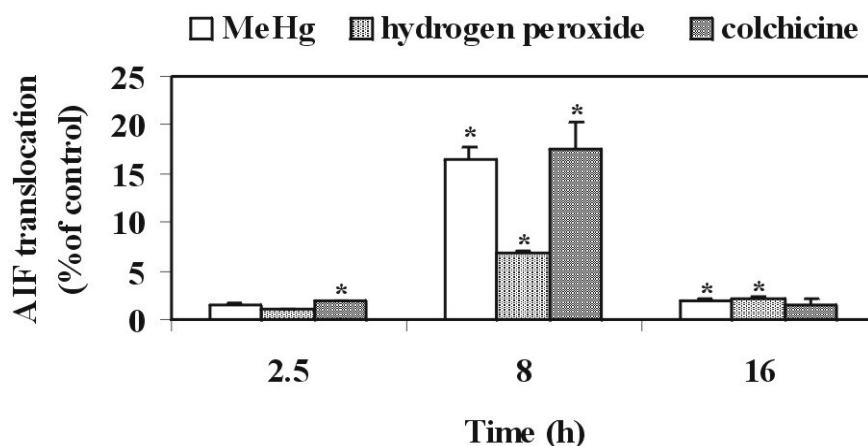


Figure 2. Quantification of the colocalized PI (red)- and AIF (green)-fluorescence signals. CGC were exposed to the neurotoxic agents for either 2.5 h, 8 h or 16 h (B). Data (means \pm SEM of 4-12 independent determinations) are expressed as percentage of untreated control at the same time point. The statistical analysis was carried out with the one-way ANOVA-Fisher's protected least significant difference (PLSD) test (* $p < 0.05$).

Discussion

We have previously shown that MeHg and H₂O₂ induce chromatin condensation and large-scale DNA fragmentation in CGC with no activation of caspase 3-like proteases, and no effect of caspase inhibitors in preventing chromatin condensation (Darè *et al.*, 2001; Darè *et al.*, 2000). Here we report that translocation of AIF into the nucleus occurs in CGC exposed to MeHg and H₂O₂, and we suggest that this may be the cellular event leading to DNA degradation and chromatin condensation, since the release of AIF correlates with the appearance of nuclear condensation at the same time points (Bonfoco *et al.*, 1995; Castoldi *et al.*, 2000; Darè *et al.*, 2001; Gorman *et al.*, 1999). Our findings imply that both MeHg and H₂O₂ induce alterations of permeability in the outer mitochondrial membrane with release of mitochondrial factors, as previously indicated by several studies (Close *et al.*, 1999; InSug *et al.*, 1997; Limke & Atchison, 2002; Takeyama *et al.*, 2002).

Mitochondria are a recognized early target of MeHg toxicity in a variety of experimental models, including neurons (Yee & Choi, 1996). MeHg has a direct inhibitory effect on respiration affecting complex III, it causes generation of reactive oxygen species (ROS) that may damage mitochondrial membranes by lipid peroxidation, and it can impair the function of mitochondria via elevation of intracellular Ca²⁺ levels (Marty & Atchison, 1998; Yee & Choi, 1996). Moreover loss of mitochondrial membrane potential and MPT have been recently described in CGC exposed to MeHg (Castoldi *et al.*, 2000; Limke & Atchison, 2002). The alteration in mitochondrial potential was observed after 4-6 h exposure to MeHg (Castoldi *et al.*, 2000), in agreement with our finding on massive AIF release at 8h.

Exposure to H₂O₂ can also induce intracellular Ca²⁺ increase in neuronal cells (Whittemore *et al.*, 1995). Previous observations (Susin *et al.*, 1999) have suggested that Ca²⁺ is one of the factors that initiate release of AIF. Braun *et al.* (2002) have recently shown that H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons is characterized by AIF release, and agents that inhibit the release of Ca²⁺, or sequester it, block AIF release and protect the cells from death (Braun *et al.*, 2002).

MeHg and H₂O₂ share the ability of inducing oxidative stress and increasing intracellular Ca²⁺. ROS generation might inhibit, at least temporarily, the activity of

caspases (Baker *et al.*, 2000; Hampton & Orrenius, 1997). Moreover, increases in intracellular Ca^{2+} can activate calpains, proteases that can cause inactivation of caspases (Lankiewicz *et al.*, 2000). Since we have found proteolytic fragments of α -fodrin and caspase 3 which are characteristic of cleavage by calpains in CGC exposed to MeHg, calpains appear activated by this toxic agent (Darè *et al.*, 2000). In absence of caspase activation, AIF release and migration to the nucleus emerge as possible key events leading to chromatin condensation and cleavage in CGC after exposure to MeHg and H_2O_2 . Our findings might also explain why antioxidants, that have the ability to prevent membrane damage caused by ROS, exert extensive protection against chromatin condensation, DNA cleavage and loss of viability induced by MeHg and H_2O_2 (Darè *et al.*, 2000; Gasso *et al.*, 2001; Götz *et al.*, 1999). The fact that antioxidants exert a better protection than calcium chelators (Gasso *et al.*, 2001) and prevent calpain breakdown products (Darè *et al.*, 2000) indicates that ROS generation is an upstream event in relation to the increase of intracellular Ca^{2+} in CGC exposed to MeHg.

We have previously reported that colchicine causes cytochrome *c* release into the cytoplasm (Gorman *et al.*, 1999). In the present paper we show that also AIF is released from the mitochondria, suggesting that colchicine exerts its toxic action through two parallel pathways, one dependent on AIF translocation and another involving release of cytochrome *c* and activation of caspases. AIF contribution to the apoptotic features observed in colchicine-exposed CGC is consistent with the fact that the caspase inhibitor z-VAD-fmk only partially prevents chromatin condensation (Gorman *et al.*, 1999). The AIF release observed after colchicine exposure may be responsible for the formation of high molecular weight DNA fragments that become detectable at an earlier time point as compared to the low molecular weight DNA fragments (see Bonfoco *et al.*, 1995). Our observations support the idea of redundant pathways of degradation during apoptosis (Susin *et al.*, 2000) and underline the importance of carefully characterizing the molecular mechanisms of cell death in order to develop therapeutic strategies for neuroprotection.

In conclusion our data point to AIF translocation as a crucial step leading to chromatin condensation and DNA degradation in CGC exposed to MeHg and H_2O_2 .

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the European Commission, the Spanish Ministry of Health and Generalitat de Catalunya, Spain. E. F. is recipient of a predoctoral fellowship from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

References

- Baker, A., Santos, B.D. & Powis, G. (2000) Redox control of caspase-3 activity by thioredoxin and other reduced proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**, 78-81.
- Bidere, N. & Senik, A. (2001) Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview. *Apoptosis*, **6**, 371-5.
- Bonfoco, E., Ceccatelli, S., Manzo, L. & Nicotera, P. (1995) Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res*, **218**, 189-200.
- Braun, J.S., Sublett, J.E., Freyer, D., Mitchell, T.J., Cleveland, J.L., Tuomanen, E.I. & Weber, J.R. (2002) Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest*, **109**, 19-27.
- Castoldi, A.F., Barni, S., Turin, I., Gandini, C. & Manzo, L. (2000) Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J Neurosci Res*, **59**, 775-787.
- Close, A.H., Guo, T.L. & Shenker, B.J. (1999) Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. *Toxicol Sci*, **49**, 68-77.
- Darè, E., Gorman, A.M., Ahlbom, E., Götz, M.E., Momoi, T. & Ceccatelli, S. (2001) Apoptotic morphology does not always require caspase activity in rat cerebellar granule neurons. *Neurotoxicity Res*, **3**, 501-514.
- Darè, E., Götz, M.E., Zhivotovsky, B., Manzo, L. & Ceccatelli, S. (2000) Antioxidants J811 and 17 β -estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J Neurosci Res*, **62**, 557-565.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N. & Kroemer, G. (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, **476**, 118-23.
- Gasso, S., Cristofol, R.M., Selema, G., Rosa, R., Rodriguez-Farre, E. & Sanfeliu, C. (2001) Antioxidant compounds and Ca²⁺ pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. *J Neurosci Res*, **66**, 135-45.
- Gorman, A.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S. & Ceccatelli, S. (1999) Cytochrome c release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci*, **11**, 1067-72.
- Götz, M.E., Ahlbom, E., Zhivotovsky, B., Blum-Degen, D., Oettel, Römer, W., Riederer, P., Orrenius, S. & Ceccatelli, S. (1999) Radical scavenging compound J 811 inhibits hydrogen peroxide-induced death of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, **56**, 420-426.
- Granville, D.J., Cassidy, B.A., Ruehlmann, D.O., Choy, J.C., Brenner, C., Kroemer, G., van Breemen, C., Margaron, P., Hunt, D.W. & McManus, B.M. (2001) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis. *Am J Pathol*, **159**, 305-11.
- Gupta, S. (2001) Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci*, **69**, 2957-64.
- Hampton, M.B. & Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*, **414**, 552-6.
- InSug, O., Datar, S., Koch, C.J., Shapiro, I.M. & Shenker, B.J. (1997) Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial

- membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology*, **124**, 211-224.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y.J., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y.M., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. & Penninger, J.M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, **410**, 549-554.
- Kaufmann, S.H. & Hengartner, M.O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*, **11**, 526-34.
- Lankiewicz, S., Luetjens, C.M., Bui, N.T., Krohn, A.J., Poppe, M., Cole, G.M., Saido, T.C. & Prehn, J.H.M. (2000) Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17064-17071.
- Limke, T.L. & Atchison, W.D. (2002) Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **178**, 52-61.
- Marty, M.S. & Atchison, W.D. (1998) Elevations of intracellular Ca^{2+} as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol*, **150**, 98-105.
- Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C. & Kroemer, G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, **192**, 571-80.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
- Takeyama, N., Miki, S., Hirakawa, A. & Tanaka, T. (2002) Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, **274**, 16-24.
- Whittemore, E.R., Loo, D.T., Watt, J.A. & Cotman, C.W. (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience*, **67**, 921-932.
- Yee, S. & Choi, B.H. (1996) Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology*, **17**, 17-26.

DISCUSSIÓ GENERAL

DISCUSSION GENERAL

Els cultius cel·lulars són àmpliament utilitzats per a l'estudi de mecanismes de neurotoxicitat. El debat social sobre l'ús dels animals d'experimentació és ben actual avui en dia (Matfield 2002). Els models *in vitro* són mètodes alternatius amb el propòsit de reduir, refinar i reemplaçar la utilització d'animals d'experimentació en neurotoxicologia. Els principals models *in vitro* en estudis de neurotoxicitat comprenen cultius organotípics, talls de teixits, reagregats, cultius primaris i línies cel·lulars. Malgrat les limitacions que es deriven en tractar-se de models d'estudi, la neurotoxicitat *in vitro* permet un ambient químic i físic uniforme, exposicions continuades o intermitents als agents tòxics, el control estricte dels paràmetres d'exposició, la utilització de petites quantitats d'agents neurotòxics, evitar els efectes sistemes i una gran varietat d'elecció d'espècies i tipus cel·lulars per a l'estudi (Ehrich i Veronesi 1999). El present treball s'ha realitzat utilitzant cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de rata i ratolí.

Els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel són un bon model per a l'estudi del receptor GABA_A com a diana d'agents neurotòxics (Suñol et al. 1994). Aquest model ha estat àmpliament utilitzat per a l'estudi de la neurotoxicitat de pesticides organoclorats (Pomés et al. 1993, Huang i Casida 1996, Rosa et al. 1996, Sanfeliu et al. 1996, Rosa et al. 1997a, Rosa et al. 1997b, Vale et al. 1997, Vale et al. 1998 i Damgaard et al. 1999). Així mateix, s'ha descrit la presència de subunitats del receptor de glicina i corrents evocats per glicina en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel (Wahl et al. 1994 i Virginio i Cherubini 1997). En la present memòria, l'antagonista del receptor GABA_A picrotoxinina i els pesticides α -endosulfà i dieldrin són un ordre de magnitud més potents inhibint el flux de clorur induït per GABA que l'induït per glicina. Per la seva banda, el lindà és igual de potent inhibint els dos fluxes de clorur. Anàlisis computacionals han permès de proposar un model farmacofòric basant-nos en l'estructura i l'activitat biològica dels pesticides organoclorats. El canal de clorur tant al receptor GABA_A com al receptor de glicina està compost pel segon segment transmembrana dels quatre en què s'estructuren les subunitats d'ambdós receptors oligomèrics. Estudis de mutagènesi dirigida van permetre identificar residus específics en aquests segments transmembrana M2 que conferirien resistència a la picrotoxinina, tant al receptor GABA_A com al receptor de

glicina (French-Constant et al. 1993 i Pribilla et al. 1994). Utilitzant models d'homologia, Zhorov i Bregestovski (2000) van calcular els perfils d'energia necessaris per a la picrotoxinina a través del canal de clorur per a ambdós receptors. Aquestes anàlisis computacionals van permetre identificar una regió hidrofòbica formada per alanines i prolines als segments M2 de les subunitats i una regió de formació de pont d'hidrogen més externa formada per treonines dels segments M2. Estudis de mutagènesi dirigida realitzats amb posterioritat a l'estudi teòric confirmen l'anell de treonines al mateix pla seccional i la importància de les alanines per a la sensibilitat a picrotoxinina (Buhr et al. 2001 i Shan et al. 2001). La reduïda potència de la picrotoxinina obtinguda en els nostres resultats estaria d'acord amb la composició de subunitats dels receptors de glicina nadius, contenint subunitats α i β , aquestes últimes aportant la insensibilitat a picrotoxinina (Kaneda et al. 1995 i Elster et al. 1998). Recentment Ratra et al. (2001) han descrit que una composició diferent de subunitats per a la formació del receptor GABA_A determina la sensibilitat als pesticides organoclorats (Pomés et al. 1993). L'estructura dels compostos i la seva activitat al receptors GABA_A i de glicina en el present treball han permès l'elaboració d'una hipòtesi per a la interacció dels pesticides al canal de clorur composta per una zona hidrofòbica i un lloc per a l'establiment de ponts d'hidrogen. Mentre que α -endosulfà i dieldrin s'ajusten al model, lindà només ho fa a la zona hidrofòbica i picrotoxinina s'ajusta parcialment. Així mateix, el receptor de glicina és deficitari del punt d'establiment dels ponts d'hidrogen amb els compostos a l'estar format per subunitats α i β en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Aquest model explicaria perquè els pesticides organoclorats capaços d'establir pont d'hidrogen són més potents al receptor GABA_A que al receptor de glicina i que lindà sigui igualment potent en ambdós receptors.

El canal de clorur del receptor GABA_A també és diana per als compostos de mercuri (Arakawa et al. 1991, Allan i Baier 1992, Komulainen et al. 1995 i Yuan i Atchison 1997). El complex-receptor GABA_A presenta diferents llocs de reconeixement, interaccionant al·lostèricament entre ells, per a un ampli espectre de substàncies com barbitúrics, benzodiazepines, pesticides organoclorats i agents convulsivants (Olsen i DeLorey 1999). En la present memòria es mostra que tant el clorur de mercuri com el metilmercuri interaccionen de forma directa amb el receptor GABA_A modulant-ne positivament el lloc de reconeixement de les benzodiazepines sense alterar el lloc de reconeixement de GABA. Aquesta modulació positiva del lloc de

reconeixement de les benzodiazepines s'observa tant en cèl·lules intactes cultivades com en preparacions de membranes a partir de cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Aquesta alteració del lloc de reconeixement de les benzodiazepines induïx una alteració en la modulació al·lostèrica que exerceix el lloc de reconeixement del GABA sobre el lloc de reconeixement de les benzodiazepines. Malgrat que els compostos de mercuri induïxen l'alliberament de GABA i glutamat, el GABA alliberat no és suficient per explicar els efectes dels compostos de mercuri al lloc de reconeixement de les benzodiazepines. Així, els compostos de mercuri alteren el perfil de la modulació positiva de la unió de benzodiazepines induït per GABA sense modificar-ne la màxima resposta a GABA. La modulació positiva del lloc de reconeixement de les benzodiazepines pels compostos de mercuri va ser inhibida per antagonistes del receptor GABA_A, per inhibidors de canals de clorur depenent de voltatge i per agents reductors, essent l'efecte del clorur de mercuri evitat també parcialment per agents reductors actuant a nivell intracel·lular. Lleugers canvis morfològics en les cèl·lules del cultiu primari correlacionen amb la protecció exercida pels agents reductors però no pels agents que actuen a nivell de canals de clorur. Malgrat els canvis morfològics a nivell de citoesquelet, les cèl·lules estan vives i són funcionals després de l'exposició als compostos de mercuri. Ni el calci intracel·lular, ni l'estat de fosforilació, agents antioxidants intracel·lulars ni l'ensamblatge dels microtúbols van evitar la modulació exercida pels compostos de mercuri. L'agent alquilant irreversible de grups sulfhidril N-etilmaleïmida va produir també una modulació positiva al lloc de reconeixement de les benzodiazepines sensible a la presència d'antagonistes GABAèrgics, sense mostrar sinergisme amb els compostos de mercuri. Així, una oxidació directa de les cisteïnes de les subunitats que conformen el receptor és el mecanisme proposat per a l'acció dels compostos de mercuri al receptor GABA_A.

En el marc de la neurotransmissió excitadora, els transportadors de glutamat són proteïnes que presenten un canal de clorur integral associat a la seva funció i són diana pels compostos de mercuri (Danbolt 2001). En la present memòria es descriu la homeòstasi del glutamat extracel·lular en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, compostats en més d'un noranta percent de neurones glutamatèrgiques. Malgrat la creença generalitzada que el transportador de glutamat neuronal EAAT3 no contribueix a la finalització de la neurotransmissió per recaptació del glutamat al solc sinàptic (Palacín et al. 1998), el nostre estudi demostra que en aquest ambient, el

transportador neuronal EAAT3 és capaç de finalitzar eficaçment la neurotransmissió mantenint l'homeòstasi extracel·lular del glutamat. En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel els compostos de mercuri alteren aquesta homeòstasi inhibint la captació de glutamat, causant-ne un alliberament massiu i produint una trimerització estable del transportador neuronal. La trimerització del transportador pot ser la causant de la inhibició de la captació de glutamat i la conseqüent desregulació de la homeòstasi del glutamat extracel·lular. La inhibició de la captació de glutamat i l'increment de l'alliberament de glutamat neuronal és similar a la descrita en cultius d'astròcits (Aschner et al. 2000). L'alliberament massiu de glutamat es produeix en absència d'un dany important en la membrana plasmàtica, no és dependent de calci ni afectat per l'inhibidor de l'alliberament de glutamat riluzole i no és sinèrgic amb l'alliberament produït en absència d'ions sodi. Aquests resultats mostren que l'alliberament de glutamat no es produeix per un trencament de la membrana i vessament al medi ni és d'origen vesicular. Els efectes no sinèrgics amb l'omissió de sodi del medi estaria d'acord amb un funcionament del transportador en mode revers o un paper del glutamat com a osmolit, eflux a través de canals osmosensibles, acompanyant la desregulació iònica. A més, l'alliberament de glutamat endogen és evitat per l'agent reductor TCEP, però no per agents antioxidants intracel·lulars, i per una concentració baixa en ions clorur al medi. La reversió per TCEP indica un mecanisme d'acció dependent de la oxidació de les cisteïnes extracel·lulars (resultats en concordança amb la modulació redox descrita per Trotti et al. (1997)) però degut a diferències en la composició de cisteïnes en la seva seqüència, el transportador neuronal EAAT3 no presenta modulació per oxidants intracel·lulars a diferència del transportador glial EAAT2 (Palacín et al. 1998 i Allen et al. 2001b). Condicions de baix contingut en ions clorur al medi, així com el bloquejant de canals de clorur DIDS però no l'antagonista GABA_A picrotoxinina, reverteixen el glutamat alliberat en resposta als compostos de mercuri però no la inhibició de la captació. L'agent alquilant irreversible de grups sulfhidril N-etilmaleïmida va produir els mateixos efectes en la trimerització del transportador, inhibició de la captació i alliberament de glutamat, per bé que en aquests últims la seva acció va ser més feble. El mecanisme proposat per als compostos de mercuri en l'homeòstasi neuronal del glutamat extracel·lular és l'oxidació de les cisteïnes del transportador causant l'aparició de trímers estables i produint una reversió o un eflux selectiu de glutamat al seu través, dependent d'ions clorur, amb la inhibició concomitant de la captació de glutamat. Diferents bloquejants de canals de clorur, com tamoxifè i

furosemda, han estat proposats subjacents a l'alliberament de glutamat en condicions patològiques (Aschner et al. 1993 i Phillis et al. 1998). D'aquesta manera, el transportador de glutamat neuronal EAAT3 podria estar contribuint a la neurotoxicitat dels compostos de mercuri a través d'una cascada d'alliberament de glutamat mediada per l'homeòstasi de clorur intracel·lular.

Les neurones granulars del cerebel són diana per als efectes del mercuri *in vivo* (Korogi et al. 1994 i Nagashima et al. 1996), i en cultiu primari presenten afectació a nivell de mitocondri, que pot ser la base de la pèrdua de viabilitat neuronal (Yee i Choi 1996, Gorman et al. 2000 i Limke i Atchison 2002). En la present memòria, els compostos de mercuri causen una fallada en el funcionament i el potencial de membrana mitocondrial. El mecanisme proposat per a la disfunció mitocondrial és la oxidació directa de cisteïnes, ja que l'agent alquilant de grups sulfhidril N-etilmaleïmida mimetitza els efectes i l'agent reductor impermeable a la membrana plasmàtica TCEP evita els efectes dels compostos de mercuri. Un contingut baix d'ions clorur al medi també evita la pèrdua de funcionalitat mitocondrial, a través de l'entrada per canals sensibles a DIDS però no a través del receptor GABA_A. S'observa també un dany neuronal posterior al dany mitocondrial, dependent de TCEP per als dos compostos de mercuri i d'ions clorur al medi per a clorur de mercuri. Ambdós compostos produeixen un augment en el calci intracel·lular, dependent d'ions clorur. Malgrat que tant els compostos de mercuri com l'inhibidor del transport de glutamat L-tPDC indueixen un augment del glutamat extracel·lular (article 3 de la present memòria), només els compostos de mercuri indueixen l'augment de calci intracel·lular, dependent d'ions clorur, en condicions no despolaritzants. Mercuri i glutamat exerceixen accions sinèrgiques en la citotoxicitat cel·lular (Matyja i Albrecht 1993 i Miyamoto et al. 2001). En cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, el receptor d'NMDA no està implicat en la citotoxicitat del mercuri, ja que l'antagonista del receptor de glutamat NMDA MK-801 no mostra efectes protectors i L-tPDC no en mimetitza les seves accions. Recentment s'ha descrit que per a causar dany neuronal en cèl·lules granulars de cerebel, cal que es produeixi una desregulació de l'homeòstasi del glutamat extracel·lular i una afectació mitocondrial (Garcia i Massieu 2001). En el cas del L-tPDC només es produeix una desregulació de l'homeòstasi del glutamat extracel·lular mentre que els compostos de mercuri produeixen per sí mateixos els dos tipus d'efectes. Clorur de mercuri i metilmercuri són capaços d'induir per si mateixos un augment en el

clorur intracel·lular, que podria ser la base de la dependència a ions clorur que presenten diferents mecanismes alterats per compostos de mercuri, entre ells l'alliberament de glutamat. Puix que els compostos de mercuri alteren el transportador de glutamat neuronal EAAT3, que presenta un canal de clorur integral acoblat a la seva funció tant en condicions de transport com de reversió del transportador (Watzke i Grewer 2001), i produeixen un alliberament massiu de glutamat, es podria pensar en una acció reverberant d'alliberament de glutamat: establint-se una neurotoxicitat per glutamat lligada a transportador més que a receptor.

Els compostos de mercuri produeixen la degeneració selectiva de les cèl·lules granulars de cerebel per mecanismes apoptòtics, però no s'ha descrit activació de caspases en resposta a exposicions a metilmercuri o a peròxid d'hidrogen (Castoldi et al. 1996, Nagashima et al. 1996, Dare et al. 2000 i Usuki et al. 2001). Metilmercuri i peròxid d'hidrogen indueixen dany mitocondrial, causant l'obertura del porus de transició mitocondrial i l'alliberament de factors mitocondrials (annex de resultats de la present memòria, InSug et al. 1997, Close et al. 1999, Castoldi et al. 2000 i Takeyama et al. 2002). Anàlisis de cèl·lules granulars de cerebel exposades a metilmercuri, peròxid d'hidrogen i colchicina mostren l'alliberament i translocació nuclear del factor iniciador de l'apoptosi (AIF) de forma massiva a les 8 hores d'exposició. Per a la colchicina la translocació d'AIF representa una via paral·lela a l'alliberament de citocrom c i l'activació de caspases, mentre que en absència d'activació de caspases l'alliberament i relocalització del factor AIF és un element clau en la condensació i trencament de la cromatina en cultius de cèl·lules granulars de cerebel exposats a metilmercuri i peròxid d'hidrogen (Gorman et al. 1999 i Dare et al. 2000).

Al llarg dels estudis els efectes d'ambdós compostos de mercuri han estat mimetitzats per l'agent alquilant de grups sulfhidril N-etilmaleïmida i revertits per agents reductors i no per agents antioxidants intracel·lulars, indicant un mecanisme d'acció universal d'oxidació de les cisteïnes en les proteïnes cel·lulars. Malgrat aquest mecanisme comú, metilmercuri i clorur de mercuri tenen accions diferencials en els diversos efectes que exerceixen i en els mecanismes subjacents d'aquests efectes, com s'il·lustra a la taula 5.

	Clorur de mercuri (10 µM)	Metilmercuri (30 µM)
Augment de Cl⁻ intracel·lular	sí	sí
Alteració receptor GABA_A (lloc de les benzodiazepines)	sí - dependent d'ions Cl ⁻	sí - parcialment dependent d'ions Cl ⁻
Oligomerització d' EAAT3	sí - mobilitat dímer anormal	sí -mobilitat dímer normal
Inhibició captació glutamat	sí - no dependent d'ions Cl ⁻	sí - no dependent d'ions Cl ⁻
Alliberament de glutamat	sí - dependent d'ions Cl ⁻ origen no sinàptic	sí - parcialment dependent d'ions Cl ⁻ origen no sinàptic
Augment calci intracel·lular	sí - dependent d'ions Cl ⁻ no dependent r. NMDA	sí - parcialment dependent d'ions Cl ⁻ no dependent r. NMDA
Pèrdua funció mitocondrial	sí - dependent d'ions Cl ⁻	sí - no dependent d'ions Cl ⁻
Pèrdua potencial de membrana mitoc.	sí	sí
Alliberament AIF mitoc.	(?)	sí
Dany neuronal -iodur propidi en exposicions de 10-30 min	sí - dependent d'ions Cl ⁻	no

Taula 5.- Resum dels efectes dels compostos de mercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de ratolí presentats en aquesta tesi doctoral.

En neurones, la concentració de clorur està fortament regulada per tal de mantenir una concentració intracel·lular baixa, calculada en 8 mM respecte uns 134 mM extacel·lular (Vale i Sanes 2000). L'homeòstasi del clorur es porta a terme per diferents canals regulats per lligand i per voltatge (Jentsch et al. 2002). Clorur de mercuri i metilmercuri produeixen un augment del clorur intracel·lular i alguns dels seus efectes són mediat per l'entrada d'ions clorur a través de canals dependents de voltatge sensibles al bloquejant DIDS. Alguns d'aquests efectes però presenten diferent dependència a ions clorur segons el compost de mercuri que provoca l'insult tòxic (Taula 5). En la Figura 5 es mostra de forma esquemàtica els diferents efectes del clorur de mercuri i el paper dels ions clorur en la toxicitat exercida en les cèl·lules granulars de cerebel en cultiu.

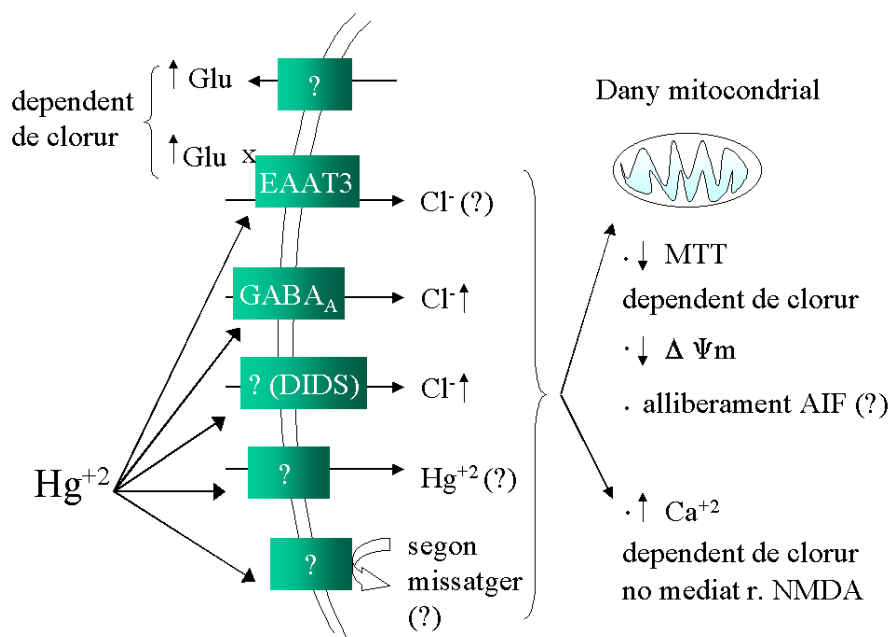


Fig 5.- Representació esquemàtica dels efectes del clorur de mercuri i la seva dependència a ions clorur presentats en aquesta memòria.

El clorur de mercuri actua a nivell de les proteïnes de membrana, com el transportador de glutamat neuronal EAAT3 i el receptor GABA_A entre d'altres, però també presenta efectes intracel·lulars com un augment de clorur o calci i una disfunció mitocondrial, com s'il·lustra a la Figura 5. Els efectes del clorur de mercuri al receptor GABA_A inclou una potenciació al voltant del 300 % al pas d'ions clorur (descriu Narahashi et al. 1994), i una alteració del lloc de reconeixement de les benzodiazepines dependent del bloquejant de canals de clorur DIDS. La trimerització del transportador de glutamat neuronal EAAT3 induïda per clorur de mercuri es produeix en paral·lel a una inhibició de la captació de glutamat, independent d'ions clorur, i un augment del glutamat endogen alliberat al medi, dependent d'ions clorur. L'inhibidor del transport de glutamat L-tPDC causa un alliberament de fins 1 μM de glutamat mentre que el clorur de mercuri produeix un alliberament de fins a 4 μM, indicant un mecanisme addicional d'alliberament de glutamat exercit per clorur de mercuri, a banda de la inhibició del transportador. Un dels mecanismes possibles per aquesta fracció de glutamat alliberada, a través del propi transportador (Dierks et al. 1990), explicaria tant l'alliberament com la seva dependència a ions clorur, ja que en ser un transport simètric la sortida de glutamat també pot activar l'entrada d'ions clorur a través del canal de

glutamat associat al transportador (Watzke i Grewer 2001). L'alliberament de glutamat induït per clorur de mercuri pot ser evitat impedit l'entrada a través de canals de clorur dependents de DIDS. Així mateix, el clorur de mercuri *per se* indueix una entrada de clorur cap a l'interior de la cèl·lula dependent de DIDS. El clorur de mercuri indueix també un augment de calci intracel·lular no mediada per receptors NMDA que pot ser bloquejada per DIDS. El calci mobilitzat per clorur de mercuri pot provenir tant de l'exterior cel·lular com dels reservoris intracel·lulars (Marty i Atchison 1997 i Gassó et al. 2001). Així mateix, la pèrdua de viabilitat mitocondrial associada a clorur de mercuri també és dependent de DIDS. Ambdós efectes intracel·lulars poden ser deguts a una acció dels ions clorur mitjançant els efectes del clorur de mercuri, a un efecte directe del clorur de mercuri (per al qual s'ha descrit transport retroaxonal i una distribució preferentment mitocondrial en ser captat per determinats tipus cel·lulars (Arvidson 1992 i Bucio et al. 1999)) o bé a través d'un altre missatger intracel·lular. Diferències trobades amb el metilmercuri comprenen una inhibició del flux de clorur a través del receptor GABA_A (Narahashi et al. 1994) - però el metilmercuri altera el lloc de les benzodiazepines de manera similar al clorur de mercuri -, una disminució de la viabilitat mitocondrial no dependent d'ions clorur, l'alliberament del factor mitocondrial AIF i un augment de calci intracel·lular parcialment dependent d'ions clorur. Diferències en els mecanismes d'acció de clorur de mercuri i metilmercuri poden estar basades en l'activació de diferents vies de senyalització intracel·lular (Shenker et al. 2000) i amb el diferent grau d'afectació dels residus de cisteïna proteics per part de Hg⁺² i CH₃Hg⁺ (Hisatome et al. 2000 i Allen et al. 2001a).

Els efectes dels compostos de mercuri al llarg de la present memòria han estat de l'ordre de pocs micromolar, tant en exposicions agudes de minuts com en hores. El clorur de mercuri i el metilmercuri han tingut un comportament similar, essent el clorur de mercuri més potent en tots els assajos realitzats. La ingesta de 2 mg de metilmercuri /kg durant 8 dies resulta en concentracions a cerebel de 9.7 ± 1.1 µg/g metilmercuri i 0.20 ± 0.03 µg/g de clorur de mercuri en rates (Usuki et al. 2001). Assumint 1g teixit de rata = 1 ml, les concentracions en cerebel equivalen a concentracions de 48.5 i 1 µM respectivament. En humans, el contingut de mercuri poblacional en cervell és de 0.05-0.174 µg/g, trobant-se fins a nivells de 1.97 µg/g en individus greument intoxicats (Davis et al. 1994, Pedersen et al. 1999, García et al. 2001 i al Saleh i Shinwari 2001). Les concentracions utilitzades *in vitro* i a les quals s'observen els canvis bioquímics i

farmacològics en la funcionalitat de la neurotransmissió i neuronopatia no difereixen d'aquelles concentracions de mercuri trobades en intoxicacions humanes i experimentals, malgrat que efectes patològics en resposta a compostos de mercuri no sempre correlacionen amb la concentració de mercuri en teixit (Usuki et al. 2001).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1.- Els pesticides organoclorats lindà (γ -hexaclorociclohexà), dieldrin i α -endosulfà bloquegen tant el receptor GABA_A com el receptor de glicina. α -Endosulfà i dieldrin tenen una acció més específica al receptor GABA_A, mentre que lindà actua de forma similar en ambdós receptors en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel de ratolí. Aquesta acció diferencial d' α -endosulfà i dieldrin al receptor GABA_A estaria basada en una interacció per pont d'hidrogen dels compostos amb el receptor, a banda d'una interacció hidrofòbica. Ni el receptor de glicina ni el compost lindà tindrien la capacitat d'establir el pont d'hidrogen i d'aquí la no selectivitat del receptor de glicina envers els pesticides organoclorats i de la no especificitat del lindà pels receptors GABA_A i glicina.

2.-Els compostos de mercuri clorur de mercuri i metilmercuri alteren el receptor GABA_A a través d'una modulació positiva del lloc de reconeixement de les benzodiazepines sense afectar directament el lloc de reconeixement de GABA. L'acció dels compostos de mercuri és mimetitzada per l'agent alquilant de grups sulfhidril N-etilmaleïmida. Tant els efectes dels compostos de mercuri com els de N-etilmaleïmida són evitats per antagonistes del receptor GABA_A. Els efectes dels compostos de mercuri no van ser evitats ni per agents antioxidants, modificadors de l'estat de fosforilació, l'estructura dels microtúbols o bloquejants de canals de calci. El mecanisme d'acció suggerit per als compostos de mercuri és una oxidació directa de les cisteïnes de les subunitats que conformen el receptor GABA_A.

3.-L'homeòstasi de glutamat extracel·lular és regulada pel transportador neuronal EAAT3 en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Els cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel són un bon model per a estudiar la neurotoxicitat en el cicle de la transmissió glutamatèrgica neuronal.

4.-Els compostos de mercuri afecten l'alliberament i la captació de glutamat així com un canvi en l'estat del transportador de glutamat neuronal EAAT3 en les cèl·lules glutamatèrgiques diana. Clorur de mercuri i metilmercuri causen un alliberament de glutamat massiu, una inhibició en la captació de glutamat i una oligomerització estable del transportador neuronal EAAT3 en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel.

Els efectes dels compostos de mercuri són mimetitzats per l'agent alquilant de grups sulfhidril N-etilmaleïmida i revertits per agents reductors però no per sistemes antioxidants cel·lulars. L'acció de clorur de mercuri i metilmercuri en el cicle de la neurotransmissió glutamatèrgica neuronal s'acompanya d'una modificació de les cisteïnes extracel·lulars del transportador de glutamat neuronal EAAT3. Aquesta modificació de les cisteïnes determinaria el canvi de funció del transportador de captar glutamat a permetre'n l'eflux al seu través.

5.-Els compostos de mercuri causen citotoxicitat a través de la pertorbació de la funcionalitat i viabilitat mitocondrial. Aquesta citotoxicitat no és evitada per l'antagonista del receptor glutamatèrgic NMDA MK-801 però sí per agents reductors. Així, els mecanismes subjacents a la toxicitat cel·lular per clorur de mercuri i metilmercuri inclouen mecanismes oxidatius però no excitotoxicitat en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel, enriquits en neurones glutamatèrgiques, diana *in vivo* per als compostos de mercuri.

6.-El clorur de mercuri és més potent en la seva acció que el derivat orgànic metilmercuri en tots els assajos realitzats, essent la seva EC_{50} de l'ordre de pocs micromolar. Mecanismes comuns i generals d'oxidació de les cisteïnes de les proteïnes estarien mediant els efectes d'ambdós compostos de mercuri. La potència diferencial dels compostos de mercuri metilmercuri i clorur de mercuri estaria determinada per la capacitat del mercuri en un o dos llocs d'acomplexació (CH_3Hg^+ i Hg^{+2} , respectivament).

7.-L'omissió de clorur o la presència de bloquejants de canals de clorur dependents de voltatge en el medi d'assaig determina els efectes dels compostos de mercuri en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. La modulació del lloc de les benzodiazepines al receptor $GABA_A$, l'alliberament de glutamat al medi extracel·lular i l'increment de calci intracel·lular per part de clorur de mercuri i metilmercuri, a més de la citotoxicitat deguda a clorur de mercuri, són reduïts en impedir l'entrada de clorur a l'interior de les cèl·lules. Així mateix, ambdós compostos de mercuri causen un increment de clorur intracel·lular.

8.-El metilmercuri, el peròxid d'hidrogen i la colchicina indueixen la translocació del factor iniciador de l'apoptosi (AIF) del mitocondri cap al nucli en cultius primaris de cèl·lules granulars de cerebel. Aquesta via de senyalització intracel·lular és causant per si mateixa de la senyalització per mort apoptòtica induïda per metilmercuri en cèl·lules granulars de cerebel en cultiu.

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

Abalis I. M., Eldefrawi M. E. i Eldefrawi A. T. (1985) High affinity stereospecific binding of cyclodiene insecticides and g-hexachlorocyclohexane to g-amonibutyric acid receptors of rat brain. *Pestic Biochem Physiol* **24**, 95-102.

Adimado A. A. i Baah D. A. (2002) Mercury in human blood, urine, hair, nail, and fish from the Ankobra and Tano River Basins in southwestern Ghana. *Bull Environ Contam Toxicol* **68**, 339-346.

Ahlbom E., Gogvadze V., Chen M., Celsi G. i Ceccatelli S. (2000) Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14726-14730.

al Saleh I. i Shinwari N. (2001) Levels of cadmium, lead, and mercury in human brain tumors. *Biol Trace Elem Res* **79**, 197-203.

Albrecht J. i Hilgier W. (1994) Similarities of the in vivo and in vitro effects of mercuric chloride on [3H]ouabain binding and potassium activation of Na⁺/K⁺-ATPase in isolated rat cerebral microvessels. *Toxicol Lett* **70**, 331-336.

Albrecht J., Talbot M., Kimelberg H. K. i Aschner M. (1993) The role of sulfhydryl groups and calcium in the mercuric chloride- induced inhibition of glutamate uptake in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* **607**, 249-254.

Allan A. M. i Baier L. D. (1992) Effect of thiol group modification on ion flux and ligand binding properties of the GABAA-benzodiazepine receptor chloride channel complex. *Synapse* **10**, 310-316.

Allen J. W., Mutkus L. A. i Aschner M. (2001a) Mercuric chloride, but not methylmercury, inhibits glutamine synthetase activity in primary cultures of cortical astrocytes. *Brain Res* **891**, 148-157.

Allen J. W., Mutkus L. A. i Aschner M. (2001b) Methylmercury-mediated inhibition of 3H-D-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. *Brain Res* **902**, 92-100.

Anthony D. C., Montine T. J. i Graham D. G. (1996) Toxic responses of the nervous system., in *Casarett & Doull's toxicology. The basic science of poisons.* (Klaassen C. D., ed.), pp. 463-486. McGraw-Hill, New York.

Anthony D. C., Montine T. J., Valentine W. M. i Graham D. G. (2001) Toxic responses of the nervous system., in *Casarett's and Doull's Toxicology. The basic Science of Poisons*. (Klaassen C. D., ed.), pp. 535-563. McGraw-Hill, New York.

Arakawa O., Nakahiro M. i Narahashi T. (1991) Mercury modulation of GABA-activated chloride channels and non-specific cation channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **551**, 58-63.

Arvidson B. (1992) Inorganic mercury is transported from muscular nerve terminals to spinal and brainstem motoneurons. *Muscle Nerve* **15**, 1089-1094.

Aschner M., Chen R. i Kimelberg H. K. (1991) Effects of mercury and lead on rubidium uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *Brain Res Bull* **26**, 639-642.

Aschner M., Du Y. L., Gannon M. i Kimelberg H. K. (1993) Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* **602**, 181-186.

Aschner M., Yao C. P., Allen J. W. i Tan K. H. (2000) Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem Int* **37**, 199-206.

Ask K., Akesson A., Berglund M. i Vahter M. (2002) Inorganic mercury and methylmercury in placentas of Swedish women. *Environ Health Perspect* **110**, 523-526.

Atlante A., Calissano P., Bobba A., Giannattasio S., Marra E. i Passarella S. (2001) Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* **497**, 1-5.

Babi D., Vasjari M., Celo V. i Korovesi M. (2000) Some results on Hg content in hair in different populations in Albania. *Sci Total Environ* **259**, 55-60.

Barbosa A. C., Jardim W., Dorea J. G., Fosberg B. i Souza J. (2001) Hair mercury speciation as a function of gender, age, and body mass index in inhabitants of the Negro River basin, Amazon, Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol* **40**, 439-444.

Batista J., Schuhmacher M., Domingo J. L. i Corbella J. (1996) Mercury in hair for a child population from Tarragona Province, Spain. *Sci Total Environ* **193**, 143-148.

Bernard S., Enayati A., Redwood L., Roger H. i Binstock T. (2001) Autism: a novel form of mercury poisoning . *Med Hypotheses* **56**, 462-471.

Betz H. (1990) Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* **5**, 383-392.

- Bloomquist J. R. (1992) Intrinsic lethality of chloride-channel-directed insecticides and convulsants in mammals. *Toxicol Lett* **60**, 289-298.
- Bloomquist J. R. (2002) Agents affecting chloride channels., in *Handbook of Neurotoxicology* (Massaro E., ed.), pp. 65-77. Humana Press, New Jersey.
- Bondy S. C. i Agrawal A. K. (1980) The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Arch Toxicol* **46**, 249-256.
- Bonfoco E., Ceccatelli S., Manzo L. i Nicotera P. (1995) Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res* **218**, 189-200.
- Bormann J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 16-19.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Braun J. S., Sublett J. E., Freyer D., Mitchell T. J., Cleveland J. L., Tuomanen E. I. i Weber J. R. (2002) Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* **109**, 19-27.
- Brevik K., Pacyna J. M. i Munch J. (1999) Use of alpha-, beta- and gamma-hexachlorocyclohexane in Europe, 1970- 1996. *Sci Total Environ* **239**, 151-163.
- Brookes N. (1988) Specificity and reversibility of the inhibition by HgCl₂ of glutamate transport in astrocyte cultures. *J Neurochem* **50**, 1117-1122.
- Bucio L., Garcia C., Souza V., Hernandez E., Gonzalez C., Betancourt M. i Gutierrez-Ruiz M. C. (1999) Uptake, cellular distribution and DNA damage produced by mercuric chloride in a human fetal hepatic cell line. *Mutat Res* **423**, 65-72.
- Budtz-Jorgensen E., Grandjean P., Keiding N., White R. F. i Weihe P. (2000) Benchmark dose calculations of methylmercury-associated neurobehavioural deficits. *Toxicol Lett* **112-113**, 193-199.
- Buhr A., Wagner C., Fuchs K., Sieghart W. i Sigel E. (2001) Two novel residues in M2 of the gamma-aminobutyric acid type A receptor affecting gating by GABA and picrotoxin affinity. *J Biol Chem* **276**, 7775-7781.
- Bulleit R. F. i Cui H. (1998) Methylmercury antagonizes the survival-promoting activity of insulin-like growth factor on developing cerebellar granule neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* **153**, 161-168.

Campoy C., Jimenez M., Olea-Serrano M. F., Moreno-Frias M., Canabate F., Olea N., Bayes R. i Molina-Font J. A. (2001) Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum Dev* **65 Suppl**, S183-S190.

Carlson B. X., Elster L. i Schousboe A. (1998) Pharmacological and functional implications of developmentally- regulated changes in GABA(A) receptor subunit expression in the cerebellum. *Eur J Pharmacol* **352**, 1-14.

Castoldi A. F., Barni S., Turin I., Gandini C. i Manzo L. (2000) Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J Neurosci Res* **59**, 775-787.

Castoldi A. F., Candura S. M., Costa P., Manzo L. i Costa L. G. (1996) Interaction of mercury compounds with muscarinic receptor subtypes in the rat brain. *Neurotoxicology* **17**, 735-741.

Castoldi A. F., Coccini T., Ceccatelli S. i Manzo L. (2001) Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull* **55**, 197-203.

Centers for Disease Control and Prevention. (2001) Blood and hair mercury levels in young children and women of childbearing age--United States, 1999. *JAMA* **285**, 1436-1437.

Chen Q., Moulder K., Tenkova T., Hardy K., Olney J. W. i Romano C. (1999) Excitotoxic cell death dependent on inhibitory receptor activation. *Exp Neurol* **160**, 215-225.

Cherubini E. i Conti F. (2001) Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci* **24**, 155-162.

Choi D. W. (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* **18**, 58-60.

Clarkson T. W. (1991) Inorganic and organometal pesticides., in *Handbook of Pesticide Toxicology* (Hayes W. J. J. and Laws E. R. J., eds.), pp. 497-584. Academic Press, San Diego.

Clarkson T. W. (2002) The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 1**, 11-23.

Close A. H., Guo T. L. i Shenker B. J. (1999) Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. *Toxicol Sci* **49**, 68-77.

- Corda M. G., Concas A., Rossetti Z., Guarneri P., Corongiu F. P. i Biggio G. (1981) Methyl mercury enhances [3H]diazepam binding in different areas of the rat brain. *Brain Res* **229**, 264-269.
- Cupello A. i Robello M. (2000) GABA(A) receptor modulation in rat cerebellum granule cells. *Receptors Channels* **7**, 151-171.
- Danbolt N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**, 1-105.
- Dare E., Gotz M. E., Zhivotovsky B., Manzo L. i Ceccatelli S. (2000) Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J Neurosci Res* **62**, 557-565.
- Damgaard I., Nyitrai G., Kovacs I., Kardos J. i Schousboe A. (1999) Possible involvement of GABA(A) and GABA(B) receptors in the inhibitory action of lindane on transmitter release from cerebellar granule neurons. *Neurochem Res* **24**, 1189-1193.
- Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S. A., Zamzami N. i Kroemer G. (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* **476**, 118-123.
- Dave V., Mullaney K. J., Goderie S., Kimelberg H. K. i Aschner M. (1994) Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D- aspartate and serotonin uptake. *Dev Neurosci* **16**, 222-231.
- Davidson P. W., Kost J., Myers G. J., Cox C., Clarkson T. W. i Shamlaye C. F. (2001) Methylmercury and neurodevelopment: reanalysis of the Seychelles Child Development Study outcomes at 66 months of age. *JAMA* **285**, 1291-1293.
- Davis L. E., Kornfeld M., Mooney H. S., Fiedler K. J., Haaland K. Y., Orrison W. W., Cernichiari E. i Clarkson T. W. (1994) Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Ann Neurol* **35**, 680-688.
- de Freitas C. M., Porto M. F., de Freitas N. B., Pivetta F., Arcuri A. S., Moreira J. C. i Machado J. M. (2001) Chemical safety and governance in Brazil. *J Hazard Mater* **86**, 135-151.
- Dierks T., Salentin A. i Kramer R. (1990) Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: evidence for a performed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport. *Biochim Biophys Acta* **1028**, 281-288.

Dingledine R. i McBain C. J. (1999) Glutamate and aspartate., in *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. (Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Fisher S. K. i Uhler M. D., eds.), pp. 315-333. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Ecobichon D. J. (2001) Toxic effects of pesticides., in *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. (Klaassen C. D., ed.), pp. 763-810. McGraw-Hill, New York.

Egeland G. M. i Middaugh J. P. (1997) Balancing fish consumption benefits with mercury exposure. *Science* **278**, 1904-1905.

Ehrich M. i Veronesi B. (1999) In vitro neurotoxicology., in *Neurotoxicology* (Tilson H. A. and Harry G. J., eds.), pp. 37-52. Taylor and Francis, Philadelphia.

Eldefrawi A. T. i Eldefrawi M. E. (1987) Receptors for gamma-aminobutyric acid and voltage-dependent chloride channels as targets for drugs and toxicants. *FASEB J* **1**, 262-271.

Elster L., Banke T., Kristiansen U., Schousboe A. i Wahl P. (1998) Functional properties of glycine receptors expressed in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. *Neuroscience* **84**, 519-528.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. i Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50.

Environmental Protection Agency (2000) Reference dose for methylmercury. *U S Federal Register* **65**, 64702-64703.

Enz R. i Cutting G. R. (1998) Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* **38**, 1431-1441.

Essrich C., Lorez M., Benson J. A., Fritschy J. M., and Luscher B. (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* **1**, 563-571.

Eto K. (2000) Minamata disease. *Neuropathology* **20 Suppl**, S14-S19.

Fernandez M. A., Alonso C., Gonzalez M. J. i Hernandez L. M. (1999) Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere* **38**, 33-43.

French-Constant R. H., Rocheleau T. A., Steichen J. C. i Chalmers A. E. (1993) A point mutation in a Drosophila GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* **363**, 449-451.

- Furuta A., Martin L. J., Lin C. L., Dykes-Hoberg M. i Rothstein J. D. (1997) Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* **81**, 1031-1042.
- Gao B. i Fritschy J. M. (1995) Cerebellar granule cells in vitro recapitulate the in vivo pattern of GABAA-receptor subunit expression. *Brain Res Dev Brain Res* **88**, 1-16.
- Garcia F., Ortega A., Domingo J. L. i Corbella J. (2001) Accumulation of metals in autopsy tissues of subjects living in Tarragona County, Spain. *J Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst Environ Eng* **36**, 1767-1786.
- Garcia O. i Massieu L. (2001) Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. *J Neurosci Res* **64**, 418-428.
- Gassó S., Cristofol R. M., Selema G., Rosa R., Rodriguez-Farre E. i Sanfeliu C. (2001) Antioxidant compounds and Ca(2+) pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. *J Neurosci Res* **66**, 135-145.
- Gassó S., Suñol C., Sanfeliu C., Rodriguez-Farre E. i Cristofol R. M. (2000) Pharmacological characterization of the effects of methylmercury and mercuric chloride on spontaneous noradrenaline release from rat hippocampal slices. *Life Sci* **67**, 1219-1231.
- Gegelashvili G. i Schousboe A. (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull* **45**, 233-238.
- Gorman A. M., Orrenius S. i Ceccatelli S. (1998) Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport* **9**, R49-R55.
- Gorman A. M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S. i Ceccatelli S. (1999) Cytochrome c release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci* **11**, 1067-1072.
- Gorman A. M., Ceccatelli S. i Orrenius S. (2000) Role of mitochondria in neuronal apoptosis. *Dev Neurosci* **22**, 348-358.
- Gotz M. E., Ahlbom E., Zhivotovsky B., Blum-Degen D., Oettel M., Romer W., Riederer P., Orrenius S. i Ceccatelli S. (1999) Radical scavenging compound J 811 inhibits hydrogen peroxide-induced death of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* **56**, 420-426.
- Grandjean P. i White R. F. (1999) Effects of methylmercury exposure on neurodevelopment. *JAMA* **281**, 896.

- Green D. R. i Reed J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Grimalt J. O., Ferrer M. i Macpherson E. (1999) The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ* **242**, 3-11.
- Gupta S. (2001) Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci* **69**, 2957-2964.
- Hare M. F., Rezazadeh S. M., Cooper G. P., Minnema D. J. i Michaelson I. A. (1990) Effects of inorganic mercury on [3H]dopamine release and calcium homeostasis in rat striatal synaptosomes. *Toxicol Appl Pharmacol* **102**, 316-330.
- Harris B., Wong G. i Skolnick P. (1993) Neurochemical actions of inhalational anesthetics at the GABAA receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* **265**, 1392-1398.
- Haugeto O., Ullensvang K., Levy L. M., Chaudhry F. A., Honore T., Nielsen M., Lehre K. P. i Danbolt N. C. (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* **271**, 27715-27722.
- Hisatome I., Kurata Y., Sasaki N., Morisaki T., Morisaki H., Tanaka Y., Urashima T., Yatsuhashi T., Tsuboi M., Kitamura F., Miake J., Takeda S., Taniguchi S., Ogino K., Igawa O., Yoshida A., Sato R., Makita N. i Shigemasa C. (2000) Block of sodium channels by divalent mercury: role of specific cysteinyl residues in the P-loop region. *Biophys J* **79**, 1336-1345.
- Hock C., Drasch G., Golombowski S., Muller-Spahn F., Willershausen-Zonnchen B., Schwarz P., Hock U., Growdon J. H. i Nitsch R. M. (1998) Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **105**, 59-68.
- Holz R. W. i Fisher S. K. (1999) Synaptic Transmission and Cellular Signaling: an overview., in *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. (Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Fisher S. K. i Uhler M. D., eds.), pp. 191-212. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Honig L. S. i Rosenberg R. N. (2000) Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* **108**, 317-330.
- Huang C. S. i Narahashi T. (1996) Mercury chloride modulation of the GABAA receptor-channel complex in rat dorsal root ganglion neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* **140**, 508-520.
- Huang C. S. i Narahashi T. (1997a) The role of G proteins in the activity and mercury modulation of GABA- induced currents in rat neurons. *Neuropharmacology* **36**, 1623-1630.

Huang C. S. i Narahashi T. (1997b) The role of phosphorylation in the activity and mercury modulation of GABA-induced currents in rat neurons. *Neuropharmacology* **36**, 1631-1640.

Huang J. i Casida J. E. (1996) Characterization of [³H]ethynylbicycloorthobenzoate ([³H]EBOB) binding and the action of insecticides on the gamma-aminobutyric acid-gated chloride channel in cultured cerebellar granule neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **279**, 1191-1196.

Huang J. i Casida J. E. (1997) Role of cerebellar granule cell-specific GABAA receptor subtype in the differential sensitivity of [³H]ethynylbicycloorthobenzoate binding to GABA mimetics. *Neurosci Lett* **225**, 85-88.

Ikeda T., Nagata K., Shono T. i Narahashi T. (1998) Dieldrin and picrotoxinin modulation of GABA(A) receptor single channels. *Neuroreport* **9**, 3189-3195.

InSug O., Datar S., Koch C. J., Shapiro I. M. i Shenker B. J. (1997) Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology* **124**, 211-224.

Jacobson M. D., Weil M. i Raff M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.

Jacoby S. C., Gagnon E., Caron L., Chang J. i Isenring P. (1999) Inhibition of Na⁺ - K⁺ - 2Cl⁻ cotransport by mercury. *Am J Physiol* **277**, 684-292.

Jang I. S., Jeong H. J. i Akaike N. (2001) Contribution of the Na-K-Cl cotransporter on GABA(A) receptor-mediated presynaptic depolarization in excitatory nerve terminals. *J Neurosci* **21**, 5962-5972.

Jentsch T. J., Stein V., Weinreich F. i Zdebik A. A. (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**, 503-568.

Joza N., Susin S. A., Daugas E., Stanford W. L., Cho S. K., Li C. Y., Sasaki T., Elia A. J., Cheng H. Y., Ravagnan L., Ferri K. F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y. Y., Mak T. W., Zuniga-Pflucker J. C., Kroemer G. i Penninger J. M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554.

Kaiser J. (2000) Toxicology. Mercury report backs strict rules. *Science* **289**, 371-372.

- Kales S. N. i Goldman R. H. (2002) Mercury exposure: current concepts, controversies, and a clinic's experience. *J Occup Environ Med* **44**, 143-154.
- Kandel E. R. (2000) Nerve cells and behaviour., in *Principles of neural science* (Kandel E. R., Schwartz J. H. i Jessell T. M., eds.), pp. 19-35. McGraw-Hill, New York.
- Kandel E. R. i Siegelbaum S. A. (2000) Synaptic integration., in *Principles of neural science* (Kandel E. R., Schwartz J. H. i Jessell T. M., eds.), pp. 207-228. McGraw-Hill, New York.
- Kaneda M., Farrant M. i Cull-Candy S. G. (1995) Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. *J Physiol* **485 (Pt 2)**, 419-435.
- Kardos J. i Guidotti A. (1988) Desensitization of GABA-stimulated $^{36}\text{Cl}^-$ influx in cerebellar granule cells., in *Chloride channels and their modulation by neurotransmitters and drugs* (Biggio G. and Costa E., eds.), pp. 161-179. Raven Press, New York.
- Kaufmann S. H. i Hengartner M. O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* **11**, 526-534.
- Kawaguchi T. (1998) Mercury in fish. *Science* **279**, 461.
- Kiskin N. I., Krishtal O. A., Tsyndrenko A. Y. i Akaike N. (1986) Are sulfhydryl groups essential for function of the glutamate-operated receptor-ionophore complex? *Neurosci Lett* **66**, 305-310.
- Kneussel M. i Betz H. (2000) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* **23**, 429-435.
- Komulainen H., Keranen A. i Saano V. (1995) Methylmercury modulates GABAA receptor complex differentially in rat cortical and cerebellar membranes in vitro. *Neurochem Res* **20**, 659-662.
- Korogi Y., Takahashi M., Shinzato J. i Okahima T. (1994) MR findings in seven patients with organic mercury poisoning (Minamata disease). *Am J Neuroradiol* **15**, 1575-1578.
- Kunimoto M. (1994) Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 310-317.
- Kunimoto M. i Suzuki T. (1997) Migration of granule neurons in cerebellar organotypic cultures is impaired by methylmercury. *Neurosci Lett* **226**, 183-186.

de Laguna A. (1555) Pedacio dioscorides anazerbeo, acerca de la materia medicinal y de los venenos mortiferos. Libro V, Cap LXIX: Del Azogue. 540-542. Iuan Latio, Anvers. (Edició facsímil publicada per la Cominidad de Madrid, Consejería de Agricultura, Madrid 1991) (ISBN 84-451-0328-8).

LeBel C. P., Ali S. F. i Bondy S. C. (1992) Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* **112**, 161-165.

Legendre P. (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* **58**, 760-793.

Lehmann A. i Jacobson I. (1990) Ion Dependence and Receptor Mediation of Glutamate Toxicity in the Immature Rat Hippocampal Slice. *Eur J Neurosci* **2**, 620-628.

Limke T. L. i Atchison W. D. (2002) Acute Exposure to Methylmercury Opens the Mitochondrial Permeability Transition Pore in Rat Cerebellar Granule Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **178**, 52-61.

Llorens J., Suñol C., Tusell J. M. i Rodriguez-Farre E. (1990) Lindane inhibition of [35S]TBPS binding to the GABAA receptor in rat brain. *Neurotoxicol Teratol* **12**, 607-610.

Macdonald R. L. i Olsen R. W. (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* **17**, 569-602.

Maekawa M., Satoh S., Murayama T. i Nomura Y. (2000) Involvement of Hg²⁺-sensitive sulfhydryl groups in regulating noradrenaline release induced by S-nitrosocysteine in rat brain slices. *Biochem Pharmacol* **59**, 839-845.

Magour S. (1986) Studies on the inhibition of brain synaptosomal Na⁺/K⁺-ATPase by mercury chloride and methyl mercury chloride. *Arch Toxicol Suppl* **9**, 393-396.

Mahaffey K. R. (1998) Methylmercury exposure and neurotoxicity. *JAMA* **280**, 737-738.

Mardones, I. G. El Gobierno impone a Boliden una multa de 45 millones de euros por el vertido de Aznalcóllar. Dia 03 agost 2002. El Pais . 2002.

Marshall F. H., Jones K. A., Kaupmann K. i Bettler B. (1999) GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 396-399.

Marty M. S. i Atchison W. D. (1997) Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* **147**, 319-330.

Marty M. S. i Atchison W. D. (1998) Elevations of intracellular Ca²⁺ as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol* **150**, 98-105.

Mate M. J., Ortiz-Lombardia M., Boitel B., Haouz A., Tello D., Susin S. A., Penninger J. , Kroemer G. i Alzari P. M. (2002) The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol* **9**, 442-446.

Mateo R., Saavedra D. i Guitart R. (1999) Reintroduction of the otter (*Lutra lutra*) into Catalan rivers, Spain: assessing organochlorine residue exposure through diet. *Bull Environ Contam Toxicol* **63**, 248-255.

Matfield M. (2002) Animal experimentation: the continuing debate. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 149-152.

Matsumoto K., Eldefrawi M. E. i Eldefrawi A. T. (1988) Action of polychlorocycloalkane insecticides on binding of [35S]t- butylbicyclophosphorothionate to Torpedo electric organ membranes and stereospecificity of the binding site. *Toxicol Appl Pharmacol* **95**, 220-229.

Matyja E. i Albrecht J. (1993) Ultrastructural evidence that mercuric chloride lowers the threshold for glutamate neurotoxicity in an organotypic culture of rat cerebellum. *Neurosci Lett* **158**, 155-158.

McGinn A. (2002) Reducing our toxic burden., in *State of the World. 2002.* (Starke L., ed.), pp. 75-100. W W Norton & Company, New York.

Mehta A. K. i Ticku M. K. (1999) An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev* **29**, 196-217.

Miyamoto K., Nakanishi H., Moriguchi S., Fukuyama N., Eto K., Wakamiya J., Murao K., Arimura K. i Osame M. (2001) Involvement of enhanced sensitivity of N-methyl-D-aspartate receptors in vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity. *Brain Res* **901**, 252-258.

Monnet-Tschudi F., Zurich M. G. i Honegger P. (1996) Comparison of the developmental effects of two mercury compounds on glial cells and neurons in aggregate cultures of rat telencephalon. *Brain Res* **741**, 52-59.

Moreiras Tuni O. i Cuadrado Vives C. (1993) Ingesta de contaminantes (metales pesados) via dieta total del Conjunto Nacional y Comunidades Autónomas: nuevo enfoque. *Rev Clin Esp* **193**, 40-45.

- Myers G. J., Davidson P. W., Cox C., Shamlay C., Cernichiari E. i Clarkson T. W. (2000) Twenty-seven years studying the human neurotoxicity of methylmercury exposure. *Environ Res* **83**, 275-285.
- Nadler L. S., Raetzman L. T., Dunkle K. L., Mueller N. i Siegel R. E. (1996) GABAA receptor subunit expression and assembly in cultured rat cerebellar granule neurons. *Brain Res Dev Brain Res* **97**, 216-225.
- Nagaraja T. N. i Brookes N. (1996) Mercuric chloride uncouples glutamate uptake from the countertransport of hydroxyl equivalents. *Am J Physiol* **271**, C1487-C1493.
- Nagashima K., Fujii Y., Tsukamoto T., Nukuzuma S., Satoh M., Fujita M., Fujioka Y. i Akagi H. (1996) Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. *Acta Neuropathol (Berl)* **91**, 72-77.
- Nagata K., Huang C. S., Hamilton B. J., Carter D. B. i Narahashi T. (1996) Differential effects of hexachlorocyclohexane isomers on the GABA receptor subunits expressed in human embryonic kidney cell line. *Brain Res* **738**, 131-137.
- Narahashi T., Ma J. Y., Arakawa O., Reuveny E. i Nakahiro M. (1994) GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell Mol Neurobiol* **14**, 599-621.
- Nayeem N., Green T. P., Martin I. L. i Barnard E. A. (1994) Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* **62**, 815-818.
- Nicotera P., Leist M. i Ferrando-May E. (1998) Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* **102-103**, 139-142.
- Numakawa T., Matsumoto T., Adachi N., Yokomaku D., Kojima M., Takei N. i Hatanaka H. (2001) Brain-derived neurotrophic factor triggers a rapid glutamate release through increase of intracellular Ca(2+) and Na(+) in cultured cerebellar neurons. *J Neurosci Res* **66**, 96-108.
- Obata T., Yamamura H. I., Malatynska E., Ikeda M., Laird H., Palmer C. J. i Casida J. E. (1988) Modulation of gamma-aminobutyric acid-stimulated chloride influx by bicycloorthocarboxylates, bicyclophosphorus esters, polychlorocycloalkanes and other cage convulsants. *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 802-806.
- Olivieri G., Brack C., Muller-Spahn F., Stahelin H. B., Herrmann M., Renard P., Brockhaus M. i Hock C. (2000) Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-

amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* **74**, 231-236.

Olney J. W. i Ludoph A. C. (2000) Glutamic acid., in *Experimental and clinical neurotoxicology* (Spencer P. S. and Schaumburg H. H., eds.), pp. 604-609. Oxford University Press, Oxford.

Olsen R. W. i DeLorey T. M. (1999) GABA and glycine., in *Basic Neurochemistry*. (Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Fisher S. K. i Uhler M. D., eds.), pp. 335-346. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Orrenius S. i Nicotera P. (1994) The calcium ion and cell death. *J Neural Transm Suppl* **43**, 1-11.

Palacín M., Estevez R., Bertran J. i Zorzano A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* **78**, 969-1054.

Pedersen M. B., Hansen J. C., Mulvad G., Pedersen H. S., Gregersen M. i Danscher G. (1999) Mercury accumulations in brains from populations exposed to high and low dietary levels of methyl mercury. Concentration, chemical form and distribution of mercury in brain samples from autopsies. *Int J Circumpolar Health* **58**, 96-107.

Phillis J. W., Song D. i O'Regan M. H. (1998) Tamoxifen, a chloride channel blocker, reduces glutamate and aspartate release from the ischemic cerebral cortex. *Brain Res* **780**, 352-355.

Pilgrim W., Schroeder W., Porcella D. B., Santos-Burgoa C., Montgomery S., Hamilton A. i Trip L. (2000) Developing consensus: mercury science and policy in the NAFTA countries (Canada, the United States and Mexico). *Sci Total Environ* **261**, 185-193.

Pomés A., Frandsen A., Suñol C., Sanfeliu C., Rodriguez-Farre E. i Schousboe A. (1994a) Lindane cytotoxicity in cultured neocortical neurons is ameliorated by GABA and flunitrazepam. *J Neurosci Res* **39**, 663-668.

Pomés A., Rodriguez-Farre E. i 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., Rodriguez-Farre E. i Suñol C. (1994b) Disruption of GABA-dependent chloride flux by cyclodienes and hexachlorocyclohexanes in primary cultures of cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **271**, 1616-1623.

- Pribilla I., Takagi T., Langosch D., Bormann J. i Betz H. (1994) The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J* **13**, 1493.
- Rajanna B., Chetty C. S., Rajanna S., Hall E., Fail S. i Yallapragada P. R. (1997a) Interaction of metals with muscarinic cholinceptor and adrenoceptor binding, and agonist-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in rat brain. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **116**, 111-116.
- Rajanna B., Rajanna S., Hall E. i Yallapragada P. R. (1997b) In vitro metal inhibition of N-methyl-D-aspartate specific glutamate receptor binding in neonatal and adult rat brain. *Drug Chem Toxicol* **20**, 21-29.
- Raldua D. i Pedrocchi C. (1996) Mercury concentrations in three species of freshwater fishes from the lower Gallego and Cinca Rivers, Spain. *Bull Environ Contam Toxicol* **57**, 597-602.
- Ratra G. S., Kamita S. G. i Casida J. E. (2001) Role of human GABA(A) receptor beta3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **172**, 233-240.
- Rosa R., Rodríguez-Farré E. i Sanfeliu C. (1996) Cytotoxicity of hexachlorocyclohexane isomers and cyclodienes in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Pharmacol Exp Ther* **278**, 163-169.
- Rosa R., Sanfeliu C., Rodríguez-Farré E., Frandsen A., Schousboe A. i Suñol C. (1997a) Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. *J Neurosci Res* **47**, 27-33.
- Rosa R., Sanfeliu C., Suñol C., Pomés A., Rodríguez-Farré E., Schousboe A. i Frandsen A. (1997b) The mechanism for hexachlorocyclohexane-induced cytotoxicity and changes in intracellular Ca²⁺ homeostasis in cultured cerebellar granule neurons is different for the gamma- and delta-isomers. *Toxicol Appl Pharmacol* **142**, 31-39.
- Rossi D. J., Oshima T. i Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**, 316-321.
- Rudolph U., Crestani F. i Mohler H. (2001) GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 188-194.
- Sakamoto M., Ikegami N. i Nakano A. (1996) Protective effects of Ca²⁺ channel blockers against methyl mercury toxicity. *Pharmacol Toxicol* **78**, 193-199.

- Sanfeliu C., Rosa R., Suñol C., Rodríguez-Farré, E. i Cristòfol R. M. (1996) Stimulation of Phosphoinositide Hydrolysis by gamma- and delta- Hexachlorocyclohexane in Primary Cultures of Cerebellar Granule Cells: Interaction with Glutamate and Carbachol Receptor-Mediated Phosphoinositide Response and Effects of Specific Pharmacological Agents. *Pestic Biochem Physiol* **55**, 64-76.
- Sanfeliu C., Sebastià J. i Ki S. U. (2001) Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* **22**, 317-327.
- Sanzo J. M., Dorronsoro M., Amiano P., Amurrio A., Aguinagalde F. X. i Azpiri M. A. (2001) Estimation and validation of mercury intake associated with fish consumption in an EPIC cohort of Spain. *Public Health Nutr* **4**, 981-988.
- Sarafian T. i Verity M. A. (1990) Altered patterns of protein phosphorylation and synthesis caused by methyl mercury in cerebellar granule cell culture. *J Neurochem* **55**, 922-929.
- Sarafian T. A. (1993) Methyl mercury increases intracellular Ca²⁺ and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* **61**, 648-657.
- Sarafian T. A., Bredesen D. E. i Verity M. A. (1996) Cellular resistance to methylmercury. *Neurotoxicology* **17**, 27-36.
- Sattler R. i Tymianski M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* **78**, 3-13.
- Scheuhammer A. M. i Cherian M. G. (1985) Effects of heavy metal cations, sulfhydryl reagents and other chemical agents on striatal D2 dopamine receptors. *Biochem Pharmacol* **34**, 3405-3413.
- Schousboe A., Meier E., Drejer J. i Hertz L. (1989) Preparation of primary cultures of mouse (rat) cerebellar granule cells., in *A dissection and tissue culture manual of the nervous system*. pp. 203-206. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Schrope M. (2001) US to take temperature of mercury threat. *Nature* **409**, 124.
- Schuhmacher M., Batiste J., Bosque M. A., Domingo J. L. i Corbella J. (1994) Mercury concentrations in marine species from the coastal area of Tarragona Province, Spain. Dietary intake of mercury through fish and seafood consumption. *Sci Total Environ* **156**, 269-273.
- Shan Q., Haddrill J. L. i Lynch J. W. (2001) A single beta subunit M2 domain residue controls the picrotoxin sensitivity of alphabeta heteromeric glycine receptor chloride channels. *J Neurochem* **76**, 1109-1120.

- Shenker B. J., Guo T. L. i Shapiro I. M. (2000) Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ Res* **84**, 89-99.
- Sieghart W. (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**, 181-234.
- Simmons-Willis T. A., Koh A. S., Clarkson T. W. i Ballatori N. (2002) Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L- cysteine complex is a substrate for human LAT1 and LAT2 amino acid carriers. *Biochem J Pt.*
- Sirois J. E. i Atchison W. D. (1996) Effects of mercurials on ligand- and voltage-gated ion channels: a review. *Neurotoxicology* **17**, 63-84.
- Sirois J. E. i Atchison W. D. (2000) Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **167**, 1-11.
- Smith A. G. (1991) Chlorinated hydrocarbon insecticides., in *Handbook of pesticide toxicology*. (Hayes W. J. J. and Laws E. R. J., eds.), pp. 731-916. Academic Press, San Diego.
- Soares D., Sarkis J., Muller R., Brabo E. i Santos E. (2002) Correlation between mercury and selenium concentrations in Indian hair from Rondjnia State, Amazon region, Brazil. *Sci Total Environ* **287**, 155-161.
- Sonnewald U., Qu H. i Aschner M. (2002) Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling. *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 1-6.
- Sorg O., Schilter B., Honegger P. i Monnet-Tschudi F. (1998) Increased vulnerability of neurones and glial cells to low concentrations of methylmercury in a prooxidant situation. *Acta Neuropathol (Berl)* **96**, 621-627.
- Storelli M. M. i Marcotrigiano G. O. (2001) Total mercury levels in muscle tissue of swordfish (*Xiphias gladius*) and bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Mediterranean Sea (Italy). *J Food Prot* **64**, 1058-1061.
- Stroh C. i Schulze-Osthoff K. (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* **5**, 997-1000.
- Su G., Kintner D. B. i Sun D. (2002) Contribution of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter to high-[K(+)](o)- induced swelling and EAA release in astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C1136-C1146.

- Suñol C., Artigas F., Tusell J. M. i Gelpi E. (1988) High-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for endogenous gamma-aminobutyric acid validated by mass spectrometric and gas chromatographic techniques. *Anal Chem* **60**, 649-651.
- Suñol C., Pomés A. i Rodriguez-Farre E. (1994) Primary neuronal cultures to study the GABAA receptor as a target for neurotoxic agents: different effects of stimulant/depressant compounds., in *European Medicines Research. Perspectives in pharmacotoxicology and pharmacovigilance* (Fracchia G. N., ed.), pp. 223-234. IOS Press, Amsterdam.
- Suñol C., Tusell J. M., Gelpi E. i Rodriguez-Farre E. (1989) GABAergic modulation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane)-induced seizures. *Toxicol Appl Pharmacol* **100**, 1-8.
- Suñol C., Vale C. i Rodriguez-Farre E. (1998) Polychlorocycloalkane insecticide action on GABA-and glycine-dependent chloride flux. *Neurotoxicology* **19**, 573-580.
- Susin S. A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P. , Ferri K. F., Irinopoulou T., Prevost M. C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W. C. i Kroemer G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**, 571-580.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M. i Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Takeyama N., Miki S., Hirakawa A. i Tanaka T. (2002) Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **274**, 16-24.
- Thompson C. L. i Stephenson F. A. (1994) GABAA receptor subtypes expressed in cerebellar granule cells: a developmental study. *J Neurochem* **62**, 2037-2044.
- Thornberry N. A. i Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Trotti D., Rizzini B. L., Rossi D., Haugeto O., Racagni G., Danbolt N. C. i Volterra A. (1997) Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci* **9**, 1236-1243.
- Trotti D., Danbolt N. C. i Volterra A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* **19**, 328-334.

- Trotti D., Rizzini B. L., Rossi D., Haugeto O., Racagni G., Danbolt N. C. i Volterra A. (1997) Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci* **9**, 1236-1243.
- Tusell J. M., Suñol C., Gelpi E. i Rodriguez-Farre E. (1987) Relationship between lindane concentration in blood and brain and convulsant response in rats after oral or intraperitoneal administration. *Arch Toxicol* **60**, 432-437.
- US Environmental Protection Agency (EPA) (2000) *The Mercury Research Strategy*, pp. EPA /600/R-00/073. Office of Research and Development, Washington DC.
- Usuki F., Yasutake A., Umehara F., Tokunaga H., Matsumoto M., Eto K., Ishiura S. i Higuchi I. (2001) In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett* **304**, 199-203.
- Vahter M. E., Mottet N. K., Friberg L. T., Lind S. B., Charleston J. S. i Burbacher T. M. (1995) Demethylation of methyl mercury in different brain sites of *Macaca fascicularis* monkeys during long-term subclinical methyl mercury exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* **134**, 273-284.
- Vale C., Pomés A., Rodriguez-Farre E. i Suñol C. (1997) Allosteric interactions between gamma-aminobutyric acid, benzodiazepine and picrotoxinin binding sites in primary cultures of cerebellar granule cells. Differential effects induced by gamma- and delta-hexachlorocyclohexane. *Eur J Pharmacol* **319**, 343-353.
- Vale C., Damgaard I., Sunol C., Rodriguez-Farre E. i Schousboe A. (1998) 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., Vilaro M. T., Rodriguez-Farre E. i Suñol C. (1999) Effects of the conformationally restricted GABA analogues, cis- and trans-4-aminocrotonic acid, on GABA neurotransmission in primary neuronal cultures. *J Neurosci Res* **57**, 95-105.
- Vale C. i Sanes D. H. (2000) Afferent regulation of inhibitory synaptic transmission in the developing auditory midbrain. *J Neurosci* **20**, 1912-1921.
- Verity M. A., Sarafian T., Pacifici E. H. i Sevanian A. (1994) Phospholipase A2 stimulation by methyl mercury in neuron culture. *J Neurochem* **62**, 705-714.
- Virginio C. i Cherubini E. (1997) Glycine-activated whole cell and single channel currents in rat cerebellar granule cells in culture. *Brain Res Dev Brain Res* **98**, 30-40.

- Wade M. J., Davis B. K., Carlisle J. S., Klein A. K. i Valoppi L. M. (1993) Environmental transformation of toxic metals. *Occup Med* **8**, 574-601.
- Wahl P., Elster L. i Schousboe A. (1994) Identification and function of glycine receptors in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* **62**, 2457-2463.
- Warfvinge K. (2000) Mercury distribution in the neonatal and adult cerebellum after mercury vapor exposure of pregnant squirrel monkeys. *Environ Res* **83**, 93-101.
- Watzke N. i Grewer C. (2001) The anion conductance of the glutamate transporter EAAC1 depends on the direction of glutamate transport. *FEBS Lett* **503**, 121-125.
- Weaver C. E., Jr., Wu F. S., Gibbs T. T. i Farb D. H. (1998) Pregnenolone sulfate exacerbates NMDA-induced death of hippocampal neurons. *Brain Res* **803**, 129-136.
- WHO (1990) *Environmental Health Criteria 101. Methylmercury*, World Health Organisation, Geneva.
- Woodward R. M., Polenzani L. i Miledi R. (1992) Effects of hexachlorocyclohexanes on gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by RNA from mammalian brain and retina. *Mol Pharmacol* **41**, 1107-1115.
- Xue H., Shi H., Tsang S. Y., Zheng H., Savva C. G., Sun J. i Holzenburg A. (2001) A recombinant glycine receptor fragment forms homo-oligomers distinct from its GABA(A) counterpart. *J Mol Biol* **312**, 915-920.
- Yagame H., Horigome T., Ichimura T., Uchiyama J. i Omata S. (1994) Differential effects of methylmercury on the phosphorylation of protein species in the brain of acutely intoxicated rats. *Toxicology* **92**, 101-113.
- Ye H., Cande C., Stephanou N. C., Jiang S., Gurbuxani S., Larochette N., Daugas E., Garrido C., Kroemer G. i Wu H. (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* **9**, 680-684.
- Yee S. i Choi B. H. (1996) Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology* **17**, 17-26.
- Yu S. W., Wang H., Poitras M. F., Coombs C., Bowers W. J., Federoff H. J., Poirier G. G. , Dawson T. M. i Dawson V. L. (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**, 259-263.

Yuan Y. i Atchison W. D. (1997) Action of methylmercury on GABA(A) receptor-mediated inhibitory synaptic transmission is primarily responsible for its early stimulatory effects on hippocampal CA1 excitatory synaptic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 64-73.

Zamzami N. i Kroemer G. (1999) Condensed matter in cell death. *Nature* **401**, 127-128.

Zhang X., Chen J., Graham S. H., Du L., Kochanek P. M., Draviam R., Guo F., Nathaniel P. D., Szabo C., Watkins S. C. i Clark R. S. (2002) Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem* **82**, 181-191.

Zheng W. (2002) Blood-brain barrier and blood-CSF barrier in metal-induced neurotoxicities., in *Handbook of Neurotoxicology* (Massaro E., ed.), pp. 161-193. Humana Press, New Jersey.

Zhorov B. S. i Bregestovski P. D. (2000) Chloride channels of glycine and GABA receptors with blockers: Monte Carlo minimization and structure-activity relationships. *Biophys J* **78**, 1786-1803.