



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Estrategias para mitigar la toxicidad asociada a la exposición crónica al mercurio a través de la dieta

Tesis doctoral presentada por:

Pilar Rodríguez Viso

Dirigida por:

Dr. Manuel Zúñiga Cabrera

Dr. Vicente Monedero García

Valencia, diciembre de 2022

Programa de Doctorado en Biotecnología
Departamento de Biotecnología
Universidad Politécnica de Valencia

Agradecimientos

Llevar a cabo una tesis doctoral nunca es fácil. Además, la llegada de la pandemia nos ha puesto a prueba en muchos sentidos. Aunque hayan sido tres años que comenzaron como nunca nos hubiéramos podido imaginar, entre todos hemos sido capaces de sacar adelante este gran trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer la gran oportunidad que me brindaron mis directores de tesis, los Drs. Manuel Zúñiga y Vicente Monedero, para comenzar a desarrollar mi carrera científica.

Agradecer a la Dra. Vicenta Devesa y la Dra. Dinoraz Vélez por todo el conocimiento que me han transmitido durante estos años, por la ayuda recibida y por confiar en mí en todo momento.

A Pepe Coll, por todas las horas pasadas en el microscopio y por sus consejos para intentar mejorar nuestro trabajo. A Helena, por la ayuda prestada durante estos años.

A todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio, gracias por poner vuestro granito de arena, por vuestra ayuda y por dejar transmitiros mis conocimientos.

Siempre llevaré en mi corazón a Alicia y Adrián, esté donde esté. Habéis sido unos pilares muy importantes para mí a lo largo de estos años, apoyándonos los unos a los otros en todo momento, y aprendiendo cada día un poquito más de cada uno. Me acogisteis desde el primer momento en que os conocí y ojalá siempre seamos una pequeña gran familia. Vais a conseguir todo lo que os propongáis.

Durante el último año se han unido a mi vida muchas personas a las que agradezco muchísimo el que hayan podido formar parte de él. Agradecer a Ruth, Celia, Sara, Carlos, Santi, María Inés, María y Pedro, habéis hecho de este último año un camino mucho más llevadero.

A mis amigos en la distancia, Maribel, Fran Regalón, Fran Ruiz, Rafa y Celia, que, aunque ahora estemos muy lejos, siempre los siento muy cerca de mí,

apoyándonos continuamente en nuestros respectivos trabajos y sin dejar de creer y de estar orgullosos los unos de los otros.

A David y Andrea, por tener tanta paciencia conmigo en lo personal y lo profesional, y en los momentos de mayor agobio.

A Carlos A., que, aunque haya aparecido en mi vida en la última etapa, ha sido un apoyo incondicional. Vas a ser un gran científico.

A mis padres, que en todo momento me han apoyado para seguir mi sueño de trabajar en lo que más me gusta y que sin ellos no hubiera podido llegar a donde estoy ahora.

A todos, gracias. Espero encontrar personas tan maravillosas como vosotros allá donde esté.

RESUMEN

La dieta es la principal vía de exposición a mercurio (Hg) para la mayoría de la población. Las principales formas de Hg en los alimentos son el metilmercurio (MeHg) y el Hg inorgánico divalente [Hg(II)]. Aunque el intestino es la principal puerta de entrada del tóxico en la circulación sistémica, los estudios sobre su toxicidad a nivel intestinal son escasos. El objetivo de la presente tesis ha sido evaluar la toxicidad y los mecanismos de acción del Hg(II) y el MeHg a nivel intestinal. Adicionalmente, se ha ensayado la eficacia de cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL) como estrategia de reducción de esta toxicidad.

Para los estudios *in vitro* se ha desarrollado un modelo celular en el que se han combinado enterocitos, células mucossecretoras y macrófagos en un sistema bicameral. Las células se han expuesto a Hg(II) y MeHg (0.1-1 mg/L) durante 10 días. Los datos han evidenciado que ambas especies generan un aumento de la respuesta inflamatoria, incrementando la liberación de la citoquina IL-8 e IL-1 β , y una respuesta pro-oxidante, con un aumento de las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS) y una sobreexpresión de proteínas de estrés (HSP70, HSP90 y MT2A). Esta respuesta ha sido más notable en macrófagos, indicando que posiblemente sean las células inmunitarias las que gobiernen la respuesta al tóxico. La situación de estrés va acompañada de una alteración de la expresión de la proteína de las uniones estrechas ZO-1 y una modificación de la morfología de la monocapa. Además, la exposición genera un aumento de la secreción de mucus y una sobreexpresión de su principal mucina, principalmente a MeHg. Los mecanismos de esta hipersecreción podrían estar relacionados con la ruta IL4/IL13/STAT6. Todos estos efectos sobre la monocapa epitelial conllevan un aumento de la permeabilidad y una reducción de la capacidad de regeneración.

En los ensayos *in vivo* se han expuesto ratones BALB/c a Hg(II) y MeHg (1-10 mg/L) durante 4 meses a través del agua de bebida. Los datos obtenidos han confirmado lo observado *in vitro*. La exposición a ambas especies (especialmente

Resumen

a 5 y 10 mg/L) induce un proceso inflamatorio en el colon, con un aumento de las citoquinas TNF- α e IL1- β y la presencia de infiltrados de neutrófilos. Paralelamente, la exposición genera estrés oxidativo con un incremento de las ROS/RNS y los peróxidos lipídicos. Se ha confirmado *in vivo* la participación en esta respuesta de algunas rutas apuntadas *in vitro*, en concreto p38 MAPK y JNK. Además, también se evidencian alteraciones en la expresión de proteínas de las uniones estrechas y de la mucina MUC2 en el colon, acompañada de una hiperplasia de las células mucosecretoras, especialmente en los tratamientos con MeHg. En estos animales se observa, además, un aumento de la expresión de IL13 e IL4, lo que apunta a la participación de la ruta IL4/IL13/STAT6, tal y como indicaban los ensayos *in vitro*. Además, estos ensayos *in vivo* muestran un efecto de ambas especies sobre el metabolismo de la microbiota intestinal con una reducción de los contenidos luminales de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), aunque los cambios detectados en la composición de la microbiota son mínimos. Finalmente, los animales tratados presentan un aumento de la permeabilidad. Todos los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* ponen de manifiesto que una exposición continuada a Hg(II) y MeHg genera una disrupción de la barrera intestinal.

Los ensayos *in vitro* realizados para determinar la eficacia de las cepas de BAL de origen murino LE1 y LE2 como estrategia de protección se han realizado coexponiendo el modelo celular a Hg(II) o MeHg (1 mg/L) junto con las cepas durante 7 días. Los datos obtenidos han mostrado un efecto protector de ambas cepas, con una reducción de la respuesta inflamatoria, el estrés y los efectos sobre las uniones estrechas y la producción de mucus. Asimismo, la presencia de ambas bacterias restaura parcialmente la permeabilidad y la capacidad de regeneración de las monocapas. Teniendo en cuenta que en este estudio las BAL están inactivadas térmicamente, esta protección se asocia principalmente a su capacidad de quelación del Hg, aunque no hay que descartar que algún componente estructural de la pared bacteriana pueda ejercer otro tipo de efecto beneficioso.

Los ensayos *in vivo* para confirmar el efecto protector de las BAL se han realizado en ratones BALB/c expuestos durante 2 meses a MeHg (5 mg/L) a través del agua de bebida. Las bacterias, en este caso viables, se han administrado por sonda gástrica diariamente. Los datos obtenidos muestran que, aunque las dos cepas reducen por igual los contenidos colónicos de MeHg, la reducción de los efectos tóxicos es mucho más notable con la cepa LE1. Se observan reducciones de los contenidos de mediadores de inflamación y estrés en el colon, hay una recuperación de la expresión de proteínas constituyentes de las uniones estrechas y del mucus. Se reestablecen los niveles luminales de los metabolitos de la microbiota y se restaura parcialmente la permeabilidad intestinal. Los resultados muestran que, además del proceso de quelación, la cepa LE1 activa la ruta de señalización Nrf2/Keap1/ARE y la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL10. Los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo*, apuntan a que la cepa LE1 podría ser una buena alternativa para reducir la toxicidad intestinal del Hg; reducción que puede tener también repercusiones beneficiosas a nivel sistémico.

RESUM

La dieta és la principal via d'exposició a mercuri (Hg) per a la majoria de la població. Les principals formes de Hg en els aliments són el metilmercuri (MeHg) i el Hg inorgànic divalent [Hg(II)]. Encara que l'intestí és la principal porta d'entrada del tòxic a la circulació sistèmica, els estudis sobre la seua toxicitat a nivell intestinal són escassos. L'objectiu de la present tesi ha sigut avaluar la toxicitat i els mecanismes d'acció del Hg(II) i el MeHg a nivell intestinal. Addicionalment, s'ha assajat l'eficàcia de soques de bacteris àcid-làctics (BAL) com a estratègia de reducció d'aquesta toxicitat.

Per als estudis *in vitro* s'ha desenvolupat un model cel·lular en el qual s'han combinat enteròcits, cèl·lules mucosecretors i macròfags en un sistema bicameral. Les cèl·lules s'han exposat des de l'inici a Hg(II) i MeHg (0.1-1 mg/L) durant 10 dies. Les dades han evidenciat que totes dues espècies generen un augment de la resposta inflamatòria, incrementant l'alliberament de la citocina IL-8 i IL-1 β , i una resposta pro-oxidant, amb un augment de les espècies reactives d'oxigen/nitrogen (ROS/RNS) i una sobreexpressió de proteïnes d'estrès (HSP70, HSP90 i MT2A). Aquesta resposta ha sigut més notable en macròfags, indicant que possiblement són les cèl·lules immunitàries les que governen la resposta al tòxic. La situació d'estrès va acompanyada d'una alteració de l'expressió de la proteïna de les unions estretes ZO-1 i una modificació de la morfologia de la monocapa. A més, l'exposició, principalment a MeHg, genera un augment de la secreció de mucus i una sobreexpressió de la seua principal mucina. Els mecanismes d'aquesta hipersecreció podrien estar relacionats amb la ruta IL4/IL13/STAT6. Tots aquests efectes sobre la monocapa epitelial comporten un augment de la permeabilitat i una reducció de la capacitat de regeneració.

En els assajos *in vivo* s'han exposat ratolins BALB/c a Hg(II) i MeHg (1-10 mg/L) durant 4 mesos a través de l'aigua de beguda. Les dades obtingudes han confirmat l'observat *in vitro*. L'exposició a totes dues espècies (especialment a 5 i 10 mg/L) indueix un procés inflamatori en el còlon, amb un augment de les

Resum

citocines TNF- α i IL1- β i la presència d'infiltrats de neutròfils. Paral·lelament, l'exposició genera estrès oxidatiu amb un increment de les ROS/RNS i els peròxids lipídics. S'ha confirmat *in vivo* la participació en aquesta resposta d'algunes rutes apuntades *in vitro*, en concret p38 MAPK i JNK. A més, també s'evidencien alteracions en l'expressió de proteïnes de les unions i de la mucina MUC2 en el còlon, acompanyada d'una hiperplàsia de les cèl·lules mucosecretors, especialment en els tractaments amb MeHg. En aquests animals hi ha, a més, un augment de l'expressió d'IL13 i IL4, la qual cosa apunta a la participació de la ruta IL4/IL13/STAT6, tal com indicaven els assajos *in vitro*. A més, aquests assajos *in vivo* mostren un efecte de les espècies de Hg sobre el metabolisme de la microbiota intestinal, amb una reducció dels continguts luminals dels àcids grassos de cadena curta (SCFA), encara que els canvis en la composició de microbiota intestinal son mínims. Finalment, els animals tractats presenten un augment de la permeabilitat. Totes les dades obtingudes *in vitro* i *in vivo* posen de manifest que una exposició continuada a Hg(II) i MeHg genera una disrupció de la barrera intestinal.

Els assajos *in vitro* realitzats per a determinar l'eficàcia de les soques de BAL d'origen murí LE1 i LE2 com a estratègia de protecció s'han realitzat coexposant el model cel·lular combinat a Hg(II) o MeHg (1 mg/L) juntament amb les soques durant 7 dies. Les dades obtingudes han mostrat un efecte protector de totes dues soques, amb una reducció de la resposta inflamatòria, l'estrès i els efectes sobre les unions estretes i la producció de mucus. Així mateix, la presència dels bacteris restaura parcialment la permeabilitat i la capacitat de regeneració de les monocapes. Tenint en compte que en aquest estudi les BAL estan inactivades tèrmicament, aquesta protecció s'associa principalment a la seua capacitat de quelació del Hg, encara que no cal descartar que algun component estructural de la paret bacteriana pugui exercir un altre tipus d'efecte beneficiós.

Els assajos *in vivo* per a confirmar l'efecte protector de les BAL s'han realitzat en ratolins BALB/c exposats durant 2 mesos a MeHg (5 mg/L) a través de l'aigua de beguda. Els bacteris, en aquest cas viables, s'han administrat per sonda gàstrica diàriament. Les dades obtingudes en aquest assaig mostren que, encara que els

dues soques redueixen per igual els continguts colònics de MeHg, la reducció dels efectes tòxics és molt més notable amb la soca LE1. S'observen reduccions dels continguts dels mediadors d'inflamació i estrès en el còlon, hi ha una recuperació de l'expressió de proteïnes constituents de les unions estretes i el mucus. Es restableixen els nivells luminals dels metabòlits de la microbiota i es restaura parcialment la permeabilitat intestinal. Els resultats mostren que a més del procés de quelació, la soca LE1 activa la ruta de senyalització Nrf2/Keap1/ARE i la producció de la citocina anti-inflamatòria IL10. Les dades obtingudes *in vitro* i *in vivo* apunten al fet que la soca LE1 podria ser una bona alternativa per a reduir la toxicitat intestinal del Hg; reducció que pot tindre també repercussions beneficioses a nivell sistèmic.

ABSTRACT

The diet is the main route of mercury (Hg) exposure for most of the population. The main Hg forms found in food are methylmercury (MeHg) and divalent inorganic Hg [Hg(II)]. Although the intestine is the main route of entry for Hg into the systemic circulation, studies on its toxicity at the intestinal level are scarce. The main objective of the present thesis has been the evaluation of the toxicity and the mechanisms of action of Hg(II) and MeHg at the intestinal level. Additionally, the efficacy of lactic acid bacteria (LAB) strains as strategies to reduce this toxicity has been tested.

A cell model for *in vitro* studies in which enterocytes, mucosecretory cells and macrophages have been combined in a bicameral system has been developed. Cells have been exposed to Hg(II) and MeHg (0.1-1 mg/L) for 10 days. The data have shown that both species induce an inflammatory response, with an increase in the release of the pro-inflammatory cytokines IL-8 and IL-1 β , and a pro-oxidant response, an increase in reactive oxygen/nitrogen species (ROS/ RNS) and an overexpression of stress proteins (HSP70, HSP90 and MT2A). These effects have been more pronounced in macrophages, suggesting that the immune cells may govern the response to the metal. The situation of stress is accompanied by alterations in the expression of the tight junction protein ZO-1 and changes in the morphology of the intestinal monolayer. In addition, exposure, especially to MeHg, generates an increase in mucus secretion and an overexpression of its main mucin. The mechanisms of this hypersecretion could be related to the IL4/IL13/STAT6 pathway. All these effects on the epithelial monolayer lead to and increased permeability and a reduced regeneration capacity.

In vivo assays have been performed in BALB/c mice exposed to Hg(II) and MeHg (1-10 mg/L) for 4 months through drinking water. The data obtained have confirmed the previous results observed *in vitro*. Exposure to both species (especially at 5 and 10 mg/L) induces an inflammatory process in the colon, with an increase in TNF- α and IL1- β cytokines and the presence of neutrophil

Abstract

infiltrates. In parallel, exposure generates oxidative stress with an increase in ROS/RNS and lipid peroxides. The participation in this response of some signaling pathways targeted *in vitro*, specifically p38 MAPK and JNK, has been confirmed *in vivo*. In addition, alterations in the expression of tight junction proteins and the mucin MUC2 in the colon are also evidenced, accompanied by a hyperplasia of the mucosecretory cells, especially in MeHg treatments. In these animals, there is also an increase in the expression of IL-13 and IL-4 cytokines, which points to the participation of the IL4/IL13/STAT6 pathway, as indicated by the *in vitro* studies. In addition, these *in vivo* assays show an effect of both species on the metabolism of the intestinal microbiota, with a reduction in the luminal contents of short-chain fatty acids (SCFA), although changes in the intestinal microbiota composition are minimal. Finally, the treated animals showed an increase in permeability. All the data obtained *in vitro* and *in vivo* demonstrate that a continued exposure to Hg(II) and MeHg causes a disruption of the intestinal barrier.

The *in vitro* studies carried out to determine the efficacy of the BAL strains of murine origin LE1 and LE2 as a strategy of protection have been performed by co-exposing the combined cell model to Hg(II) or MeHg (1 mg/L) together with the strains for 7 days. The data obtained have shown a protective effect of both strains, with a reduction in the inflammatory response, oxidative stress and the effects on tight junctions and mucus production. In the same way, the presence of both bacteria partially restores the permeability and the regenerative capacity of the monolayers. Bearing in mind that in this study the LABs are heat-inactivated, this protection is mainly associated with their ability to bind Hg, although it cannot be ruled out that some structural components of the bacterial wall may exert another type of beneficial effect.

In vivo assays carry out to confirm the protective effect of LAB have been performed in BALB/c mice exposed for 2 months to MeHg (5 mg/L) through drinking water. The strains of LAB, in this case viable, have been administered daily by gavage. The data obtained show that, although both strains equally reduce

colonic MeHg contents, the reduction of the toxic effects is much more pronounced when LE1 strain is administrated. Reductions in the contents of inflammatory and stress mediators in the colon are observed, together with a recovery in the expression of proteins of the tight junctions and the mucus layer. The luminal levels of microbiota metabolites are restored, and intestinal permeability is partially reestablished. The results show that in addition to the chelation process, LE1 strain activates the Nrf2/Keap1/ARE signaling pathway and the production of the anti-inflammatory cytokine IL10. The data obtained *in vitro* and *in vivo* suggest that LE1 strain could be a good strategy to reduce Hg intestinal toxicity; reduction that can also have beneficial repercussions at a systemic level.

Índice general

Índice de Tablas	XXI
Índice de Figuras	XXIV
Abreviaturas	XXIX
Introducción	1
1. Características generales del mercurio	3
2. Fuentes de emisión de mercurio	4
3. Ciclo del mercurio	5
4. Exposición humana a mercurio	7
5. Toxicocinética del mercurio inorgánico y metilmercurio.....	10
6. Toxicidad del mercurio.....	11
6.1. Mecanismo de acción	12
6.2. Toxicidad gastrointestinal	13
7. Estrategias encaminadas a reducir la toxicidad intestinal.....	15
8. Estructura y fisiología de la mucosa intestinal	17
8.1. Epitelio intestinal.....	18
8.2. Sistema inmunitario intestinal	21
9. Microbiota intestinal.....	24
10. Modelos para el estudio de la toxicidad intestinal.....	25
Objetivos	33
Metodología	37
1. Especies mercuriales.....	39

Índice general

2. Modelos celulares y animales.....	39
2.1. Modelos celulares	39
2.2. Modelos animales	41
3. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de una exposición subcrónica a mercurio inorgánico y metilmercurio sobre el epitelio intestinal	41
3.1. Estudios preliminares para determinar las condiciones de exposición subcrónica a mercurio inorgánico y metilmercurio.....	41
3.2. Evaluación de la toxicidad subcrónica del mercurio inorgánico y metilmercurio	44
4. Evaluación <i>in vivo</i> de la toxicidad subcrónica del mercurio sobre el epitelio intestinal	50
4.1. Tratamiento y recolección de muestras.....	50
4.2. Determinación de la respuesta pro-inflamatoria	50
4.3. Determinación del estrés oxidativo del tejido intestinal	51
4.4. Evaluación de la estructura de la mucosa intestinal.....	53
4.5. Evaluación de rutas de señalización implicadas en la toxicidad intestinal generada por el mercurio.....	54
4.6. Permeabilidad intestinal.....	55
4.7. Evaluación de la composición de la microbiota intestinal	55
4.8. Determinación de los contenidos fecales de ácidos grasos de cadena corta	57
5. Evaluación <i>in vitro</i> de la idoneidad de determinadas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) para reducir la toxicidad intestinal del mercurio.....	59
5.1. Mantenimiento y cultivo de las cepas de BAL	59

5.2. Ensayos para determinar las condiciones de exposición de las células a mercurio en presencia de BAL.....	60
5.3. Condiciones de coexposición del tricultivo a BAL y mercurio	60
6. Evaluación <i>in vivo</i> de la idoneidad de las cepas LE1 y LE2 como estrategias de protección frente a la toxicidad intestinal del mercurio.....	61
7. Extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y cuantificación de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)	62
8. Análisis estadístico	64
Capítulo 1	69
RESULTADOS	73
1. Establecimiento de las condiciones para el tricultivo Caco-2/HT29-MTX/THP-1 y la exposición a mercurio durante tiempos prolongados	73
2. Distribución del mercurio durante el ensayo	77
3. Respuesta pro-oxidante causada por la exposición a mercurio	78
4. Respuesta pro-inflamatoria causada por la exposición a mercurio.....	82
5. Efectos del mercurio sobre la morfología de las uniones estrechas	89
6. Efectos del mercurio en la producción y secreción de mucus	91
7. Efectos del mercurio en la permeabilidad paracelular	93
8. Efectos del mercurio en el proceso de reparación celular	94
DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES	103
Capítulo 2	105
RESULTADOS	108
1. Evaluación de la respuesta pro-inflamatoria en el intestino	108

Índice general

2. Evaluación del estrés oxidativo en el intestino	111
3. Efecto de la exposición a mercurio sobre la fosforilación de la proteína JNK y p38 MAPK.....	114
4. Análisis de la estructura del epitelio intestinal	116
5. Evaluación de la función barrera del intestino.....	120
6. Evaluación de la exposición a mercurio sobre la microbiota intestinal.....	120
7. Análisis del perfil de ácidos grasos de cadena corta.....	125
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES	133
Capítulo 3	135
RESULTADOS	138
1. Optimización de las condiciones de coexposición con mercurio y BAL ..	138
2. Quelación de mercurio por las cepas de BAL	138
3. Efecto de las cepas de BAL sobre la respuesta pro-inflamatoria.....	138
4. Efecto de las cepas de BAL sobre la respuesta pro-oxidante	142
5. Efecto de las cepas de BAL sobre la estructura de la monocapa intestinal	145
6. Efecto de las cepas de BAL sobre la permeabilidad intestinal	149
7. Efecto de las cepas de BAL sobre la regeneración celular	150
DISCUSIÓN.....	152
CONCLUSIONES	154
Capítulo 4	157
RESULTADOS	160
1. Modulación <i>in vivo</i> de la respuesta pro-inflamatoria por las cepas de BAL	160

2. Efecto <i>in vivo</i> de las cepas de BAL sobre la respuesta pro-oxidante.....	162
3. Efecto <i>in vivo</i> de las BAL sobre la estructura de la mucosa intestinal	163
4. Efecto <i>in vivo</i> de las cepas de BAL sobre la permeabilidad intestinal	166
5. Evaluación de las posibles rutas de señalización implicadas en la protección frente a la toxicidad inducida por MeHg.....	167
6. Cambios en el perfil de ácidos grasos de cadena corta en presencia de las cepas BAL	170
DISCUSIÓN.....	172
CONCLUSIONES.....	177
Conclusiones generales.....	179
Referencias bibliográficas.....	183
Anexo.....	203

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies mercuriales mayoritarias en muestras medioambientales y biológicas.	4
Tabla 2. Estudios sobre la toxicidad intestinal del Hg(II) y MeHg llevados a cabo en mamíferos.	29
Tabla 3. Componentes de la reacción de RT.	63
Tabla 4. Oligonucleótidos de origen humano empleados en la presente tesis.	65
Tabla 5. Oligonucleótidos de origen murino empleados en la presente tesis.	67
Tabla 6. Expresión génica de marcadores de diferenciación en monocapas Caco-2/HT29-MTX.	74
Tabla 7. Porcentaje de adherencia de las células THP-1.	76
Tabla 8. Expresión relativa de marcadores de diferenciación en células THP-1.	76
Tabla 9. Expresión relativa de marcadores de estrés en las monocapas Caco-2/HT29-MTX y en los macrófagos THP-1.	81
Tabla 10. Expresión relativa de marcadores pro-inflamatorios en monocapas Caco-2/HT29-MTX y en células THP-1.	85
Tabla 11. Expresión relativa de marcadores de inflamación en macrófagos THP-1 tratados con inhibidores de rutas de señalización.	88
Tabla 12. Expresión relativa de MUC5AC e IL-13 en las monocapas epiteliales Caco-2/HT29-MTX tras la exposición a Hg.	92
Tabla 13. Expresión relativa de las proteínas ZO-1 y OCLN en ratones expuestos a Hg(II) y MeHg durante 4 meses.	116
Tabla 14. Expresión relativa de <i>Muc2</i> , <i>Il13</i> e <i>Il4</i> en ratones expuestos a Hg(II) y MeHg durante 4 meses.	117

Índice de Tablas

Tabla 15. Expresión relativa de marcadores de inflamación en células THP-1.	141
Tabla 16. Expresión relativa de los genes de la metalotioneína 2A y de las proteínas de choque térmico 70 y 90 en monocapas Caco-2/HT29-MTX y en macrófagos THP-1.....	144
Tabla 17. Expresión relativa del gen ZO1, MUC5AC e IL13 en monocapas Caco-2/HT29-MTX.	146
Tabla 18. Expresión génica relativa de las proteínas de las uniones intercelulares OCLN y ZO-1 a nivel colónico.	163
Tabla 19. Expresión génica relativa de los genes involucrados en la secreción de mucina.	165
Tabla 20. Expresión génica relativa de los genes <i>Il10</i> , <i>Il10r2</i> , <i>Nrf2</i> , <i>Hol</i> y <i>Nqo1</i> en colon.	168

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo global biogeoquímico del Hg.7

Figura 2. Estructura de la pared intestinal. 18

Figura 3. Estructura de epitelio en el intestino delgado (A) y en el intestino grueso (B)..... 19

Figura 4. Proteínas de las uniones estrechas presentes en las células del epitelio intestinal.21

Figura 5. Anatomía y fisiología del GALT.23

Figura 6. Diferenciación de células Th efectoras durante la enfermedad inflamatoria intestinal.24

Figura 7. Modelo de tricultivo de células intestinales y células del sistema inmunitario en un sistema bicameral.27

Figura 8. Imágenes de microscopía óptica de monocapas Caco-2/HT29-MTX cultivadas a diferentes concentraciones de SFB (A: 5%, B: 7.5%, C: 10%) tras 10 días de siembra. 73

Figura 9. Imágenes de microscopía óptica de monocapas Caco-2/HT29-MTX.75

Figura 10. Morfología de los núcleos en células THP-1.77

Figura 11. Niveles intracelulares de ROS/RNS en las monocapas Caco-2/HT29-MTX. 79

Figura 12. Niveles intracelulares de ROS/RNS en macrófagos THP-1.80

Figura 13. Liberación de IL-8 al compartimento apical en los cocultivos Caco-2/HT29-MTX o en los tricultivos Caco-2/HT29-MTX/THP-1.....82

Figura 14. Liberación de IL-8 al compartimento basolateral en los cocultivos Caco-2/HT29-MTX o en los tricultivos Caco-2/HT29-MTX/THP-1.83

Figura 15. Liberación de IL-1 β al compartimento basolateral de tricultivos Caco-2/HT29-MTX/THP-1.	84
Figura 16. Representación esquemática de las rutas de señalización en inflamación y estrés.....	86
Figura 17. Inmunolocalización de la proteína ZO-1 y expresión relativa del gen <i>ZOI</i> en monocapas Caco-2/HT29-MTX.	90
Figura 18. Tinción con azul alcian de las monocapas Caco-2/HT29-MTX.....	91
Figura 19. Inmunodetección de la forma fosforilada del factor de transcripción STAT6 en las monocapas Caco-2/HT29-MTX (verde).	92
Figura 20. Efecto de la exposición subcrónica a Hg sobre la permeabilidad celular.	93
Figura 21. Efecto de la exposición subcrónica a Hg sobre la regeneración celular.	95
Figura 22. Porcentaje de cierre de la herida en monocapas Caco-2/HT29-MTX tras 48 h.	96
Figura 23. Contenido de citoquinas pro-inflamatorias en el colon.	109
Figura 24. Contenido de lactoferrina fecal. Niveles de lactoferrina en heces de ratones tratados con Hg(II) y MeHg (0, 1, 5 y 10 mg/L) durante 4 meses.....	109
Figura 25. Imágenes de cortes trasversales de colon teñidos con PAS.	110
Figura 26. Evaluación del estrés oxidativo en el intestino delgado.	112
Figura 27. Evaluación del estrés oxidativo en el colon.	113
Figura 28. Efecto del Hg(II) y MeHg sobre la activación de las proteínas quinasas JNK y p38.....	115
Figura 29. Efecto del Hg(II) y MeHg sobre genes relacionados con la síntesis y secreción de la capa de mucus colónica.	118

Índice de Figuras

Figura 30. Efecto del Hg sobre el número de células caliciformes y la profundidad de las criptas.	119
Figura 31. Niveles de albúmina en heces de ratón.	120
Figura 32. Análisis de la composición de la microbiota en ratones control y expuestos a Hg(II) y MeHg.	122
Figura 33. Análisis de la diversidad beta en ratones control y expuestos a Hg(II) y MeHg.	124
Figura 34. Concentración de SCFA en heces de ratón.	126
Figura 35. Liberación de IL-8 al compartimento basolateral del tricultivo Caco-2/HT29-MTX/THP-1.	139
Figura 36. Niveles intracelulares de ROS/RNS en las monocapas Caco-2/HT29-MTX (A) y en los macrófagos THP-1 (B).	143
Figura 37. Inmunolocalización de la proteína zonula occludens-1 (ZO-1) en las monocapas Caco-2/HT29-MTX.	147
Figura 38. Imágenes de microscopía óptica tras la tinción de azul alcian de las monocapas Caco-2/HT29-MTX.	148
Figura 39. Coeficiente aparente de permeabilidad del LY (P_{app} , A) y resistencia eléctrica transepitelial (RET, B) de las monocapas Caco-2/HT29-MTX.	149
Figura 40. Porcentaje de cierre de herida tras 48 h en monocapas Caco-2/HT29-MTX.	150
Figura 41. Imágenes del proceso de reparación de la herida en monocapas Caco-2/HT29-MTX en ausencia y presencia de BAL.	151
Figura 42. Contenido colónico de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β (A) y TNF- α (B).	161
Figura 43. Niveles tisulares de ROS/RNS (A) y de GSH (B) a nivel colónico.	162

Figura 44. Efecto del tratamiento con MeHg y las cepas LE1 y LE2 en la síntesis y secreción de la capa de mucus colónica. 166

Figura 45. Efecto del tratamiento con MeHg y las cepas LE1 y LE2 sobre la albúmina fecal. 167

Figura 46. Efecto del tratamiento con MeHg y las cepas LE1 y LE2 sobre la activación de la quinasa p38 en tejido colónico. 169

Figura 47. Efecto del tratamiento con MeHg y las cepas LE1 y LE2 sobre el contenido fecal de SCFAs. 171

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
AJ	Unión adherente
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
Ang4	Angiogenina-4
AP-1	Proteína activadora 1
ASVs	Amplicon Sequence Variants
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATSDR	Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades
BAL	Bacterias Ácido-Lácticas
BSA	Albúmina de suero bovino
CLDN1	Claudina 1
CV-AFS	Espectrómetro de fluorescencia atómica
CXCL8	Interleuquina IL-8
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño
DAPI	Diclorhidrato de 4',6'-diamidino-2-fenilindol
DHCF-DA	2',7'-diacetil dihidroclorofluoresceína
DMEM	Eagle modificado de Dubelcco
DMT1	Transportador de cationes divalentes 1
DPP4	Dipeptidil peptidasa 4
DO	Densidad óptica
ECACC	Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético

Lista de abreviaturas

FAE	Epitelio asociado al folículo
FasL	Ligando CD95
FDA	Food and Drug Administration
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
GPCR	Familia de receptores acoplados a la proteína G
GSH	Glutación reducido
GRAS	Generally Recognized as Safe
Grx	Glutaredoxina
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
Hg	Mercurio
Hg(II)	Mercurio inorgánico
Hg ⁰	Mercurio elemental
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HSP90	Proteína de choque térmico 90
IARC	Agencia Internacional de la Investigación sobre el Cáncer
IBD	Patología intestinal inflamatoria crónica
IL-1RN	Receptor de la citoquina IL-1
JNK o SAPK	Quinasa c-Jun NH2-terminal
LP	Lámina Propia
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
LY	Lucifer Yellow
M1	Fenotipo pro-inflamatorio
XXX	

M2	Fenotipo anti-inflamatorio
MDA	Malondialdehído
MeHg	Metilmercurio
MEM	Medio Esencial Mínimo
MEM-10% SFB	Medio Esencial Mínimo suplementado con suero fetal bovino al 10%
MEM-7.5% SFB	Medio Esencial Mínimo suplementado con suero fetal bovino al 7.5%
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófagos 2
MLN	Ganglios linfáticos mesentéricos
MMP-7	Metaloproteinasa-7
MRS	Medio de Man, Rogosa y Sharpe
MT2A	Metalotioneína 2 ^a
MUC5AC	Mucina 5AC
NAC	N-acetilcisteína
NQO1	NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1
OMS	Organización Mundial de Salud
OPT	Orto-ftalaldehído
p38 MAPK	Proteína quinasa p38 activada por mitógenos
PAF	Paraformaldehído
P _{app}	Permeabilidad aparente
PBS	Tampón fosfato salino
PMA	12-miristato 13-acetato de forbol
PP	Placa de Peyer
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

Lista de abreviaturas

QPS	Qualified Presumption of Safety
RET	Resistencia Eléctrica Transepitelial
ROS/RNS	Especies Reactivas del Oxígeno y/o Nitrógeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RPMI-10% SFB	Medio Roswell Park Memorial Institute suplementado con suero fetal bovino al 10%
RT	Retrotranscripción
SCFA	Ácidos Grasos de Cadena Corta
SDS	Dodecilsulfato sódico
SED	Cúpula subepitelial asociada
SFB	Suero Fetal Bovino
SH	Grupo tiol
SOD	Superóxido dismutasa
TA	Ácido teicoico
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TJ	Unión estrecha
TLR	Receptor tipo Toll
Tr1	Células T productoras de IL-10
Treg	Células T reguladoras
Trx	Tioredoxina
UAF	Unidades Arbitrarias de Fluorescencia
USEPA	Agencia Estadounidense de Medioambiente
ZO-1	Proteína zonula occludens 1

Introducción

1. Características generales del mercurio

El mercurio (Hg) es un metal pesado con una densidad de 13.534 g/cm³. Su símbolo químico, Hg, deriva del griego “hydrargyros” que significa “agua plateada” (Clifton, 2007). Este elemento pertenece a los metales de transición (grupo XII) y posee siete isótopos estables y cuatro radioactivos con un periodo de desintegración relativamente largo, entre 46 días y 444 años.

El Hg puede encontrarse en tres estados de oxidación estables: mercurio elemental [Hg⁰/Hg(0)], ion mercurioso [Hg₂⁺/Hg(I)] e ion mercúrico [Hg²⁺/Hg(II)] (Tabla 1) (EFSA, 2012). El Hg elemental es la única especie metálica líquida a temperatura y presión ambiental. Debido a su alta presión de vapor (163 × 10⁻³ Pa) evapora fácilmente a temperatura ambiente, de ahí que sea la forma mayoritaria en la atmósfera. Esta forma elemental, es poco soluble en agua (60 µg/L a 25°C) pero se disuelve muy bien en disolventes apolares (Marsh et al., 2016).

El Hg inorgánico se encuentra principalmente como sulfuro (HgS), óxido (HgO) o cloruro de mercurio (HgCl₂). En los compuestos orgánicos el átomo de Hg está unido a uno o dos grupos alquil o aril. Las principales especies orgánicas son el metilmercurio (MeHg), dimetilmercurio, etilmercurio y fenilmercurio, siendo el MeHg la especie más abundante en el medioambiente (Tabla 1) (EFSA, 2012). Tanto las formas orgánicas como las inorgánicas poseen una elevada afinidad por una amplia variedad de ligandos, especialmente aquellos que contienen grupos sulfuro.

Tabla 1. Especies mercuriales mayoritarias en muestras medioambientales y biológicas (EFSA, 2012).

	Especie	Fórmula
Mercurio elemental	Hg(0)	Hg ⁰
Formas inorgánicas	Ion mercurioso	Hg ⁺
	Ion mercúrico	Hg ²⁺
Formas orgánicas	Metilmercurio	CH ₃ Hg ⁺
	Dimetilmercurio	(CH ₃) ₂ Hg
	Etilmercurio	CH ₃ CH ₂ Hg ⁺
	Fenilmercurio	C ₆ H ₅ Hg ⁺

2. Fuentes de emisión de mercurio

El Hg forma parte de la corteza terrestre y está presente en el aire, agua, suelos y sedimentos acuáticos debido a procesos naturales (actividad volcánica y erosión de las rocas) o a la actividad antropogénica (Davidson et al., 2004). Se estima que la proporción de Hg procedente de fuentes geológicas primarias es menor que el emitido por la actividad humana (70% aproximadamente) (Davidson et al., 2004; Raj & Maiti, 2019). Los datos más recientes estiman que las emisiones antropogénicas suponen una media de 2200 toneladas/año de Hg (UN, 2018). La combustión del carbón en centrales eléctricas, seguido de la incineración de residuos y de la extracción minera de Hg, oro y otros metales, movilizan grandes cantidades de Hg, que llega finalmente a la atmósfera, los océanos y los sistemas terrestres (Selin, 2009). Por otro lado, la incorporación de Hg en productos como lámparas, baterías o instrumentación, además de su uso en las amalgamas dentales, suponen otra fuente importante de emisión de Hg de forma intencionada (UN, 2018).

Las emisiones de Hg a la atmósfera han ido cambiando a lo largo del tiempo. En un principio, la minería del oro y la plata suponía la mayor fuente de emisión y los niveles eran relativamente bajos. A partir de la revolución industrial y, por consiguiente, del auge de los combustibles fósiles, las emisiones de Hg se fueron incrementado a lo largo de los años. Actualmente, las emisiones siguen siendo elevadas y suponen un grave problema de contaminación a escala global. Existe una creciente preocupación por el riesgo que esta contaminación puede tener sobre la salud humana y la fauna silvestre (UN, 2018). La Unión Europea elaboró en el año 2005 una estrategia destinada a reducir la exposición al metal (Comisión de las Comunidades Europeas, 2005), cuyos principales objetivos eran: reducir las emisiones de Hg, restringir la oferta y la demanda y gestionar las cantidades ya almacenadas. La UE ha elaborado directivas limitando o reduciendo el uso de mercurio en productos (Directiva 2005/32/CE; Directiva 2006/66/CE) o procesos industriales (Directiva 2010/75/UE). Desde el 10 de abril de 2014 está prohibida la comercialización de tensiómetros, barómetros, higrómetros, manómetros, esfigmomanómetros y termómetros con Hg (Reglamento 847/2012).

3. Ciclo del mercurio

La especiación de Hg es clave en su toxicidad y esta varía dependiendo de una serie de procesos bióticos y abióticos que ocurren en el medio ambiente (Figura 1). El Hg^0 es la forma predominante en la atmósfera, donde puede permanecer entre 6 y 12 meses (Lin y Pehkonen, 1999). Esta forma mercurial es fotoquímicamente oxidada de manera progresiva a Hg inorgánico [Hg(II)] por acción de oxidantes presentes en la atmósfera como el ozono. El Hg(II) tiene un tiempo de residencia en la atmósfera mucho más corto, ya que puede disolverse en agua o adsorberse a partículas en suspensión y acabar siendo depositado en suelos y aguas por precipitación o deposición seca (Selin, 2009). La mayor parte del Hg(II) depositado en el suelo se encuentra asociado a materia orgánica, donde se une fuertemente a grupos tiol (SH). Una fracción de Hg(II) depositada en los

suelos o en el agua puede reducirse de nuevo a Hg^0 mediante procesos biológicos o fotoquímicos, volatilizándose a la atmósfera (5% – 60%), o bien puede convertirse a MeHg mediante metilación (Hintelmann et al., 2002; Selin, 2009).

La metilación de Hg(II) a MeHg es un proceso biológico llevado a cabo por bacterias sulfatoreductoras (SRB) y ferreductoras (FeRB) que tiene lugar principalmente en los humedales y en los sedimentos (Bravo y Cosio, 2020). Esta metilación depende de una serie de factores como la composición y estructura de los sedimentos, y las fuentes de carbono y azufre disponibles (Gilmour et al., 1992). Las bacterias metiladoras de Hg presentan en su genoma dos genes (*hgcA* y *hgcB*) responsables de la conversión de Hg(II) a MeHg. El gen *hgcA* codifica una proteína que transfiere un grupo metilo al Hg(II) y posee un dominio transmembrana que podría estar relacionado con la captación de Hg(II) y/o con la liberación de MeHg del interior celular. El gen *hgcB* codifica un tipo de las denominadas proteínas hierro-azufre que cede electrones a la proteína HgcA, etapa necesaria para mantener el ciclo de metilación/desmetilación. Es posible que además de esta función, el gen *hgcB* participe en la transferencia de Hg(II) a la proteína HgcA (Regnell y Watras, 2019). La formación de MeHg es un proceso relevante desde el punto de vista toxicológico ya que éste se bioacumula y biomagnifica a lo largo de la cadena trófica marina, de modo que determinados organismos marinos y los alimentos derivados de los mismos presentan contenidos elevados de esta especie mercurial (Finley et al., 2016; Harding et al., 2018).

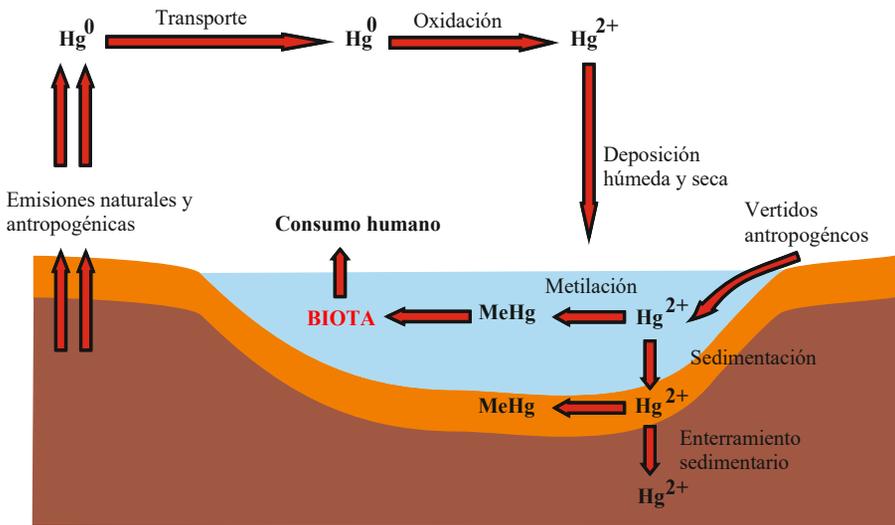


Figura 1. Ciclo global biogeoquímico del Hg.

4. Exposición humana a mercurio

El ser humano está expuesto a Hg a través de múltiples vías debido a la diversidad de usos del metal y a las diferentes formas en las que podemos encontrarlo en la naturaleza (EPA, 2022). La exposición humana a Hg^0 puede producirse por inhalación, aunque se trata de casos puntuales relacionados principalmente con trabajadores de la minería (Risher et al., 2003) o a través de las amalgamas dentales (Mutter et al., 2004).

La principal vía de exposición para la mayoría de la población es la dietaria, donde se puede encontrar como $Hg(II)$ o MeHg. La principal fuente de exposición a MeHg son los productos pesqueros (Driscoll et al., 2013). El contenido de MeHg varía en función del nivel trófico, siendo mayor en los grandes depredadores marinos como el pez espada, el tiburón o el atún (EFSA, 2012). Varios estudios han mostrado que los niveles de MeHg en estos peces [hasta 2.34 mg/kg de peso húmedo (ph)] (Forsyth et al., 2004; Torres-Escribano et al., 2010) pueden exceder los límites máximos legislados (1 mg/kg, Comisión Reguladora No, 1881/2006).

Los alimentos que presentan mayores contenidos de Hg(II) son los productos vegetales, especialmente algunos tipos de setas. En Europa no hay legislación al respecto, en cambio China limita el contenido de Hg en este producto alimentario a 0.1 mg/kg ph, lo que equivale a 1 mg/kg peso seco (ps) (Health, 2012). Se han encontrado concentraciones muy superiores (10.3 ± 2.6 mg/kg ps) en setas recolectadas en el sur de España (Ostos et al., 2015). Kalač y Svoboda (2000), también encontraron valores elevados (> 1 mg/kg ps) en muestras de *Boletus*, *Agaricus*, *Lepista* y *Macrolepiota*. Aunque los niveles de Hg(II) son más elevados en setas, las principales fuentes dietarias de la forma inorgánica son los productos pesqueros anteriormente mencionados, donde puede suponer hasta un 20% del Hg total (EFSA, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una ingesta máxima recomendable para ambas formas mercuriales que no debe superarse para evitar la aparición de efectos adversos [MeHg: 1.6 μ g/kg peso corporal (pc); Hg(II): 4 μ g/kg pc] (JECFA, 2006). Además, las agencias nacionales relacionadas con la salud han establecido recomendaciones de consumo de productos pesqueros en poblaciones consideradas susceptibles (niños, mujeres embarazadas o en periodo de lactancia) (AESAN, 2019), para evitar una ingesta excesiva de MeHg, conocido neurotóxico durante el desarrollo.

La exposición humana a Hg a través de la dieta puede en algunos casos superar los valores de ingesta recomendados. Se han estimado ingestas que superan estos valores en poblaciones del Mediterráneo con un elevado consumo de productos pesqueros (hasta 3.23 μ g/kg pc) (Buzina et al., 1995; Storelli et al., 2005). La ingesta semanal de la población japonesa es muy superior, oscila entre 0.38 y 6.79 μ g/kg pc, debido posiblemente al elevado consumo de grandes depredadores marinos como el tiburón (Iwasaki et al., 2003).

La elevada exposición a Hg también se ha evidenciado a través de la evaluación de biomarcadores, principalmente de pelo y sangre. La Agencia Estadounidense de Medioambiente (USEPA) y la OMS dan valores guía de Hg en pelo de 1.2 y

1.8 $\mu\text{g/g}$ respectivamente (EPA, 1997; UNEP, 1990). Los estudios de exposición basados en biomarcadores muestran poblaciones con niveles superiores. Así, se han reportado elevadas concentraciones de Hg en el pelo de poblaciones que habitan diversas zonas amazónicas donde existe una importante minería a pequeña escala. En zonas de Colombia cercanas al río Caqueta (17.3 $\mu\text{g/g}$) (Olivero-Verbel et al., 2016) o al río Apaporis (23 $\mu\text{g/g}$) (Valdelamar-Villegas y Olivero-Verbel, 2020) y en las poblaciones brasileñas de Yanomami (15.5 $\mu\text{g/g}$) y Parabara (27.6 $\mu\text{g/g}$) (Olivero-Verbel et al., 2021), los contenidos de Hg en pelo son un orden de magnitud superiores a los valores de referencia. Aunque parte del Hg presente en el pelo puede tener un origen no dietario, se han reportado, en los pescados de agua dulce que suponen la base alimentaria de estas poblaciones, niveles de Hg que están por encima de los límites legislados (1.0 – 2.3 mg/kg) (Hacon et al., 2020).

Los valores elevados en biomarcadores también se han puesto de manifiesto en poblaciones donde no existe actividad minera. Sheehan et al. (2014) en una revisión de 164 estudios sobre la exposición a mercurio en mujeres y sus bebés, evidencian que los valores más elevados de Hg en los biomarcadores se presentan en poblaciones con dietas basadas en productos pesqueros, principalmente poblaciones ribereñas tropicales y poblaciones indígenas del Ártico. Estos autores también destacan los valores de los biomarcadores encontrados en las regiones costeras del Asia sudoriental, el Pacífico occidental y el Mediterráneo, cuyo promedio se aproxima a los valores de referencia. Varios estudios llevados a cabo en la población infantil española muestran también niveles de Hg en pelo superiores a los recomendados, que nuevamente se atribuyen al consumo de productos pesqueros (Freire et al., 2010; Soler-Blasco et al., 2019).

Estos datos de exposición muestran que existen poblaciones expuestas a niveles de Hg a través de la dieta, principalmente de MeHg, superiores a los recomendados y que, por tanto, es necesario tomar medidas que tengan como objetivo reducir esta exposición. En muchas ocasiones, la eliminación de la fuente de exposición de la dieta no es sencilla o posible, debido a que estos alimentos son

la base de la dieta de poblaciones, como en zonas de la Amazonia, o bien por tratarse de alimentos que aportan una gran cantidad de nutrientes, incluyendo compuestos beneficiosos para la salud humana.

5. Toxicocinética del mercurio inorgánico y metilmercurio

Tras la ingesta, las formas mercuriales se absorben principalmente en el duodeno. La absorción del MeHg es casi completa, tanto si se vehicula a través del agua como si se ingiere con los alimentos (Bradley et al., 2017). Sin embargo, la forma inorgánica tiene una baja absorción (5 - 15%) (Piotrowski et al., 1992).

Durante su tránsito a través del tracto digestivo, las formas mercuriales pueden formar complejos con compuestos con grupos SH como el glutatión reducido (GSH) o la cisteína. Estos complejos atraviesan la membrana apical del epitelio intestinal a través de transportadores de aminoácidos dada su similitud con aminoácidos como la cisteína o la metionina (Vázquez et al., 2014a; Vázquez et al., 2015a). Cuando están formando sales de cloruro o nitrato presentan formas de transporte distintas. Se ha descrito que el Hg(II) puede emplear el transportador de cationes divalentes DMT1 (Vázquez et al., 2015b). Por otro lado, el MeHg, debido a su carácter lipofílico, puede atravesar el lado apical y basolateral del epitelio por simple difusión pasiva (Vázquez et al., 2014a). La acumulación de ambas especies Hg en el intestino se ha reportado previamente en ratones dosificados mediante sonda gástrica con Hg(II) y MeHg (0.5 mg/kg pc) [Hg(II), 108 ng/g; MeHg, 663 ng/g] siendo uno de los órganos que presenta una mayor acumulación (Jadán-Piedra, 2017). Esta acumulación puede suponer la activación de una serie de mecanismos de toxicidad que no han sido estudiados con detalle hasta el momento.

Tras su ingreso en la circulación sistémica, el Hg(II) se acumula principalmente en el hígado y los riñones, en concreto, en los túbulos contorneados proximales (Park y Zheng, 2012), mientras que el MeHg presenta una mayor acumulación en el cerebro e hígado y, en menor medida, en los riñones (Bridges y Zalups, 2010). El Hg(II) no atraviesa la barrera hematoencefálica, pero se acumula en la placenta,

el líquido amniótico y otros tejidos fetales (Bernhoft, 2012). El MeHg, sin embargo, puede atravesar eficientemente la barrera hematoencefálica, de ahí su potente efecto neurotóxico (Jackson, 2018).

La excreción del MeHg se produce principalmente en las heces en forma de Hg(II). Esta excreción es el resultado de la eliminación biliar del compuesto (Norseth y Clarkson, 1971) y su posterior conversión a la forma inorgánica por la microbiota intestinal (Seko et al., 1981). Parte del MeHg excretado en la bilis también puede reabsorberse ingresando así en la circulación enterohepática. La excreción de MeHg es lenta, lo que da como resultado una vida media biológica en humanos de aproximadamente 50 días (Rand y Caito, 2019). Es interesante destacar el importante papel de la microbiota intestinal en la detoxificación del MeHg. Hasta la fecha se han descrito dos mecanismos de desmetilación. En la desmetilación reductiva interviene una organomercurio liasa codificada por el gen *merB* que cataliza la escisión del enlace C-Hg del MeHg, dando lugar a una molécula de metano (CH₄) y Hg(II). La desmetilación oxidativa, se considera la principal vía de degradación del MeHg en condiciones anaerobias, y da lugar a CO₂ y Hg(II) (Li et al., 2019).

Las sales inorgánicas de Hg se excretan principalmente en las heces, debido a su baja absorción, y a través de la orina. La tasa de excreción es bifásica y dependiente de la dosis, con una fase inicial de excreción rápida seguida de una más lenta. La vida media biológica del Hg(II) se estima en unos 60 días (Park y Zheng, 2012).

6. Toxicidad del mercurio

Todas las formas mercuriales inducen efectos tóxicos en mamíferos, sin embargo, difieren en el grado de toxicidad y en los efectos que generan (Bjørklund et al., 2017). De hecho, la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) cataloga el Hg como el tercer metal más tóxico después del arsénico (As) y el plomo (Pb) (Risher, 1999). Además, el MeHg está catalogado como

posible carcinogénico por la Agencia Internacional de la Investigación sobre el Cáncer (IARC) (IARC, 1993).

El Hg(II) es un importante nefrotóxico, que afecta principalmente a las células epiteliales del túbulo contorneado proximal (Bridges y Zalups, 2017). A nivel clínico, los pacientes con daño renal causado por Hg(II) muestran edemas, cambios en el volumen de orina, proteinuria y/o síndrome nefrítico (Gao et al., 2022). Por su parte, la exposición prolongada a MeHg causa daños importantes en el sistema nervioso, siendo el cerebro, en concreto los córtex cerebral y cerebelar, las principales dianas de esta especie mercurial (Jackson, 2018). En el adulto, los principales efectos incluyen alteraciones motoras y disfunción sensorial (EFSA, 2012). En cuanto a los efectos en la población infantil, se han realizado tres estudios epidemiológicos prospectivos en las Islas Seychelles, Nueva Zelanda y las Islas Feroe para evaluar el efecto de una exposición fetal a MeHg por consumo frecuente de productos pesqueros. En el estudio de las Islas Seychelles no se reportaron efectos adversos en niños de 2 años (Shamlaye et al., 1995), pero los niños de las Islas Feroe mostraron déficits sutiles de la memoria, la atención y el lenguaje a los 7 y 14 años (Grandjean et al., 1997). En el estudio prospectivo de Nueva Zelanda, los niños de 4 a 6 años también presentaron deficiencias en una serie de pruebas neuropsicológicas (Kjellström et al., 1989).

6.1. Mecanismo de acción

Los mecanismos de toxicidad más descritos para el Hg están relacionados con su afinidad por grupos SH y selenol (-SeH). Debido a su carácter electrofílico, las formas mercuriales interactúan con (y oxidan) estos grupos nucleófilos presentes en proteínas o moléculas de bajo peso molecular como el GSH o algunos aminoácidos.

La afinidad del Hg por los grupos SH es mucho mayor que la de otros metales como el cadmio (Cd), el As o el Pb (Bjørklund et al., 2019). Se ha descrito que la unión del MeHg o el Hg(II) a residuos de cisteína de algunos enzimas tiene como

resultado la inhibición de su actividad. Este hecho se ha descrito para enzimas que forman parte de la maquinaria antioxidante como la superóxido dismutasa (SOD) o la glutatión reductasa (GR) (Ajsuvakova et al., 2020). Adicionalmente, su unión directa al GSH o su efecto inhibitorio sobre enzimas responsables de la síntesis de este tripéptido o su conjugación a xenobióticos también reduce la disponibilidad del principal antioxidante endógeno (Farina y Aschner, 2019). Esto contribuye al desequilibrio redox descrito en las exposiciones a Hg en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

El Hg tiene una mayor afinidad por las proteínas que contienen SeH que por las que presentan grupos SH, con las cuales forma complejos muy estables (Spiller, 2018). Cuando existen niveles elevados de Hg, su unión al Se intracelular da lugar a complejos insolubles Hg-Se, MeHg-Se o Hg-Se-Cys reduciendo la disponibilidad del Se, elemento constituyente de enzimas pertenecientes a determinados sistemas antioxidantes como el de la tioredoxina (Trx) o el de la glutaredoxina (Grx) (Spiller, 2018). De hecho, se ha puesto de manifiesto que la suplementación con Se restaura la actividad de la Trx reductasa 1 (Branco et al., 2014).

6.2. Toxicidad gastrointestinal

A pesar de que la dieta es la principal ruta de exposición a Hg en el ser humano y que el tracto gastrointestinal es la principal vía de entrada de este metal en la circulación sistémica, los estudios sobre la toxicidad intestinal del Hg en mamíferos son muy limitados, especialmente en lo que al MeHg se refiere. La Tabla 2 muestra los estudios *in vivo* existentes hasta el momento. En general, la mayor parte de las exposiciones llevadas a cabo son agudas y a dosis muy elevadas. Además, en la mayoría de los casos, se emplea una dosificación a través de sonda gástrica o jeringa. En estos estudios se muestra un efecto sobre el intestino delgado y grueso, especialmente a través de estudios histológicos. Los artículos más recientes muestran además una alteración de la microbiota intestinal. El tipo de exposición realizada en la mayoría de los estudios no refleja lo que

realmente ocurre en las poblaciones expuestas, donde existe una exposición continuada a través de la dieta.

Los estudios *in vitro* realizados empleando la línea celular Caco-2, modelo de enterocito, han mostrado que una exposición aguda (4-24 h) a Hg(II) y MeHg genera una respuesta pro-oxidante, conjuntamente con una alteración de la expresión y distribución de algunas proteínas de las uniones intercelulares y una disrupción de la función barrera de la monocapa celular (Vázquez et al., 2014b). Estos ensayos en modelos celulares permiten evaluar los mecanismos de acción del tóxico, cuyo análisis en modelos animales resulta más complicado. Sin embargo, al igual que ocurre con las investigaciones *in vivo*, estos ensayos se han llevado a cabo a tiempos cortos y concentraciones no relevantes desde el punto de vista medioambiental.

El estudio de la toxicidad intestinal de contaminantes dietarios ha experimentado un importante auge en la última década. Esto en parte es debido a la asociación que ha empezado a establecerse entre la pérdida de la continuidad del epitelio, la disrupción de la barrera o de alguno de sus componentes y el desarrollo de patologías a nivel sistémico (Camara-Lemarroy et al., 2020; Yang et al., 2018). La endotoxemia metabólica o inflamación sistémica moderada consecuencia de la entrada a la circulación sistémica de endotoxinas, debido a la alteración de la barrera intestinal, se ha asociado con patologías con base inflamatoria (Erridge et al., 2007; Ghanim et al., 2009). Además, determinados componentes de la dieta pueden alterar otros órganos a través de ejes como el de intestino-sistema nervioso (Oriach et al., 2016) o intestino-hígado (Sellmann et al., 2015). El estudio de la posible relación tóxico-intestino-órgano diana abre nuevas líneas de investigación que pueden esclarecer los mecanismos de acción de algunos tóxicos alimentarios y también identificar con mayor certeza las medidas que deben tomarse para reducir el riesgo asociado a la exposición.

7. Estrategias encaminadas a reducir la toxicidad intestinal

La disfunción de la barrera es el resultado de una compleja interacción entre diferentes células y moléculas de señalización en el intestino, que da lugar a una alteración de las uniones intercelulares epiteliales, y a un mayor paso de diferentes moléculas a través de un espacio intercelular menos selectivo y más abierto (Lechuga y Ivanov, 2017). Patologías intestinales inflamatorias crónicas (IBD) como la colitis ulcerosa o el síndrome de Crohn cursan con una elevada permeabilidad intestinal. Además, se han relacionado con desórdenes metabólicos (Desreumaux et al., 1999) y del sistema nervioso central (de Lau et al., 2008). De ahí, que en los últimos años se hayan realizado un gran número de investigaciones encaminadas a identificar posibles estrategias que permitan reducir la disrupción de la barrera intestinal.

De entre todas las estrategias evaluadas, el uso de bacterias ácido-lácticas (BAL) puede que sea una de las que mayor atención han suscitado (Marlicz et al., 2021). Numerosos miembros de la familia Lactobacillaceae están reconocidos como microorganismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (Food and Drug Administration) y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por la European Food Security Authority (EFSA). Su empleo en alimentos está altamente extendido (De Angelis y Gobbetti, 2016) y muchas especies son usadas habitualmente como probióticos para el tratamiento/prevención de diversas patologías.

Los ensayos *in vitro* muestran la capacidad de algunas cepas de BAL para reducir los procesos inflamatorios, incluso para mantener la permeabilidad en modelos celulares de epitelio donde se induce la disrupción de la barrera con mediadores de inflamación (Zeng et al., 2016). Sin embargo, los estudios *in vivo*, especialmente en poblaciones afectadas, muestran resultados variados. Por ejemplo, el análisis de los ensayos clínicos aleatorizados existentes hasta el momento, apunta a las BAL como una buena alternativa para reducir los síntomas globales y el dolor abdominal de los pacientes con síndrome del colon irritable

(Marlicz et al., 2021). Sin embargo, los estudios existentes para otros desórdenes intestinales, como la enfermedad de Crohn (Lichtenstein et al., 2016) y la colitis ulcerosa (Kaur et al., 2020) no son tan concluyentes, aunque en algunos casos si muestran cierto grado de remisión.

El uso de BAL para reducir la toxicidad de Hg se ha aplicado principalmente para modular los procesos de absorción intestinal y acumulación tisular, debido a su capacidad para quelar Hg(II) y MeHg (Alcántara et al., 2017; Kinoshita et al., 2013). La superficie de las BAL está formada por compuestos (peptidoglicanos, ácidos teicoicos, proteínas y polisacáridos) con grupos funcionales cargados negativamente, lo que favorece su unión a metales catiónicos (Chiocchetti et al., 2019). Jadán-Piedra et al. (2019) han mostrado como cepas de las especies *Lactocaseibacillus paracasei* o *Lactobacillus acidophilus* (5×10^8 UFC, unidades formadoras de colonias) reducen la biodisponibilidad de MeHg en ratones tras la administración conjunta por sonda gástrica del MeHg/cepa bacteriana, no obstante, no se observan cambios en la acumulación tisular tras 5 días de exposición. Majlesi et al. (2017), sin embargo, evidencian que la administración oral de una cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* (1×10^9 UFC) junto con esporas de una cepa de *Bacillus subtilis* reduce la acumulación de Hg en el hígado y los riñones de ratas expuestas a Hg(II) (10 mg/L) a través del agua durante 48 h.

La quelación de Hg por parte de las bacterias puede favorecer la actividad protectora frente al tóxico, ya que una menor cantidad del Hg está disponible para acumularse en los órganos, pero adicionalmente pueden coexistir otros mecanismos relacionadas con la capacidad antioxidante/antiinflamatoria de las BAL. Un único trabajo *in vivo* muestra este efecto protector; Jiang et al. (2018) evidencian la reducción del daño intestinal producido por una exposición aguda a Hg(II) en ratones tras la dosificación de una cepa de *Levilactobacillus brevis*. Todos los estudios descritos en este apartado sugieren que el uso de LAB para reducir los daños asociados a una exposición continuada a Hg podría ser una alternativa viable. Sin embargo, hay que indicar que en ninguna de las

investigaciones mencionadas con anterioridad se realizan ensayos dosificando MeHg, que es la forma mercurial predominante en la dieta.

A nivel poblacional, los escasos estudios que existen solamente analizan el efecto de la administración de BAL sobre el contenido de Hg en suero sanguíneo (Bisanz et al., 2014) y en heces (Astolfi et al., 2019), aunque los resultados no son prometedores. Sin embargo, cabe resaltar que estas escasas pruebas en humanos presentan ciertas limitaciones, como el bajo número de sujetos involucrados en los ensayos o el bajo nivel de exposición a Hg de estos.

8. Estructura y fisiología de la mucosa intestinal

Para entender mejor la importancia toxicológica de la acción de cualquier contaminante alimentario sobre el tracto gastrointestinal y sus posibles repercusiones sistémicas, es necesario conocer el papel que desempeñan los distintos componentes de la barrera intestinal en el mantenimiento de la homeostasis y el efecto de sus interacciones con el entorno. El intestino es una estructura tubular muscular que se extiende desde la parte distal del estómago hasta el ano. Se divide en intestino delgado y grueso, cada uno de ellos divididos a su vez en diferentes partes. El intestino delgado está formado por el duodeno, el yeyuno y el íleon, y el intestino grueso se divide en ciego, colon y recto. La pared del intestino (Figura 2) está formada por diferentes capas: la mucosa (epitelio, lamina propia y muscular de la mucosa), submucosa, muscularis propia (capa muscular circular interna, espacio intermuscular, capa muscular longitudinal externa) y serosa.

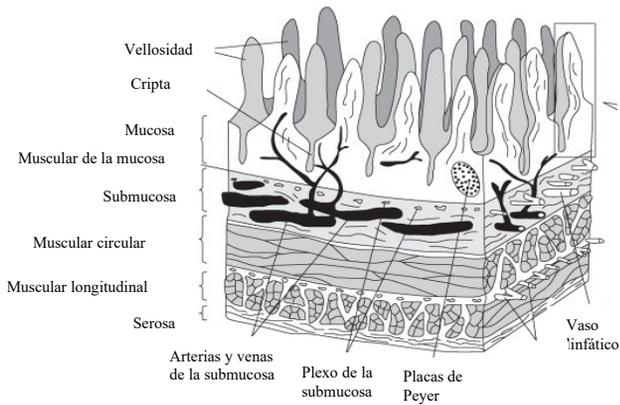


Figura 2. Estructura de la pared intestinal. Imagen modificada de Caballero (2005).

8.1. Epitelio intestinal

La mucosa, la capa más externa de la pared intestinal, está formada por una capa de células epiteliales y un sistema inmune asociado. El epitelio constituye una barrera dinámica, permeable y selectiva para la absorción de nutrientes, agua y electrolitos procedentes de la dieta. Además, impide el paso de patógenos y de antígenos presentes en los alimentos (Luissint et al., 2016). No es únicamente una barrera física inerte, el secretoma de sus distintos tipos celulares y la intercomunicación entre estas células, el microbioma y las células inmunitarias, convierte a esta barrera en un componente esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal.

La arquitectura del epitelio intestinal varía entre el intestino delgado y el grueso (Figura 3). El epitelio del intestino delgado forma invaginaciones tubulares (criptas de Lieberkühn) y prolongaciones hacia el lumen (vellosidades) (Peterson y Artis, 2014). Estas vellosidades están ausentes en el colon, lo que da como resultado una superficie mucosa relativamente plana (Figura 3). En la parte basal de las criptas se encuentran las células madre epiteliales, de 4 a 6 por cripta. Estas células son las progenitoras de los distintos tipos celulares del epitelio: enterocitos, células mucosecretoras o caliciformes, células enteroendocrinas, células de

Paneth, células Tuft y células M (de Santa Barbara et al., 2003). Las células menos diferenciadas se encuentran en la parte basal, cercana a las criptas, mientras que las más diferenciadas se encuentran en la parte apical, con excepción de las células de Paneth que se localizan siempre en la parte basal, al lado de las células madre. También existen diferencias en cuanto a la composición celular en ambas porciones del intestino. Algunos tipos celulares son exclusivos del intestino delgado, como las células de Paneth y las células M (Allaire et al., 2018). Además, las proporciones de las células mayoritarias y los subconjuntos de células enteroendocrinas varían dependiendo del tramo intestinal que se considere (Mowat y Agace, 2014).

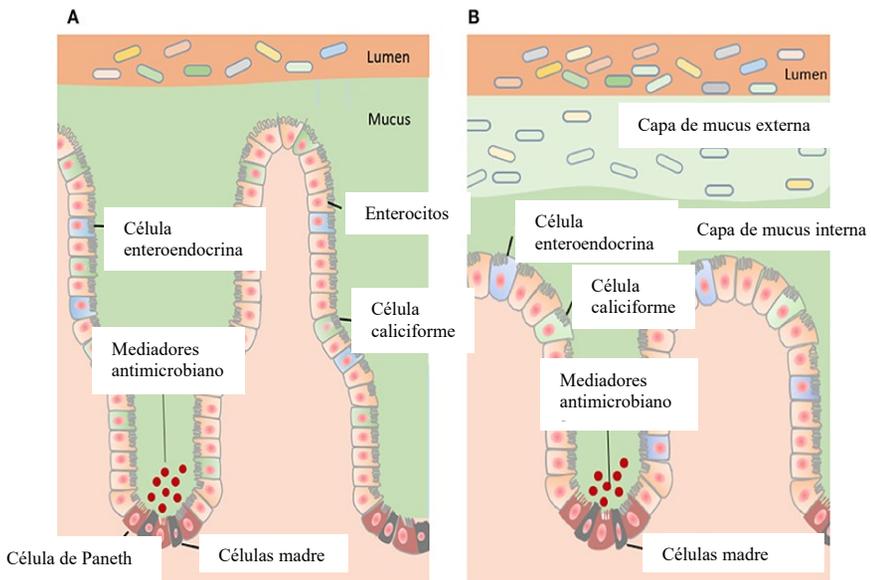


Figura 3. Estructura de epitelio en el intestino delgado (A) y en el intestino grueso (B). Imagen adaptada de Herath et al. (2020).

Los enterocitos son el tipo celular mayoritario, su proporción disminuye desde el duodeno hasta el ano. Presentan en su parte apical un conjunto de microvellosidades que aumentan su superficie de absorción. Estas células están

implicadas en el movimiento transepitelial de nutrientes desde el lumen intestinal hacia la capa serosa (de Santa Barbara et al., 2003). Las células caliciformes representan el segundo tipo celular del epitelio, su proporción aumenta caudalmente desde el duodeno (4%) hasta el colon distal (16%) (Kim y Ho, 2010). Se caracterizan por la secreción de mucina, principal componente del mucus intestinal, que proporciona la primera línea de defensa del huésped contra agentes tóxicos endógenos y exógenos, e impide la invasión microbiana.

Las células de Paneth son células secretoras altamente especializadas que se encuentran en una proporción de 5 a 12 células por cripta aproximadamente (Elphick y Mahida, 2005). Los densos gránulos que producen contienen abundantes péptidos antimicrobianos y proteínas inmunomoduladoras que regulan la composición de la microbiota intestinal y la respuesta inflamatoria (Lueschow y McElroy, 2020). Entre las proteínas secretadas por las células de Paneth destacan las α -defensinas (criptidinas en ratones), lisozima, fosfolipasa A2 de secreción, angiogenina-4 (Ang4), metaloproteínasa-7 (MMP-7), ligando CD95 (FasL) y xantina oxidasa (Gassler, 2017; Lueschow y McElroy, 2020).

Las células enteroendocrinas comprenden sólo el 1% del epitelio y están dispersas por todo el intestino, pero en conjunto forman el sistema endocrino más grande en el ser humano (Worthington et al., 2018). Producen una gama de hormonas que tienen un papel clave en el control del metabolismo, ya que modulan la función intestinal, la secreción de insulina, la asimilación de nutrientes y la ingesta de alimento (Gribble y Reimann, 2019). Estudios recientes también muestran su papel inmunomodulador. El secretoma de las células enteroendocrinas comprende citoquinas y hormonas peptídicas que tienen la capacidad de influir directa e indirectamente en la mayor parte del sistema inmunitario de la mucosa intestinal (Worthington et al., 2018).

Las células del epitelio intestinal se mantienen unidas entre sí mediante proteínas de las uniones estrechas (TJ) y las uniones adherentes (AJ). Las TJ son zonas de contacto entre las membranas plasmáticas de células adyacentes, que

permiten la correcta polarización de las células, participan en rutas de señalización celular, en la regulación transcripcional, en el ciclo celular, en el tráfico de vesículas y permiten la formación de una barrera paracelular (Anderson y Van Itallie, 2009; Otani y Furuse, 2020). La estructura de las TJ consiste en proteínas transmembrana [claudinas (CLDN), ocludinas (OCLN) y moléculas de adhesión de unión (JAM)] que interactúan con las proteínas transmembrana de las células vecinas, y en proteínas de anclaje, como la zonula ocludens 1 (ZO-1) o 2 (ZO-2), que anclan las proteínas transmembrana al citoesqueleto de actina (Lee et al., 2018) (Figura 4). El papel de las TJ en el mantenimiento de la barrera intestinal se ha estudiado detalladamente. Alteraciones en la expresión, en las modificaciones postraduccionales o en la localización de las proteínas de las TJ se han asociado con la disrupción de la barrera y patologías intestinales crónicas (Chelakkot et al., 2018; Shen et al., 2009).

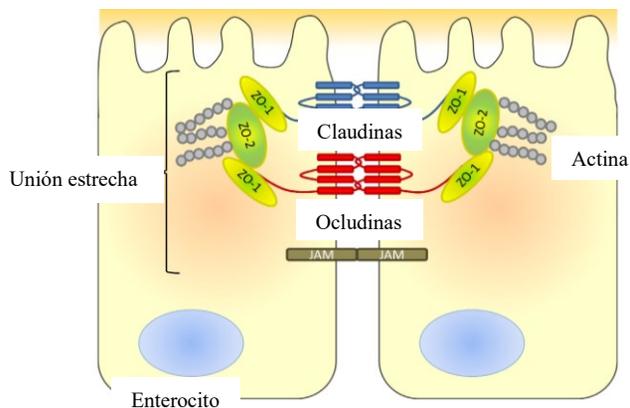


Figura 4. Proteínas de las uniones estrechas presentes en las células del epitelio intestinal. Imagen modificada de Collins et al. (2017).

8.2. Sistema inmunitario intestinal

Una de las propiedades más importantes del sistema inmunitario intestinal es su capacidad para establecer una tolerancia inmunitaria frente a una enorme cantidad de microorganismos comensales que cambian constantemente y, al mismo tiempo, preservar las respuestas inmunitarias contra patógenos u otro tipo de antígenos

(Zheng et al., 2020). El sistema inmunitario de la mucosa es uno de los principales responsables del mantenimiento de la homeostasis intestinal. Sin embargo, su sobreactivación impulsada por microorganismos o antígenos ingeridos con los alimentos puede conducir al desarrollo de procesos inflamatorios, incluso a enfermedades crónicas.

El tejido linfoide asociado al intestino (GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue) se divide en dos compartimentos. El GALT organizado, inductor de la respuesta inmunitaria intestinal, está constituido por folículos linfoides aislados, las placas de Peyer (PP) y las placas colónicas, y los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN: mesenteric lymph node). El GALT difuso, es el efector de la respuesta inmunitaria y está integrado por poblaciones de linfocitos dispersas en el entramado epitelial (IEL: intraepithelial lymphocytes) o en la lámina propia (LP) (LPL: lamina propria lymphocytes) (Ramiro-Puig et al., 2008).

Las PP se encuentran en mayor proporción en la parte distal del íleon. Son agregados linfoides que se organizan en tres regiones principales: a) una serie de folículos de células B; b) el epitelio asociado al folículo (FAE) y la cúpula subepitelial asociada (SED) que se encuentra entre los folículos y el FAE y; c) las pequeñas zonas de células T que están situadas entre los folículos de células B (Reboldi y Cyster, 2016). El FAE contiene células especializadas conocidas como células M, las cuales están involucradas en el transporte de antígenos luminales a las PP mediante transcitosis. Las células dendríticas del SED son capaces de migrar dentro de las PP, adquiriendo el antígeno en la superficie basolateral de la célula M para presentarlo en el área de células T de la zona interfolicular. Además, las células dendríticas migran a sitios distantes, incluidos los MLN, e incluso a la lámina propia del intestino para dirigir una respuesta inmunitaria (Wershil y Furuta, 2008). De ahí que las PP se consideren los sensores inmunológicos del intestino.

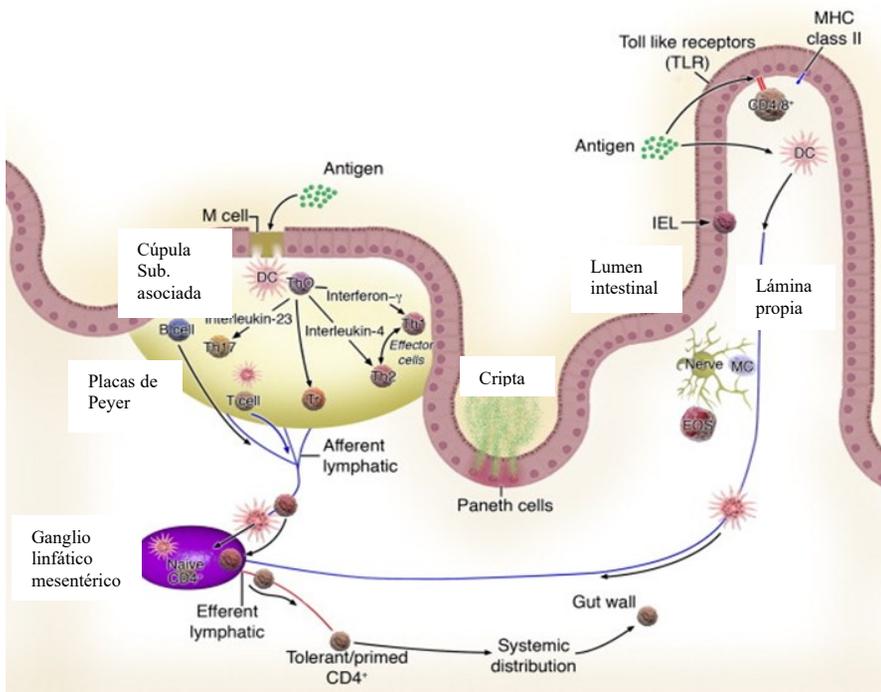


Figura 5. Anatomía y fisiología del GALT. Imagen modificada de Wershil y Furuta (2008).

Las células T desempeñan una función esencial en diferentes etapas de la respuesta inmunitaria. Tras la presentación del antígeno, estas células pueden proliferar y diferenciarse rápidamente en diversos tipos celulares efectoras dependiendo del tipo de estímulo (Figura 6). Las células T se clasifican en células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ según el tipo de glicoproteínas que presentan en la superficie. Las células T $CD4^+$, también llamadas células Th (T auxiliares), pueden diferenciarse en Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg (T reguladoras), y Tfh (T auxiliares foliculares) (Fu et al., 2020). Algunos de estos tipos celulares se han identificado como actores importantes en la instauración de procesos inflamatorios crónicos y la consiguiente disrupción de la barrera intestinal (Imam et al., 2018).

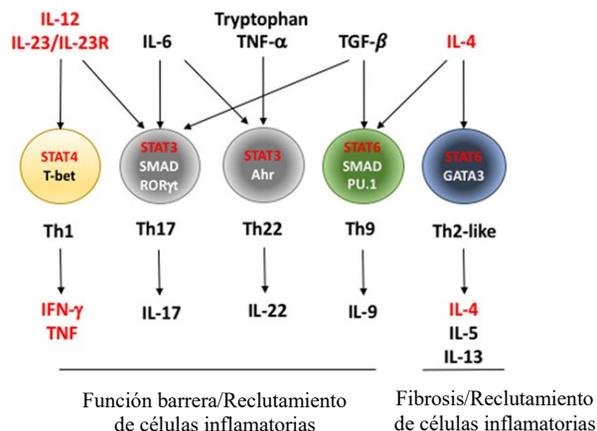


Figura 6. Diferenciación de células Th efectoras durante la enfermedad inflamatoria intestinal. Imagen adaptada de Imam et al. (2018).

9. Microbiota intestinal

La mucosa y el secretoma de sus diferentes tipos celulares no son los únicos componentes de la barrera intestinal. Hoy en día, la microbiota intestinal se considera un componente más a tener en cuenta, con una función muy relevante en la homeostasis intestinal. El intestino distal de los humanos representa uno de los ecosistemas microbianos más densamente poblados, con más de 10^{12} microorganismos/g de contenido luminal. Este ecosistema está dominado por bacterias, siendo los miembros de Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes (actualmente Bacillota, Pseudomonadota y Bacteroidota, respectivamente) los más abundantes (Garrett et al., 2010). Diversos estudios han demostrado la capacidad de la microbiota intestinal para metabolizar diferentes componentes procedentes de la dieta. A partir de la fermentación de los carbohidratos se producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA: Short Chain Fatty Acids) que pueden ser posteriormente metabolizados por el huésped. Además, pueden producir metabolitos fenólicos o diferentes tipos de vitaminas que juegan un papel fundamental en la nutrición humana (Ramakrishna, 2013).

Por otro lado, la microbiota intestinal juega un papel crucial en el mantenimiento de la barrera intestinal. Se ha evidenciado como la permeabilidad intestinal puede verse afectada por cambios en la composición de la microbiota intestinal (disbiosis). Los estudios con modelos animales libres de microorganismos intestinales muestran como la ausencia de microbiota intestinal afecta negativamente a la morfología y renovación del epitelio intestinal, mostrando un acortamiento de las vellosidades y unas criptas intestinales de menor tamaño (Natividad y Verdu, 2013). Otro hecho que muestra la importancia de la microbiota intestinal es la reducción de la sintomatología de enfermedades derivadas de la disrupción de la barrera intestinal tras el trasplante de microbiota fecal procedente de individuos sanos (Shen et al., 2018; Wang et al., 2019). Este efecto sobre la barrera intestinal se atribuye principalmente a determinados metabolitos o componentes estructurales de la microbiota intestinal (Ghosh et al., 2021).

Además, se ha evidenciado el importante papel que tiene la microbiota en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune intestinal. Los ratones criados en condiciones libres de microorganismos poseen un GALT subdesarrollado, con pocas células plasmáticas IgA⁺ y pocas células T CD4⁺ en la LP, un número reducido de IEL y PP, así como una expresión reducida del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II en las células presentadoras de antígenos (Kayama y Takeda, 2012; Round y Mazmanian, 2009).

10. Modelos para el estudio de la toxicidad intestinal

El estudio de la toxicidad en animales modelo aporta información que no puede obtenerse en estudios *in vitro*, ya que en la respuesta a un tóxico intervienen numerosos componentes, se activan e inhiben numerosas vías de señalización y procesos, existe una intercomunicación entre componentes de un mismo sistema e incluso interactúan distintos órganos o sistemas. Los modelos animales que se han empleado en mayor medida para el estudio de la toxicidad intestinal han sido

los mamíferos de pequeño tamaño, en especial los roedores. En lo que al Hg se refiere el uso de ratas está muy extendido, sin embargo, el ratón puede considerarse un mejor modelo, al menos para el MeHg. Los estudios sobre toxicocinética muestran que la fracción de MeHg unida a los glóbulos rojos depende en gran medida de la especie; en humanos, la proporción entre los eritrocitos y el plasma es de aproximadamente 20, en ratones y monos de aproximadamente 10 y en ratas de aproximadamente 300 (EFSA, 2012). Esto se debe a la gran afinidad de la hemoglobina de rata por el Hg, muy superior a la de otros mamíferos (Doi y Tagawa, 1983). La elevada retención sanguínea del Hg en ratas conlleva un lento proceso de distribución y de excreción. Sin embargo, la toxicocinética de algunas cepas de ratón es más similar a la de humanos (Doi y Tagawa, 1983).

El empleo de modelos *in vitro* es complementario a los estudios con animales de experimentación y necesario, especialmente si se desconocen los aspectos básicos de acción del tóxico, como es el caso del Hg a nivel intestinal. Estos modelos permiten obtener valiosa información que permite en última estancia reducir el número de animales de laboratorio necesarios para confirmar determinados aspectos de la toxicidad. Además, constituyen modelos más accesibles, de menor coste y cuyo uso no supone tantas consideraciones de carácter ético. Los modelos empleados para reproducir el entorno de la mucosa van desde monocultivos celulares crecidos sobre placas de pocillos hasta los sofisticados órganos en un chip.

Las líneas celulares Caco-2 y HT29-MTX han sido las más empleadas al constituir modelos de células absortivas y mucosecretoras, respectivamente (Dosh et al., 2017; Verhoeckx et al., 2015), tipos celulares mayoritarios del epitelio. Numerosos estudios han empleado estos dos tipos celulares solos o en cocultivo formando monocapas. Estas combinaciones permiten reproducir parcialmente el epitelio intestinal, si bien existen tipos celulares de relevancia en la respuesta intestinal que no están representados (células madre, de Paneth, enteroendocrinas).

Este inconveniente se resuelve en parte si se emplean monocapas procedentes de organoides o directamente de criptas aisladas de animales o humanos (Matsui y Shinozawa, 2021; Sato et al., 2009) o bien si se trabaja con explantes (Browning y Trier, 1969). A pesar de las ventajas de estos modelos al recrear más fielmente el epitelio intestinal, no están libres de inconvenientes que pueden limitar su uso, como son el elevado coste de su obtención y mantenimiento, y su difícil manejo.

El crecimiento de la monocapa de células epiteliales sea cual sea su origen, puede realizarse sobre placas multipocillo o sobre insertos porosos en placas multipocillo, creando así dos compartimentos, un compartimento superior o apical, que emularía el lumen intestinal, y un compartimento inferior o basolateral, que emularía el espacio subepitelial (Figura 7). El sistema bicameral permite que la diferenciación morfológica y funcional tenga lugar en mejores condiciones (Hilgers et al., 1990). Adicionalmente, se pueden recubrir los pocillos o los insertos con componentes de la matriz extracelular (colágeno, laminina, etc.), hecho que también favorece el crecimiento y la diferenciación celular (Basson et al., 1996).

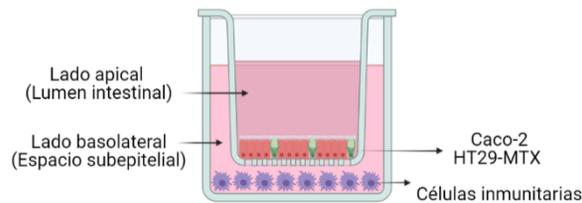


Figura 7. Modelo de tricultivo de células intestinales y células del sistema inmunitario en un sistema bicameral.

El sistema bicameral permite la adición de otros tipos celulares al compartimento basolateral del modelo celular. La introducción de células del sistema inmune (monocitos diferenciados, polimorfonucleares primarios, macrófagos) (Hu et al., 2020; Kordulewska et al., 2020), emulando su posición subepitelial (Figura 7), permite mejorar enormemente el sistema, ya que tal y como

hemos mencionado en el apartado 8.2 de esta introducción, son un componente esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Los escasos estudios sobre toxicidad intestinal del Hg *in vitro* emplean monocultivos de Caco-2, modelo con escasa complejidad y, por tanto, las conclusiones obtenidas, aunque siempre proporcionan información valiosa, pueden diferir enormemente de lo que puede ocurrir *in vivo*.

Tabla 2. Estudios sobre la toxicidad intestinal del Hg(II) y MeHg llevados a cabo en mamíferos.

Especie mercurial	Modelo animal	Exposición (tiempo, concentración y vía)	Efecto tóxico	Referencia
Hg(II)	Ratas Brown-Norway	2 veces al día durante 2 meses, 3 mg/kg pc, sonda gástrica	Signos de inflamación intestinal con infiltraciones de neutrófilos en la mucosa intestinal del íleon y colon.	Andres (1984)
Hg(II)	Ratones Kunming	3 días, 160 mg/L, agua de bebida	Aumento del estrés oxidativo a nivel intestinal. Mayor peroxidación lipídica, reducción de los niveles de SOD y GSH. Alteración de la composición de la microbiota.	Zhao et al. (2021)
Hg(II)	Ratones BALB/c	1 día, 10 mg/kg pc, sonda gástrica	Signos de inflamación intestinal con infiltraciones de neutrófilos en el duodeno y colon.	Jiang et al. (2018)
Hg(II)	Ratones Kunming	90 días, 80 mg/L, agua de bebida	Atrofia de las glándulas colorrectales, capa muscular más delgada, mucosa ensanchada, menor número de células caliciformes y necrosis de los enterocitos. Alteración de la composición de la microbiota.	Zhao et al. (2020)

Tabla 2. Estudios sobre la toxicidad intestinal del Hg(II) y MeHg llevados a cabo en mamíferos. Continuación.

Especie mercurial	Modelo animal	Exposición (tiempo, concentración y vía)	Efecto tóxico	Referencia
MeHg	Monos Rhesus	3, 7 y 12 meses, 0.08 – 0.127 mg/kg pc, jeringa	Alteración de las células de Paneth.	Chen et al. (1983)
Hg(II)	Ratas Sprague Dawley	1 día, 10 mg/kg pc, sonda gástrica	Alteración de la microbiota intestinal.	Ruan et al. (2019)
MeHg	Ratas Wistar	1 día, 10 mg/kg pc, sonda gástrica	Alteración de la microbiota intestinal.	Lin et al. (2020)
Hg(II) MeHg	Ratones	7 días, 33.6 mg/kg pc Hg(II), 3.1 mg/kg pc MeHg, sonda gástrica	Inflamación a nivel de ileon. Aumento de la expresión génica de transportadores de Hg(II) y MeHg en el intestino delgado. Alteración de la microbiota intestinal.	Zhang et al. (2019)

Objetivos

La reducción de la exposición a Hg en la población, especialmente en poblaciones que se encuentran en zonas contaminadas o donde el consumo de pescado es la base de la dieta, es de vital importancia para las autoridades sanitarias. Además, es muy importante reducir la exposición, especialmente a MeHg, en los grupos más susceptibles (mujeres embarazadas, que planean estarlo, en periodo de lactancia y niños). Sin embargo, a pesar de que la dieta es la principal vía de entrada del Hg a nuestro organismo, y que el intestino es la ruta de entrada hacia la circulación sistémica, son muy escasos los estudios llevados a cabo a nivel intestinal. Además, dada el importante valor nutricional que aporta el pescado en nuestra dieta, es imprescindible buscar posibles estrategias que nos permitan reducir la exposición a este metal sin necesidad de reducir su consumo, y que se puedan incluir en nuestro día a día como un componente más de nuestra dieta.

La presente tesis tiene como objetivo general **evaluar el efecto tóxico de las principales especies de Hg sobre el epitelio intestinal, en exposiciones *in vitro* e *in vivo*, además de la búsqueda de posibles estrategias basadas en microorganismos probióticos para contrarrestar este efecto tóxico.**

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Evaluación *in vitro* de los efectos derivados de una exposición subcrónica a Hg(II) y MeHg en un modelo de mucosa intestinal, para determinar los efectos tóxicos e identificar los posibles mecanismos de acción de ambas especies Hg a nivel intestinal.
- ✓ Evaluación *in vivo* de los efectos de una exposición subcrónica a Hg(II) y MeHg, para confirmar los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*.
- ✓ Evaluación *in vitro* de la capacidad de cepas de bacterias ácido-lácticas para contrarrestar el efecto tóxico del Hg(II) y MeHg sobre la mucosa intestinal.
- ✓ Evaluación *in vivo* de la capacidad de las cepas de bacterias ácido-lácticas para contrarrestar el efecto tóxico de una exposición subcrónica a MeHg, con el fin de constatar los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*.

Objetivos

Metodología

Metodología

1. Especies mercuriales

Las disoluciones de Hg(II) y MeHg empleadas a lo largo de esta tesis se prepararon por dilución de los patrones comerciales de Hg(NO₃)₂ (1000 mg/L, Scharlab) y CH₃HgCl (1000 mg/L, Alfa Aesar), respectivamente.

2. Modelos celulares y animales

2.1. Modelos celulares

Se emplearon tres líneas celulares humanas, dos de ellas procedentes de un adenocarcinoma de la región colónica (la línea Caco-2, modelo de enterocitos y la línea HT29-MTX, modelo de células mucosecretoras o caliciformes) y una línea celular monocítica (THP-1).

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC® HTB-37™). El mantenimiento de la línea se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionaron 10 mL de medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle y con L-glutamina (0.6 g/L) a pH 7.4. El MEM se suplementó con suero fetal bovino (SFB) 10% v/v, aminoácidos no esenciales 1% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL, piruvato de sodio 1 mM y ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 10 mM. Este medio suplementado se denominará MEM-10% SFB a lo largo de esta tesis.

Las células HT29-MTX se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC, número 12040401). El mantenimiento de la línea celular se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionaron 10 mL de medio Eagle modificado de Dubelcco (DMEM) con L-glutamina (0.6 g/L) y un alto contenido de glucosa (4.5 g/L) a pH 7.4. El DMEM se suplementó con SFB 10% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL, piruvato de sodio 1 mM y HEPES 10 mM. Este medio suplementado se denominará DMEM-10% SFB a lo largo de esta tesis.

Metodología

Las células THP-1 se obtuvieron de la ECACC (número 88081201). El mantenimiento de la línea celular se llevó a cabo en frascos de 75 cm² a los que se adicionaron 10 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 a pH 7.4. El RPMI fue suplementado con SFB 10% v/v, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.0025 mg/mL y HEPES 10 mM. Este medio suplementado se denominará RPMI-10% SFB a lo largo de la tesis.

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C, en atmósfera controlada con una humedad relativa del 95% y una concentración de CO₂ del 5%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Cuando la monocapa alcanzó el 80% de confluencia, las células adherentes Caco-2 y HT29-MTX se recuperaron por incubación con una disolución de tripsina (0.5 mg/L) y ácido etilendiamino tetracético (EDTA, 0.22 g/L) durante 10 min a 37 °C y se sembraron en frascos de 75 cm² a una densidad de 1.5×10^4 células/cm². Las células no adherentes THP-1 se recuperaron por centrifugación (450 ×g, 5 min) y se sembraron en frascos de 75 cm² a una densidad de 2.6×10^4 células/cm².

A lo largo de este trabajo se empleó un sistema de cultivo bicameral (Figura 2). En este sistema cada pocillo de la placa está dividido en dos compartimentos por medio de un inserto poroso (tamaño de poro 0.4 μm, Transwell®, Corning): compartimento superior o apical y compartimento inferior o basolateral. El modelo celular empleado está constituido por un cocultivo Caco-2/HT29-MTX en una relación inicial 70/30 sembrado sobre los insertos con la membrana apical hacia el compartimento superior, y la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos dispuesta en el lado basolateral (Figura 2). Este tricultivo se mantuvo con MEM suplementado, con una reducción del SFB al 7.5% (MEM-7.5%), adicionado a ambos compartimentos. Este sistema de cultivo es una aproximación simplificada del entorno de la mucosa intestinal, tal y como se ha explicado en el apartado 10 de la Introducción.

Todos los ensayos se realizaron con células epiteliales entre los pases 9 y 16, y con células THP-1 entre los pases 2 y 7. Los reactivos empleados para el mantenimiento celular se adquirieron a Hyclone y Capricorn.

2.2. Modelos animales

Para el estudio *in vivo* se emplearon ratones hembra BALB/c procedentes de Envigo. Los animales se adquirieron con una edad de 8 semanas y con un peso que oscilaba entre 16.2 y 17.1 g. A lo largo del estudio, los animales se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (ciclos de 12 h de luz y oscuridad, temperatura ambiente de 22 °C y humedad del 75%) en las instalaciones de la Sección de Producción y Experimentación Animal del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Los ratones se alimentaron *ad libitum* con pienso de mantenimiento estándar para roedores con una concentración de Hg <0.01 ng/g.

Los protocolos de experimentación aplicados a los animales se diseñaron conforme a la normativa para el uso de animales de experimentación (Real Decreto 53/2013) (BOE, 2013) y fueron aprobados por la Consellería d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Generalitat Valenciana.

3. Evaluación *in vitro* del efecto de una exposición subcrónica a mercurio inorgánico y metilmercurio sobre el epitelio intestinal

En este estudio se empleó el modelo celular combinado descrito en el apartado 2.1. En cada apartado se detallan las condiciones de siembra y los tratamientos aplicados.

3.1. Estudios preliminares para determinar las condiciones de exposición subcrónica a mercurio inorgánico y metilmercurio

Previamente a los ensayos de toxicidad subcrónica en sistemas bicamerales, se identificaron las condiciones de cultivo óptimas, empleando el cocultivo Caco-

Metodología

2/HT29-MTX como modelo celular. Debido a que el ensayo requiere tiempos prolongados de exposición, es necesario ajustar todas las variables de cultivo para mantener la integridad de las monocapas. En este estudio preliminar se consideraron las siguientes variables: a) concentración de SFB (5%, 7.5% y 10%), b) concentración de Hg(II) y MeHg (0.1, 0.5 y 1 mg/L) y c) tiempo de exposición (hasta 12 días postsiembra).

En condiciones normales, el mantenimiento del cocultivo se realiza con MEM-10% SFB. Dada la alta afinidad del Hg por los grupos SH de las proteínas (Introducción, apartado 6.1), es conveniente, en la medida de lo posible, reducir la cantidad de SFB, rico en proteínas, durante los ensayos de toxicidad. Sin embargo, esta reducción puede afectar a la formación de la monocapa, sus características y su estabilidad. Para evaluar este punto, las células se sembraron a una densidad de 3.4×10^4 células/cm² en placas de 12 pocillos con MEM suplementado con 5, 7.5 y 10% de SFB un máximo de 12 días, cambiando el medio cada 2 días. A distintos tiempos postsiembra (6, 8, y 10 días), se evaluó la formación e integridad de la monocapa mediante la visualización bajo microscopio invertido OPTIKA B-500 con cámara fotográfica Reflex APS-C acoplada.

Transcurrido el tiempo de exposición, la monocapa celular se lavó con tampón fosfato salino (PBS) y las células se recuperaron con tripsina/EDTA para la extracción de ARN, obtención del ADNc por transcripción inversa (RT) y evaluación de la expresión por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), siguiendo los protocolos que se describen en el apartado 7. En este ensayo se analizó la expresión relativa de marcadores estructurales (*ZO-1*, zonula occludens-1; *CLDN1*, claudina 1), de diferenciación celular (*SI*, sacarosa isomaltasa; *DPP4*, dipeptidil peptidasa 4; *MUC5AC*, mucina 5AC) y de estrés (*HSP70*, proteína de choque térmico 70; *HSP90*, proteína de choque térmico 90; *MT2A*, metalotioneína 2A) de las células cultivadas con MEM-5% SFB y MEM-7.5% SFB respecto a las mantenidas con MEM-10% SFB. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la Tabla 5.

Una vez establecida la concentración de SFB a emplear, se determinó el rango de concentraciones de Hg(II) y MeHg, y los tiempos de ensayo, con el fin de trabajar en condiciones subletales. Las células se sembraron a una densidad de 3.4×10^4 células/cm² en placas de 12 pocillos y desde el momento inicial de siembra, se expusieron a distintas concentraciones de Hg(II) y MeHg (0, 0.1, 0.5 y 1 mg/L) en MEM-7.5% SFB, cambiando el medio cada 2 días. A distintos tiempos postsiembra (6, 8, y 10 días), se evaluó la formación e integridad de la monocapa mediante la visualización bajo microscopio invertido (Olympus CKX41).

Transcurrido el tiempo de exposición (12 días), se determinó la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripano (0.4%, Sigma). Se consideraron condiciones de exposición adecuadas aquellas que permitieron la formación de una monocapa íntegra y no conllevaron reducciones de viabilidad superiores al 15%.

Por otro lado, para llevar a cabo la correcta diferenciación de las células THP-1 a macrófagos se evaluaron diferentes concentraciones de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA, 50, 100 y 200 nM, Sigma) y diferentes tiempos de exposición (24 y 48 h). Las células THP-1 fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad de 1.5×10^5 células/cm² e incubadas con PMA diluido en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB (v/v) durante 24 y 48 h. Tras la exposición, las células se incubaron durante 6 h con RPMI-10% SFB sin PMA. Posteriormente, se evaluó el porcentaje de adherencia y la morfología nuclear mediante tinción DAPI (diclorhidrato de 4',6'-diamidino-2-fenilindol). Por último, los macrófagos se recuperaron por raspado para analizar la expresión génica de los marcadores de diferenciación CD68 y CD36 mediante RT-qPCR siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la Tabla 5.

3.2. Evaluación de la toxicidad subcrónica del mercurio inorgánico y metilmercurio

En todos los ensayos se emplearon los sistemas bicamerales de 12 o 24 pocillos descritos en el apartado 2.1. Las células Caco-2/HT29-MTX (70/30) se sembraron a una densidad de 4.4×10^4 células/cm² sobre los insertos porosos, mientras que los monocitos THP-1 activados se dispusieron en el lado basolateral a una densidad de 1.57×10^5 células/cm². El tratamiento se realizó adicionando MEM-7.5% SFB con Hg(II) o MeHg (0, 0.1, 0.5 y 1 mg/L) al lado apical (0.5 mL para las placas de 12 pocillos y 0.1 mL para las placas de 24 pocillos) y MEM-7.5%SFB al compartimento basolateral (1.5 mL para las placas de 12 pocillos y 0.5 mL para las placas de 24 pocillos). El tratamiento se prolongó durante 10 días, si no se indica lo contrario.

Debido a la labilidad de los monocitos, no es aconsejable prolongar su mantenimiento más de 5 días tras su activación (Daigneault et al., 2010; Kohro et al., 2004), por tanto, durante el tratamiento de 10 días, la monocapa de macrófagos se renovó 2 veces. Para tal fin, los insertos con los cocultivos Caco-2/HT29-MTX se pasaron a nuevas placas multipocillo con macrófagos recién activados en el lado basolateral.

El objetivo de este estudio era determinar la toxicidad intestinal del Hg, por lo tanto, los estudios estructurales y funcionales que se describen a continuación se refieren a la monocapa compuesta por las dos líneas intestinales. El efecto del Hg sobre los macrófagos también se analizó para determinar si podían modular los efectos tóxicos del Hg sobre el modelo de epitelio intestinal. Para confirmar el rol de los macrófagos en la toxicidad del metal, algunas pruebas se hicieron paralelamente en presencia y ausencia de estas células inmunitarias (apartados 3.2.1 y 3.2.2).

3.2.1. Determinación de especies reactivas del oxígeno y/o del nitrógeno (ROS/RNS)

Para la evaluación de la respuesta pro-oxidante, las células se expusieron durante 10 días, tal y como se detalla en el apartado 3.2, con y sin macrófagos. Posteriormente, se lavaron las monocapas Caco-2/HT29-MTX y los macrófagos THP-1 con PBS y se recuperaron con una disolución de tripsina y EDTA o mediante rascado, respectivamente. Las células se incubaron durante 30 min a 37 °C con una disolución de 100 µM de 2',7'-diacetil dihidroclorofluoresceína (DHCF-DA, Sigma) preparada en PBS. Tras la incubación, las células se lisaron utilizando 200 µL de Tritón X-100 (0.1% m/v en PBS, Merck), sonicación en un baño de agua (100 W, 10 min, 4 °C) y centrifugación a 12300×g durante 3 min. Los lisados celulares fueron transferidos a una placa de 96 pocillos y la fluorescencia se determinó (λ excitación = 488 nm; λ emisión = 53 nm) en un lector de microplacas CLARIOstar (BMG-Labtech). Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron por mg de proteína medidos mediante el método Bradford (Bio-Rad).

La respuesta pro-oxidante se confirmó mediante la evaluación de la expresión relativa de varias proteínas de estrés (HSP70, HSP90, MT2A) en las células intestinales y los macrófagos tras 10 días de tratamiento, siguiendo los protocolos que se describen en el apartado 7 y empleando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 5.

3.2.2. Evaluación de la respuesta pro-inflamatoria

Para la evaluación de la respuesta pro-inflamatoria, las células se expusieron durante 10 días a ambas especies de Hg, tal y como se describe en el apartado 3.2, en presencia y ausencia de macrófagos. Tras la exposición, se recuperaron los medios apical y basolateral para el análisis de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 e IL-1 β , mediante kits de ELISA específicos [human IL-8/CXCL8 y human IL-1 β (Sigma)] siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Análisis de la estructura de la monocapa intestinal

El análisis estructural se llevó a cabo mediante la evaluación de las uniones intercelulares y la capa de mucus a nivel transcriptómico y microscópico. Tras el tratamiento con ambas formas mercuriales, las monocapas Caco-2/HT29-MTX se recuperaron con tripsina/EDTA para la extracción del ARN total, obtención del ADNc y evaluación de la expresión relativa de los genes que codifican la proteína de las uniones estrechas ZO-1 y de la mucina MUC5AC, glicoproteína mayoritaria de la capa de mucus secretada por las células HT29-MTX (Kitamura et al., 1996).

Por otro lado, se evaluó la morfología de las uniones intercelulares de las monocapas intestinales mediante la inmunolocalización de la proteína ZO-1. Tras 7 días de exposición a Hg(II) y MeHg, en presencia de los monocitos activados, las monocapas Caco-2/HT29-MTX se lavaron con PBS y se incubaron en agitación con N-acetilcisteína (NAC, 10 mM, Sigma) durante 45 min a 37 °C para eliminar la capa de mucus y facilitar la posterior tinción. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído (PAF) 4% (v/v en PBS, Sigma) durante 10 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% (v/v en PBS) durante 15 min. La monocapas permeabilizadas se bloquearon con suero de cabra al 10% (v/v en PBS, Abcam).

Para la inmunolocalización de ZO-1, la monocapa celular se incubó a 4 °C durante toda la noche con un anticuerpo policlonal anti-ZO-1 (ab216880, Abcam) diluido 1:200 en suero de cabra al 2% v/v. Para la detección, se realizó una incubación (1 h, temperatura ambiente) con un anticuerpo anticonejo tipo IgG conjugado con Alexa 488 (R37116, Invitrogen), diluido 1:200 en suero de cabra al 2% v/v. A continuación, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con DAPI diluido 1:500 en PBS con el fin de visualizar los núcleos celulares. Finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos con ProLong[®] Antifade (Molecular Probe) y se examinaron en un microscopio de epi-fluorescencia Nikon eclipse 90i (Alexa 488: λ excitación = 488 nm, λ emisión = 519 nm; DAPI: λ excitación = 340 nm, λ emisión = 485 nm).

La monocapa de mucus se visualizó mediante tinción con azul de alcian (Alcian Blue 8 GX, Sigma). Para ello, las monocapas epiteliales se fijaron con PAF 4% v/v durante 15 min a 4 °C, seguido de la tinción con azul de alcian durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, las monocapas se lavaron sucesivas veces con PBS y se examinaron bajo microscopio óptico invertido (Olympus CKX41).

3.2.4. Evaluación de la permeabilidad de las monocapas celulares

La permeabilidad de las monocapas Caco-2/HT29-MTX se monitorizó mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) y del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) del marcador paracelular Lucifer Yellow (LY, Sigma). La medida de la RET se realizó empleando un voltímetro Millicell[®]-ERS (Millipore Corporation). Para determinar el P_{app} del LY, el marcador se añadió al compartimento apical a una concentración de 100 μ M y a distintos tiempos (20, 40, 60 y 80 min) se recogieron alícuotas (100 μ L) del compartimento basolateral, reponiendo cada vez el volumen recogido con medio fresco. Los contenidos de LY en las alícuotas se determinaron mediante la lectura de la fluorescencia (λ excitación = 488 nm; λ emisión = 530 nm) frente a una curva patrón (0 – 0.52 μ g/mL), utilizando el lector de microplacas CLARIOstar. Los datos obtenidos permitieron calcular la P_{app} empleando la ecuación 1:

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

donde:

dC/dt es el flujo (μ g/s) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que gobierna la variación de las concentraciones LY, corregidas por la dilución, frente al tiempo.

V_r es el volumen del compartimento aceptor (1.5 mL).

A es la superficie ocupada por la monocapa celular (1.12 cm²).

C_0 es la concentración inicial de LY en el compartimento apical (52 $\mu\text{g/mL}$).

3.2.5. Regeneración celular

Tras 10 días de exposición (apartado 3.2), las monocapas Caco-2/HT29-MTX se recuperaron de los insertos con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de 8.5×10^4 células/cm² en placas con pocillos divididos por insertos de silicona (Culture-Insert 2 well 24, Ibidi). En este sistema, cada pocillo está separado en dos compartimentos por un inserto de silicona de 500 μm . Tras alcanzar la confluencia (48 h), los insertos se retiraron, dejando un espacio libre de células (herida) de 500 μm . Posteriormente, se adicionó MEM-7.5% SFB a cada pocillo y el cierre de la herida fue monitorizado durante 48 h bajo el microscopio Nikon Eclipse 90i. El área de la herida fue cuantificada con el programa NIS Elements BR (Nikon Instruments).

3.2.6. Estudio de posibles rutas de señalización implicadas en la respuesta celular al tóxico

Se llevó a cabo un ensayo de inhibición química para determinar las posibles rutas implicadas en el proceso pro-inflamatorio y pro-oxidante generado por el Hg. Las células se sembraron tal y como se ha descrito previamente (apartado 3.2), aplicando el tratamiento con Hg al lado apical, mientras que los inhibidores se adicionaron al lado basolateral durante el tiempo de exposición, cambiando el medio cada 2 días. Los inhibidores que se utilizaron fueron los siguientes: SP600125 [300 nM, inhibidor de la quinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK o SAPK)], BIRB796 [300 nM, inhibidor de la proteína quinasa p38 activada por mitógenos (p38 MAPK)], BAY 11-7082 [250 nM, inhibidor de la ruta del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B)] (todos obtenidos de MedChemExpress). Tras 6 días de exposición, se recogieron los macrófagos para analizar la expresión génica de marcadores pro-inflamatorios

(CXCL10, CXCL9, IL-8 e IL-1 β) tal y como se describe en el apartado 7. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 5.

También, se analizó la posible participación de la ruta IL4/IL13/STAT6 en la producción de mucus como respuesta al tóxico mediante el análisis de la expresión relativa de las citoquinas IL-4 e IL-13 de las monocapas tratadas respecto a las no tratadas, empleando los protocolos descritos en el apartado 7 y los oligonucleótidos detallados en la Tabla 5. Además, se analizó la fosforilación del factor de transcripción STAT6 mediante inmunocitoquímica, empleando un anticuerpo policlonal anti-fosfo-STAT6 (Tyr641) (700247, Invitrogen) diluido 1:200 en suero de cabra al 2% v/v, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3.

3.2.7. Análisis de mercurio total

El Hg total se analizó en alícuotas de medio basolateral y apical y en las células recuperadas al final del experimento. Las muestras fueron digeridas utilizando un microondas de reacción acelerada por microondas (MARS, CEM), utilizando recipientes de poli(tetrafluoroetileno), 4 mL de HNO₃ 14 M (Merck) y 1 mL de H₂O₂ (30%, Prolabo). Los reactores se irradiaron (180 °C, 15 min) y la digestión obtenida se dejó en reposo durante 12 h para eliminar los vapores nitrosos. Posteriormente, se llevó a volumen final con HCl 0.6 M y se cuantificó mediante vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica (CV-AFS) (PSA 10.025 Millennium Merlin, PS Analytical).

Las condiciones analíticas fueron las siguientes: agente reductor, 2% (m/v) de SnCl₂ (Scharlab) en HCl 1.8 M a un flujo de 4.5 mL/min; solución portadora, 0.6 M HCl a un flujo de 9 mL/min; gas portador, argón a un flujo de 0.3 L/min; gas de secado, aire a un flujo de 2.5 L/min; lámpara específica de Hg; filtro de 254 nm. La cuantificación se realizó frente a una curva externa de calibración (0.1–2 ng/mL). El control de calidad de la cuantificación se evaluó mediante el análisis de muestra de agua de referencia (RTC, QCI-049-1, LGC Standards) con un contenido certificado de Hg de 40.8 ± 0.396 μ g/L.

4. Evaluación *in vivo* de la toxicidad subcrónica del mercurio sobre el epitelio intestinal

4.1. Tratamiento y recolección de muestras

En los estudios *in vivo* se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c que fueron distribuidos al azar en 7 grupos, con 10 ratones por grupo. Un grupo se utilizó como control y el resto se expusieron a distintas concentraciones de Hg(II) y MeHg (1, 5 y 10 mg/L) a través de agua de bebida durante 4 meses. Durante el tiempo de exposición se monitorizó semanalmente el peso corporal de los animales, la cantidad de agua y alimentos ingeridos, así como el estado general y el comportamiento. Al final de la exposición los animales se sacrificaron por inhalación de isofluorano y se recogieron muestras de intestino delgado y grueso, y de heces.

4.2. Determinación de la respuesta pro-inflamatoria

4.2.1. Análisis de citoquinas pro-inflamatorias tisulares

Las porciones de intestino delgado y grueso (~40 mg) fueron homogenizadas en 1 mL de tampón RIPA modificado [NaCl 150 mM (Panreac), tampón Tris 50 mM pH 8 (Sigma), EDTA 5 mM (Sigma), Triton X-100 1% v/v, sodio desoxicolato 0.5% m/v (Sigma) e inhibidor de proteasa 6 mg/mL (Roche)], empleando un disruptor de tejidos [TissueRuptor II (Qiagen)]. El homogenizado se centrifugó (13800×g, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante se recuperó para determinar la concentración de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β empleando kits de ELISA específicos (TNF alpha Mouse ELISA Kit, IL-1 beta Mouse ELISA Kit, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron normalizados por mg de tejido.

4.2.2. Infiltración de neutrófilos

Para evaluar la infiltración de la mucosa por neutrófilos se analizó el contenido fecal de lactoferrina, proteína plasmática que durante procesos inflamatorios se acumula en gránulos en los neutrófilos y es liberada al lumen intestinal, tras la infiltración (Lönnerdal y Iyer, 1995; Uchida et al., 1994). Las muestras de heces (~50 mg) se homogenizaron en 500 μ L de tampón RIPA modificado utilizando el equipo FastPrep-24™ 5^G (MP Biomedicals™). El homogenizado se centrifugó (13800 \times g, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante se empleó para determinar el contenido fecal de lactoferrina utilizando un kit de ELISA específico (Mouse Lactoferrin, MyBioSource) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se normalizaron por mg de heces.

Adicionalmente, se verificó la presencia de neutrófilos en la mucosa por medio del examen microscópico de cortes histológicos del intestino grueso. Los tejidos se prepararon tal y como se describe en el apartado 4.4.

4.3. Determinación del estrés oxidativo del tejido intestinal

4.3.1. Análisis de los niveles de ROS/RNS

Las porciones de intestino delgado y grueso (~30 mg) se homogenizaron con un disruptor tisular en 1 mL de tampón RIPA modificado. El homogenizado se centrifugó (13800 \times g, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante se empleó para determinar los niveles tisulares de ROS/RNS a través de la técnica de oxidación de la DHCF-DA. Se incubaron 50 μ L de homogenizado tisular con 6 μ L de DHCF-DA 10 μ M y 50 μ L de tampón Tris pH 7 durante 30 min a 37 °C. Tras la incubación, la fluorescencia se midió en un lector de placas a una longitud de onda de excitación/emisión de 488/530 nm. Las unidades de fluorescencia se normalizaron por mg de tejido.

4.3.2. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se determinó mediante la técnica TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), que permite evaluar el producto mayoritario de este proceso oxidativo, el malondialdehído (MDA) (Mas-Bargues et al., 2021). Las porciones de intestino delgado y grueso (~40 mg) se homogenizaron tal y como se describe en el apartado 4.3.1. El sobrenadante (20 μ L) se mezcló con 20 μ L de dodecilsulfato sódico (SDS) 8.1% m/v (Sigma, GE healthcare), 150 μ L de ácido acético 20% v/v (Janssen), 150 μ L de ácido tiobarbitúrico 0.8 % m/v (TBA, Sigma) y agua destilada hasta un volumen final de 400 μ L. La mezcla se incubó 1 h a 95 °C. Posteriormente, las muestras se enfriaron y los aductos TBA-MDA fueron extraídos con 200 μ L de 1-butanol (Panreac). La fase orgánica obtenida tras centrifugación (13800 \times g, 5 min, 4 °C) se analizó en un lector de placas a una longitud de onda de excitación/emisión de 532/553 nm. Los resultados se expresaron como equivalente de MDA/mg tejido analizados frente a una curva patrón de MDA (0.5 - 10 mg/L).

4.3.3. Contenidos tisulares de glutatión reducido (GSH)

Las porciones de intestino delgado y grueso (~10 mg) se homogenizaron mediante un disruptor tisular en 400 μ L de tampón fosfato 100 mM con EDTA 10 mM a pH 8 y 100 μ L de ácido ortofosfórico 25% v/v (Fluka). El homogenizado se centrifugó (13800 \times g, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante (10 μ L) se mezcló con 10 μ L de orto-ftalaldehído (OPT; Fluka) 0.07 mM en metanol y 180 μ L de tampón fosfato 100 mM pH 8. La fluorescencia se midió a una longitud de onda excitación/emisión de 340/420 nm. Las concentraciones se obtuvieron por interpolación a una curva de calibrado de GSH (6.5 – 65.0 mg/L, Merck), y los valores se normalizaron por mg de tejido.

4.4. Evaluación de la estructura de la mucosa intestinal

El análisis estructural de la mucosa se realizó mediante su evaluación histológica. Una porción de tejido (1 cm) se fijó con PAF 4% v/v (Sigma) inmediatamente tras el sacrificio y se almacenó a 4 °C hasta el momento de la preparación. Posteriormente, las porciones intestinales se embebieron en parafina (Merck) y se realizaron cortes con un grosor de 5 µm con un microtomo (Leica Biosystems). Para el examen de las células caliciformes se llevó a cabo una tinción con ácido peryódico-Schiff (PAS). Las secciones de tejido se desparafinaron con xileno y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (100° - 50°) y un paso final con agua destilada. Posteriormente se tiñeron con ácido peryódico (Panreac) al 0.5% v/v en H₂O destilada durante 5 min. Tras varios lavados con agua destilada, se adicionó el reactivo Schiff (Sigma) durante 30 min. Posteriormente se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Panreac) durante 5 min. Las secciones de tejido se deshidrataron con etanol (70°, 96°, 100°) y xileno, y se montaron con medio de montaje EUKITT® (Panreac). Las imágenes fueron adquiridas bajo un microscopio óptico invertido (Olympus CKX41).

Adicionalmente, se analizó la expresión génica de proteínas constituyentes de las uniones intercelulares (ZO-1 y OCLN) y de la capa de mucus (MUC2). Los tejidos intestinales empleados para este análisis se recogieron tras el sacrificio y se sumergieron inmediatamente en RNAlater (Qiagen) durante 24 h. Tras la eliminación del reactivo estabilizante del ARN, las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de análisis. Los protocolos y los oligonucleótidos empleados para determinar la expresión génica relativa se describen en el apartado 7 y en la Tabla 6, respectivamente.

También, se determinó la expresión proteica de la mucina MUC2 mediante Western blot, empleando los homogenizados obtenidos en el apartado 4.2.1. La concentración proteica de cada muestra se analizó mediante el método Bradford y se cargaron 20 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida al 8% v/v (Biobasic). La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 30 min, seguido de 1 h a 120 V.

Metodología

Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Immobilon[®]) en un sistema de transferencia semihúmedo (Bio-Rad) durante 1 h a 100 mA. Finalmente, las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) al 5% m/v diluida en TBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5; NaCl 0.9% m/v)-Tween 20 al 0.1% v/v durante 2 h a temperatura ambiente en constante agitación.

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-MUC2 (ABK1-A6853, 1:1000, Abyntek) o anti-HPRT (Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa) (CQA1250, 1:1000, Cohesion Biosciences), como control de carga y normalización, durante toda la noche a 4 °C en constante agitación. Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:10000, Amersham[™]) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando la disolución de revelado Amersham ECL Select[™] Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) y la señal quimioluminiscente generada fue capturada con el sistema ImageQuant 800 (Cytiva). El análisis densitométrico se realizó mediante el software ImageJ (National Institutes of Health).

4.5. Evaluación de rutas de señalización implicadas en la toxicidad intestinal generada por el mercurio

Para elucidar las posibles rutas de señalización implicadas en la toxicidad generada por el Hg *in vivo*, se analizaron las formas fosforiladas de las quinasas JNK, p38 MAPK e IKK (parte de la cascada de transducción de señales de NF- κ B), empleando los homogenizados obtenidos previamente en el apartado 4.2.1. La concentración proteica de cada muestra se analizó mediante el método de Bradford y se cargaron 40 μ g de proteínas en un gel de poliacrilamida al 10% (Biobasic). Las condiciones de electroforesis, transferencia y bloqueo se describen en el apartado 4.4.

Las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-fosfo-p38 MAPK (D3F9, 1:1000, Cell Signaling Technology), anti-fosfo-SAPK/JNK (81E11, 1:1000, Cell

Signaling Technology), anti-fosfo-IKK α/β (16A6, 1:1000, Cell Signaling Technology) y anti-HPRT (1:1000) durante toda la noche a 4 °C en constante agitación. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:10000) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. La detección de las proteínas de interés y la posterior cuantificación de la imagen se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.

Asimismo, se evaluó la expresión relativa de los genes que codifican las citoquinas IL-4 e IL-13 para determinar la implicación de la ruta IL-4/IL-13/STAT6 en el efecto del Hg sobre la secreción de mucus. El protocolo y los oligonucleótidos empleados se describen en el apartado 7 y la Tabla 6 respectivamente.

4.6. Permeabilidad intestinal

La permeabilidad intestinal se analizó a través de la medida del contenido de albúmina fecal. La albúmina es una proteína de tipo globular presente en el suero. Sin embargo, cuando la integridad de la barrera intestinal está comprometida esta puede pasar al lumen intestinal, por lo que su presencia en heces es un indicador del aumento de la permeabilidad intestinal (Seethaler et al., 2021). Las muestras de heces se prepararon tal y como se describe en el apartado 4.2.2. Los sobrenadantes se recuperaron para determinar la albúmina fecal empleando un kit específico de ELISA [Mouse Albumin (Alb) ELISA Kit, Cusabio], siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron normalizados por mg de heces.

4.7. Evaluación de la composición de la microbiota intestinal

El DNA bacteriano de las heces de los ratones fue aislado empleando el kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen) a partir de ~100 mg de heces individuales y cuantificado por fluorescencia con el kit dsDNA HS assay (ThermoFisher) en un equipo Qubit (ThermoFisher). La región variable V3-V4 del ADNr 16S bacteriano de cada muestra fue amplificada siguiendo el protocolo *16S rDNA gene Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina* (Cod. 15044223 Rev. A).

Metodología

Se utilizaron cebadores específicos (PCR1_f: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'; PCR1_r: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGTATCTAATCC-3') que contienen colas con el adaptador para Illumina seleccionados según Klindworth et al. (2012). Tras la amplificación, la multiplexación se llevó a cabo usando el kit Nextera XT Index. Se verificó el tamaño de los fragmentos amplificados en un Bioanalyzer DNA 1000 chip (Agilent). Las librerías obtenidas se secuenciaron usando 2×300 *paired-end run* (MiSeq Reagent kit v3) en un secuenciador MiSeq siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación y secuenciación de librerías se efectuaron en el Servicio de Genómica del SCSIE de la Universidad de Valencia.

Las secuencias se analizaron posteriormente en el programa informático R v4.1.1 (Team, 2021). Las secuencias crudas 16S V3-V4 directas y reversas fueron procesadas con el paquete informático DADA2 (Callahan et al., 2016). Las lecturas se recortaron a 260 bases y se filtraron con maxEE ajustado a 5. Posteriormente las lecturas fueron dereplicadas, se estimaron los errores y las secuencias se unieron usando funciones implementadas en el paquete DADA2. Las secuencias quiméricas se eliminaron con la función *removeBimeraDenovo* de DADA2 usando el método *consensus*. La taxonomía se asignó a ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) utilizando la versión 138 de SILVA (Quast et al., 2012). El preprocesado inicial y la exploración de datos se llevaron a cabo mediante funciones implementadas en el paquete phyloseq v1.38.0 (McMurdie y Holmes, 2013). Los resultados gráficos se obtuvieron con el programa ggplot2 (Wickham, 2016). Las secuencias ASVs no asignadas a ningún filo, además de las secuencias ASVs con 10 o menos lecturas se eliminaron de los datos. Las secuencias potencialmente contaminantes se identificaron con el paquete decontam (Davis et al., 2018) con el método ajustado a frecuencia y umbral de 0.3. Para la reconstrucción filogenética, las secuencias ASV se alinearon con herramientas

implementadas en el paquete DECIPHER v2.22.0 (Wright, 2016) y la inferencia de la filogenia se realizó usando un árbol filogenético de máxima probabilidad GTR+G+I (*generalized time-reversible with gamma rate variation and invariants*) construido con el paquete phangorn v2.7.1 (Schliep, 2010).

El análisis de la diversidad alfa se llevó a cabo con el paquete breakaway versión 4.7.6 (Willis y Bunge, 2015) para estimar la riqueza, y el paquete DivNet versión 0.4.0 para la diversidad (Willis y Martin, 2020). Para los análisis de diversidad beta, los valores de lectura cero se reemplazaron con valores imputados usando el método *square root Bayesian multiplicative* implementado en zCompositions v1.4 (Palarea-Albaladejo y Martín-Fernández, 2015). Las distancias Euclidianas se calcularon (dist, base R 4.1.1) llevando a cabo primero la transformación de los datos mediante *phylogenetic isometric log ratio transformation* implementada en el paquete phylr (Silverman et al., 2017). Las distancias calculadas fueron utilizadas para realizar los análisis PCA o NMDS utilizando las herramientas implementadas en el paquete phyloseq. Las diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento se estimaron mediante PERMANOVA por parejas utilizando la función `adonis.pair` incluida en el paquete EcoUtils (<https://github.com/GuillemSalazar/EcoUtils>), que utiliza la función `adonis` del paquete VEGAN (Dixon, 2003). La homogeneidad de las varianzas se estimó mediante las funciones `betadisper` y `permutest` implementadas en el paquete VEGAN. Las abundancias diferenciales de taxones bacterianos entre los grupos de tratamiento se estimaron mediante funciones implementadas en el paquete corncob (Martin et al., 2020), o en el paquete ANCOM-BC (Lin y Peddada, 2020).

4.8. Determinación de los contenidos fecales de ácidos grasos de cadena corta

La determinación de los SCFA en muestras fecales se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Takeshi Furuhashi (2018), con algunas modificaciones. Las

Metodología

muestras de heces (50 mg) se homogenizaron con 1 mL de isobutanol (10% v/v) en un equipo FastPrep-24™ 5^G. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 min a 12600×g. Los sobrenadantes (629 µL) se mezclaron con 23 µL de ácido isovalérico (patrón interno a una concentración final de 20 mg/L, Fluka), 125 µL de NaOH 20 mM (Panreac) y agua desionizada hasta un volumen final de 800 µL. Una porción de esta mezcla (400 µL) se derivatizó empleando 100 µL de piridina (Sigma), 80 µL de isobutanol y 70 µL de agua desionizada, a la cual se le adicionó posteriormente 50 µL de cloroformiato de isobutilo (Sigma). Los ésteres de ácidos grasos se retroextrajeron en 150 µL de hexano tras centrifugación (3 min a 13800×g). La fase orgánica se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, Agilent 5977B GC/MSD).

Los derivados se separaron en una columna capilar [DB-5 MS Ultra Inert capillary column (30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm) (Agilent)]. Las muestras (1.3 µL) se inyectaron en modo split a un ratio 1:50, empleando helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min. La temperatura de la fuente de iones del GC-MS y de la línea de transferencia se mantuvo a 250 °C. El gradiente de temperatura del horno fue el siguiente: 5 min a 40 °C; aumento de 4 °C/min hasta alcanzar los 90 °C y aumento de 30 °C/min hasta alcanzar los 290 °C. Los compuestos se identificaron empleando la librería de espectros de masas NIST 17 (versión 2011, Agilent). Los datos se analizaron mediante el programa Agilent MassHunter Qualitative Analysis (versión B.06.00) y la cuantificación se realizó empleando disoluciones patrón (5-50 mg/L) de ácido acético (Janssen Chimica), ácido propiónico (Fluka) y ácido butírico (Fluka). Las disoluciones estándar se derivatizaron en las mismas condiciones que las muestras de heces.

El análisis de recuperación se llevó a cabo adicionando una concentración conocida de cada ácido graso (50 mg/L, 23 µL) a alícuotas de 630 µL de homogenizado fecal. Tras añadir, 125 µL de NaOH 20 mM y 23 µL de ácido isovalérico (50 mg/L), la derivatización se llevó a cabo tal y como se ha descrito previamente. El porcentaje de recuperación osciló del 72 al 106%. La precisión se evaluó a través del análisis de cuadruplicados de tres muestras diferentes de heces.

Los porcentajes de desviación estándar relativa (RSD%) para la reproducibilidad fueron los siguientes: ácido acético, $9.7 \pm 2.1\%$; ácido propiónico, $5.7 \pm 3.7\%$; ácido butírico, $10.7 \pm 2.5\%$.

5. Evaluación *in vitro* de la idoneidad de determinadas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) para reducir la toxicidad intestinal del mercurio

En este estudio se empleó el modelo celular combinado descrito en el apartado 2.1. En cada apartado se detallan las condiciones de siembra y los tratamientos aplicados.

5.1. Mantenimiento y cultivo de las cepas de BAL

Se emplearon dos cepas de origen murino aisladas en nuestro laboratorio a partir de heces de ratón e identificadas por secuenciación parcial del ADNr 16S [LE1 (*Lactobacillus intestinalis*); LE2 (*Lactobacillus johnsonii*)]. Se seleccionaron estas cepas porque presentaban una elevada capacidad de captación del Hg, que se mantenía incluso en las condiciones de digestión gastrointestinal (datos no publicados).

Las cepas se cultivaron en medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) a 37 °C en condiciones estáticas. Tras 24 h, se centrifugaron ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C), se eliminó el sobrenadante, y el sedimento bacteriano se lavó con PBS y se resuspendió en 2 mL de PBS. Posteriormente, las cepas se inactivaron mediante calor (85 °C durante 30 min), produciendo una pérdida de la viabilidad superior a 7 unidades logarítmicas, determinada mediante recuento en placa. La densidad óptica (DO) fue medida a una λ de 600 nm. Cada cepa de BAL se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.2. Ensayos para determinar las condiciones de exposición de las células a mercurio en presencia de BAL

Para establecer las condiciones óptimas de exposición del modelo celular, se ensayaron diferentes DO (0.150, 0.200 y 0.600 DO₆₀₀) y diferentes tiempos de inicio de la exposición (desde el momento de la siembra y 3 días postsiembra). La formación de la monocapa se monitorizó mediante su visualización a través de un microscopio óptico invertido (OPTIKA B-500) y mediante la medida de la RET y la permeabilidad a LY a tiempo final.

5.3. Condiciones de coexposición del tricultivo a BAL y mercurio

Las células Caco-2 y HT29-MTX se sembraron a una densidad de 4.4×10^4 células/cm² en una proporción 70/30 en insertos colocados en placas de 12 pocillos. En el lado basolateral se sembraron monocitos THP-1 diferenciados previamente a macrófagos. Tres días después de la siembra, las células se expusieron apicalmente a Hg(II) y MeHg (1 mg/L) en MEM-7.5% SFB con o sin la adición de las cepas de BAL (LE1 y LE2) (0.15 DO₆₀₀) durante 4 días. Los macrófagos fueron reemplazados cada 4 días y los medios de cada compartimento cada 2 días.

Tras la exposición, se analizaron los siguientes parámetros, siguiendo los protocolos que se describen en la sección 3: niveles intracelulares de ROS/RNS (apartado 3.2.1), respuesta pro-inflamatoria (apartado 3.2.2), expresión génica de las proteínas de las uniones intercelulares y capa de mucus (apartado 3.2.3) y funcionalidad de la monocapa intestinal (apartados 3.2.4 y 3.2.5).

Adicionalmente, se analizó la capacidad de quelación de las cepas de BAL como un posible mecanismo de protección frente a la toxicidad. Las cepas LE1 y LE2 (0.15 DO₆₀₀) se incubaron en MEM-7.5% SFB adicionado con Hg(II) y MeHg (1 mg/L) durante 48 h a 37 °C en constante agitación para evitar la sedimentación de las bacterias. Los parámetros de incubación fueron seleccionados en base a las condiciones en las que fueron llevados a cabo los

experimentos con los cultivos celulares. Tras la incubación, los medios se centrifugaron durante 5 min a 13800×g y las bacterias y los sobrenadantes se analizaron para determinar el contenido en Hg siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.7.

6. Evaluación *in vivo* de la idoneidad de las cepas LE1 y LE2 como estrategias de protección frente a la toxicidad intestinal del mercurio

Tras los ensayos *in vitro* con las cepas LE1 y LE2, se evaluó si el efecto protector observado *in vitro* también se evidenciaba *in vivo*. Se emplearon ratones hembra BALB/c (n=32), los cuales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de 8 animales cada uno. El primer grupo no recibió tratamiento (control negativo), al segundo grupo se le administró MeHg (control positivo) y los dos grupos restantes se coexpusieron a MeHg y cada una de las cepas de BAL (LE1: grupo 3, LE2: grupo 4). El MeHg se dosificó a través del agua de bebida (5 mg/L) y las BAL (10⁹ UFC) se dosificaron mediante sonda gástrica a modo de suspensión en 100 µL de 0.9% NaCl, diariamente durante 2 meses. Los ratones de los grupos control negativo y control positivo recibieron igualmente una dosificación intragástrica diaria de 100 µL de 0.9% NaCl. A lo largo de la exposición se monitorizó el peso corporal de los animales, la cantidad de agua y alimentos ingeridos, así como el estado general y el comportamiento. Al final de la exposición, los animales se sacrificaron por inhalación de isofluorano y se recogieron muestras de intestino delgado y grueso, y heces.

Para determinar el efecto protector de ambas cepas de BAL se analizaron los siguientes parámetros, siguiendo los protocolos que se describen en la sección 4: respuesta pro-inflamatoria (apartado 4.2.1), infiltración de neutrófilos (apartado 4.2.2), ROS/RNS intracelular (apartado 4.3.1), contenidos tisulares de GSH (apartado 4.3.3), estructura del epitelio intestinal (apartado 4.4), permeabilidad intestinal (apartado 4.6) y perfil de SCFA (apartado 4.7).

Metodología

Adicionalmente, para determinar las posibles rutas implicadas en la protección frente a la toxicidad generada por el MeHg, se analizó la expresión génica de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y su receptor, IL10R2, y de proteínas implicadas en la ruta de señalización Nrf2 (factor nuclear eritroide 2), que regula la expresión de enzimas antioxidantes y anti-inflamatorias (Niture et al., 2014). Los oligonucleótidos empleados se detallan en la Tabla 5.

7. Extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y cuantificación de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)

La extracción de ARN se llevó a cabo a partir del pellet de células o a partir de 20 mg de tejido empleando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó por espectrometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación 260/280 nm (Nanodrop Technologies). Además, se comprobó la calidad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% m/v (Scharlau) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), verificando la presencia de las bandas de ARN ribosómico 18S y 28S.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Reverse Transcriptase Core kit, Eurogentec Headquarters) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción (Tabla 4, 10 μ L de volumen final) se sometió a una etapa inicial de calentamiento a 25 °C durante 10 min, seguido de un ciclo de RT a 48 °C durante 30 min y finalmente, se inactivó el enzima a 95 °C durante 5 min.

Tabla 3. Componentes de la reacción de RT.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Tampón de reacción 10 \times	1	1 \times
25 mM MgCl_2	2	5 mM
2.5 mM dNTP	2	500 μM de cada dNTP
Oligo d(T) ₁₅ VN	0.5	2.5 μM
Inhibidor de RNAsas	0.2	0.4 U/ μL
Retrotranscriptasa (EuroScript RT)	0.25	1.25 U/ μL
Muestra	---	200 ng ARN total

Para el análisis de expresión génica de los marcadores listados en la Tabla 4 y 5, se llevó a cabo la amplificación del ADNc mediante el equipo LightCycler® 480 Real-Time qPCR System (Roche Diagnostics). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μL , empleando los siguientes volúmenes:

- 5 μL de LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (2 \times , Roche).
- 1.5 μL de agua libre de ARNasa.
- 0.5 μL de cada oligonucleótido (10 μM) (Biolegio).
- 2.5 μL de ADNc (6.7 – 10 ng/ μL).

La reacción consistió en una etapa inicial a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min y 40 ciclos posteriores con una etapa de desnaturalización (95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s), una de alineamiento (55 $^{\circ}\text{C}$, 10 s) y una de extensión (72 $^{\circ}\text{C}$, 20 s).

La eficacia de cada pareja de oligonucleótidos se analizó mediante una curva de diluciones seriadas empleando muestras de ADNc procedentes de los ensayos *in vitro* o *in vivo*. Los resultados se analizaron en el software REST2009 (Horgan y Dempfle, 2002).

8. Análisis estadístico

Todos los análisis *in vitro* se llevaron a cabo al menos en triplicado en cultivos independientes y fueron verificados en un segundo experimento.

La determinación del tamaño muestral necesario para los ensayos de toxicidad *in vivo* se llevó a cabo empleando el programa GPower 3.1, con un $\alpha = 0.05$ y una potencia ($1 - \beta$) de 0.8.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba t-student o el análisis de la varianza con un solo factor (ANOVA) con comparaciones múltiples post hoc (test de Fisher HSD) cuando se cumplieron los requerimientos de normalidad (test Shapiro-Wilk) y de homogeneidad entre las varianzas de los grupos (test Brown-Forsythe). Para el resto de los casos, los datos fueron analizados con el test de Mann-Whitney U o el test de Kruskal-Wallis con múltiples comparaciones empleando el test de Dunn. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo con el programa SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc) o el XLSTAT (Addinsoft).

Tabla 4. Oligonucleótidos de origen humano empleados en la presente tesis.

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>GADPH</i>	NM_002046.3	5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3' 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'	113	2.0	Cario et al. (2000)
<i>RN18s</i>	NM_003286.2	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'	151	2.0	Wang et al. (2012)
<i>HSP70</i>	NM_005345.6	5'-GGAAGGACCGAGCTCTTCTCGC-3' 5'-CAGGAGTAGGTGGTGCCAGGTC-3'	137	2.18	Alard et al. (2009)
<i>HSP90</i>	NM_001271971.2	5'-GGCAGTCAAGCACTTTTCTGTAG-3' 5'-GTCAACCACACCACGGATAA-3'	199	2.10	Yao et al. (2010)
<i>MT2A</i>	NM_005953.5	5'-AAAGGGGCGTCGGACAAGT-3' 5'-TAGCAAACGGTCACGGTCAG-3'	126	2.10	Song y Freedman (2005)
<i>ZOI</i>	NM_003257.3	5'-CGAGTTGCAATGGTTAACGGA-3' 5'-TCAGGATCAGGACGACTTACTGG-3'	146	2.28	Orbán et al. (2008)
<i>CLDN1</i>	NM_021101.4	5'-CCGGCGACAACATCGTGAC-3' 5'-CGGGTTGCTTGCAATGTGC-3'	136	1.93	Kaarteenaho et al. (2010)
<i>SI</i>	NM_001041.3	5'-AAATCAGACACCCAATCGTTTCC-3' 5'-GGGCAACCTTCACATCATAAA-3'	134	1.97	Wang et al. (2012)
<i>DPP4</i>	NM_001935.3	5'-GTGGCGTTC AAGTGTGG-3' 5'-CAAGGTTGTCTTCTGGAGTTGG-3'	111	2.10	Varona et al. (2010)
<i>IL13</i>	NM_002188.3	5'-CCTCATGGCGTTTGTGAC- 3' 5'-TCTGTTTCTGGGTGATGTTGA- 3'	134	1.97	Spandidos et al. (2009)
<i>IL8</i>	NM_001354840.3	5'-GAACTGAGAGTGATTGAGAGTGGA- 3' 5'-CTCTTCAAAAACCTTCTCCACAACC- 3'	134	2.04	Ohki et al. (2002)
<i>IL1B</i>	NM_000576.3	5'-TCCCAGCCCTTTTGTGTA- 3' 5'-TTAGAACCAAATGTGCCCGTC- 3'	91	1.89	Locati et al. (2002)

<i>CXCL10</i>	NM_001565.4	5'-TGATGGCCTTCGATTCTGGATT-3' 5'-CTGGCATTCAAGGAGTACCTC-3'	198	2.10	Spandidos et al. (2009)
<i>CXCL9</i>	NM_002416.3	5'-GAAGGGCTTGGGGCAAATTG-3' 5'-GCTGGTTCTGATTGGAGTGC-3'	129	2.04	Spandidos et al. (2009)
<i>MUC5AC</i>	NM_001304359.2	5'-CCTTCGACGGACAGAGCT-3' 5'-TCTCGGTGACAACACGAA-3'	111	1.97	Ohuchida et al. (2006)
<i>CD36</i>	NM_00100158.3	5'-GCCAAGGAAAATGTAACCCAGG-3' 5'-GCCTCTGTTCCAAGTATAGTGA-3'	101	1.89	Alshahrani et al. (2017)
<i>CD68</i>	NM_001040059.2	5'-CTTCTCTCATTCCCCTATGGACA-3' 5'-GAAGGACACATTGTAAGTCCACC-3'	105	2.10	Wang et al. (2018)
<i>NLRP3</i>	NM_001079821.3	5'-GATCTTCGCTGCGATCAACAG-3' 5'-GTGCATTATCTGAACCCAC-3'	80	1.97	Guo et al. (2018)

Tabla 5. Oligonucleótidos de origen murino empleados en la presente tesis.

Gen	GenBank ID	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>Rn18s</i>	NR_003278.3	5' -CGGACAGGATTGACAGATTG- 3' 5' -CAAATCGCTCCACCAACTAA- 3'	98	1.81	Cieslik et al. (2015)
<i>Zo1</i>	NM_009386.2	5' -GCTAAGAGCACAAGCAATGGA- 3' 5' -GCATGTTCAACGTTATCCAT- 3'	246	2.29	Katsuno et al. (2008)
<i>Ocln</i>	NM_001360538.1	5' -ATGTCCGGCCGATGCTCTC- 3' 5' -TTTGGCTGCTTTGGGTCTGTAT- 3'	308	1.97	Van Hul et al. (2018)
<i>Muc2</i>	NM_023566.4	5' - GCTGACGAGTTGGTGAATG- 3' 5' - GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC- 3'	132	2.22	Hoebler et al. (2006)
<i>Il13</i>	NM_008355.3	5' -GAGGATATTGCATGGCCTCT- 3' 5' -GTTGCTTTGTGTAGCTGAGCA- 3'	116	2.36	Lee et al. (2014)
<i>Il4</i>	NM_021283.2	5' - CCCAGCTAGTTGTCATCCTG - 3' 5' - CAAGTGATTTTTGTCGCATCCG - 3'	78	1.92	Xia et al. (2018)
<i>Il10</i>	NM_010548.2	5' - GCTCTTACTGACTGGCATGAG - 3' 5' - CGCAGCTCTAGGAGCATGTG - 3'	105	1.96	Souza et al. (2007)
<i>Il10r2</i>	NM_001405058.1	5' - GGACGTCTCTTCCACAGCAC- 3' 5' - CTGCTTGCTGCCTTCAGACT - 3'	146	2.04	Spandidos et al. (2009)
<i>Nrf2</i>	NM_010902.5	5' - CAGCATAGAGCAGGACATGGAG - 3' 5' - GAACAGCGGTAGTATCAGCCAG - 3'	107	2.10	Shrestha et al. (2022)
<i>Ho1</i>	NM_010442.2	5' - AGGTACACATCCAAGCCGAGA - 3' 5' - CATCACCAGCTTAAAGCCTTCT - 3'	86	2.02	Ngo et al. (2017)
<i>Nqo1</i>	NM_008706.5	5' - ACGACAACGGTCCTTTCCAGA - 3' 5' - CAGAAACGCAGGATGCCACT - 3'	142	2.08	Chen et al. (2019)

Capítulo 1

Evaluación *in vitro* de la toxicidad del mercurio en el epitelio intestinal

Los estudios sobre toxicidad intestinal del Hg, tal y como hemos indicado en la Introducción (apartado 6.2) son escasos, aunque este metal y especialmente su forma orgánica, es uno de los contaminantes alimentarios que mayor preocupación despiertan en los organismos relacionados con la seguridad alimentaria. Algunos estudios *in vivo* han mostrado el carácter tóxico a nivel intestinal, si bien se han centrado en la forma inorgánica (Jiang et al., 2018; Zhao et al., 2020), mientras que *in vitro* el estudio más detallado emplea un modelo simplificado de epitelio intestinal para mostrar el efecto del Hg(II) y el MeHg sobre la permeabilidad intestinal en una exposición aguda (Vázquez et al., 2014b).

El papel clave de la intercomunicación epitelio/sistema inmune para el adecuado funcionamiento del intestino y su respuesta frente a situaciones de estrés está bien establecido (Wittkopf et al., 2014). En los modelos *in vitro* de mucosa intestinal que sólo incorporan células epiteliales, esta intercomunicación no se establece. De ahí, la importancia de incorporar no sólo células epiteliales, sino también células del sistema inmunitario en el modelo celular. Estos sistemas, aunque más complejos en su mantenimiento y manejo, recrean de forma más realista la situación *in vivo*.

En este capítulo hemos llevado a cabo un estudio de toxicidad empleando un modelo combinado que tiene en cuenta la composición mayoritaria del epitelio, mediante el cocultivo de enterocitos y células mucosecretoras en una monocapa epitelial. Gracias al empleo de un sistema bicameral de soporte, esta monocapa se ha combinado con macrófagos en la parte inferior, emulando la situación *in vivo* con un epitelio en contacto por el lado basal con el sistema inmunitario. Este sistema más complejo se ha adaptado para poder realizar exposiciones continuadas mediante la renovación de las células inmunitarias a distintos tiempos durante los 10 días de exposición. Los resultados obtenidos han permitido confirmar la toxicidad intestinal de ambas formas mercuriales e identificar algunos de los mecanismos de acción responsables de la misma. Además, la incorporación de los

macrófagos ha permitido corroborar el importante papel que puede tener el sistema GALT en la respuesta intestinal al tóxico.

RESULTADOS

1. Establecimiento de las condiciones para el tricultivo Caco-2/HT29-MTX/THP-1 y la exposición a mercurio durante tiempos prolongados

Se llevaron a cabo ensayos preliminares para establecer las condiciones de exposición. Dado que se trataba de una exposición subcrónica desde el momento de siembra, era necesario incluir en el medio de tratamiento SFB. Tal y como se ha comentado previamente (Metodología, apartado 3.1), existía la posibilidad de que hubiera interacciones Hg/SFB que pudieran reducir la disponibilidad del metal para las células, por lo que se optó por disminuir el porcentaje de SFB en el medio de cultivo. Se evaluaron distintos parámetros para confirmar que la reducción de suero no conllevara efectos negativos sobre la monocapa.

La Figura 8 muestra la formación de la monocapa Caco-2/HT29-MTX en MEM con diferentes porcentajes de SFB tras 10 días de cultivo. En todas las monocapas se observó una estructura típica de empedrado característica de estos tipos celulares.

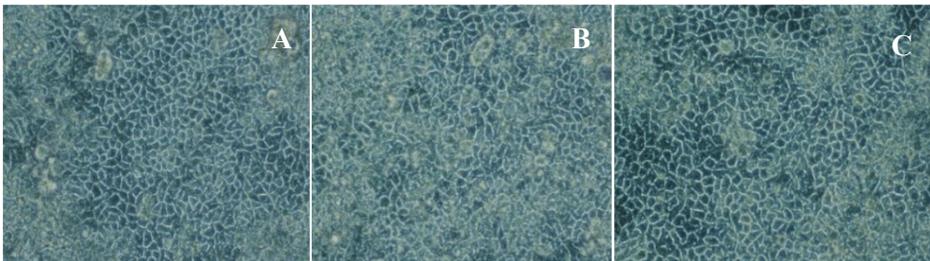


Figura 8. Imágenes de microscopía óptica de monocapas Caco-2/HT29-MTX cultivadas a diferentes concentraciones de SFB (A: 5%, B: 7.5%, C: 10%) tras 10 días de siembra. Magnificación 20×.

Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la expresión del gen *MUC5AC* (Tabla 7), empleado como marcador de diferenciación de las células mucosecretoras. Sin embargo, la expresión de los marcadores de diferenciación de

Capítulo 1. Resultados

las células Caco-2 (*SI* y *DPP4*, Tabla 6) mostró una regulación a la baja en las monocapas cultivadas en MEM-5% SFB respecto a las mantenidas en MEM-10% SFB. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió llevar a cabo la exposición con MEM-7.5% SFB.

Tabla 6. Expresión génica de marcadores de diferenciación en monocapas Caco-2/HT29-MTX. Células cultivadas con distintas concentraciones de SFB durante 10 días. Valores expresados como unidades de cambio de expresión respecto a las células cultivadas con MEM-10% SFB (media \pm SE, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células cultivadas con MEM-10% SFB. En color azul se muestran las regulaciones a la baja respecto a las células cultivadas con MEM-10% SFB.

	<i>SI</i>	<i>DPP4</i>	<i>MUC5AC</i>
MEM-5% SFB	0.49 \pm 0.29*	0.45 \pm 0.20*	0.77 \pm 0.17
MEM-7.5% SFB	0.96 \pm 0.27	0.71 \pm 0.35	0.71 \pm 0.27

Las concentraciones de Hg se eligieron en función de los contenidos de Hg que habitualmente se reportan en muestras de alimentos (0.1, 0.5 y 1 mg/L) e inicialmente se planteó una exposición de 12 días. En la Figura 9 se muestran las monocapas intestinales a los 10 días postsiembra en presencia de ambas especies de Hg. Todas las concentraciones permitieron la formación de monocapas íntegras observándose a medida que aumenta la concentración una mayor presencia de los gránulos de secreción típicos de las células HT29-MTX (Figura 9). La exposición a 12 días se descartó porque la hiperproducción de estos gránulos en las células tratadas dificultaba el análisis de las monocapas y su recuperación.

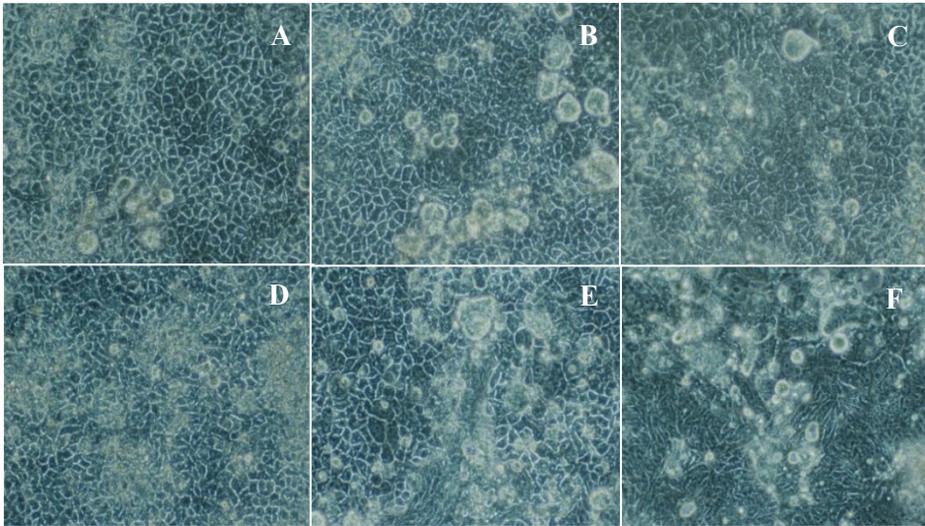


Figura 9. Imágenes de microscopía óptica de monocapas Caco-2/HT29-MTX. Células cultivadas a diferentes concentraciones de Hg(II) y MeHg (0.1, 0.5 y 1 mg/L) con MEM-7.5% SFB tras 10 días de exposición. A, 0.1 mg/L Hg(II); B, 0.5 mg/L Hg(II); C, 1 mg/L Hg(II); D, 0.1 mg/L MeHg; E, 0.5 mg/L MeHg; F, 1 mg/L MeHg. Magnificación 20×.

Además de determinar las condiciones óptimas de exposición para mantener una monocapa epitelial íntegra, fue necesario optimizar las condiciones de diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos. Asimismo, se puso a punto el modo de combinar éstos con la monocapa Caco-2/HT29-MTX para poder disponer de un modelo que permitiera realizar una exposición subcrónica. Para evaluar el proceso de diferenciación se analizaron tres parámetros que permiten distinguir monocitos de macrófagos: la capacidad de adherencia, la morfología nuclear y la expresión de ciertos marcadores que aumentan su expresión durante el proceso de diferenciación.

Capítulo 1. Resultados

La Tabla 7 presenta el porcentaje de células THP-1 que adquirieron adherencia tras 24 y 48 h de exposición a diferentes concentraciones de PMA. El máximo de adherencia se alcanzó en las células expuestas a 200 nM de PMA durante 48 h.

Tabla 7. Porcentaje de adherencia de las células THP-1. Tratamiento de las células a diferentes concentraciones de PMA durante distintos tiempos (media \pm SD, n=4).

PMA (nM)	24 h	48 h
50	18.6 \pm 2.1	19.9 \pm 2.0
100	17.7 \pm 3.7	24.5 \pm 1.7
200	22.0 \pm 0.6	62.0 \pm 3.4

Los datos de expresión mostraron que la concentración más alta de PMA aumentaba el grado de diferenciación tras 48 h; ambos marcadores (*CD36* y *CD68*) estaban sobreexpresados respecto a los monocitos no tratados con PMA (Tabla 8).

Tabla 8. Expresión relativa de marcadores de diferenciación en células THP-1. Células expuestas a diferentes concentraciones de PMA tras 48 h de tratamiento (media \pm SE, n=4). Valores expresados como unidades de cambio de expresión respecto a los monocitos no diferenciados con PMA. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a los monocitos no diferenciados. En color rojo se muestran las sobreexpresiones respecto a células no tratadas-

PMA (nM)	<i>CD36</i>	<i>CD68</i>
50	0.6 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3
100	3.8 \pm 1.1*	0.6 \pm 0.3
200	9.8 \pm 2.3*	2.4 \pm 0.7*

En estas condiciones, también se observó un cambio en la morfología nuclear, pasando de un aspecto multilobular característico de monocitos a una morfología

más redondeada (Figura 10). Teniendo en cuenta estos resultados, las condiciones de diferenciación que se utilizaron en el resto del estudio fueron exposiciones a 200 nM de PMA durante 48 h y un período de reposo de 6 h con medio sin PMA tras la diferenciación.

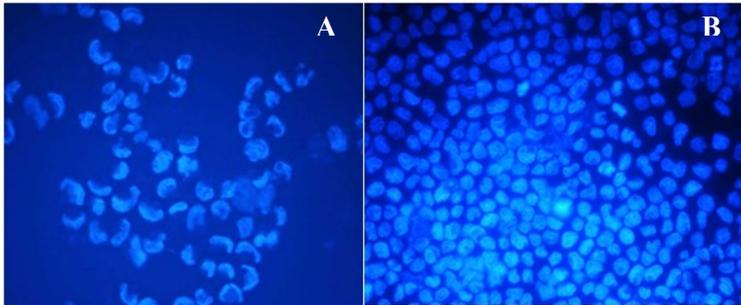


Figura 10. Morfología de los núcleos en células THP-1. Células sin diferenciar (A) y células diferenciadas a macrófagos (B) con 200 nM de PMA durante 48 h (tinción DAPI. Magnificación 20×).

2. Distribución del mercurio durante el ensayo

Tal y como se ha indicado previamente, el tratamiento con Hg se realizó adicionando las especies al compartimento apical, en contacto estrecho con las monocapas intestinales Caco-2/HT29-MTX. El análisis del contenido de Hg total al final del ensayo mostró que una fracción del Hg adicionado al compartimento apical fue captado y transportado por la monocapa intestinal al compartimento basolateral [7% del MeHg y 3% del Hg(II) adicionado]. Además, las células THP-1 internalizaron un 3% del MeHg presente en la fracción basolateral, mientras que no se detectó internalización del Hg(II). Estos datos evidencian que los macrófagos estuvieron continuamente expuestos al tóxico durante el tratamiento, aunque en menor medida que las células intestinales.

3. Respuesta pro-oxidante causada por la exposición a mercurio

La respuesta pro-oxidante a Hg se evaluó inicialmente con y sin la adición de macrófagos, midiendo los niveles intracelulares de ROS/RNS. En líneas generales, las células tratadas con Hg(II) (Figura 11A) presentaron niveles más elevados de ROS/RNS que las expuestas a MeHg (Figura 11B) ($p < 0.001$) a todas las concentraciones ensayadas. La exposición a Hg(II) indujo un aumento significativo de los niveles de ROS/RNS en presencia y ausencia de macrófagos (con THP-1: 0.1 mg/L, 85%; 0.5 mg/L, 90%; 1 mg/L, 140%; sin THP-1: 0.5 mg/L, 111%; 1 mg/L, 139%), a excepción de los tratamientos con 0.1 mg/L en ausencia de las células THP-1, donde no se observaron diferencias significativas respecto al control. La exposición a MeHg produjo un aumento significativo de las especies reactivas solo a las concentraciones más elevadas en presencia de macrófagos (0.5 mg/L, 44%; 1 mg/L, 60%). En la mayoría de los tratamientos, la presencia de macrófagos aumentó la generación de especies reactivas.

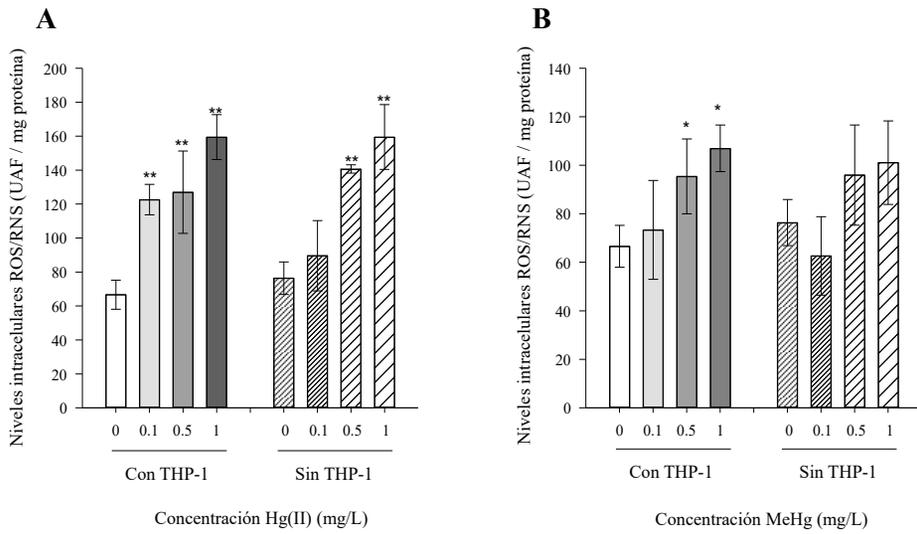


Figura 11. Niveles intracelulares de ROS/RNS en las monocapas Caco-2/HT29-MTX. Células expuestas a Hg(II) y MeHg (0.1, 0.5 y 1 mg/L) durante 10 días, en presencia y ausencia de macrófagos. Los valores se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF)/mg proteína (media \pm SD, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $0.001 \leq p < 0.05$; ** $p < 0.001$) respecto a las células control.

Las células THP-1 diferenciadas también presentaron aumentos significativos ($p < 0.001$) de los contenidos de ROS/RNS tras el tratamiento con Hg cuando estos se determinaron en el modelo expuesto a 1 mg/L de Hg(II) o MeHg [Figura 12; Hg(II): 58%; MeHg: 50%].

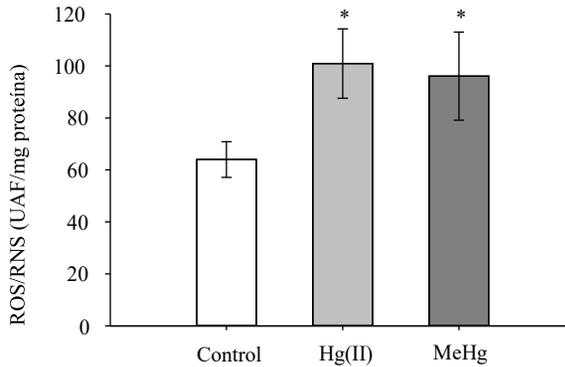


Figura 12. Niveles intracelulares de ROS/RNS en macrófagos THP-1. Células expuestas a Hg(II) o MeHg (1 mg/L). Los valores se expresan como UAF/mg de proteína (media \pm SD, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) respecto a las células control.

El estrés oxidativo se confirmó en ambos tipos celulares (células epiteliales y macrófagos) mediante el análisis de la expresión de proteínas de estrés (Tabla 9). Se determinó la expresión del gen *MT2A*, que codifica la metalotioneína 2, proteína que participa en la respuesta al estrés al unir metales y disminuir su efecto tóxico (Sato y Kondoh, 2002) y de genes de dos proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90), que se ven inducidas en condiciones de estrés y participan en el plegado de las proteínas recién sintetizadas y en la reparación de las proteínas dañadas o mal plegadas (Åkerfelt et al., 2010). La expresión relativa observada en las monocapas Caco-2/HT29-MTX tratadas con Hg apoyó los resultados obtenidos con la determinación de ROS/RNS, ya que en general, todas las concentraciones de Hg(II) inducían una mayor expresión de estos genes y solo las concentraciones más elevadas de MeHg producían este efecto. Por su parte, en los macrófagos se observó un aumento de la expresión de estos marcadores de estrés en la mayoría de los tratamientos, siendo en general, superiores a los evidenciados para las monocapas epiteliales.

Tabla 9. Expresión relativa de marcadores de estrés en las monocapas Caco-2/HT29-MTX y en los macrófagos THP-1. Valores expresados como unidades de cambio de expresión de la metalotioneína 2A (*MT2A*) y las proteínas de choque térmico 70 y 90 (*HSP70*, *HSP90*) respecto a las células control (media \pm SE, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control. En rojo se muestran las sobreexpresiones respecto al control.

Tratamiento con Hg	<i>MT2A</i>		<i>HSP90</i>		<i>HSP70</i>		
	Caco2/HT29-MTX	THP-1	Caco-2/HT29-MTX	THP-1	Caco-2/HT29-MTX	THP-1	
Hg(II)	0.1 mg/L	3.3 \pm 1.0*	13.3 \pm 3.2*	1.8 \pm 0.4*	0.4 \pm 0.1	1.6 \pm 0.5	0.7 \pm 0.3
	0.5 mg/L	2.8 \pm 0.6*	8.5 \pm 1.2*	2.4 \pm 0.4*	1.5 \pm 0.5	2.4 \pm 0.6*	14.5 \pm 1.3*
	1 mg/L	4.6 \pm 1.0 *	14.4 \pm 3.2*	3.4 \pm 0.4*	3.5 \pm 0.9*	1.7 \pm 0.3	3.4 \pm 1.0*
MeHg	0.1 mg/L	0.6 \pm 0.1	13.0 \pm 3.3*	1.3 \pm 0.2	3.0 \pm 0.7*	1.2 \pm 0.3	2.4 \pm 0.7*
	0.5 mg/L	1.0 \pm 0.1	9.6 \pm 3.4*	1.6 \pm 0.3	9.7 \pm 1.9*	3.1 \pm 0.6*	4.1 \pm 1.2*
	1 mg/L	3.5 \pm 0.8 *	8.5 \pm 2.0*	8.0 \pm 2.0*	4.7 \pm 0.9*	5.8 \pm 1.3*	8.4 \pm 2.5*

4. Respuesta pro-inflamatoria causada por la exposición a mercurio

La Figura 13 muestra los contenidos de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 en el lado apical con los distintos tratamientos. En este compartimento, sólo se observó un incremento de los contenidos de esta citoquina en los cultivos expuestos a 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) en presencia de macrófagos (incrementos respecto a las células no tratadas: 27 - 45%).

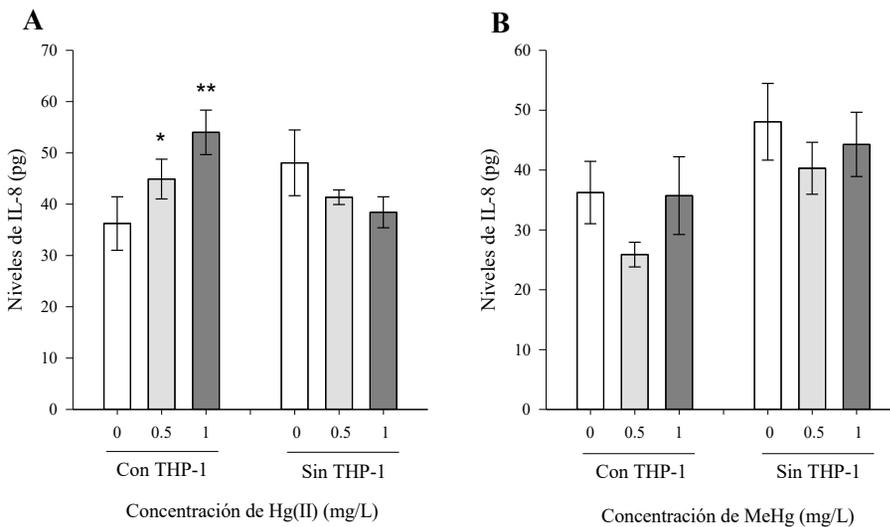


Figura 13. Liberación de IL-8 al compartimento apical en los cocultivos Caco-2/HT29-MTX o en los tricultivos Caco-2/HT29-MTX/THP-1. Las células fueron tratadas con Hg(II) (A) o MeHg (B) (0, 0.5 y 1 mg/L) durante 10 días. Los valores se expresan en pg (media \pm SD, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $0.001 \leq p < 0.05$; ** $p < 0.001$) respecto a las células control.

En el lado basolateral, el tratamiento con Hg(II) aumentó los niveles de IL-8 tanto en ausencia como en presencia de macrófagos (Figura 14; con THP-1: 0.5 mg/L, 69%; 1 mg/L, 126%; sin THP-1: 0.5 mg/L, 45%; 1 mg/L, 39%). Sin embargo, el tratamiento con MeHg, sólo incrementó la secreción de IL-8 cuando

los macrófagos THP-1 estaban presentes en el compartimento basolateral y a la concentración más elevada (1 mg/L, 15%).

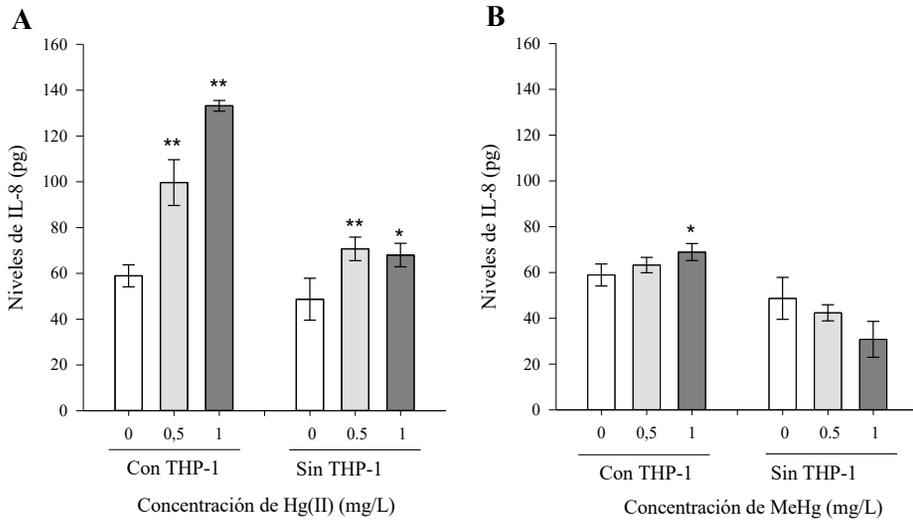


Figura 14. Liberación de IL-8 al compartimento basolateral en los cocultivos Caco-2/HT29-MTX o en los tricultivos Caco-2/HT29-MTX/THP-1. Las células fueron tratadas con Hg(II) (A) o MeHg (B) (0, 0.5 y 1 mg/L) durante 10 días. Los valores se expresan en pg (media \pm SD, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $0.001 \leq p < 0.05$; ** $p < 0.001$) respecto a las células control.

El efecto del tratamiento con Hg en la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β fue medido en presencia de macrófagos THP-1 (Figura 15). La exposición a Hg(II) solo indujo un incremento significativo en el contenido basolateral de IL-1 β a la concentración más elevada (1 mg/L: 63%), mientras que el tratamiento con MeHg incrementó su liberación a la concentración de 0.5 mg/L (46%) y 1 mg/L (39%).

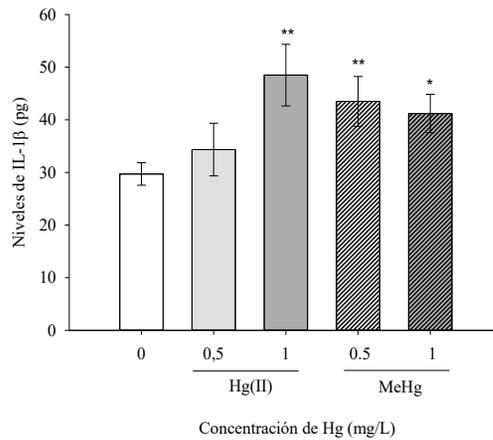


Figura 15. Liberación de IL-1 β al compartimento basolateral de tricultivos Caco-2/HT29-MTX/THP-1. Las células fueron tratadas con Hg(II) y MeHg (0, 0.5 y 1 mg/L) durante 10 días. Los valores se expresan en pg (media \pm SD, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $0.001 \leq p < 0.05$; ** $p < 0.001$) respecto a las células control.

Para determinar el papel de ambos tipos celulares (epiteliales e inmunitarias) en la respuesta pro-inflamatoria, se midió la expresión de varios marcadores de inflamación en las monocapas Caco-2/HT29-MTX y en los macrófagos tras la exposición subcrónica a Hg (1 mg/L) (Tabla 10). Los datos mostraron un mayor aumento en la expresión del gen *CXCL8*, que codifica la interleuquina IL-8, en los macrófagos que en las monocapas Caco-2/HT29-MTX, mientras que la citoquina *IL1 β* solo experimentó un aumento en los macrófagos tratados con Hg. La sobreexpresión de los genes de las quimioquinas *CXCL9* y *CXCL10*, desencadenada por la exposición a Hg, confirmó la adquisición del fenotipo pro-inflamatorio M1 por la población de macrófagos. Todos estos resultados sugieren que, en el modelo celular empleado, los macrófagos son los principales responsables de la respuesta pro-inflamatoria causada por la exposición a Hg.

Tabla 10. Expresión relativa de marcadores pro-inflamatorios en monocapas Caco-2/HT29-MTX y en células THP-1. Los valores se expresan como unidades de cambio de expresión respecto a las células control (media \pm SE, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células control. En rojo se muestran las sobreexpresiones respecto al control.

Tratamientos	Caco-2/HT29-MTX		THP-1			
	<i>IL1β</i>	<i>CXCL8</i>	<i>IL1β</i>	<i>CXCL8</i>	<i>CXCL9</i>	<i>CXCL10</i>
1 mg/L Hg(II)	1.2 \pm 0.1	6.4 \pm 0.6*	4.9 \pm 2.5*	17.7 \pm 3.5*	31.2 \pm 13.1*	30.3 \pm 7.3*
1 mg/L MeHg	0.8 \pm 0.1	4.2 \pm 0.6*	5.0 \pm 2.7*	21.0 \pm 4.7*	13.6 \pm 3.6*	42.4 \pm 8.0*

Capítulo 1. Resultados

Para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la respuesta inflamatoria, se analizó la respuesta en presencia de inhibidores de varias rutas de señalización relacionadas con la inflamación y el estrés (JNK o SAPK, p38 MAPK y IKK/NF- κ B; Figura 16). La adición se realizó en el compartimento basolateral porque, tal y como habíamos puesto de manifiesto previamente, la mayor respuesta se producía a este nivel, debido a la participación de los macrófagos.

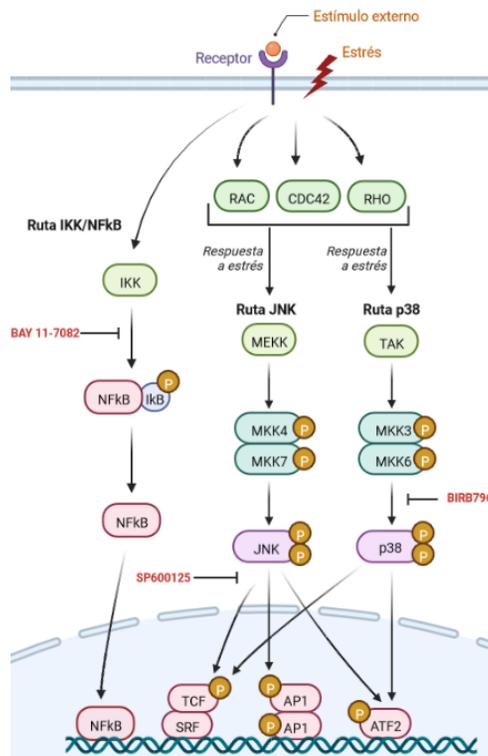


Figura 16. Representación esquemática de las rutas de señalización en inflamación y estrés. Los inhibidores empleados en este estudio se identifican en rojo. La presencia de un estímulo externo o estrés genera una transducción de señal mediada por diferentes proteínas quinasas que desemboca en la activación de reguladores transcripcionales que controlan la expresión de diversos genes implicados en la respuesta pro-inflamatoria/pro-oxidante.

La Tabla 11 muestra los marcadores de inflamación en los macrófagos tras la inhibición de las rutas mencionadas anteriormente. Todos los inhibidores disminuyeron significativamente la expresión de los marcadores respecto a las células tratadas con Hg sin inhibidores, sugiriendo la participación de estas rutas en la respuesta pro-inflamatoria/pro-oxidante provocada por el metal. Adicionalmente, se evaluó la modulación de la expresión del inflamasoma *NLRP3* (familia NLR conteniendo dominio piridina 3) en los macrófagos tratados, con el fin de determinar si la activación de este inflamasoma también podía estar involucrada en la respuesta celular al metal. Los datos mostraron una sobreexpresión estadísticamente significativa del gen *NLRP3* tras el tratamiento con Hg [número de veces aumentado respecto a células no tratadas: 1 mg/L Hg(II), 3.06 ± 0.6 ; 1 mg/L MeHg, 2.4 ± 0.5 , $p < 0.05$], sugiriendo su participación en la acción tóxica del metal.

Tabla 11. Expresión relativa de marcadores de inflamación en macrófagos THP-1 tratados con inhibidores de rutas de señalización. Las células fueron tratadas apicalmente con Hg (1 mg/L) y basolateralmente con los distintos inhibidores: BAY 11-7082 (NF- κ B); BIRB796 (p38 MAPK); SP600125 (JNK). Los valores se expresan como unidades de cambio de expresión respecto a las células tratadas con Hg sin inhibidores (media \pm SE, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto ($p < 0.05$) a las células sin inhibidores. En azul se muestran regulaciones a la baja respecto al control.

Especie mercurial	Inhibidor	<i>CXCL10</i>	<i>CXCL9</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL1B</i>
Hg(II)	BAY 11-7082	0.5 \pm 0.10	0.5 \pm 0.07	0.8 \pm 0.20	0.3 \pm 0.07*
	BIRB796	1.5 \pm 0.20	0.4 \pm 0.06*	0.6 \pm 0.17	0.8 \pm 0.11
	SP600125	0.1 \pm 0.02*	0.4 \pm 0.06*	0.6 \pm 0.10	0.7 \pm 0.14
MeHg	BAY 11-7082	0.2 \pm 0.04*	0.3 \pm 0.04*	0.7 \pm 0.10*	0.4 \pm 0.07*
	BIRB796	0.3 \pm 0.06*	1.0 \pm 0.14	0.6 \pm 0.15	0.4 \pm 0.09*
	SP600125	0.2 \pm 0.04*	1.1 \pm 0.15	0.7 \pm 0.28	0.6 \pm 0.16

5. Efectos del mercurio sobre la morfología de las uniones estrechas

La influencia del Hg sobre la organización de las uniones estrechas se evaluó mediante la inmunolocalización de la proteína ZO-1 en el monocapa epitelial. La Figura 17 muestra la distribución de esta proteína en las monocapas Caco-2/HT29-MTX no tratadas (Figura 17A), tratadas con 1 mg/L de Hg(II) (Figura 17B) o con 1 mg/L de MeHg (Figura 17C) en presencia de macrófagos. En todos los casos se evidenció una estructura típica de empedrado con una localización periférica de la ZO-1. No obstante, en las monocapas expuestas a Hg, especialmente a Hg(II) (Figura 17B), se puso de manifiesto un intenso zigzagueo en las líneas de unión, indicativo de una mayor laxitud de las uniones. Además, el tratamiento con ambas especies indujo un incremento en el tamaño celular respecto a las células control. Los efectos sobre las uniones intercelulares se confirmaron mediante el análisis de la expresión del gen codificante de la proteína ZO-1 en las células expuestas a 1 mg/L de Hg(II) y MeHg, observándose una regulación a la baja con respecto a las células no tratadas ($p < 0.05$) (Figura 17D).

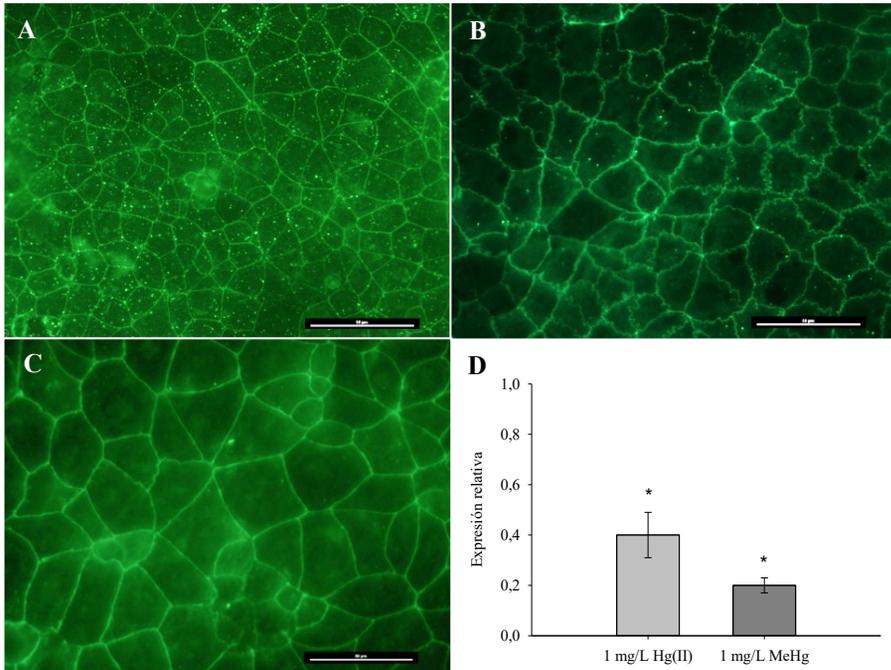


Figura 17. Inmunolocalización de la proteína ZO-1 y expresión relativa del gen *ZO1* en monocapas Caco-2/HT29-MTX. Las figuras muestran células no tratadas (A) y células tratadas con 1 mg/L de Hg(II) (B) o 1 mg/L de MeHg (C) durante 7 días, en presencia de macrófagos THP-1. Las barras de escala representan una longitud de 50 µm. Magnificación 40×. Expresión génica relativa de *ZO1* en monocapas Caco-2/HT29-MTX tras la exposición a Hg (D) (media ± SE, n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a las células control.

6. Efectos del mercurio en la producción y secreción de mucus

La secreción de mucus fue analizada mediante la tinción con azul alcian, un colorante que se une a los carbohidratos de las mucinas, los componentes mayoritarios de la capa de mucus (Fagan et al., 2020). Tal y como muestra la Figura 18, las monocapas Caco-2/HT29-MTX tratadas con Hg(II) (Figura 18B) y MeHg (Figura 18C) presentaron una mayor superficie teñida por este colorante que las células control (Figura 18A), indicando una mayor secreción de mucus en las células expuestas a Hg. Además, la sobreexpresión del gen *MUC5AC* ($p < 0.05$) (Tabla 13), la principal mucina secretada por la línea celular HT29-MTX, confirmó la inducción de esta secreción en las células tratadas de manera subcrónica con el metal.

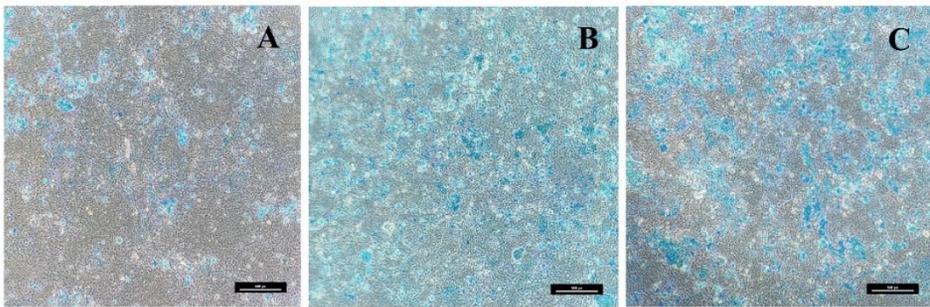


Figura 18. Tinción con azul alcian de las monocapas Caco-2/HT29-MTX. A) Células no tratadas, B) células tratadas con 1 mg/L Hg(II), C) células tratadas con 1 mg/L MeHg. Los tratamientos se llevaron a cabo durante 10 días en presencia de macrófagos THP-1. Las barras de escala representan una longitud de 100 px. Magnificación 10 \times .

Se han relacionado varias cascadas de señalización celular con la secreción de mucus en células caliciformes, inducidas por citoquinas Th1 (TNF α , IL-1 β) y Th2 (IL-13, IL-4) (Cornick et al., 2015). Los datos mostrados en el apartado 4, pusieron de manifiesto que en las monocapas epiteliales no había un aumento de las citoquinas Th1 (Tabla 10). Sin embargo, sí se evidenció un aumento de la

Capítulo 1. Resultados

expresión de la citoquina *IL13* en las células epiteliales tratadas con las concentraciones más elevadas de Hg, especialmente en las exposiciones con MeHg (Tabla 12). La inducción de la ruta IL4/IL13/STAT6 en las monocapas Caco-2/HT29-MTX expuestas a Hg se confirmó con el aumento de la fosforilación del factor de transcripción STAT6, determinado mediante inmunocitoquímica (Figura 19).

Tabla 12. Expresión relativa de *MUC5AC* e *IL-13* en las monocapas epiteliales Caco-2/HT29-MTX tras la exposición a Hg. Los valores se expresan como unidades de cambio de expresión respecto a las células control (media \pm SE, n=4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células no expuestas. En rojo se muestran las sobreexpresiones respecto al control.

Tratamientos	<i>MUC5AC</i>	<i>IL-13</i>
1 mg/L Hg(II)	1.7 \pm 0.2*	2.0 \pm 0.8*
1 mg/L MeHg	2.4 \pm 0.3*	11.9 \pm 4.3*

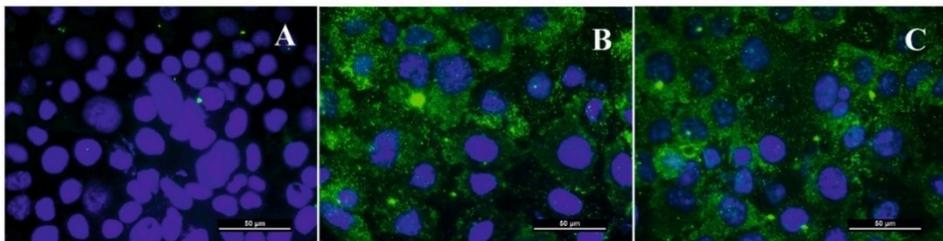


Figura 19. Inmunodetección de la forma fosforilada del factor de transcripción STAT6 en las monocapas Caco-2/HT29-MTX (verde). A) Células no tratadas, B) células tratadas con 1 mg/L Hg(II), C) células tratadas con 1 mg/L MeHg. Los tratamientos se llevaron a cabo durante 7 días en presencia de macrófagos THP-1. Las barras de escala representan una longitud de 50 μ m. Magnificación 40 \times .

7. Efectos del mercurio en la permeabilidad paracelular

La permeabilidad paracelular de las monocapas epiteliales Caco-2/HT29-MTX se analizó a través de la medida de la RET y el coeficiente de permeabilidad de LY tras 10 días de exposición a ambas especies de Hg en presencia de macrófagos. Los datos evidenciaron una reducción significativa en los valores de RET de la monocapas intestinales tratadas con ambas especies de Hg, a 0.5 mg/L (17 – 22% de reducción) y 1 mg/L (11 – 27% de reducción) (Figura 20, representado por líneas). También se observó un aumento de la permeabilidad del marcador paracelular LY en las células tratadas con 1 mg/L de Hg(II) (aumento del 170%) y MeHg (aumento del 126%) (Figura 20, barras).

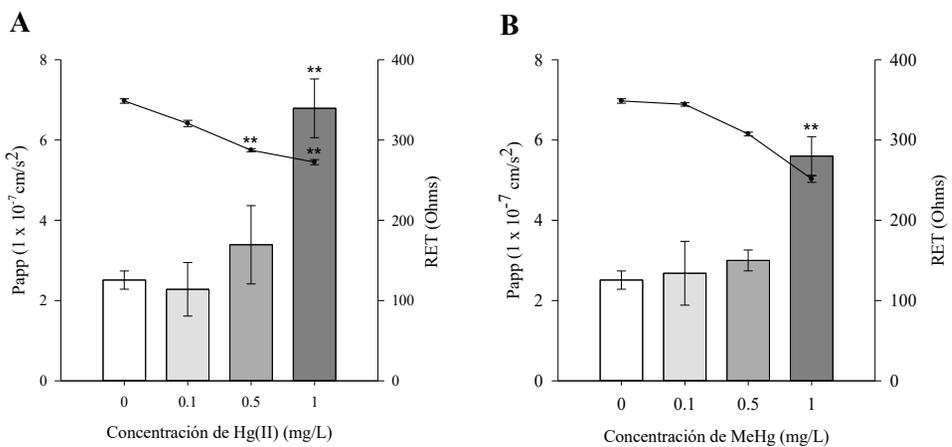


Figura 20. Efecto de la exposición subcrónica a Hg sobre la permeabilidad celular. Resistencia eléctrica transepitelial (RET, líneas) y coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app} , barras) de LY en monocapas Caco-2/HT29-MTX expuestas a Hg(II) (A) y MeHg (B) (0, 0.1, 0.5 and 1 mg/L) durante 10 días, en presencia de macrófagos THP-1. Los valores se expresan como media \pm SD (n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) respecto a las células control.

8. Efectos del mercurio en el proceso de reparación celular

La capacidad de regeneración de las monocapas celulares Caco-2/HT29-MTX tras la exposición a Hg se analizó a través del test de cierre de herida. Tras la generación de la herida se monitorizó el cierre a las 24 y 48 h. En la Figura 21 se muestran las imágenes a tiempo cero y tras 48 h. Los resultados mostraron una ralentización del cierre en las células tratadas (Figura 21, paneles B-G) respecto a las células control (Figura 21A), más evidente en los tratamientos con MeHg (Figura 21, paneles E-G). Este efecto se corrobora a través de la medida de la herida a las 48 h (Figura 22). Los porcentajes de cierre mostraron que las células tratadas cerraban la herida más lentamente, especialmente las expuestas a MeHg, y que este efecto negativo era dosis-dependiente.

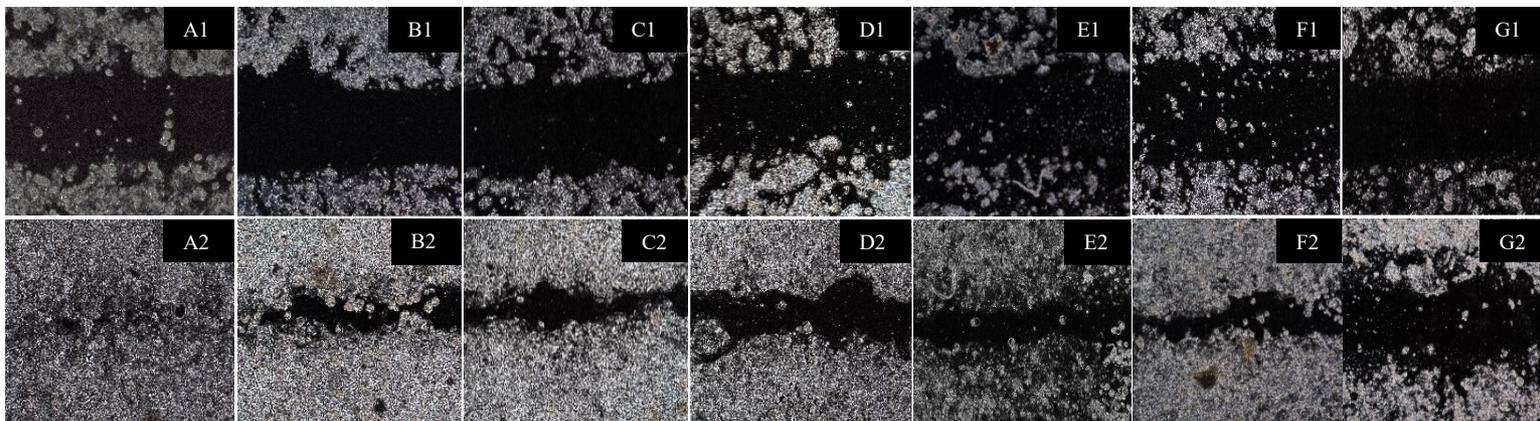


Figura 21. Efecto de la exposición subcrónica a Hg sobre la regeneración celular. Proceso de cierre de herida en las monocapas celulares Caco-2/HT29-MTX tras una exposición subcrónica a Hg en presencia de macrófagos. Células control (A); células expuestas a Hg(II) (0.1 mg/L, B; 0.5 mg/L, C; 1 mg/L, D) y MeHg (0.1 mg/L, E; 0.5 mg/L, F; 1 mg/L, G) durante 10 días antes de la generación de la herida. Las imágenes A1-G1 fueron obtenidas a tiempo cero y las imágenes A2-G2 tras 48 h. Magnificación 40 \times .

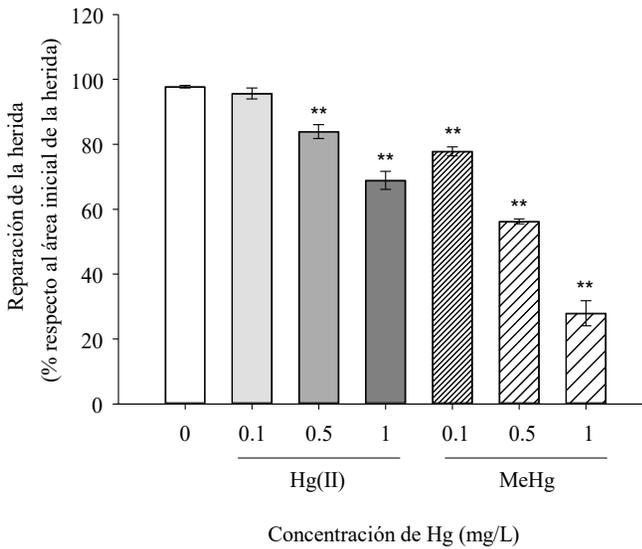


Figura 22. Porcentaje de cierre de la herida en monocapas Caco-2/HT29-MTX tras 48 h. Células control y en células previamente expuestas a diferentes concentraciones de Hg(II) y MeHg durante 10 días en presencia de macrófagos. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a la herida inicial (media \pm SD, n=4). Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) respecto a las células control.

DISCUSIÓN

La exposición continuada a Hg sobre las células intestinales ha mostrado un efecto tóxico sobre varios de los componentes que mantienen la barrera intestinal. Es la primera vez que se emplea un modelo celular en el que se integran células del epitelio intestinal y del sistema inmunitario para determinar la toxicidad de este elemento sobre las células intestinales.

La homeostasis intestinal se mantiene en gran parte gracias a las células del sistema inmune intestinal. Los macrófagos, en concreto, secretan citoquinas y otros factores solubles, remodelan las células epiteliales y eliminan las células apoptóticas y/o muertas del tejido (Bain y Mowat, 2014). Estos macrófagos proceden de monocitos que son extravasados de la sangre y que, en condiciones normales, se diferencian principalmente a macrófagos anti-inflamatorios (M2). Estos macrófagos producen citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y TGF- β (Bain et al., 2013), aunque también se ha evidenciado una baja producción de citoquinas pro-inflamatorias (Murray, 2017). Cuando la homeostasis se altera a causa de un daño tisular, como el que puede causar la exposición a Hg, comienza un proceso inflamatorio y la mayor parte de los monocitos y macrófagos anti-inflamatorios residentes en el intestino dan lugar a macrófagos con un fenotipo pro-inflamatorio (M1), los cuales presentan una elevada expresión de TLR (receptores tipo Toll) y un incremento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Han et al., 2021).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la exposición apical del tricultivo Caco-2/HT29-MTX/THP-1 a Hg(II) y MeHg induce la activación de los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio con un aumento de la expresión de la citoquina IL-1 β y las quimoquinas IL-8 (CXCL8), CXCL9 y CXCL10 (Tabla 10). Esta activación puede ser el resultado de una exposición directa a Hg. Los datos analíticos muestran que el Hg atraviesa la monocapa intestinal llegando al lado basolateral, y que existe una acumulación, especialmente de MeHg en las células inmunitarias. Los estudios acerca del papel

Capítulo 1. Discusión

del Hg como estímulo pro-inflamatorio en macrófagos son muy escasos. Begam y Sengupta (2015), mostraron que los macrófagos aislados del intestino de peces de agua dulce expuestos durante 7 días a HgCl₂ (0.3 mg/L) presentaban una mayor liberación de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6. Recientemente, David et al. (2020), han evidenciado que la exposición *in vitro* de macrófagos a 20 μ M de HgCl₂ durante 24 h aumenta significativamente la expresión de la citoquina pro-inflamatoria MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófagos 2). De forma similar, Yamamoto et al. (2017) observaron un incremento en la expresión de las citoquinas IL-6 e IL-8 en la línea celular de macrófagos humanos U937 tras la exposición a MeHg 10 μ M.

Además de una activación por contacto directo con el Hg, la estimulación de los macrófagos podría ser consecuencia de los factores solubles pro-inflamatorios derivados de las células epiteliales que están expuestas apicalmente al tóxico. La intercomunicación entre las células intestinales y los macrófagos subepiteliales se ha descrito en numerosas ocasiones y se produce a través de la liberación de factores solubles y su unión a receptores (Al-Ghadban et al., 2016; Mahapatro et al., 2021). Nuestros resultados han mostrado una mayor expresión de IL-8 (Tabla 10) y de distintas proteínas de estrés (Tabla 9), además de un aumento de las ROS/RNS (Figura 11) en la monocapa de células Caco-2/HT29-MTX. Se ha descrito que todos estos factores pueden regular la respuesta inflamatoria en macrófagos a través de varias vías (Rahman et al., 2004). En este sentido, los estudios de inhibición realizados en este trabajo han mostrado que las tres rutas de señalización estudiadas (JNK o SAPK, p38 MAPK y NF- κ B) participan en la respuesta pro-inflamatoria del modelo celular de mucosa intestinal empleado (Tabla 11). Las proteínas SAPKs y p38s contribuyen a la activación de la AP-1 (proteína activadora 1) mediante la estimulación de la transcripción de genes que codifican los componentes de la AP-1 (Mansouri et al., 2003), induciendo de esta forma la expresión de mediadores de inflamación (Reuter et al., 2011).

El factor de transcripción NF- κ B, tras su translocación al núcleo, induce la expresión de varios genes pro-inflamatorios, incluyendo aquellos que codifican

citoquinas y quimoquinas (Liu et al., 2017), y también participa en la regulación del inflamasoma NLRP3, ruta promotora del procesado y la activación de IL-1 β (Muri et al., 2020; Nolan et al., 2020). En el presente estudio se evidencia un aumento de la expresión del gen *NRPL3* en los macrófagos expuestos a Hg, lo que sugiere la participación del inflamasoma en la respuesta al tóxico.

La activación de las anteriores rutas de señalización puede ser iniciada por la unión a receptores de diferentes citoquinas y de los denominados patrones moleculares asociados al daño (*Damage Associated Molecular Patterns*, DAMP) (Li y Chang, 2021; Roh y Sohn, 2018). Los DAMP se producen en las células como consecuencia de procesos inflamatorios y situaciones de estrés o daño, y comprenden entre otros a las ROS/RNS y a las proteínas HSP, las cuales, tal y como se evidencia en este capítulo, están aumentadas tras los tratamientos con Hg (Figura 11 y Tabla 9, respectivamente). Así, una exposición continuada a Hg, incluso a los niveles presentes en algunos alimentos, podría llevar a la cronificación de una situación inflamatoria/oxidante en el intestino.

Los datos obtenidos también muestran células epiteliales con unas uniones intercelulares más laxas, con una morfología en zigzag, especialmente en las células expuestas a Hg(II), indicativo de un daño estructural (Figura 17). Estos cambios en la morfología van acompañados de una regulación a la baja de la expresión de la proteína de anclaje de las uniones estrechas ZO-1. Diferentes estudios han mostrado como la reducción de la proteína ZO-1 retrasa el reensamblaje y el establecimiento de la barrera paracelular en las células epiteliales. Umeda et al. (2006), muestran que las células epiteliales deficientes en las proteínas ZO-1 y ZO-2 están correctamente polarizadas pero no forman las uniones intercelulares debido a la ausencia de polimerización de las claudinas.

Se han relacionado varios mediadores pro-inflamatorios y pro-oxidantes con la reducción de la expresión génica, con alteraciones de las modificaciones postraduccionales o con redistribuciones de las proteínas de las uniones intercelulares, que finalmente conllevan una desestabilización de la barrera

Capítulo 1. Discusión

intestinal. Así, la exposición a diversas citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α) en células endoteliales produce una reducción de la expresión de las proteínas ZO-1, CLDN-5 y OCLN, comprometiendo la función barrera (Rochfort y Cummins, 2015; Yu et al., 2013). Especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico inducen la redistribución de estas proteínas desde las uniones intercelulares al citoplasma, hecho que también se asocia con la pérdida de la función barrera (Rao, 2008).

Además de las alteraciones de las proteínas de las uniones intercelulares, el tratamiento con Hg afecta a la producción de mucus por parte de las células HT29-MTX. Se observa una mayor secreción de mucus (Figura 18) y una sobreexpresión de la mucina mayoritaria de esta capa glicoproteica en las células epiteliales tratadas a las concentraciones más altas de Hg (Tabla 12). Además, las células tratadas presentan un aumento de la citoquina IL-13 (Tabla 12) y de los niveles de STAT6 fosforilado (Figura 19), lo que apunta a la ruta IL-4/IL-13/STAT6 como el mecanismo responsable de la hipersecreción de mucus de las células epiteliales tratadas con el metal. Los incrementos en los niveles de IL-13 por parte de Hg han sido previamente descritos en niños expuestos a través de la inhalación de partículas finas con metales (Zahedi et al., 2021). Los autores pusieron de manifiesto una asociación significativa entre los niveles de Hg en sangre y los niveles de IL-13 ($\beta = 0.8$, $p < 0.001$). Los defectos de la capa de mucus intestinal pueden llegar a comprometer la barrera intestinal, tal y como evidencian otros estudios (Grondin et al., 2020)

Todos los efectos expuestos anteriormente pueden promover el aumento de la permeabilidad intestinal (Figura 20). Es esperable que la instauración de un proceso inflamatorio y un desequilibrio redox activen una serie de vías responsables de la desestructuración de las uniones estrechas y la hiperplasia de las células mucosecretoras. Este escenario, previamente descrito para otros xenobióticos y patógenos (Dickman et al., 2000; Haswell et al., 2021; Roxas y Viswanathan, 2018) es el ideal para que se produzcan una disrupción de la barrera intestinal.

Las consecuencias de la alteración de la barrera intestinal se han estudiado con detalle. En primer lugar, favorece, mientras se siga mantenido el estímulo, la generación de una respuesta inflamatoria exacerbada, debido al contacto de antígenos lumenales con el sistema inmunitario subepitelial y por tanto a una cronificación de la inflamación local (Bamford, 1999). Además, un gran número de estudios apuntan al aumento de la permeabilidad intestinal como un factor desencadenante o agravante de algunas patologías no intestinales. A nivel sistémico, los desórdenes renales y los neurológicos en etapas tempranas del desarrollo son los que más se manifiestan en exposiciones prolongadas a Hg. Estudios recientes relacionan las alteraciones en el eje intestino-cerebro con la patogénesis y fisiopatología de varios trastornos neurológicos (Barbosa y Reis Barbosa, 2020; Houser y Tansey, 2017; Martin et al., 2018). En niños con déficit de atención e hiperactividad (ADHD), se han asociado niveles séricos elevados de zonulina (marcador de aumento de la permeabilidad intestinal) con el deterioro del comportamiento social (Asbjornsdottir et al., 2020).

Finalmente, hay que señalar que el Hg, principalmente el MeHg, reduce la capacidad de regeneración de la monocapa epitelial de las células intestinales (Figuras 21 y 22), dificultando de esta forma reparar el daño producido tras su exposición, y favoreciendo, la instauración de una barrera defectuosa. El proceso de regeneración de la herida es posible gracias a la capacidad de migración, proliferación y diferenciación de las células epiteliales adyacentes al área de la herida (Iizuka y Konno, 2011). Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que el Hg reduce la capacidad de migración de las células epiteliales para restituir la zona dañada. Posiblemente también haya un efecto sobre el proceso de proliferación necesario para repoblar esta área. Por ejemplo, Burke et al. (2006), observaron que la exposición a MeHg disminuía la capacidad de proliferación celular en el hipocampo de ratas recién nacidas. Además, el MeHg inhibe la síntesis de ADN y reduce los niveles de ciclinas (D1, D3, E) de vital importancia en la transición de la fase G1 a la fase S (Abbott y Nigussie, 2021). Tampoco hay que descartar la posibilidad de que el Hg altere la etapa de

Capítulo 1. Discusión

diferenciación necesaria para obtener un epitelio maduro. Chan et al. (2017) observaron alteraciones en el proceso de diferenciación en células nerviosas expuestas a Hg(II). Independientemente de la etapa que afecte, es evidente que las células epiteliales no son capaces de regenerar la monocapa en exposiciones crónicas a Hg, lo que agrava todavía más la situación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo ponen de manifiesto que la exposición subcrónica a Hg a concentraciones comparables a las que se pueden encontrar en algunos alimentos pueden afectar a funciones clave de la mucosa intestinal e interferir con su capacidad de autorreparación. Estos efectos tóxicos posiblemente se deben a la instauración de un proceso de inflamación crónico y a un desequilibrio redox, dirigidos principalmente por los macrófagos, por activación de las rutas de señalización de MAPK y NF- κ B. La activación de estos procesos es, posiblemente, el desencadenante de las alteraciones observadas en las proteínas de las uniones intercelulares y en la secreción de mucina por parte de las células caliciformes. Todos estos efectos tóxicos afectan negativamente a la función barrera del epitelio intestinal. Este proceso puede verse agravado ya que las monocapas epiteliales tratadas con Hg presentan un mecanismo de reparación alterado que, posiblemente, impida la regeneración del tejido dañado. Además, el proceso, debido a la continua exposición al tóxico, tiende a cronificarse.

Además, la inclusión de macrófagos en el modelo *in vitro* permite detectar respuestas a la exposición al tóxico que posiblemente no habrían sido evidentes empleando únicamente células epiteliales, lo que aporta una aproximación más precisa a los procesos que tienen lugar en el epitelio intestinal.

Los resultados mostrados en este capítulo son especialmente preocupantes en regiones con problemas de contaminación por Hg o en poblaciones con elevado consumo de determinados productos alimentarios. Por ello, son necesarios estudios *in vivo* que verifiquen los efectos tóxicos del Hg en el intestino derivados de exposiciones crónicas por vía dietaria, los cuales se van a abordar en el siguiente capítulo.

Capítulo 2

Evaluación de una exposición subcrónica a mercurio en el epitelio intestinal en modelos *in vivo*

La mucosa intestinal y su entorno constituyen un sistema complejo con un gran número de interacciones que mantienen la homeostasis celular y que desencadenan una respuesta conjunta frente a las situaciones adversas que pueda presentarse. El empleo de un modelo celular como el descrito en el Capítulo 1, mejora nuestro entendimiento sobre esta respuesta, sin embargo, en un sistema *in vitro* no pueden incluirse todos los componentes que intervienen en ella. Hay que tener en cuenta que la barrera intestinal está constituida por la mucosa con todos sus tipos celulares, pero también por la microbiota intestinal, la cual puede verse afectada por los compuestos que ingerimos y cuyos metabolitos pueden ser parte de los mecanismos de defensa (Introducción, apartado 9). La composición del sistema linfóide asociado al intestino también es de enorme complejidad. Además de macrófagos incluye linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos. Algunas de estas poblaciones celulares tienen un papel muy relevante en la respuesta pro-inflamatoria y pro-oxidante que puede desencadenar un estímulo externo (Introducción, apartado 8.2). Finalmente, además de la respuesta conjunta de los componentes de la barrera, hay que tener en cuenta que el intestino está relacionado con el resto de los tejidos de nuestro organismo y que, en la actualidad, ya existen estudios que evidencian un efecto a nivel intestinal y sistémico que es dependiente de distintos ejes.

El estudio *in vivo* realizado en este capítulo se ha llevado a cabo para evaluar si la toxicidad intestinal observada *in vitro* se mantiene cuando todos los componentes de la barrera intestinal y los ejes asociados entran en juego. Los resultados han evidenciado una toxicidad intestinal a concentraciones similares a las encontradas en alimentos (1-10 mg/L). Los mecanismos de toxicidad del metal son similares a los observados *in vitro*, hecho que sugiere que el modelo celular empleado puede ser adecuado para el estudio de la toxicidad intestinal de metales. Además, se ha identificado un posible efecto del Hg sobre el metabolismo microbiano, con una importante reducción de algunos de los metabolitos que más influyen en la homeostasis intestinal.

RESULTADOS

Durante el experimento, se sacrificaron 4 animales (grupo control, 1 mg/L Hg(II), 5 mg/L Hg(II) y 10 mg/L MeHg) ya que mostraron una pérdida de peso superior al 20%. El resto de los animales no presentaron cambios físicos notables y la media de los pesos de todos los grupos fue similar al finalizar el estudio: controles, 21.5 g; Hg(II), 21.5 g; MeHg, 22.5 g.

1. Evaluación de la respuesta pro-inflamatoria en el intestino

El análisis de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β en el intestino delgado de los ratones tratados con ambas especies Hg no mostró diferencias significativas con respecto a los animales no tratados (datos no mostrados). Sin embargo, la exposición a Hg indujo un aumento significativo de los niveles de las citoquinas TNF- α (46 - 96%) e IL-1 β (13 -30%) en el colon (Figura 23). En algunos casos, se produjo un fenómeno de hormesis, siendo el aumento de la producción de citoquinas menor a las concentraciones de Hg más elevadas.

La respuesta pro-inflamatoria se confirmó mediante la detección de infiltrados de neutrófilos. La Figura 24 muestra la concentración de lactoferrina fecal de los animales control y los tratados con Hg. Los datos revelaron un aumento de la lactoferrina estadísticamente significativo en los tratamientos con 5 y 10 mg/L de Hg(II) (16 – 36%) y con la exposición a 10 mg/L de MeHg (15%), indicativo de una infiltración a nivel epitelial. La histología puso de manifiesto la presencia de infiltrados de neutrófilos de gran tamaño en los ratones tratados con la concentración más elevada de Hg(II) (Figura 25B) y MeHg (Figura 25C). Estos infiltrados no aparecieron en los animales control (Figura 25A).

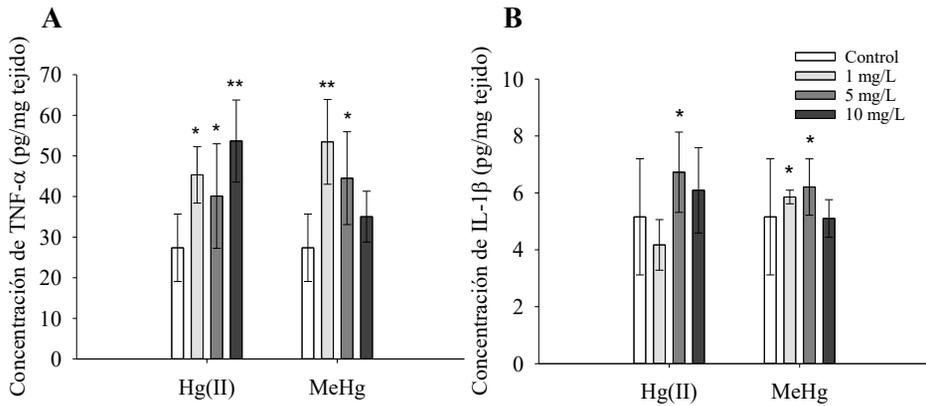


Figura 23. Contenido de citoquinas pro-inflamatorias en el colon. Contenido de TNF- α (A) e IL-1 β (B) en ratones expuestos a Hg(II) y MeHg (0, 1, 5 y 10 mg/L) durante 4 meses. Los valores se expresan como pg/mg tejido (media \pm SD, n = 9-10). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* 0.001 < p < 0.05; ** p < 0.001) respecto a los animales control.

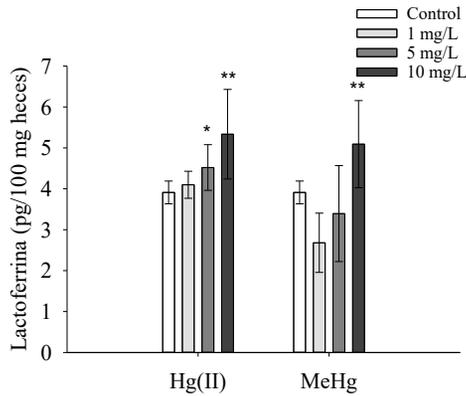


Figura 24. Contenido de lactoferrina fecal. Niveles de lactoferrina en heces de ratones tratados con Hg(II) y MeHg (0, 1, 5 y 10 mg/L) durante 4 meses. Los valores se expresan pg/100 mg heces (media \pm SD, n = 9-10). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* 0.001 < p < 0.05; ** p < 0.001) respecto a los animales control.

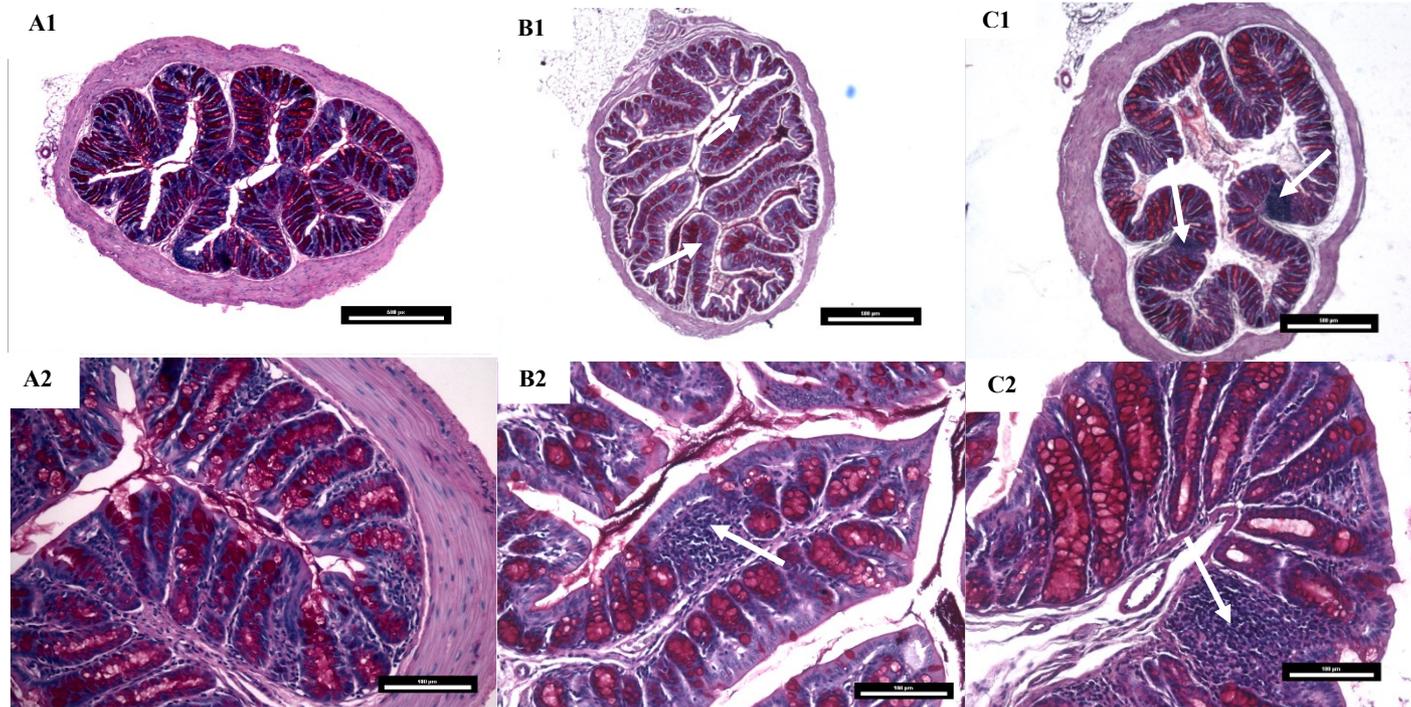


Figura 25. Imágenes de cortes transversales de colon teñidos con PAS. Ratones no tratados (A1 - A2), tratados con 10 mg/L de Hg(II) (B1 - B2) y 10 mg/L de MeHg (C1 - C2) durante 4 meses. Las infiltraciones de neutrófilos se señalan con una flecha blanca. Imágenes A1, B1 y C1 amplificadas 16×. Las barras de escala representan una longitud de 500 y 100 μm . Imágenes A2, B2 y C2 magnificadas 32×.

2. Evaluación del estrés oxidativo en el intestino

La Figura 26 muestra los niveles de ROS/RNS (A), los equivalentes de MDA (B) y las concentraciones de GSH (C) en muestras de intestino delgado de ratones expuestos durante 4 meses a diferentes concentraciones de Hg(II) y MeHg. El tratamiento de los ratones con ambas formas Hg no produjo cambios en los niveles ROS/RNS tisulares a ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 26A). Sin embargo, los tratamientos con 5 y 10 mg/L de ambas especies de Hg generaron una mayor peroxidación lipídica (22-44%, Figura 26B). Además, en los ratones expuestos a las concentraciones más elevadas de Hg(II) y MeHg, se observó una alteración de los niveles de GSH, con aumentos estadísticamente significativos (31 - 58%, Figura 26C). A diferencia de lo que se ha reportado para otros metales y otros compuestos pro-oxidantes, el tratamiento con Hg generó un aumento de los contenidos tisulares de GSH. Este hecho podría ser consecuencia de los mecanismos de transporte del metal. Se ha evidenciado que, en algunos tipos celulares y en modelos animales, la eliminación de Hg del interior celular se lleva a cabo tras la formación de complejos Hg-GSH (Bridges y Zalups, 2010). Esto podría explicar el aumento de GSH que experimentan los animales tratados con Hg.

A nivel colónico (Figura 27), se evidenció un aumento de las concentraciones tisulares de ROS/RNS (12-24%, Figura 27A), acompañado de una mayor peroxidación lipídica (44-59%, Figura 27B) a la concentración más alta de Hg(II) y a todas las concentraciones de MeHg. Sin embargo, sólo el tratamiento con MeHg afectó los contenidos de GSH tisular, con aumentos significativos respecto a los animales no tratados (4 - 14%, Figura 27C).

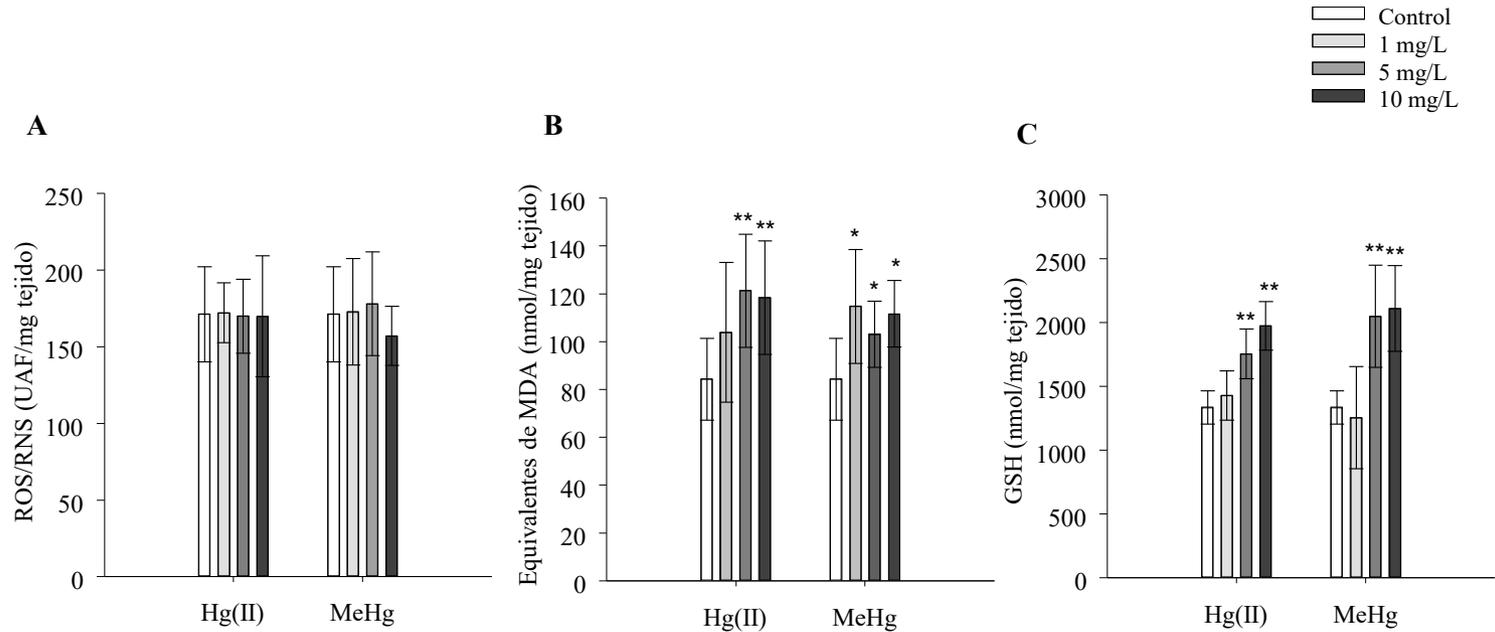


Figura 26. Evaluación del estrés oxidativo en el intestino delgado. Niveles tisulares de ROS/RNS (A), equivalentes de MDA (B) y GSH (C) en el intestino delgado de ratones expuestos durante 4 meses a Hg(II) y MeHg (0, 1, 5 y 10 mg/L). Los valores se expresan como media \pm SD (n = 9-10). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* 0.001 < p < 0.05; ** p < 0.001) respecto a los animales control.

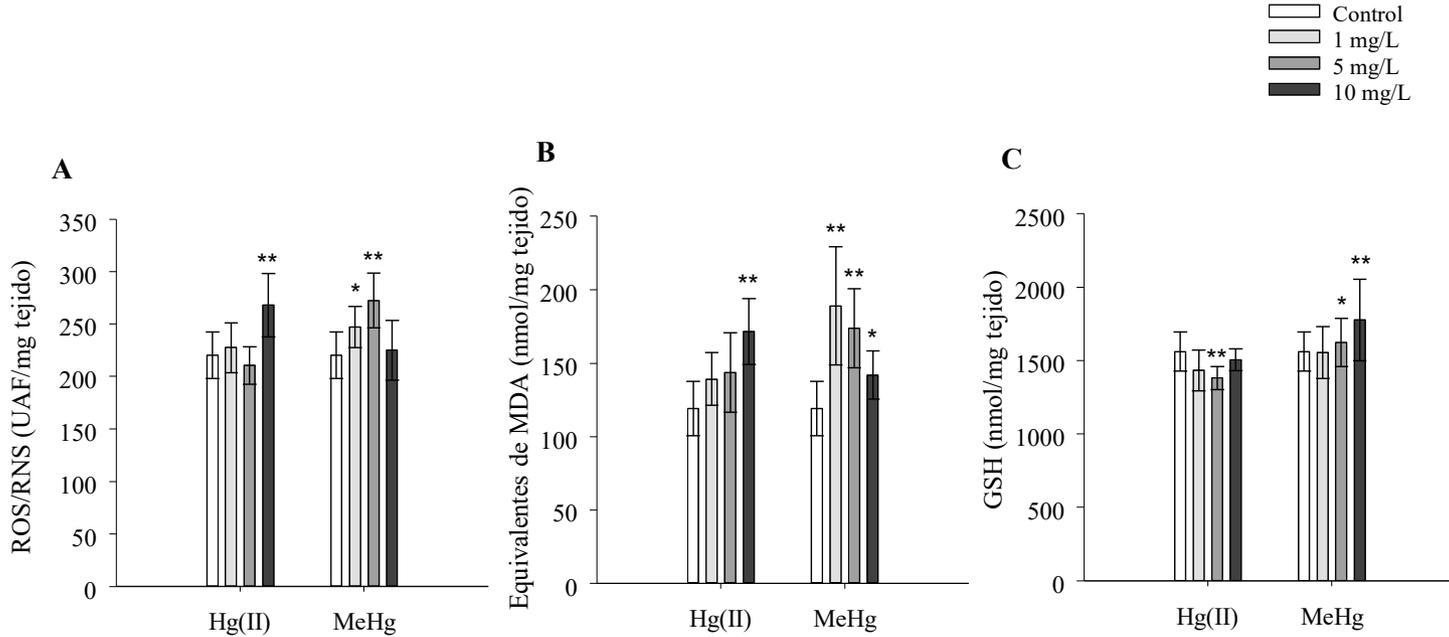


Figura 27. Evaluación del estrés oxidativo en el colon. Niveles tisulares de ROS/RNS (A), equivalentes de MDA (B) y GSH (C) en el colon de ratones expuestos durante 4 meses a Hg(II) y MeHg (0, 1, 5 y 10 mg/L). Los valores se expresan como la media \pm SD (n = 9-10). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* 0.001 < p < 0.05; ** p < 0.001) respecto al control negativo.

3. Efecto de la exposición a mercurio sobre la fosforilación de la proteína JNK y p38 MAPK

En el Capítulo 1 se evidenció la participación *in vitro* de las rutas de señalización que involucran las proteínas JNK, p38 MAPK y IKK en la respuesta pro-inflamatoria y pro-oxidante inducidas por el Hg (Capítulo 1, apartado 4). La participación de JNK y p38 MAPK se ha confirmado en el colon de los animales expuestos a Hg, especialmente en los tratados con MeHg (Figura 28). Los resultados mostraron un mayor contenido tisular de la forma fosforilada de JNK en los ratones tratados con 5 mg/L de Hg(II) y MeHg (40 – 147%) y de la proteína p38 MAPK en los ratones expuestos a 5 mg/L de MeHg (566%), sugiriendo la posible implicación de estas proteínas en los procesos pro-inflamatorios y pro-oxidantes previamente descritos.

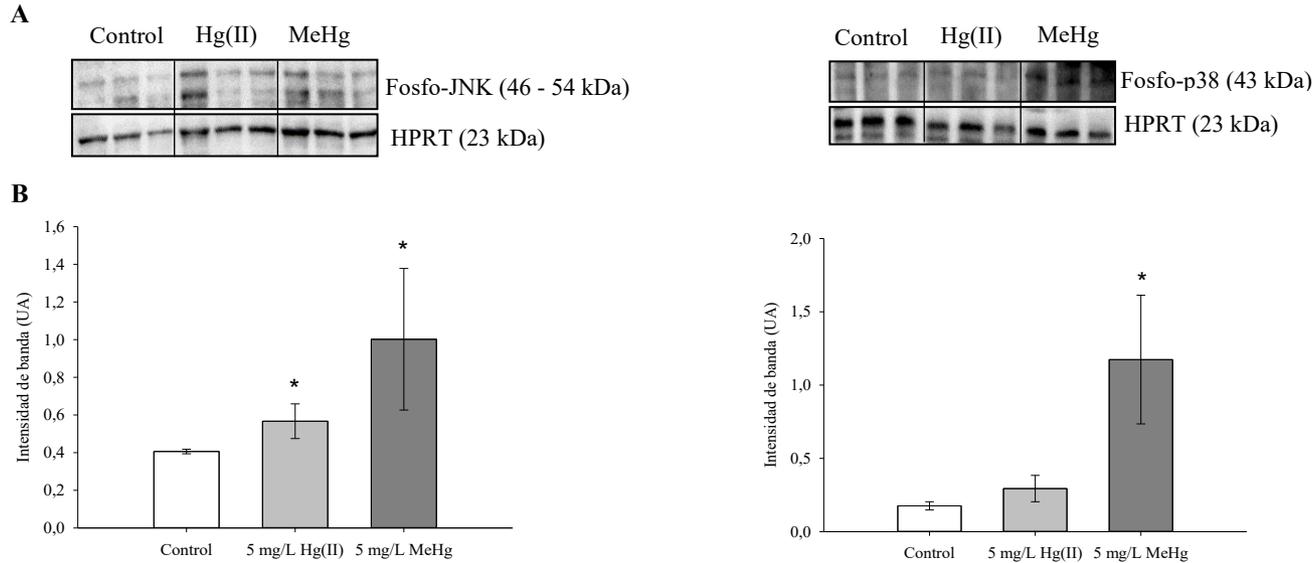


Figura 28. Efecto del Hg(II) y MeHg sobre la activación de las proteínas quinasas JNK y p38. A) Western blot empleando anticuerpos anti-fosfo-JNK y anti-fosfo-p38 en extractos de tejido colónico. HPRT se utilizó como control de carga para la normalización. B) Niveles de expresión relativa de las proteínas fosfo-JNK y fosfo-p38 MAPK en ratones control y en ratones tratados con Hg(II) y MeHg (5 mg/L). Los valores se expresan como unidades estándar de densitometría (UA, media \pm SD, n = 3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a los animales control.

4. Análisis de la estructura del epitelio intestinal

4.1. Evaluación de las proteínas de las uniones intercelulares

El análisis de expresión génica de las proteínas de las uniones estrechas, ZO-1 y OCLN (Tabla 13), mostró una regulación a la baja estadísticamente significativa del gen *Zo1* en los ratones tratados con ambas concentraciones de Hg(II), mientras que solo la concentración más elevada de MeHg produjo una reducción significativa de su expresión. La expresión génica de la *Ocln* se redujo en los ratones expuestos a Hg(II) mientras que no se observaron cambios en los ratones tratados con MeHg.

Tabla 13. Expresión relativa de las proteínas ZO-1 y OCLN en ratones expuestos a Hg(II) y MeHg durante 4 meses. Los valores se expresan como nivel de cambio de la expresión respecto a los animales no tratados (media \pm SE, n = 8-9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales no tratados ($p < 0.05$). En azul se muestran las regulaciones de expresión a la baja respecto a los animales control.

	Hg(II)		MeHg	
	5 mg/L	10 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
<i>Zo1</i>	0.49 \pm 0.11*	0.46 \pm 0.12*	1.41 \pm 0.31	0.50 \pm 0.08*
<i>Ocln</i>	0.55 \pm 0.16*	0.52 \pm 0.15*	1.14 \pm 0.30	1.36 \pm 0.32

4.2. Análisis de la expresión de la mucina de la capa de mucus y genes asociados a su secreción

La Tabla 14 muestra los valores de expresión relativa de *Muc2*, principal mucina del mucus del intestino grueso (Johansson et al., 2011) y las citoquinas *Il13* e *Il4*, relacionadas con la vía de señalización responsable de la secreción de mucus. Los animales tratados con las concentraciones más elevadas de Hg(II) y MeHg

mostraron una expresión significativamente mayor del gen *Muc2* que los animales control. En cuanto a las citoquinas Th2, el tratamiento con Hg sólo produjo un aumento significativo de la expresión génica de la citoquina *III3*.

Tabla 14. Expresión relativa de *Muc2*, *III3* e *II4* en ratones expuestos a Hg(II) y MeHg durante 4 meses. Los valores se expresan como nivel de cambio de la expresión respecto a los animales control (media \pm SE, n = 8-9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales no tratados ($p < 0.05$). En rojo se muestran las sobreexpresiones respecto a los animales control.

	Hg(II)		MeHg	
	5 mg/L	10 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
<i>Muc2</i>	3.49 \pm 1.73*	2.54 \pm 1.46*	2.46 \pm 0.90*	4.66 \pm 1.73*
<i>III3</i>	2.49 \pm 0.33*	1.03 \pm 0.14	10.85 \pm 1.60*	83.91 \pm 13.86*
<i>II4</i>	1.20 \pm 0.34	1.26 \pm 0.09	1.77 \pm 0.55	1.09 \pm 0.32

La expresión proteica de MUC2 (Figura 29), a diferencia de lo observado transcriptómicamente, sólo se incrementó en los ratones expuestos a MeHg (185%), sugiriendo la posible implicación de procesos post-transcripcionales en el procesamiento de esta proteína.

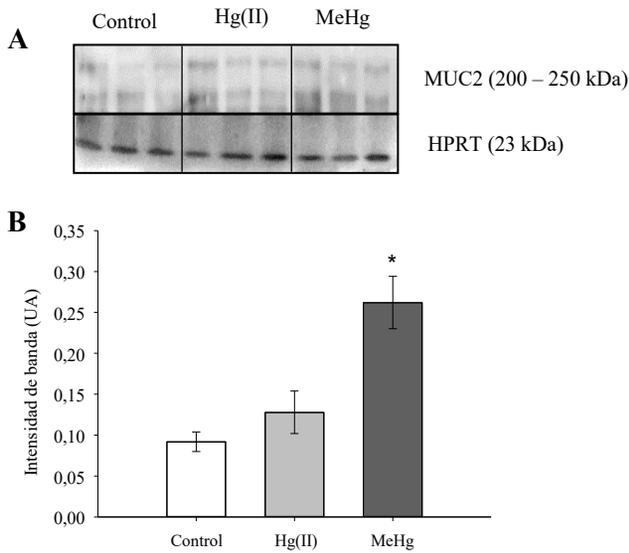


Figura 29. Efecto del Hg(II) y MeHg sobre genes relacionados con la síntesis y secreción de la capa de mucus colónica. A) Western blot empleando el anticuerpo anti-MUC2 en muestras de tejido de colon. HPRT se utilizó como control de carga para la normalización. B) Niveles de expresión relativa de la proteína MUC2 en ratones tratados con 5 mg/L de Hg(II) y MeHg respecto a los animales control. Los valores se expresan como unidades estándar de densitometría (media \pm SD, n = 3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p^* < 0.001$) respecto a los ratones no tratados.

4.3. Evaluación histológica del tejido colónico

El análisis histológico mediante tinción PAS del colon de los ratones control y los tratados con ambas especies de Hg se muestra en la Figura 30. La histología reveló un efecto distinto de ambas formas mercuriales sobre la población de células mucosecretoras (PAS^+). El Hg(II) produjo una reducción estadísticamente significativa de las células PAS^+ respecto a los animales control (porcentaje de reducción: 29%), mientras que la administración de MeHg aumentó significativamente la población de este tipo celular (porcentaje de aumento: 118%) (Figura 30A), confirmando los resultados obtenidos en los ensayos de expresión de los genes relacionados con la síntesis y secreción de la capa de mucus (Capítulo

1, apartado 6). Por otro lado, la profundidad de las criptas colónicas en los animales expuestos a MeHg fue significativamente mayor que la observada en animales no tratados (Figura 30B) (porcentaje de incremento: 119%). Sin embargo, no se observaron cambios en la profundidad de las criptas de los ratones expuestos a Hg(II) (Figura 30B).

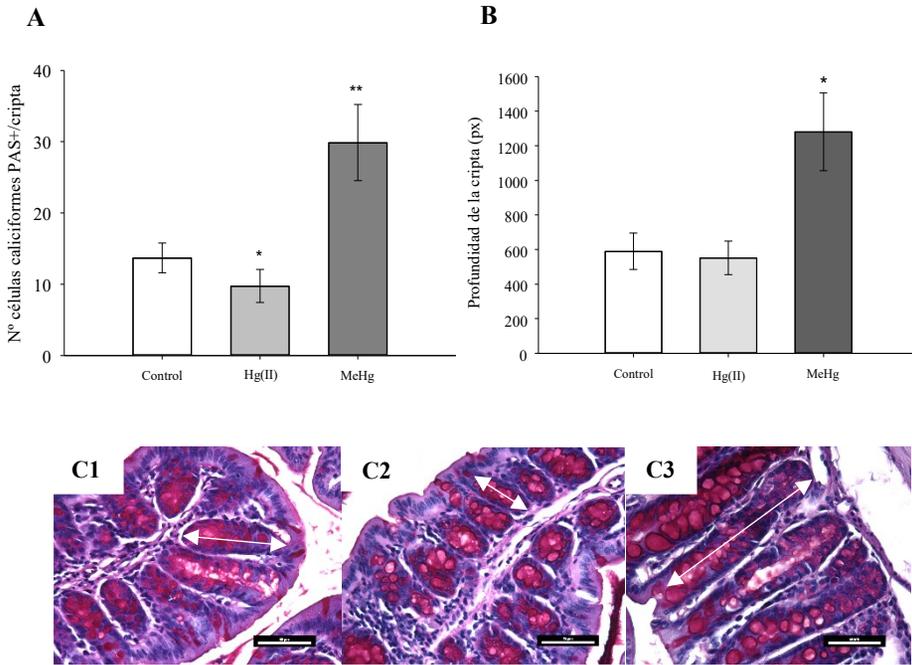


Figura 30. Efecto del Hg sobre el número de células caliciformes y la profundidad de las criptas. (A) Número promedio de células caliciformes por cripta (n = 18) y (B) longitud media de las criptas intestinales (n = 38). Los valores se expresan como media \pm SD. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $0.001 < p < 0.05$; ** $p < 0.001$) respecto a los animales control. Imágenes de secciones transversales de colon teñidas con PAS de animales no tratados (C1), animales tratados con 10 mg/L de Hg(II) (C2) y animales tratados con 10 mg/L MeHg (C3) durante 4 meses. Las barras de escala hacen referencia a una longitud de 50 μ m. Imágenes magnificadas 32 \times .

5. Evaluación de la función barrera del intestino

La permeabilidad intestinal se analizó a través de la medida del contenido de albúmina fecal (Figura 31). Tal y como muestra la Figura 31, la exposición a Hg(II) generó un aumento de la albúmina fecal, y por tanto de la permeabilidad, a todas las concentraciones ensayadas (43-49%), mientras que el tratamiento con MeHg afectó a la permeabilidad intestinal de los animales tratados con las concentraciones más elevadas (27-43%).

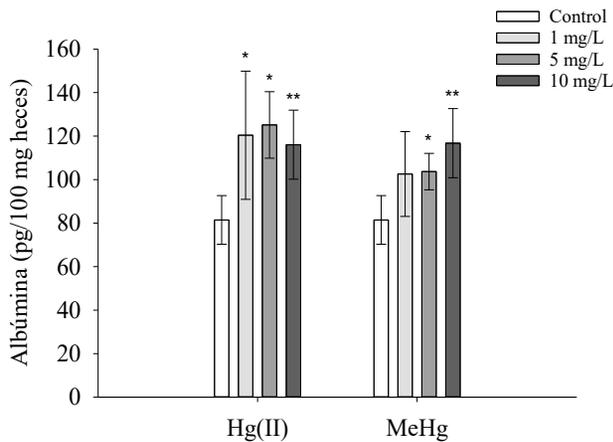


Figura 31. Niveles de albúmina en heces de ratón. Concentración de albúmina fecal tras 4 meses de exposición a Hg(II) y MeHg (0, 1, 5 y 10 mg/L). Los valores se expresan como pg/100 mg de heces (media \pm SD, n = 9-10). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* 0.001 < p < 0.05; ** p < 0.001) respecto a los animales control.

6. Evaluación de la exposición a mercurio sobre la microbiota intestinal

El efecto de la exposición a Hg sobre la microbiota intestinal de los ratones fue analizada mediante la secuenciación del gen 16S de muestras fecales recolectadas al final del experimento. El análisis de la composición de la microbiota a nivel de Phyla mostró que los taxones mayoritarios eran los Firmicutes (Bacillota) y los Bacteroidetes (Pseudomonadota) [Figuras 32, panel A a) y panel B a)], como se

ha observado normalmente en ratones de laboratorio (Yang y Chun, 2021). El análisis de la diversidad alfa mostró tendencias diferentes en los grupos de los animales tratados con cada especie Hg. El aumento de la riqueza en los animales tratados con Hg(II) era dosis-dependiente [Figura 32, panel A b)], mientras que no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los animales tratados con MeHg [Figura 32, panel B b)]. La estimación de los índices de Shannon y de Simpson, que muestran la riqueza y la uniformidad, solamente evidenciaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados con 5 mg/L Hg(II), 5 mg/L MeHg y 10 mg/L MeHg [Figura 32, panel A c) y d); panel B c) y d)].

La estimación de la diversidad beta indicó que la exposición a ambas especies Hg no alteraba significativamente la composición de la microbiota de los ratones bajo nuestras condiciones experimentales. Las ordenaciones PCoA y NMDS no mostraron un claro agrupamiento de las muestras en relación con la exposición a Hg (Figura 33). Los análisis PERMANOVA confirmaron estos resultados ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de los ratones no tratados y de aquellos expuestos a Hg(II). Por otro lado, sí se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los ratones tratados con 1 mg/L MeHg. No obstante, el análisis PERMANOVA mostró que la variable “jaula” tenía un mayor peso sobre el porcentaje de variabilidad que el tratamiento (R^2 0.219 y 0.159, respectivamente), sugiriendo que este resultado no indicaría una diferencia real en la composición de la microbiota entre los dos grupos. El análisis de la homogeneidad de las varianzas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, apoyando así la fiabilidad de los análisis PERMANOVA.

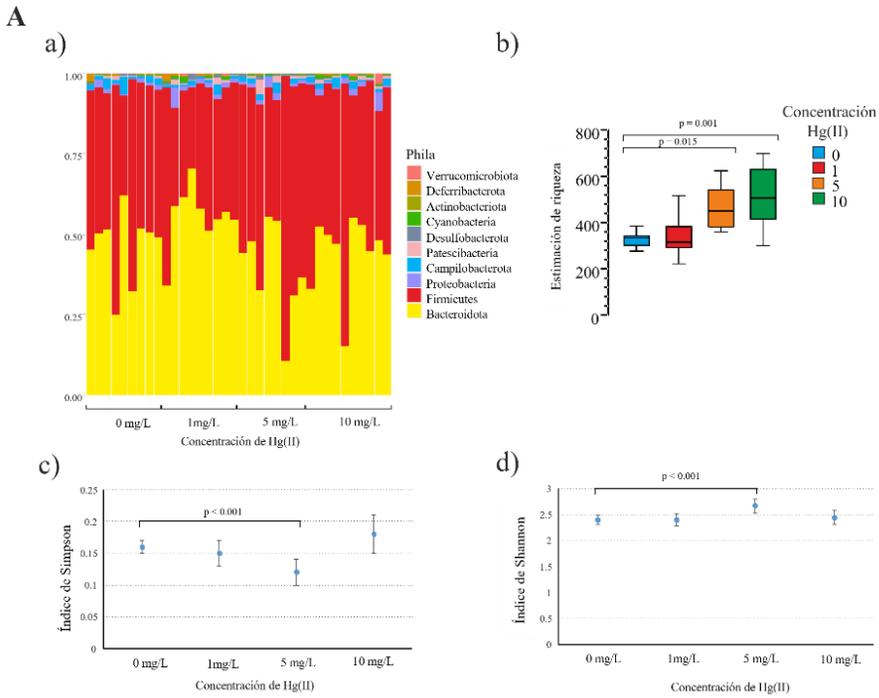


Figura 32. Análisis de la composición de la microbiota en ratones control y expuestos a Hg(II) y MeHg. a) Diagrama de barras apiladas mostrando la abundancia relativa de los phyla presentes en muestras fecales de ratones expuestos a Hg(II) (Panel A) y MeHg (Panel B). b) Estimaciones de la riqueza taxonómica de muestras fecales de ratones. c) y d) Estimaciones de los índices de Shannon y Simpson. Las horquillas indican grupos comparados con valores de p significativos (<0.05).

B

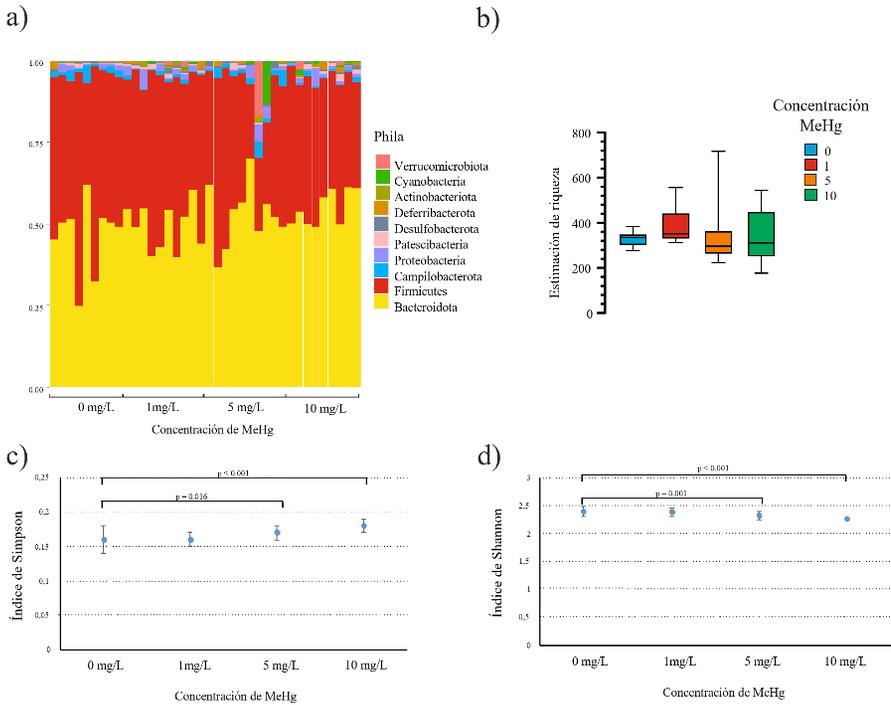
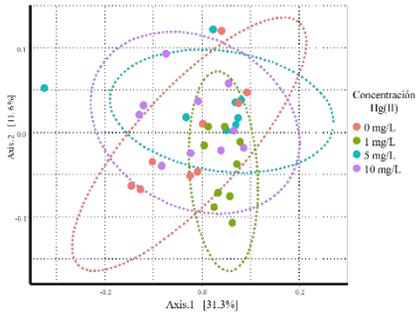


Figura 32. Análisis de la composición de la microbiota en ratones control y expuestos a Hg(II) o MeHg. a) Diagrama de barras apiladas mostrando la abundancia relativa de los phyla presentes en muestras fecales de ratones expuestos a Hg(II) (Panel A) o MeHg (Panel B). b) Estimaciones de la riqueza taxonómica de muestras fecales de ratones. c) y d) Estimaciones de los índices de Shannon y Simpson. Las horquillas indican grupos comparados con valores de p significativos (<0.05). (Continuación).

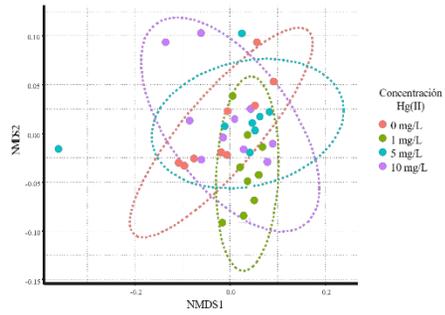
Capítulo 2. Resultados

A

a)

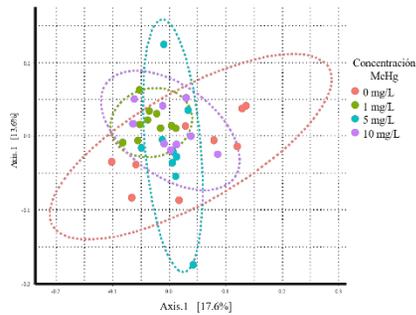


b)



B

a)



b)

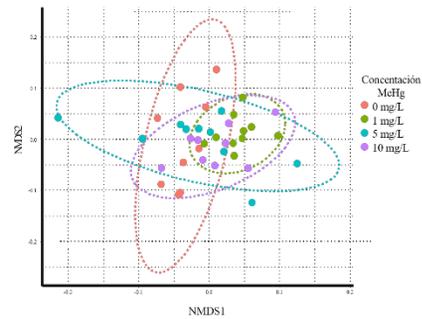


Figura 33. Análisis de la diversidad beta en ratones control y expuestos a Hg(II) (A) y MeHg (B). a) ordenación PCoA de las muestras fecales basada en las distancias euclídeas calculadas a partir de las lecturas por ASV transformadas en proporciones logarítmicas. b) ordenación por escalado multidimensional no métrico (NMDS) de las muestras fecales basada en las distancias euclídeas calculadas a partir de las lecturas por ASV transformadas en proporciones logarítmicas isométricas. Cada punto representa el perfil de la microbiota de un solo ratón.

7. Análisis del perfil de ácidos grasos de cadena corta

La Figura 34 muestra los contenidos fecales de SCFA en animales tratados con Hg(II) (Figura 34A) y con MeHg (Figura 34B). Los ratones tratados con Hg(II) experimentaron un descenso significativo del contenido de ácido acético a las dosis de 5 y 10 mg/L (32%) y del ácido propiónico a la dosis de 10 mg/L (34%), mientras que no presentaron cambios en el contenido de ácido butírico. El tratamiento con MeHg tuvo un efecto mayor sobre los contenidos de todos los ácidos analizados. Los tratamientos con la forma orgánica redujeron significativamente la concentración de todos los SCFA analizados a todas las concentraciones ensayadas (ácido acético: 44 - 54%, ácido butírico: 29 - 34%, ácido propiónico: 26 - 40%).

Capítulo 2. Resultados

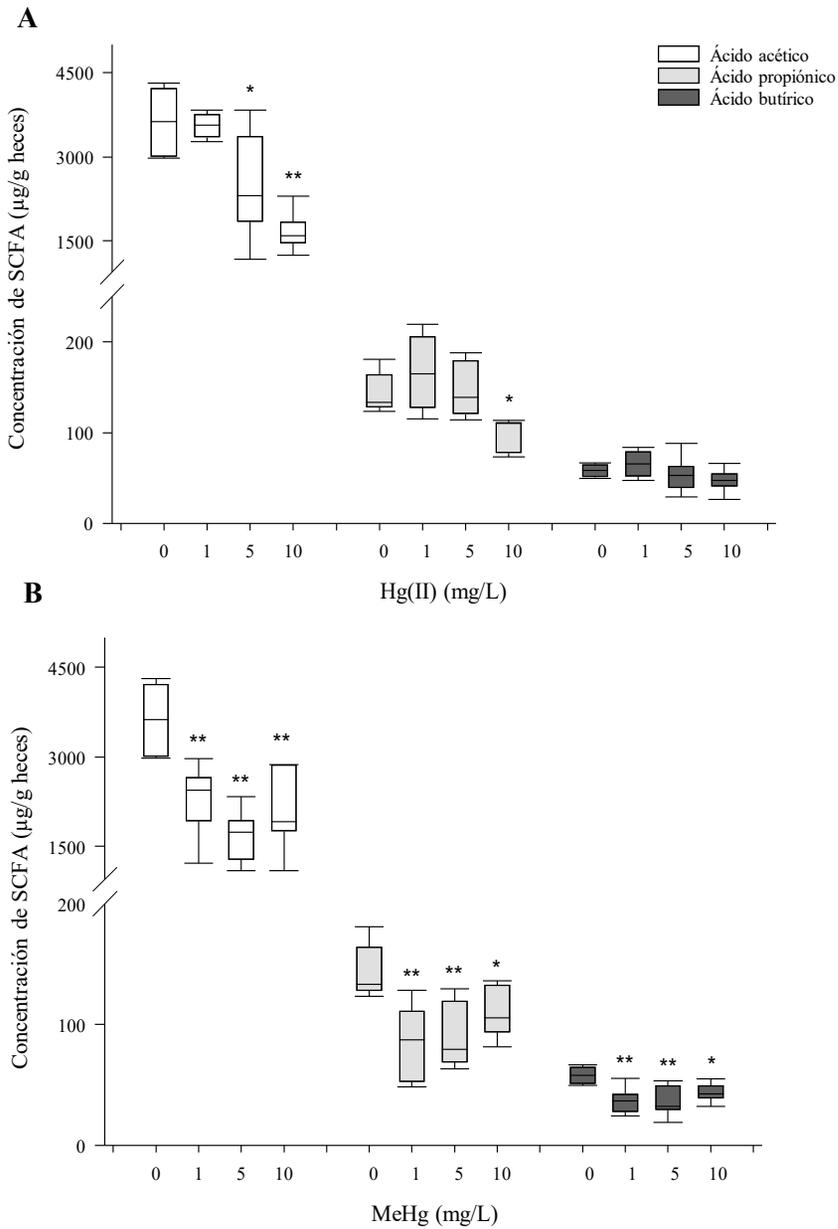


Figura 34. Concentración de SCFA en heces de ratón. Niveles de SCFAs tras 4 meses de exposición a Hg(II) (A) y MeHg (B) (0, 1, 5 y 10 mg/L). Los valores se expresan como $\mu\text{g/g}$ de heces (media \pm SD, n = 9-10). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $0.001 < p < 0.05$; ** $p < 0.001$) respecto a los animales control.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo se ha mostrado que la exposición oral a las formas mercuriales más comunes en la dieta conlleva daño intestinal, con una alteración significativa de la función barrera y un efecto adverso sobre varios componentes de la misma relevantes para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Los datos obtenidos han confirmado lo observado previamente en el Capítulo 1, donde ya se evidenciaba que la exposición a Hg(II) y MeHg ejercía un efecto adverso sobre el epitelio intestinal. En este sentido hay que señalar que la respuesta observada con el tricultivo Caco-2/HT29-MTX/THP-1 empleado en el capítulo anterior, expuesto subcrónicamente a ambas especies de Hg, es comparable a la observada en este estudio *in vivo*. Este hecho sugiere que el modelo podría ser una alternativa para realizar estudios de toxicidad intestinal que reduzcan el uso de animales de experimentación.

La exposición crónica a Hg(II) o MeHg no causó cambios relevantes en la composición de la microbiota de los ratones bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 32 y 33). En otros estudios sí se han observado diferencias en la composición de la microbiota entre ratones expuestos y control. Zhao et al. (2020) expusieron ratones hembra (raza no especificada) a 80 mg/L de HgCl₂ en el agua de bebida durante 90 días y observaron diferencias significativas entre los dos grupos tanto en el contenido del ciego como del recto. Zhang et al. (2019) también reportaron diferencias significativas tanto con Hg(II) como con MeHg en ratones macho Kunming expuestos mediante sonda gástrica durante siete días (dosis diaria, 33.6 mg/kg HgCl₂ o 3.1 mg/kg MeHg). Nielsen et al. (2018) expusieron ratones macho CD-1 a diferentes dosis de MeHg a través del pienso durante 30 días y también observaron diferencias en la composición de la microbiota entre los ratones expuestos y no expuestos. Sin embargo, las diferencias en cepa, sexo, vía de exposición y duración de la misma, origen de las muestras, así como técnicas de análisis de los datos de secuenciación masiva hace que la comparación entre estos estudios no sea posible.

Capítulo 2. Discusión

No obstante, la exposición crónica a Hg a través de la dieta podría afectar al metabolismo microbiano, ya que se observó una reducción significativa de los SCFA, especialmente en los animales tratados con MeHg (Figura 34B). Teniendo en cuenta que los cambios en la composición de la microbiota no son significativos, la reducción de estos metabolitos podría deberse a una alteración en su síntesis y/o su catabolismo. La síntesis de SCFA supone la participación de una serie de enzimas (Zhao et al., 2019) que pueden estar afectados por la exposición a Hg. Numerosos estudios evidencian el efecto inhibitorio tanto del Hg(II) como del MeHg debido principalmente a su elevada afinidad por los grupos SH presentes en los sitios catalíticos de las enzimas (Introducción, apartado 6.1). Por otro lado, los SCFA son una importante fuente de energía para las células del epitelio intestinal, que los incorporan principalmente a través de los transportadores de monocarboxilatos (Parada Venegas et al., 2019). El empleo de los SCFA por parte de las células intestinales podría verse aumentado en exposiciones al tóxico, debido a la generación de estrés y a un mayor requerimiento metabólico por parte del epitelio, lo que también podría influir en sus niveles en el lumen intestinal.

Numerosos estudios han evidenciado que la reducción de los contenidos luminales de SCFA puede afectar negativamente el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Además de ser importantes fuentes de energía para el epitelio, los SCFA desempeñan numerosas funciones relacionadas con la inmunomodulación y el mantenimiento de la función barrera de la mucosa intestinal. Se ha evidenciado que los SCFA pueden modular la producción y liberación de citoquinas y quimiocinas de los neutrófilos (Vinolo et al., 2011) y la ruta de señalización Nrf2 a través de receptores específicos de ácidos grasos (González-Bosch et al., 2021), regulando de esta forma la respuesta pro-inflamatoria y pro-oxidante. Estudios previos también muestran que promueven el ensamblaje de las uniones estrechas mediante la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Peng et al., 2009). La reducción de las concentraciones de SCFA a consecuencia de la exposición a Hg puede ser, por lo

tanto, una de las causas de la alteración observada en la barrera intestinal de los animales expuestos. Además, hay que tener en cuenta, que los SCFAs que no son empleados por las células intestinales llegan a la circulación sistémica donde afectan el metabolismo de los lípidos, la glucosa y el colesterol en varios tejidos (den Besten et al., 2013). Por tanto, el efecto adverso sobre los SCFA puede tener también repercusiones sistémicas. De hecho, estudios previos muestran un efecto del Hg en el metabolismo lipídico de ratas expuestas a Hg(II) (Rizzetti et al., 2019), incluso se ha descrito una asociación positiva entre la exposición al Hg y el riesgo de dislipemia (Sohn et al., 2020).

Del mismo modo que se observaba *in vitro*, la exposición prolongada a Hg afecta a la producción de mucus, aunque en este caso se manifiesta de forma más evidente en los animales tratados con MeHg. El tratamiento crónico con la forma metilada de Hg produce un aumento a nivel transcriptómico (Tabla 14) y proteico de la MUC2 (Figura 29), mucina mayoritaria del mucus colónico. En estos animales se evidencia también un aumento considerable del número de células mucosectoras respecto a los animales no tratados (Figura 30) y una sobreexpresión de la citoquina IL-13 (Tabla 14). La actuación de esta citoquina en la producción de mucus *in vivo* puede darse a través de varios mecanismos. La hiperplasia de las células mucosectoras como respuesta a un estímulo tóxico se ha descrito previamente en las vías respiratorias, indicándose que es consecuencia de la modificación del proceso de diferenciación de las células progenitoras. Así, la inflamación de las vías respiratorias dirigida por los linfocitos auxiliares Th2, característica del asma, induce la hiperplasia de las células mucosectoras a través de la participación de la IL-13. Esta citoquina activa la señalización de la ruta Notch que favorece la diferenciación de los progenitores derivados de células madre de las vías respiratorias al linaje de células caliciformes (Shaykhiev, 2019). Este fenómeno no está descrito a nivel intestinal pero posiblemente el mecanismo de toxicidad sea el mismo. Además, la IL-13 puede actuar directamente sobre la producción de mucus. Los datos obtenidos previamente en el Capítulo 1 apuntan a una participación de la ruta de señalización IL-4/IL-13/STAT6 en la mayor

Capítulo 2. Discusión

producción de mucina y por tanto de mucus de las células intestinales tratadas subcrónicamente con Hg.

Las consecuencias de una hiperplasia de las células mucosecretoras, que puede cronificarse si no desaparece el estímulo tóxico, es un proceso adverso para el resto de los componentes de la barrera intestinal, y por lo tanto es otro factor que puede contribuir al aumento de la permeabilidad intestinal. La gruesa capa de mucus producida por las células caliciformes sirve como primera línea de defensa innata del huésped. Además de constituir una barrera física, existen evidencias de que sus componentes, en especial las mucinas, están involucradas en varias rutas de señalización. De hecho, las colas intracelulares de las mucinas pueden fosforilarse y activar vías de señalización que regulan la inflamación, interacciones célula-célula, la diferenciación y la apoptosis (van Putten y Strijbis, 2017).

A nivel epitelial, además del aumento del número de las células mucosecretoras, se observa una modificación de la profundidad de las criptas intestinales (Figura 30) y una regulación a la baja de los genes codificantes de las proteínas de las uniones intercelulares ZO-1 y OCLN (Tabla 13). Las modificaciones de expresión de estas proteínas de ensamblaje celular han sido vinculadas, tanto *in vitro* como *in vivo*, con la pérdida de la función barrera intestinal. En el Capítulo 1 ya se han descrito los efectos adversos sobre la barrera intestinal de una regulación a la baja de la proteína ZO-1. Los estudios sobre el efecto de la OCLN en la integridad de las uniones intercelulares son menos concluyentes. Richter et al. (2019) reportan, en un estudio realizado empleando la línea celular Caco-2 con el gen de la OCLN silenciado a distintos niveles, que no existe un vínculo claro entre la deficiencia de esta proteína y el flujo de macromoléculas por vía paracelular. Sin embargo, Al-Sadi et al. (2011) muestran que las monocapas de las células con la OCLN silenciada presentan una mayor permeabilidad al manitol, un marcador de transporte paracelular. En este mismo estudio se evidencia que el efecto del silenciamiento de la OCLN sobre la permeabilidad en ratones depende del tamaño de las moléculas, siendo más

efectivo para aquellas que tiene un mayor tamaño. Los autores concluyen que la OCLN regula principalmente el transporte paracelular a través de las uniones con un mayor tamaño de poro de paso. De ser así, la reducción de la expresión de la OCLN sí tendría un efecto directo sobre el grado de permeabilidad de la barrera intestinal.

El aumento de la profundidad de las criptas del colon observado en los animales tratados con MeHg es también un efecto tóxico que puede alterar la funcionalidad del epitelio intestinal. El alargamiento podría deberse a la expansión de la LP como resultado de la proliferación de células del estroma, la infiltración de células inflamatorias o la remodelación del tejido (Dickson et al., 2006), entre otros factores. La infiltración de neutrófilos se ha evidenciado en los tejidos de los animales expuestos a Hg (Figura 24 y Figura 25), pudiendo ser una posible causa de este fenómeno. Tampoco hay que descartar un posible proceso de remodelación del epitelio como consecuencia del daño tisular causado por el Hg, lo que aumentaría la actividad mitótica de las células madre. En otras patologías, como la celiaquía, el aumento de la profundidad de la cripta precede a la atrofia de la vellosidad (Dickson et al., 2006) donde están las células diferenciadas, lo que puede comprometer el correcto funcionamiento de la mucosa intestinal.

Todos los efectos descritos a nivel estructural y funcional, tal y como se ha observado en estudios *in vitro* (Capítulo 1), indican que la exposición continua a Hg puede conducir a un estado crónico de inflamación y estrés en el intestino. El mayor contenido de citoquinas pro-inflamatorias (Figura 23) y de especies reactivas y peróxidos lipídicos (Figura 26 y 27) sugiere este mecanismo de toxicidad como la base del daño al tejido colónico. Todas estas moléculas, que pueden actuar como DAMPs, inducen y prolongan un estado de inflamación que afecta a los distintos componentes de la barrera intestinal a través de distintas rutas de señalización (Boyapati et al., 2016). De hecho, en el presente estudio hemos podido comprobar como existe una activación de dos rutas muy relacionadas con los procesos pro-inflamatorios y pro-oxidantes a nivel intestinal, p38-MAPK y JNK (Figura 24). Varios estudios han mostrado *in vivo* que estas rutas intervienen

Capítulo 2. Discusión

en la regulación de la barrera intestinal, a través de la modulación de las uniones intercelulares (Minakami et al., 2015). Al-Sadi et al. (2019) muestran en un estudio con ratones con enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), la posible relación de la ruta p38-MAPK y la alteración de las uniones intercelulares, a través de la activación de la ruta de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). La implicación de la ruta JNK en la alteración de la proteína ZO-1 a través de la regulación de su expresión génica también se ha reportado en varios estudios (Chen et al., 2012; Wang et al., 2020).

Estas cascadas de señalización junto con la continua intercomunicación de los distintos componentes de la barrera (bacterias residentes, epitelio intestinal y sistema inmunitario) en situaciones adversas pueden llevar a la amplificación del efecto tóxico del Hg, especialmente si el estímulo se mantiene a lo largo de una exposición crónica. El metal puede iniciar una respuesta pro-inflamatoria/pro-oxidante que aumenta la permeabilidad intestinal, de modo que las bacterias residentes en el intestino y otras sustancias presentes en el lumen, citoquinas pro-inflamatorias, DAMPs o el propio Hg, pueden translocarse e interactuar con el sistema inmune asociado induciendo a su vez un estado pro-inflamatorio crónico y el mantenimiento de una barrera defectuosa. Además, todos estos agentes dañinos podrían llegar al torrente sanguíneo o al sistema linfático produciendo daño a nivel sistémico (Clark y Coopersmith, 2007).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio indican que la exposición oral a Hg(II) y a MeHg afecta negativamente a la barrera intestinal, confirmando los datos obtenidos en el capítulo anterior. Hay que destacar que las concentraciones a las que se evidencia la toxicidad intestinal en este estudio son similares a las encontradas en alimentos, especialmente en zonas contaminadas. El aumento de la permeabilidad intestinal puede estar asociado con desórdenes a otros niveles. De hecho, un trabajo reciente de Lin et al. (2021), sugiere que la toxicidad hepática del Hg(II) podría en parte explicarse por los desórdenes que esta forma mercurial genera a nivel intestinal. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo un mayor número de investigaciones para determinar si este efecto adverso a nivel intestinal podría tener un papel relevante en las enfermedades descritas, especialmente en las poblaciones infantiles. La identificación del modo de acción del tóxico *in vivo* es de gran interés para identificar posibles estrategias destinadas a reducir la toxicidad en las poblaciones expuestas crónicamente. Este último punto se va a abordar en los próximos capítulos de la tesis.

Capítulo 3

Análisis *in vitro* de la capacidad de bacterias ácido-lácticas para reducir la toxicidad generada por el mercurio en el epitelio intestinal

Los capítulos previos han mostrado la capacidad del Hg(II) y el MeHg para aumentar la permeabilidad y generar un proceso inflamatorio a nivel intestinal. Tal y como hemos comentado en la Introducción (apartado 6), este efecto local puede tener implicaciones sistémicas, incluso puede favorecer la aparición de algunas de las patologías descritas en poblaciones expuestas crónicamente al metal. Por tanto, buscar estrategias para reducir esta toxicidad puede tener efectos beneficiosos tanto a nivel intestinal como sistémico.

Los estudios encaminados a reducir la toxicidad de metales a nivel intestinal son escasos y en la mayoría de los casos se han centrado en la búsqueda de estrategias para disminuir la absorción y por tanto la llegada a la circulación sistémica (Introducción, apartado 7). El empleo de BAL para restaurar la barrera intestinal se ha ensayado con éxito en cultivos celulares tratados con sustancias pro-inflamatorias como el lipopolisacárido (LPS) o alguna citoquina pro-inflamatoria (Yeung et al., 2013; Zeng et al., 2016). Además, estos microorganismos pueden secuestrar metales catiónicos, reduciendo al mismo tiempo la disponibilidad del tóxico.

El objetivo de este capítulo ha sido investigar la eficacia de dos cepas de BAL [*L. intestinalis* (LE1) y *L. johnsonii* (LE2)] en la protección frente a la toxicidad intestinal de Hg. Se eligieron estas cepas porque se había evidenciado su capacidad para quelar Hg *in vitro* e *in vivo* (Burbano, 2022). Los resultados obtenidos han revelado que ambas cepas, especialmente la LE1, tienen la capacidad de reducir los efectos tóxicos causados por el Hg(II) y MeHg sobre la barrera intestinal, posiblemente como consecuencia de su capacidad de quelación de Hg, aunque no se descartan otras posibles rutas de actuación.

RESULTADOS

1. Optimización de las condiciones de coexposición con mercurio y BAL

La exposición de las monocapas Caco-2/HT29-MTX a las cepas desde el momento de la siembra impidió la formación de la monocapa intestinal a las diferentes DO_{600} ensayadas (0.15, 0.2 y 0.5). Sin embargo, la exposición a partir del tercer día postsiembra con la DO_{600} más baja (0.15) permitió la correcta formación de la monocapa Caco-2/HT29-MTX mientras que las DO_{600} de 0.2 y 0.5 no posibilitaron esta formación. Por ello, las condiciones de exposición a 1 mg/L MeHg empleadas fueron: coexposición del tricultivo a BAL empleando una DO_{600} de 0.15 desde el día 3 postsiembra y mantenimiento de la coexposición durante 7 días.

2. Quelación de mercurio por las cepas de BAL

Se analizó la capacidad de unión del Hg(II) y MeHg de las cepas LE1 y LE2 en las mismas condiciones empleadas en los cultivos celulares. El análisis del contenido de Hg en las cepas mostró que el $29.5 \pm 7.6\%$ del total de Hg(II) presente en el medio fue captado por la cepa LE1, mientras que la cepa LE2 unió el $78.1 \pm 13.6\%$. Por otro lado, la cepa LE1 captó el $26.4 \pm 6.2\%$ de MeHg presente en el medio mientras que alrededor del $48 \pm 1.5\%$ fue captado por la cepa LE2.

3. Efecto de las cepas de BAL sobre la respuesta pro-inflamatoria

Para determinar el efecto de las cepas de BAL sobre la respuesta pro-inflamatoria causada por el Hg, se analizó la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8/CXCL-8 al medio basolateral y la expresión génica de algunos marcadores pro-inflamatorios (IL-1 β , IL-8/CXCL8, CXCL9, CXCL10) en los macrófagos THP-1.

En la Figura 35 se muestra la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 al medio basolateral en los tricultivos Caco-2/HT29-MTX/THP-1 expuestos a Hg(II) (1 mg/L) o MeHg (1 mg/L) en ausencia (control positivo) o presencia de LE1 y LE2. Ambas especies de Hg incrementaron significativamente la liberación de la citoquina IL-8 respecto a las células no tratadas (control negativo) [Hg(II): 117%; MeHg: 88%], como se había observado previamente en el Capítulo 1. La adición de ambas cepas de BAL redujo significativamente la respuesta pro-inflamatoria causada por el tratamiento con Hg(II) (porcentaje medio de reducción respecto al control positivo: LE1: 80%, LE2: 51%), mientras que sólo la LE1 disminuyó la liberación de IL-8 en las células tratadas con MeHg (porcentaje medio de reducción respecto al control positivo: 63%).

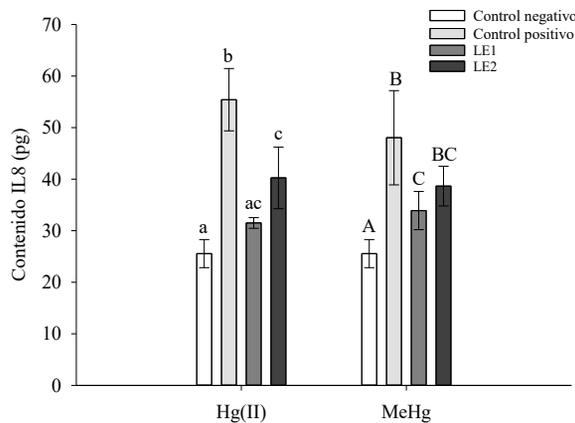


Figura 35. Liberación de IL-8 al compartimento basolateral del tricultivo Caco-2/HT29-MTX/THP-1. Células no expuestas a Hg (control negativo) o expuestas a Hg(II) (1 mg/L) y MeHg (1 mg/L) en ausencia (control positivo) o presencia de LE1 o LE2 durante 7 días. Los valores se expresan como pg (media \pm SD, n=3-4). Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de los contenidos de IL-8 en el medio basolateral entre tratamientos.

Capítulo 3. Resultados

Únicamente se presentan los datos referentes a la expresión génica de las citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias (*IL1B*, *IL-8/CXCL8*, *CXCL9*, *CXCL10*) en los macrófagos THP-1, ya que no se observaron cambios en las monocapas Caco-2/HT29-MTX (Tabla 15). Tal y como se mostró en el Capítulo 1, la exposición a Hg indujo un aumento significativo de la expresión de estos genes. En la mayoría de los casos, el tratamiento con ambas cepas de BAL redujo significativamente la sobreexpresión causada por el Hg ($p < 0.05$) a niveles próximos a los de las células no tratadas (Tabla 15), confirmando el efecto antiinflamatorio de las cepas de BAL ensayadas.

Tabla 15. Expresión relativa de marcadores de inflamación en células THP-1. Células expuestas a Hg(II) (1 mg/L) o MeHg (1 mg/L) en ausencia o presencia de las cepas BAL. Los valores se expresan como nivel de cambio de la expresión respecto a las células no tratadas (media \pm SE, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células no tratadas. En color rojo se marcan las sobreexpresiones y en color azul las regulaciones a la baja respecto al control.

Tratamientos	<i>IL1B</i>	<i>IL-8</i>	<i>CXCL9</i>	<i>CXCL10</i>
Hg(II) 1 mg/L	3.26 \pm 0.78*	4.25 \pm 0.92*	4.08 \pm 0.93*	3.92 \pm 1.06*
Hg(II) + LE1	0.78 \pm 0.10	0.92 \pm 0.11	2.07 \pm 0.27	0.74 \pm 0.14
Hg(II) + LE2	1.82 \pm 0.28	1.55 \pm 0.24	2.46 \pm 0.32*	1.03 \pm 0.20
MeHg 1 mg/L	9.07 \pm 1.69*	8.58 \pm 1.01*	10.23 \pm 1.36*	10.05 \pm 2.26*
MeHg + LE1	0.47 \pm 0.12	0.50 \pm 0.16	1.66 \pm 0.37	0.50 \pm 0.13
MeHg + LE2	0.83 \pm 0.10	0.39 \pm 0.06*	2.94 \pm 0.40	0.56 \pm 0.13

4. Efecto de las cepas de BAL sobre la respuesta pro-oxidante

La Figura 36 muestran los niveles intracelulares de ROS/RNS analizados en las monocapas celulares Caco-2/HT29-MTX y en los macrófagos THP-1, respectivamente, tras la exposición subcrónica a Hg(II) o MeHg en ausencia o presencia de las cepas BAL. La exposición subcrónica a Hg indujo un aumento significativo de los niveles de ROS/RNS respecto a las células no tratadas (control negativo) [Caco-2/HT29-MTX: Hg(II) 46%, MeHg 28%; THP-1: Hg(II) 58%, MeHg 50%]. La adición de las cepas BAL disminuyó de forma más eficaz la respuesta pro-oxidante en los macrófagos (LE1: 30-33%, LE2: 33-45%) que en las monocapas Caco-2/HT29-MTX (LE1: 15-35%, LE2: 26%). En algunos casos, el tratamiento con las cepas de BAL permitió llegar a niveles cercanos a los basales de las células no tratadas.

El análisis de la expresión de las proteínas de choque térmico y de la metalotioneína 2A también confirmó el efecto protector de las cepas de BAL frente a la toxicidad generada por el Hg (Tabla 16). Como se había observado anteriormente en el Capítulo 1, los tratamientos con ambas especies de Hg incrementaban significativamente la expresión génica de estas proteínas de estrés respecto a las células no tratadas. Sin embargo, en algunos casos, la adición de las cepas de BAL disminuyó significativamente la expresión de *HSP70*, *HSP90* y *MT2A* tanto en las monocapas Caco-2/HT29-MTX como en los macrófagos respecto a las células tratadas únicamente con Hg ($p < 0.05$). En muchos casos, la expresión génica de estas proteínas en las monocapas intestinales tratadas con Hg y las cepas de BAL presentó niveles similares a los de las células no tratadas.

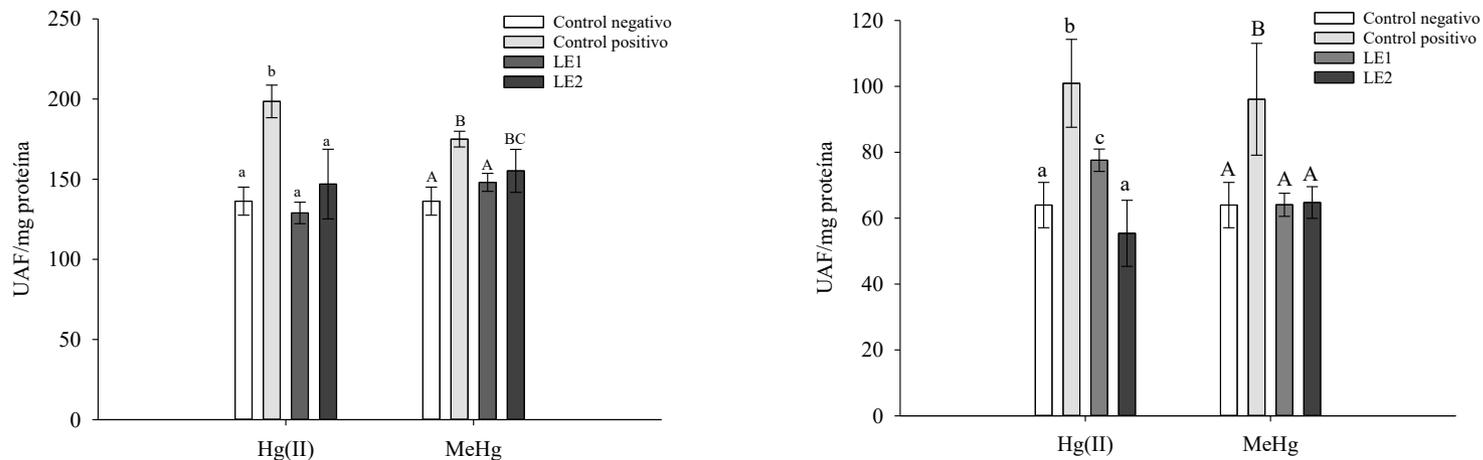


Figura 36. Niveles intracelulares de ROS/RNS en las monocapas Caco-2/HT29-MTX (A) y en los macrófagos THP-1 (B). Células expuestas a Hg(II) y MeHg (1 mg/L) en ausencia (control positivo) o presencia de LE1 o LE2 durante 7 días. Los valores se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF)/mg proteína (media \pm SD, n=3-4). Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de los contenidos de ROS/RNS en ambos tipos celulares entre tratamientos.

Tabla 16. Expresión relativa de los genes de la metalotioneína 2A y de las proteínas de choque térmico 70 y 90 en monocapas Caco-2/HT29-MTX y en macrófagos THP-1. Células tratadas con Hg(II) o MeHg en ausencia o presencia de las cepas BAL. Los valores se expresan como nivel de cambio de la expresión respecto a las células no tratadas (media \pm SE, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células no expuestas. En rojo se marcan las sobreexpresiones respecto a las células control.

Tratamientos	<i>MT2A</i>		<i>HSP90</i>		<i>HSP70</i>	
	Caco-2/HT29-MTX	THP-1	Caco-2/HT29-MTX	THP-1	Caco-2/HT29-MTX	THP-1
Hg(II)	3.72 \pm 0.54*	3.58 \pm 0.58*	2.25 \pm 0.44*	4.36 \pm 1.13*	3.91 \pm 0.28*	2.30 \pm 0.48*
LE1	1.72 \pm 0.22	2.07 \pm 0.72*	1.10 \pm 0.15	2.95 \pm 0.71*	0.35 \pm 0.08	0.61 \pm 0.22
LE2	2.33 \pm 0.24*	2.67 \pm 0.64*	1.75 \pm 0.24*	3.55 \pm 1.35*	1.46 \pm 0.26	2.28 \pm 0.56*
MeHg	6.25 \pm 0.92*	4.48 \pm 0.88*	4.98 \pm 0.73*	6.76 \pm 1.69*	5.09 \pm 1.34*	4.67 \pm 0.99*
LE1	2.37 \pm 0.73	2.22 \pm 0.75*	1.69 \pm 0.33	2.67 \pm 0.60*	1.81 \pm 0.27	0.79 \pm 0.31
LE2	2.63 \pm 0.58	2.12 \pm 0.35*	1.33 \pm 0.21	2.55 \pm 0.50*	1.17 \pm 0.12	1.22 \pm 0.28

5. Efecto de las cepas de BAL sobre la estructura de la monocapa intestinal

La Figura 37 muestra la inmunolocalización de la proteína de las uniones estrechas ZO-1 en las monocapas Caco-2/HT29-MTX sin tratar o tratadas con Hg(II) (1 mg/L) o MeHg (1 mg/L), en ausencia o presencia de las cepas de BAL durante 4 días. Las células no expuestas presentaron una morfología típica de empedrado con unas uniones estrechas lineales, mientras que las monocapas celulares expuestas a Hg(II) o MeHg mostraron unas uniones más zigzagueantes y un aumento del volumen celular. Estos efectos fueron menos pronunciados cuando las cepas de BAL se adicionaron a los cultivos, siendo el efecto protector más evidente en las células tratadas con Hg(II). Por otro lado, el análisis de la expresión del gen que codifica la proteína ZO-1 (Tabla 17) indicó una regulación a la baja estadísticamente significativa en las monocapas expuestas a ambas especies de Hg. Sin embargo, la adición de las cepas de BAL reestableció la expresión génica de esta proteína respecto al control positivo.

La secreción de mucina analizada mediante la tinción con azul alcian reveló una mayor secreción de mucus inducida por la exposición a Hg (Figura 38). Además, los tratamientos con Hg aumentaron la expresión de la *MUC5AC* (Tabla 18). La adición de las cepas redujo significativamente la secreción de mucus en las monocapas intestinales tratadas con ambas especies Hg (Figura 38) y la expresión de la *MUC5AC* en las células tratadas con MeHg. Sin embargo, el efecto de las cepas sobre la expresión de la mucina fue distinta en las células tratadas con Hg(II); y únicamente la cepa LE1 redujo la sobreexpresión causada por la forma inorgánica de Hg.

Adicionalmente se evaluó el efecto de las cepas sobre la expresión de *IL13*, que tal y como se indicó en el Capítulo 1, podría estar implicada en la hipersecreción de mucina. La adición de ambas cepas redujo la expresión de la citoquina IL-13 respecto a los cultivos tratados con MeHg (Tabla 17), mientras que sola la cepa LE1 redujo la expresión de esta citoquina en los cultivos expuestos a Hg(II).

Capítulo 3. Resultados

Tabla 17. Expresión relativa del gen *ZOI*, *MUC5AC* e *IL13* en monocapas Caco-2/HT29-MTX. Células tratadas con Hg(II) o MeHg en ausencia o presencia de las cepas de BAL. Los valores se expresan como unidades de cambio de expresión respecto a las células no tratadas (media \pm SE, n=3-4). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a las células no expuestas. En color rojo se muestran las sobreexpresiones y en color azul las regulaciones a la baja respecto al control.

		<i>ZOI</i>	<i>MUC5AC</i>	<i>IL13</i>
Hg(II)	Hg(II)	0.28 \pm 0.04*	2.89 \pm 0.49*	3.49 \pm 0.66*
	LE1	0.92 \pm 0.15	1.36 \pm 0.24	1.78 \pm 0.49
	LE2	0.90 \pm 0.14	2.51 \pm 0.52*	2.41 \pm 0.49*
MeHg	MeHg	0.20 \pm 0.05*	7.81 \pm 1.63*	9.48 \pm 1.67*
	LE1	0.74 \pm 0.13	1.46 \pm 0.54	1.98 \pm 0.42
	LE2	0.82 \pm 0.14	1.87 \pm 0.38	1.35 \pm 0.69

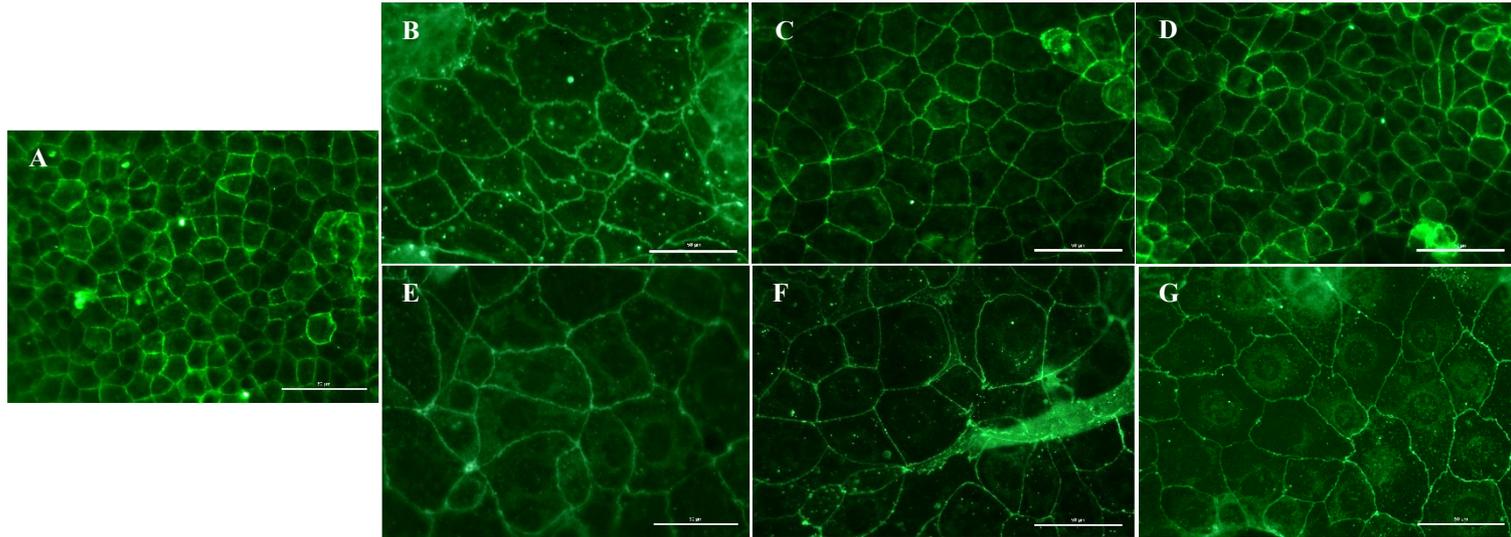


Figura 37. Inmunolocalización de la proteína zonula occludens-1 (ZO-1) en las monocapas Caco-2/HT29-MTX. Células sin tratar (A), tratadas con 1 mg/L de Hg(II) en ausencia de cepas BAL (B) o presencia de LE1 (C) y LE2 (D); tratadas con 1 mg/L de MeHg en ausencia de las cepas BAL (E) o presencia de LE1 (F) y LE2 (G). Las barras de escala representan una longitud de 50 μm . Magnificación 40 \times .

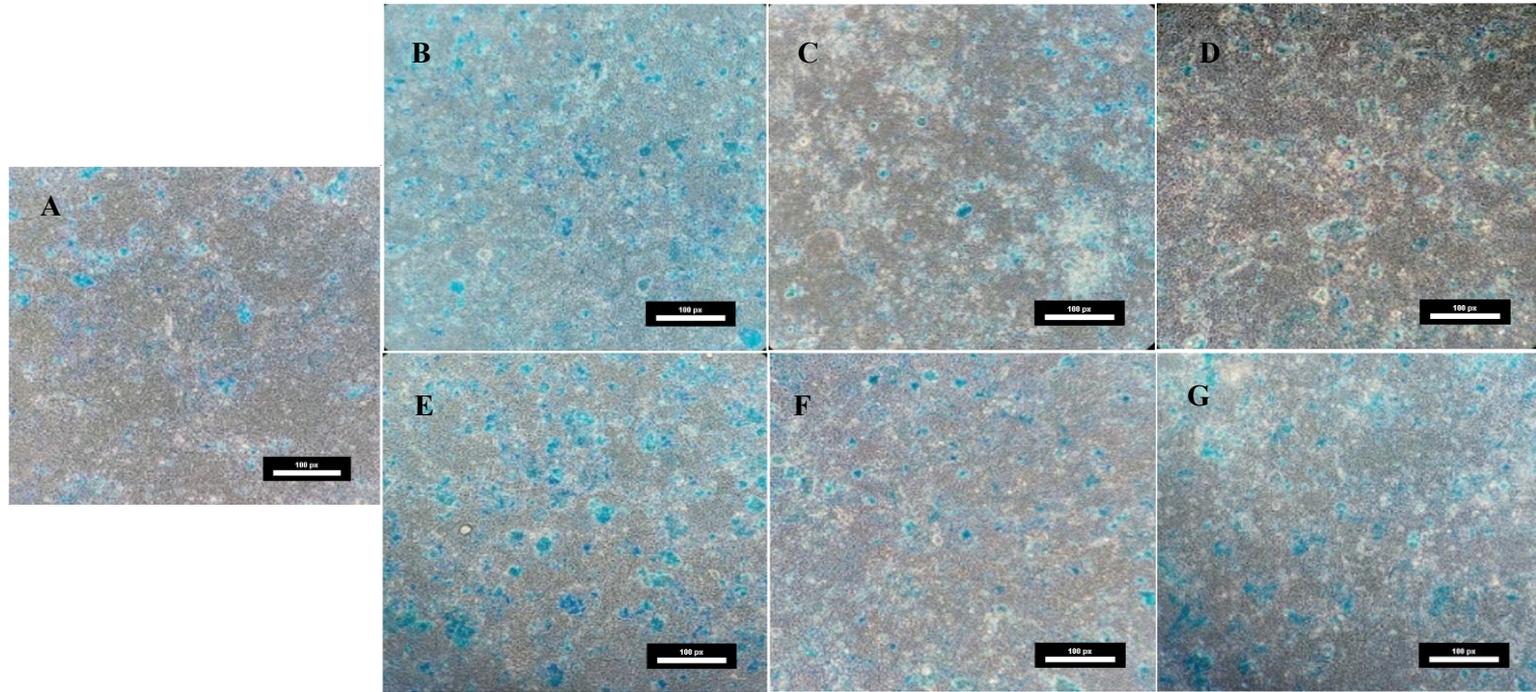


Figura 38. Imágenes de microscopía óptica tras la tinción de azul alcian de las monocapas Caco-2/HT29-MTX. Células sin tratar (A), tratadas con 1 mg/L de Hg(II) en ausencia de cepas BAL (B) o presencia de LE1 (C) y LE2 (D); tratadas con 1 mg/L de MeHg en ausencia de las cepas BAL (E) o presencia de LE1 (F) y LE2 (G). Las barras de escala hacen referencia a una longitud de 100 px. Magnificación 10×.

6. Efecto de las cepas de BAL sobre la permeabilidad intestinal

En la Figura 39 se muestra el coeficiente de permeabilidad aparente de LY y la RET de las células intestinales no tratadas y las células expuestas a Hg(II) (1 mg/L) o MeHg (1 mg/L) durante 7 días en ausencia o presencia de las cepas de BAL. La exposición subcrónica a Hg redujo significativamente los valores de RET en las monocapas intestinales (Figura 39B) y aumentó el transporte de LY (Figura 39A), tal y como se había observado en el Capítulo 1. La adición de las cepas de BAL incrementó los valores de RET respecto a las células tratadas únicamente con Hg(II) (LE1: 11%; LE2: 8%) o con MeHg (LE1: 10%; LE2: 8%). Además, la coexposición con la cepa LE1 redujo significativamente el transporte de LY en las monocapas expuestas a Hg(II) (37%) y MeHg (56%). El tratamiento con la cepa LE2 únicamente produjo un descenso significativo de la permeabilidad intestinal en las células expuestas a MeHg (36%).

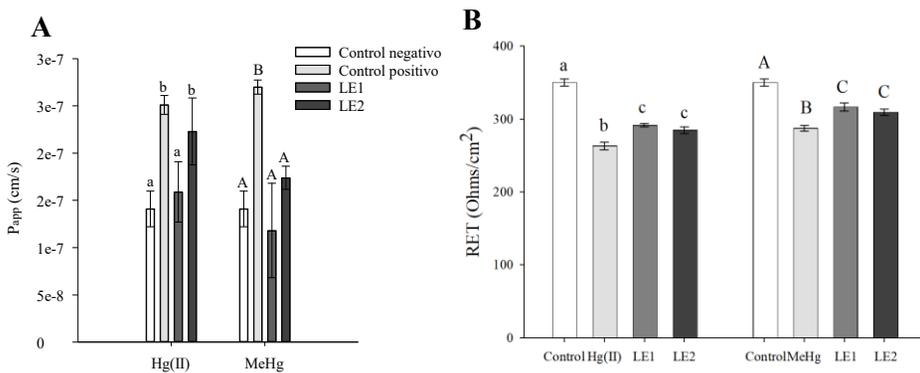


Figura 39. Coeficiente aparente de permeabilidad del LY (P_{app} , A) y resistencia eléctrica transepitelial (RET, B) de las monocapas Caco-2/HT29-MTX. Monocapas no expuestas a Hg (control negativo) y monocapas expuestas a 1 mg/L Hg(II) o MeHg en ausencia (control positivo) o presencia de las cepas de BAL. Los valores se expresan como media \pm SD (n=3-4). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7. Efecto de las cepas de BAL sobre la regeneración celular

La capacidad de regeneración de las monocapas Caco-2/HT29-MTX se analizó tras su tratamiento con ambas especies de Hg en ausencia o presencia de LE1 y LE2 (Figura 40 y 41). Las células no expuestas a Hg (control negativo) eran capaces de cerrar la herida a las 48 h (95% de cierre de herida). El tratamiento con Hg(II) o MeHg afectó negativamente al proceso de reparación celular, tal y como se observó en el Capítulo 1 [porcentaje de cierre: Hg(II): 70%, MeHg: 61%]. Sin embargo, la adición de las cepas BAL restauró casi por completo la capacidad de regeneración celular de la monocapa intestinal [porcentaje de cierre: Hg(II) + LE1: 88%, Hg(II) + LE2: 83%, MeHg + LE1: 84%, MeHg + LE2: 91%] (Figura 40).

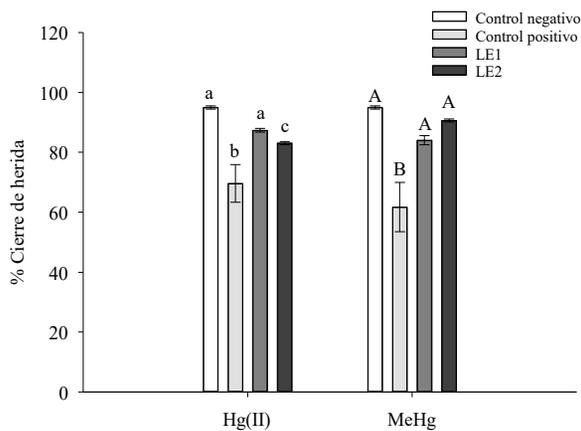


Figura 40. Porcentaje de cierre de herida tras 48 h en monocapas Caco-2/HT29-MTX. Células no tratadas (control negativo), células tratadas con 1 mg/L Hg(II) o 1 mg/L MeHg en ausencia (control positivo) o presencia de LE1 o LE2. Los valores se expresan como la media \pm SD (n=3-4). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$) en el porcentaje de cierre de herida entre tratamientos.

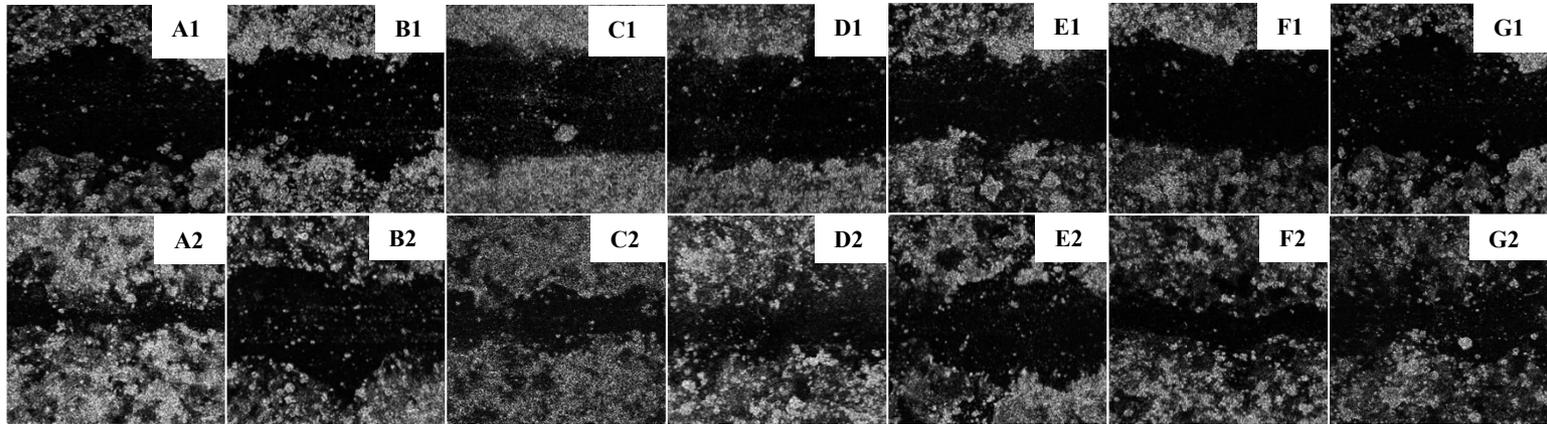


Figura 41. Imágenes del proceso de reparación de la herida en monocapas Caco-2/HT29-MTX en ausencia y presencia de BAL. Células sin tratar (A); tratadas con 1 mg/L de Hg(II) en ausencia de las cepas BAL (B) o en presencia de LE1 (C) y LE2 (D); tratadas con 1 mg/L de MeHg en ausencia de las cepas BAL (E) o en presencia de LE1 (F) y LE2 (G). Las imágenes de A1 – G1 fueron obtenidas a tiempo cero y las imágenes A2 – G2 fueron obtenidas tras 48 h de la generación de la herida. Magnificación 40×.

DISCUSIÓN

En este capítulo se ha evidenciado el papel protector de dos cepas de BAL frente al daño producido en diferentes componentes de la mucosa intestinal como resultado de una exposición subcrónica a Hg(II) y MeHg.

Existen un conjunto de hipótesis que podrían explicar los efectos beneficiosos de las bacterias empleadas en el presente estudio. La capacidad de las cepas LE1 y LE2 para unir Hg podría ser una de las principales causas de la protección observada. Las cepas bacterianas empleadas en este estudio han mostrado su capacidad para secuestrar ambas especies de Hg tras ser inactivadas mediante calor, lo que sugiere la presencia de componentes estructurales presentes en la pared bacteriana que podrían intervenir en esta unión. Algunos lactobacilos presentan en su superficie glicoproteínas con lugares de unión a grandes moléculas e iones (Abdullah, 2020). Sin embargo, cabe la posibilidad de que estas proteínas se encuentren dañadas tras la inactivación térmica de las bacterias. No obstante, existen otros componentes en la pared bacteriana como los ácidos teicoicos (TA) y los ácidos lipoteicoicos (LTA), que podrían unir Hg. Ambos poseen una estructura que se basa en una “columna” compuesta por moléculas de glicerol fosfato unidas a moléculas de D-alanina, N-acetilglucosamina o a grupos hidroxilo (Holst y Müller-Loennies, 2007; Naumova et al., 2006), lo que les confiere carga negativa, pudiendo de esta forma atraer metales catiónicos. Varios estudios han reportado la capacidad de estas moléculas para unir iones como el magnesio (Mg^{2+}) y el calcio (Ca^{2+}) (Lambert et al., 1975; Thomas y Rice, 2014, 2015). Además, se ha evidenciado recientemente la participación del LTA en la unión a Hg(II) y MeHg en cepas de lactobacilos (Alcántara et al., 2020; Alcántara et al., 2017). Sin embargo, no se descarta la posible participación de otros componentes de la pared bacteriana en el secuestro de Hg, ya que la inactivación del gen que codifica la polimerasa LTA (*ltaS*) no suprime por completo la capacidad de unión a este metal (Alcántara et al., 2020). Todo lo expuesto indica que el contenido de Hg libre en el medio se vería reducido posiblemente como consecuencia de la

interacción de las cepas LE1 y LE2 con este metal, reduciendo su disponibilidad para ejercer su efecto tóxico a nivel intestinal.

Otra posible propiedad que podrían poseer las BAL sería su capacidad antioxidante o antiinflamatoria. Existen antecedentes sobre donde se reporta esta capacidad en BAL están inactivadas. Kang et al. (2021), empleando BAL inactivadas por calor en macrófagos RAW 264.7, mostraron la inhibición de la sobreexpresión génica de las enzimas óxido-nítrico sintasa y la ciclooxigenasa-2 inducida por la exposición a LPS, reduciendo así el contenido de ROS/RNS intracelular. Se ha reportado la reducción de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, IL-6 e IL-8, en monocapas celulares Caco-2 estimuladas mediante un cocktail inflamatorio tras el pretratamiento con *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 tratadas térmicamente (Castro-Herrera et al., 2020). La exposición con *Lactobacillus gasseri* SBT2055 tratado térmicamente de fibroblastos aislados de ratón expuestos a paraquat induce, la reducción de la respuesta pro-oxidante (Kobatake et al., 2017). Por otro lado, los efectos beneficiosos del uso de BAL, como es el caso de *Lactocaseibacillus casei* ATCC393 inactivado, se han demostrado sobre la disrupción de las proteínas de las TJ en células Caco-2 sometidas a estrés osmótico (Samak et al., 2021). Además, la exposición de células Caco-2 con *L. rhamnosus* GG inactivada por calor restaura los valores de RET cuando las monocapas celulares son tratadas con gliadina (Orlando et al., 2014).

CONCLUSIONES

En el presente capítulo se ha mostrado la capacidad de las cepas LE1 y LE2 para aliviar la toxicidad asociada a una exposición continuada a Hg sobre el epitelio intestinal. Aunque el mecanismo de quelación de Hg posiblemente juega un papel importante, las diferencias observadas en la capacidad de quelación de las dos cepas junto con su efecto protector, indican la posible implicación de otros mecanismos antioxidantes o anti-inflamatorios a través de componentes estructurales presentes en la pared celular de las bacterias, lo que podría explicar la distinta eficacia de LE1 y LE2 observada.

Los resultados expuestos en este capítulo han mostrado, además, que el uso de un modelo celular desarrollado en este trabajo proporciona una buena herramienta para analizar los efectos potencialmente beneficiosos de microorganismos probióticos tras la exposición a Hg a nivel intestinal. Dados los resultados prometedores de *L. intestinalis* (LE1) y *L. johnsonii* (LE2) para reducir la toxicidad generada por el Hg *in vitro*, es necesario la evaluación del efecto de estas cepas en modelos *in vivo* bajo exposiciones subcrónicas y crónicas a Hg(II) y MeHg. Este estudio también nos permitiría administrar las BAL en su forma viable y elucidar otros posibles mecanismos de protección, además de la quelación por sí misma. Este estudio se va a abordar en el siguiente capítulo.

Capítulo 4

Evaluación *in vivo* del efecto protector de bacterias ácido lácticas para reducir la toxicidad generada por el metilmercurio en el intestino

Los datos obtenidos en el capítulo anterior indican que las cepas bacterianas ensayadas pueden ser estrategias viables para proteger las poblaciones expuestas frente a la exposición dietaria a Hg. Sin embargo, tal y como hemos indicado a lo largo de la tesis, los ensayos *in vitro* carecen de muchos componentes que *in vivo* intervienen tanto en los procesos de toxicidad como de protección. De ahí la necesidad de llevar a cabo ensayos en animales modelo para confirmar los datos obtenidos en cultivos celulares.

En este capítulo se ha llevado a cabo la evaluación *in vivo* de la capacidad protectora de las cepas LE1 y LE2, empleando ratones expuestos de forma subcrónica a MeHg (5 mg/L). Los resultados han mostrado una reducción de la toxicidad intestinal generada tras la exposición a MeHg siendo la cepa LE1 la que ha manifestado mayor eficacia. La administración de esta cepa ha permitido reducir la inflamación y el estado oxidativo en el tejido colónico, además de restaurar los niveles de las proteínas de las uniones intercelulares y de la secreción de mucina. Por otro lado, se ha reestablecido la producción de los SCFAs y se ha conseguido recuperar parcialmente la función barrera.

RESULTADOS

A lo largo del experimento, se sacrificaron 2 animales (grupo tratado con MeHg y LE1, grupo tratado con MeHg y LE2) ya que mostraron una pérdida de peso mayor al 20%. El resto de los animales no presentaron cambios físicos notables y la media de los pesos de todos los grupos fue similar al finalizar el estudio: controles, 19.8 g; MeHg, 21.8 g; LE1, 20.5 g; LE2, 20.7 g.

1. Modulación *in vivo* de la respuesta pro-inflamatoria por las cepas de BAL

El análisis de la respuesta pro-inflamatoria tras dos meses de exposición a 5 mg/L de MeHg no mostró diferencias significativas en el intestino delgado tal y como se observó en las exposiciones durante 4 meses (Capítulo 2). No obstante, se produjo un aumento significativo de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α en el colon de los ratones tratados con MeHg respecto a los animales no tratados (porcentajes de incremento: IL-1 β , 25%; TNF- α , 80%) (Figura 42). Ambas cepas redujeron significativamente la concentración de la citoquina IL-1 β (LE1, 16%; LE2, 24%) respecto a los animales tratados únicamente con MeHg, mientras que la administración de la cepa LE1 también redujo los niveles de TNF- α (35%). Además, es importante destacar que los contenidos de las citoquinas en los animales dosificados con la cepa LE1 fueron similares a los observados en los ratones no expuestos (control negativo).

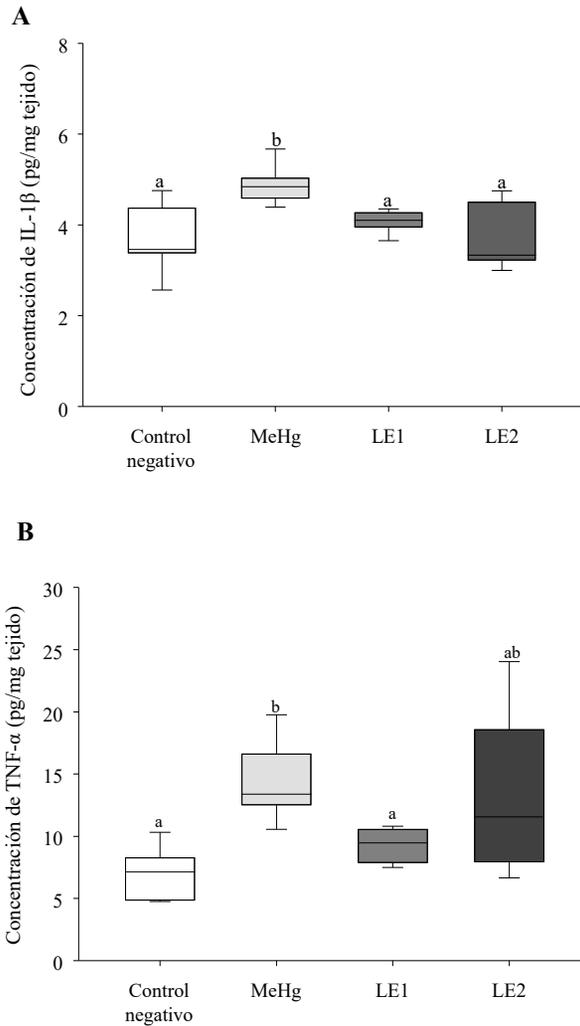


Figura 42. Contenido colónico de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β (A) y TNF- α (B). Valores correspondientes a animales no tratados (control negativo) y a ratones tratados con MeHg (5 mg/L) en presencia o ausencia de las cepas LE1 y LE2 durante 2 meses. Los valores se expresan como pg/mg tejido (media \pm SD, n = 7-8). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p < 0.05).

2. Efecto *in vivo* de las cepas de BAL sobre la respuesta pro-oxidante

El análisis de los niveles intracelulares de ROS/RNS y el contenido de GSH (Figura 43) se llevó a cabo en el intestino delgado y en el colon. Tras dos meses de exposición a MeHg (5 mg/L) no se observaron aumentos significativos en estos parámetros en el intestino delgado (datos no mostrados). Sin embargo, el tratamiento con MeHg indujo un aumento en los niveles tisulares de ROS/RNS (105%) y de GSH (17%) en el colon (Figura 43), hecho observado anteriormente en exposiciones a 4 meses (Capítulo 2). La administración de ambas cepas redujo la respuesta pro-oxidante (LE1: ROS/RNS 45%, GSH 25%; LE2: ROS/RNS 36%, GSH 34%) respecto a los animales tratados sólo con MeHg. Sin embargo, los niveles de GSH en el colon de los ratones tratados con MeHg y la cepa LE2 fueron significativamente inferiores ($p < 0.001$) a los de los animales no tratados.

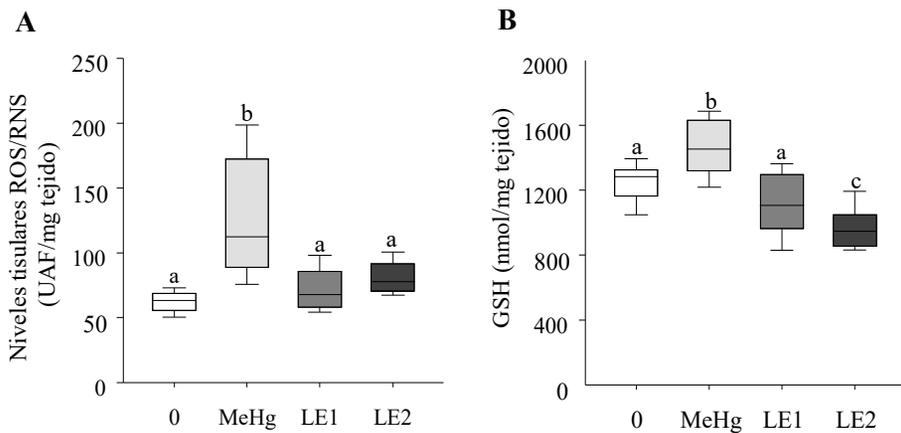


Figura 43. Niveles tisulares de ROS/RNS (A) y de GSH (B) a nivel colónico. Valores correspondientes a animales no tratados (control negativo) y a ratones tratados con MeHg (5 mg/L) en presencia o ausencia de las cepas LE1 y LE2 durante 2 meses. Los valores se expresan como la media \pm SD ($n = 7-8$). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

3. Efecto *in vivo* de las BAL sobre la estructura de la mucosa intestinal

3.1. Evaluación de las uniones intercelulares

La Tabla 18 muestra la expresión de los genes que codifican la proteína ZO-1 y OCLN. La exposición a MeHg redujo significativamente la expresión del gen *Zo1* respecto a los animales no tratados. No obstante, la expresión génica de esta proteína se restauró cuando las cepas LE1 y LE2 fueron administradas a los animales. Aunque no se observaron cambios significativos en la expresión de la *Ocln* en los animales tratados con MeHg, la administración con MeHg y la cepa LE2 redujo significativamente su expresión.

Tabla 18. Expresión génica relativa de las proteínas de las uniones intercelulares OCLN y ZO-1 a nivel colónico. Expresión relativa de los ratones expuestos a MeHg en ausencia o presencia de LE1 y LE2 respecto a los ratones no tratados. Los valores se expresan como nivel de cambio de la expresión respecto a los animales no tratados (media \pm SE, n = 7-8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales no tratados ($p < 0.05$). En color azul se muestran las regulaciones a la baja respecto al control.

Genes	MeHg	LE1	LE2
<i>Ocln</i>	1.78 \pm 0.60	1.07 \pm 0.53	0.51 \pm 0.18*
<i>Zo1</i>	0.48 \pm 0.15*	1.73 \pm 0.47	0.62 \pm 0.36

3.2. Evaluación de la capa de mucus

La exposición a MeHg indujo un incremento significativo de la expresión génica y proteica de la mucina MUC2 (Tabla 19, Figura 44), el principal constituyente de la capa de mucus, tal como fue reportado anteriormente en el Capítulo 2. Esta hiperproducción de mucina fue significativamente reducida tras la administración de la cepa LE1 ($p < 0.05$) (porcentaje de reducción de la expresión, 55%). Por el contrario, este efecto protector no fue observado en los animales tratados con la cepa LE2. De hecho, esta cepa de BAL indujo un aumento de los niveles proteicos de MUC2 a nivel colónico (Figura 44, porcentaje de incremento de la expresión proteica, 171%).

Las cepas también modificaron la expresión de los componentes de la ruta de señalización IL4/IL13/STAT6, que se había postulado como responsable de la hipersecreción atendiendo a los datos de los Capítulos 1 y 2. La administración de ambas cepas indujo una reducción significativa de la expresión de los genes *Il13* e *Il4* respecto a los animales tratados únicamente con MeHg ($p < 0.05$), mostrando niveles de expresión génica cercanos o incluso inferiores a los de los animales no tratados (Tabla 20).

Tabla 19. Expresión génica relativa de los genes involucrados en la secreción de mucina. Los valores se expresan como nivel de cambio de la expresión respecto a los animales no tratados (media \pm SE, n = 7-8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo ($p < 0.05$). En color rojo se muestran las sobreexpresiones y en color azul, las regulaciones a la baja respecto a los animales control.

Genes	MeHg	LE1	LE2
<i>Muc2</i>	3.26 \pm 1.02*	1.50 \pm 0.46	2.13 \pm 0.94*
<i>Il13</i>	3.90 \pm 1.17*	1.14 \pm 0.39	0.93 \pm 0.32
<i>Il4</i>	2.16 \pm 0.67*	0.69 \pm 0.13	0.15 \pm 0.06*

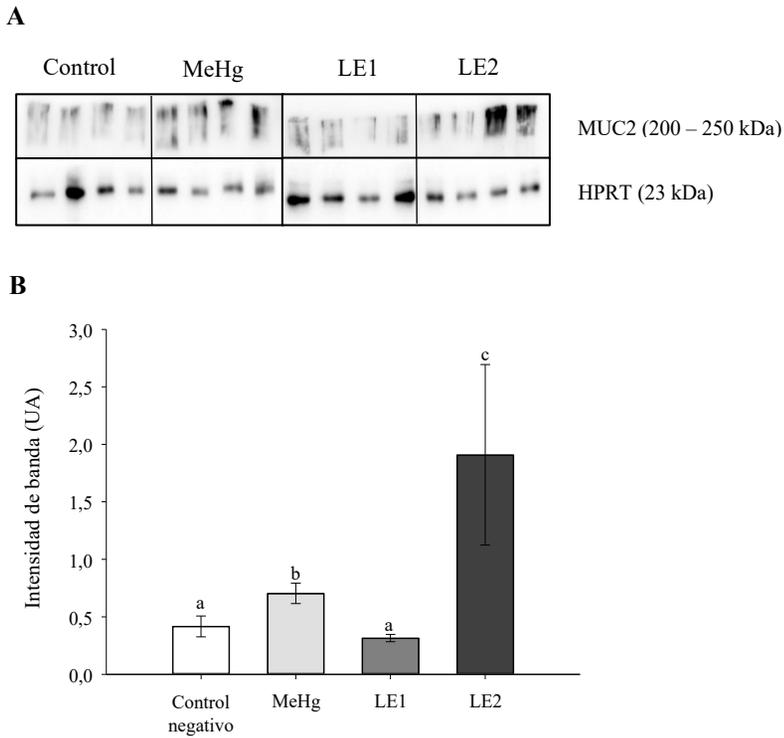


Figura 44. Efecto del tratamiento con MeHg y las cepas LE1 y LE2 en la síntesis y secreción de la capa de mucus colónica. A) Western blot empleando el anticuerpo anti-MUC2. HPRT se utilizó como control de carga para la normalización. B) Niveles de expresión relativa de la proteína MUC2 en ratones no tratados y en ratones expuestos a 5 mg/L MeHg en presencia o ausencia de las cepas LE1 y LE2. Los valores se expresan como unidades estándar de densitometría (media \pm SD, n = 3). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p < 0.05).

4. Efecto *in vivo* de las cepas de BAL sobre la permeabilidad intestinal

La Figura 45 muestra el contenido de albúmina fecal en los ratones tras dos meses de exposición a MeHg (5 mg/L) en presencia o ausencia de las cepas

LE1 y LE2. La dosificación de la cepa LE1 redujo significativamente (36%) el contenido de albúmina fecal respecto a los ratones tratados únicamente con MeHg. Además, estos valores de albúmina fueron similares a los hallados en animales no tratados (control, 268.1 ± 98.7 pg/100 mg heces; LE1, 273.5 ± 45.7 pg/mg heces). Por otro lado, la administración de la cepa LE2 no mostró cambios significativos en la permeabilidad intestinal respecto a los animales tratados únicamente con MeHg.

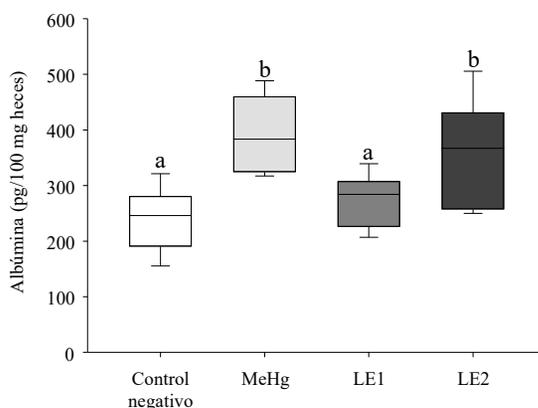


Figura 45. Efecto del tratamiento con MeHg y las cepas LE1 y LE2 sobre la albúmina fecal. Valores correspondientes a animales no tratados (control negativo) y a ratones tratados con MeHg (5 mg/L) en presencia o ausencia de las cepas LE1 y LE2 durante 2 meses. Los valores se expresan como pg/100 mg de heces (media \pm SD, n = 7-8). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

5. Evaluación de las posibles rutas de señalización implicadas en la protección frente a la toxicidad inducida por MeHg

Para determinar los posibles mecanismos involucrados en la protección ejercida por las cepas BAL contra la toxicidad del MeHg a nivel intestinal, se

Capítulo 4. Resultados

evaluó la expresión génica de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y de una subunidad de su receptor (IL10R2), y de proteínas involucradas en la ruta de señalización Nrf2/Keap1/ARE que regula la expresión de enzimas antioxidantes (Niture et al., 2014). Como se puede observar en la Tabla 20, la cepa LE2 no modificó la expresión de estos genes respecto a la observada en los animales tratados con MeHg. Sin embargo, los animales tratados con la cepa LE1 presentaron niveles de expresión superiores a los animales expuestos sólo a la forma orgánica de Hg. Estos datos sugieren que la cepa LE1 podría ejercer su efecto protector a través de la activación del factor Nrf2 y de la ruta de señalización asociada a la citoquina IL-10.

Tabla 20. Expresión génica relativa de los genes *Il10*, *Il10r2*, *Nrf2*, *Ho1* y *Nqo1* en colon. Expresión relativa de ratones tratados con MeHg en presencia de la cepa LE1 y LE2 respecto a los ratones tratados únicamente con MeHg. Los valores se expresan como nivel de cambio de la expresión respecto a los animales tratados con MeHg (mean \pm SE, n = 7-8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales tratados únicamente con MeHg ($p < 0.05$). En color rojo se muestran las sobreexpresiones respecto a los animales tratados sólo con MeHg.

	<i>Il10</i>	<i>Il10r2</i>	<i>Nrf2</i>	<i>Ho1</i>	<i>Nqo1</i>
LE1	11.37 \pm 1.96*	3.31 \pm 1.32*	2.06 \pm 0.40*	3.88 \pm 1.35*	2.04 \pm 0.50*
LE2	1.10 \pm 0.62	1.29 \pm 0.58	1.53 \pm 0.25	1.37 \pm 0.40	1.67 \pm 0.15

La reducción de la respuesta pro-inflamatoria/pro-oxidante se confirmó mediante el análisis del contenido tisular de la quinasa fosfo-p38 (Figura 46). El tratamiento con MeHg indujo un aumento en la fosforilación de esta proteína a nivel colónico con respecto a los animales no tratados. Sin embargo, los

animales administrados con la cepa LE1 y LE2 mostraron una reducción en la activación de la ruta de señalización de la p38 MAPK.

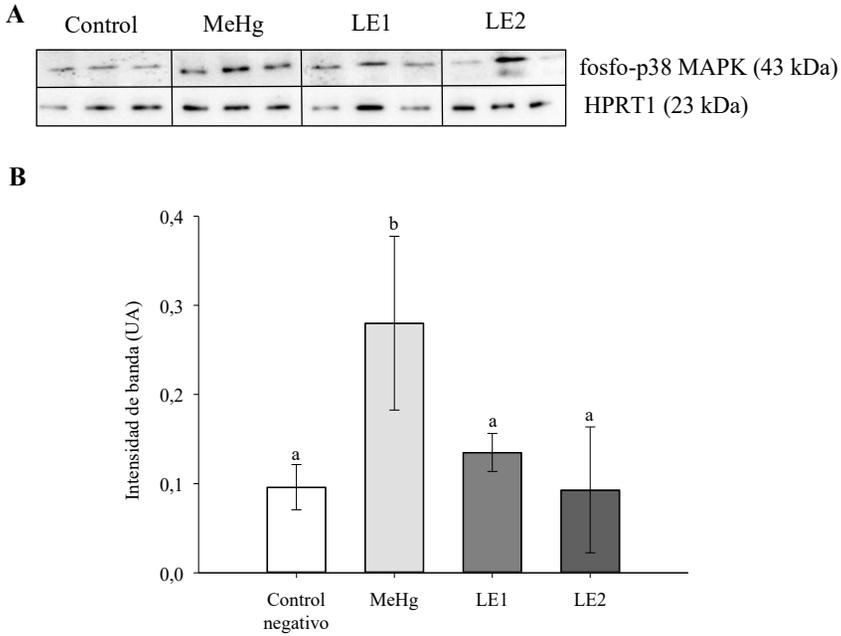


Figura 46. Efecto del tratamiento con MeHg y las cepas LE1 y LE2 sobre la activación de la quinasa p38 en tejido colónico. A) Western blot empleando el anticuerpo anti-fosfo-p38. HPRT se utilizó como control de carga para la normalización. B) Niveles de expresión relativa de la proteína fosfo-p38 en ratones no tratados y en ratones expuestos a 5 mg/L MeHg en presencia o ausencia de las cepas LE1 y LE2. Los valores se expresan como unidades estándar de densitometría (media \pm SD, n = 3). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

6. Cambios en el perfil de ácidos grasos de cadena corta en presencia de las cepas BAL

La Figura 47 muestra los niveles de SCFA de los animales no tratados (control negativo) y los expuestos a MeHg en ausencia y presencia de las cepas bacterianas. El tratamiento con MeHg redujo significativamente el contenido de los tres ácidos grasos analizados [ácido acético, 40%; ácido propiónico, 84%; ácido butírico, 47%], corroborando los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* del Capítulo 2. La administración de la cepa LE1 aumentó significativamente el contenido de los ácidos acético (151%), de ácido propiónico (166%) y de ácido butírico (35%) con respecto a los ratones tratados únicamente con MeHg (5 mg/L). Los niveles de ácido acético en los ratones expuestos a MeHg y la cepa LE1 fueron mayores incluso a los observados en ratones no tratados. La dosificación de la cepa LE2 solo aumentó significativamente el contenido de ácido propiónico (310%) respecto a los ratones tratados con MeHg. Es importante destacar que los niveles de ácido acético en los ratones administrados con la cepa LE2 fueron significativamente inferiores ($p < 0.001$) a los hallados en los animales expuestos únicamente con MeHg.

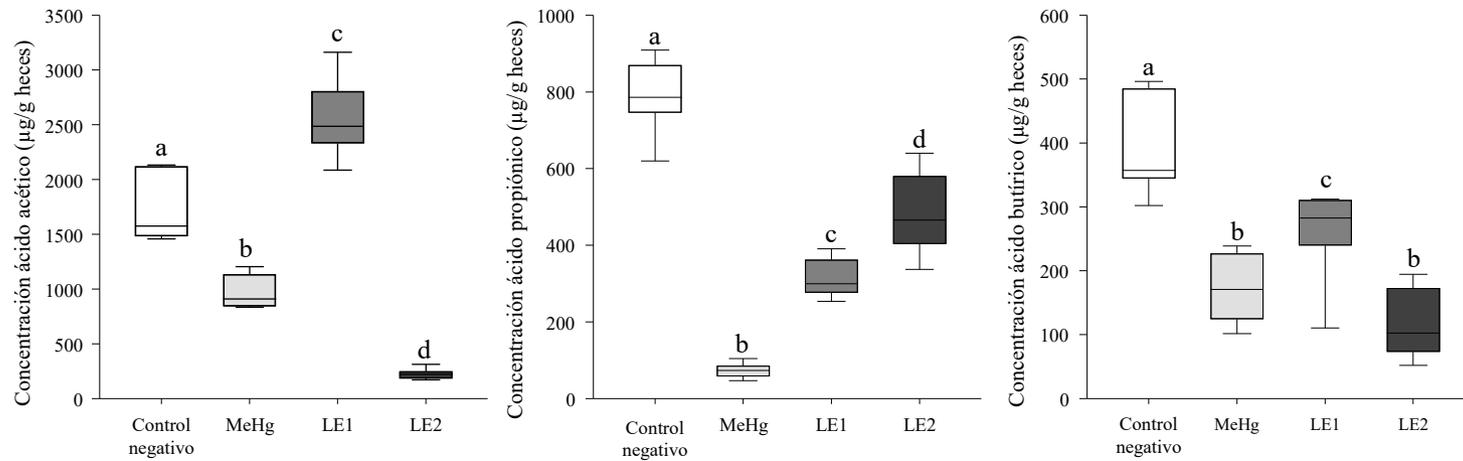


Figura 47. Efecto del tratamiento con MeHg y las cepas LE1 y LE2 sobre el contenido fecal de SCFAs. Valores correspondientes a animales no tratados (control negativo) y a ratones tratados con MeHg (5 mg/L) en presencia o ausencia de las cepas LE1 y LE2 durante 2 meses. Los valores se expresan como µg/g de heces (media ± SD, n = 7-8). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

La toxicidad intestinal causada por el MeHg, observada tanto en exposiciones orales crónicas (Capítulo 2) como subcrónicas (presente capítulo), supone una pérdida de la función barrera del intestino, que tal y como se ha indicado a lo largo de la tesis, puede llevar a la generación de una situación inflamatoria intestinal crónica o a un proceso inflamatorio sistémico. Por lo tanto, intentar paliar la toxicidad de Hg a nivel intestinal puede tener un efecto beneficioso no sólo a nivel local, sino también a nivel sistémico.

El empleo de compuestos de origen dietario o cuyo uso para el consumo humano esté permitido, como los probióticos, ha sido estudiado para reducir el carácter anti-inflamatorio y antioxidante del Hg y otros elementos traza tóxicos a nivel sistémico (Chiocchetti et al., 2019; Jadán-Piedra et al., 2018). Se han reportado reducciones en los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias y de la actividad antioxidante en el tejido testicular de ratas expuestas a HgCl₂ tras la administración de *Lactiplantibacillus plantarum* (Fadda et al., 2020) . También, se ha mostrado la reducción del estrés oxidativo a nivel sérico inducido por la exposición a Hg(II) y la acumulación de este metal tras la administración de una mezcla probiótica (una cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* y esporas de una cepa de *Bacillus subtilis*) en ratas (Majlesi et al., 2017). Igualmente, Jiang et al. (2018) mostraron el efecto protector de una cepa de *Levilactobacillus brevis* a nivel intestinal en exposiciones agudas a Hg(II) en ratones. Sin embargo, no existían, hasta el presente estudio, datos que mostraran que el uso de BAL era una estrategia de protección adecuada para exposiciones crónicas a MeHg, principal forma mercurial en la dieta.

Las cepas LE1 y LE2 seleccionadas en este estudio, se han ensayado previamente en ratones expuestos a MeHg a través del agua de bebida y de los alimentos, evidenciándose en ambos casos una importante reducción de los niveles de MeHg en los tejidos intestinales (60% en ratones administrados con

agua de bebida y 30% en animales dosificados a través de productos pesqueros, datos no publicados) (Burbano, 2022). Esto indica que la cantidad de tóxico que se internaliza en el epitelio intestinal está muy reducida, hecho esperable si tenemos en cuenta que las bacterias lácticas tienen una elevada capacidad de quelar Hg, tanto en su forma orgánica como inorgánica (Alcántara et al., 2017), incluso en condiciones de digestión gastrointestinal (Jadán-Piedra et al., 2017). Además, se ha demostrado en el capítulo 3 mediante el empleo de estas dos cepas en forma no viable, su capacidad para reducir la toxicidad intestinal *in vitro*, probablemente a través de un proceso mayoritariamente de quelación.

En el presente trabajo se ha demostrado que las cepas de *Lactobacillus* empleadas (LE1 y LE2), especialmente la LE1, son capaces de aliviar la toxicidad intestinal ejercida *in vivo* ejercida por el MeHg. A diferencia de los ensayos *in vitro* realizados en el Capítulo 3, en este estudio se emplearon bacterias lácticas vivas y, por tanto, metabólicamente activas. Así, al efecto protector debido a la captación del MeHg, hay que sumarle un posible efecto relacionado con el metabolismo bacteriano, que podría actuar a distintos niveles. En primer lugar, hay que considerar la existencia de bacterias aisladas del tracto digestivo que tienen la capacidad de demetilar el MeHg dando lugar a Hg(II), cuya tasa de reabsorción es muy baja (Li et al., 2019). Si se produce este proceso de demetilación a nivel colónico, la cantidad de Hg que se acumularía en el epitelio y que entraría en la circulación sistémica sería menor. La capacidad de demetilar MeHg en bacterias se debe a los genes de resistencia al Hg (*merB* y *merA*), tal y como se ha indicado en la Introducción (apartado 5). Sin embargo, la presencia de estas actividades en las cepas empleadas es poco probable, ya que no se ha descrito la existencia de estos genes en el género *Lactobacillus*, aunque sí se ha referido su presencia (genes *merA*) en transposones conjugativos en otros miembros del orden Lactobacillales como *Enterococcus faecalis* (Rice y Carias, 1998) y *Enterococcus faecium* (Davis et al., 2005).

Otro efecto protector de las bacterias vivas frente a la toxicidad del MeHg podría estar relacionado con los metabolitos que secretan. El presente estudio muestra como el descenso promovido por el MeHg en las concentraciones de SCFA fecales, derivados del metabolismo de la microbiota, es compensado por la administración de las cepas de lactobacilos, especialmente la cepa LE1 en cuya presencia existe un aumento importante de los SCFA respecto a los animales tratados solo con MeHg (Figura 47). Los niveles de ácido acético en los animales tratados con esta cepa son superiores incluso a los observados en los animales control. Es probable que estos cambios en los SCFA no estén asociados al propio metabolismo de las cepas de BAL (los lactobacilos suministrados son heterofermentativos facultativos, principalmente productores de ácido láctico), sino a cambios en la microbiota o en la fisiología intestinal causados por el MeHg y por la presencia de las cepas LE1 y LE2. Independientemente de cuál sea el mecanismo responsable de los cambios observados, las propiedades protectoras de los SCFA en situaciones de inflamación y estrés oxidativo han sido ampliamente descritas. Los receptores específicos de ácidos grasos de cadena corta pertenecientes a la familia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR), están presentes en las células del epitelio intestinal y en las células inmunes de la LP (Reimann et al., 2012). En la mucosa del colon, la unión del butirato al receptor GPR109A localizado en las células presentadoras de antígenos, induce un programa de expresión antiinflamatoria que, a su vez, induce la diferenciación de células T reguladoras (Treg) y células T productoras de IL-10 (Tr1) (Singh et al., 2014). Por otro lado, los ratones deficientes en el receptor GPR43 presentan una inflamación exacerbada en situaciones de colitis inducida por sulfato de dextrano (Maslowski et al., 2009). Por lo tanto, el aumento de los SCFA, evidenciado especialmente tras el tratamiento con la cepa LE1, podría ser una de las causas de la menor toxicidad del MeHg observada a nivel colónico. Por el contrario, la cepa LE2 que exhibe una menor protección comparada con LE1, no restaura

los niveles de SFCA, incluso reduce de forma muy marcada la concentración de ácido acético en el lumen, por debajo de los niveles observados en los animales tratados con MeHg.

En el presente estudio se ha evidenciado un incremento en la expresión génica de la citoquina IL-10 y de una de las subunidades de su receptor (IL10R2) en los animales tratados con la cepa LE1 (Tabla 20). Una mayor producción de IL-10 supone la supresión de la secreción de numerosas citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas el TNF- α e IL-1 β (M. Tomoyose, 1998). La citoquina IL-10 activa una ruta de señalización que conlleva la fosforilación del factor de transcripción STAT3, que a su vez, induce la expresión del supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS-3) y el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RN) (Schülke, 2018). SOCS-3 inhibe la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP quinasa), la translocación del factor NF- κ B al núcleo y la subsiguiente inducción de la expresión de genes pro-inflamatorios (Berti et al., 2017), mientras que la proteína IL-1RN suprime la señalización pro-inflamatoria iniciada por la unión de IL-1 β a su receptor. En el presente estudio se observan parte de estos efectos, ya que los niveles tisulares de las citoquinas están reducidos (Figura 42) y hay una menor activación de la ruta p38 MAPK (Figura 46). Por otro lado, la unión de la citoquina IL-10 a su receptor también conlleva la inhibición de la ruta IL-4/IL-13/STAT6 (Schülke, 2018). Nuestros datos de expresión génica de estas dos citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13) y de *Muc2* (Tabla 19), inducida por la ruta, junto con los datos de expresión proteica de MUC2 (Figura 44) y los estudios previos (Capítulo 2), apuntan a que esta ruta está aumentada por el tratamiento a MeHg y, que LE1 es capaz de revertir esta activación.

La mayor producción de IL-10 observada tras la administración de LE1 podría tener su origen en la activación de la ruta de señalización Nrf2, ya que se ha descrito que algunos probióticos son capaces de contrarrestar el estrés

oxidativo regulando los niveles del factor Nrf2 (Aboulgheit et al., 2021; Kobatake et al., 2017). El factor de transcripción Nrf2 y su principal regulador negativo, el adaptador Keap1, desempeñan un papel central en el mantenimiento de la homeostasis redox y la regulación de la inflamación. Se ha visto que los SCFA pueden favorecer la acumulación nuclear de Nrf2 y ejercer su actividad antioxidante a través de la activación de esta ruta (González-Bosch et al., 2021). En el presente estudio se observa en los tejidos de los animales tratados con la cepa LE1, un aumento de la expresión génica de este factor y de las proteínas HO-1 (Hemo-oxigenasa 1) y NQO1 [NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1]. La expresión de HO-1 y NQO1 está regulada por el factor Nrf2 como respuesta a distintos tipos de estímulos (Schülke, 2018). Varios estudios han demostrado que HO-1 tienen efectos antiinflamatorios significativos. La elevación de la expresión de HO-1 conduce a la inhibición de la señalización de NF- κ B y a un aumento de la producción de IL-10 (Ahmed et al., 2017). Del mismo modo, el papel de NQO-1 en el mantenimiento del balance redox ha sido previamente evaluado en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Ross y Siegel, 2021).

Además de los SCFA, hay otros metabolitos que no se han analizado en el presente estudio, que también pueden ser importantes por su carácter antioxidante y/o antiinflamatorio en la protección frente al MeHg. Este es el caso de los indoles procedentes del metabolismo del triptófano. Al igual que los SCFA, estos derivados pueden inducir la producción de IL-10 (Paeslack et al., 2022). Del mismo modo, hay componentes de la pared celular de las BAL que también han mostrado actividad antioxidante y anti-inflamatoria, como los exopolisacáridos y las proteínas de superficie (Cai et al., 2018; Li et al., 2021).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este capítulo muestran que la cepa de *L. intestinalis* LE1 tiene un importante papel protector frente a la toxicidad intestinal de MeHg. Esta protección se produce posiblemente a través de varios mecanismos. Su capacidad de secuestrar el metal y reducir la acumulación colónica de Hg posiblemente es uno de ellos, pero puede que no sea el más relevante, ya que la cepa LE2 produce una reducción similar de los contenidos tisulares y, sin embargo, ofrece una menor reducción de los parámetros toxicológicos. Por otro lado, los datos muestran que sólo la cepa LE1 activa rutas de señalización antioxidantes y anti-inflamatorias, hecho que sí pudiera explicar esta protección diferencial.

La dosificación diaria de esta cepa de *Lactobacillus* supone la reducción de los daños generados en el epitelio por la exposición subcrónica a MeHg. Es destacable la reducción de la hipersecreción de mucus y el aumento de la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares, pilares fundamentales para el adecuado funcionamiento de la mucosa. Esto se traduce en una recuperación de la función barrera, tan importante para el mantenimiento de la homeostasis intestinal y sistémica. Son necesarios más estudios que muestren si esta protección se extiende más allá del entorno intestinal y si se consigue reducir los efectos observados en otros órganos tras una exposición continuada a MeHg.

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en la presente tesis han dado lugar a las siguientes conclusiones.

- ✓ La exposición subcrónica a concentraciones de Hg(II) y MeHg que normalmente encontramos en alimentos induce, tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo*, un estado pro-inflamatorio y pro-oxidante crónico que en última instancia produce la disrupción de la función barrera del epitelio intestinal y de la regeneración celular.
- ✓ Los procesos pro-inflamatorios y pro-oxidantes observados podrían deberse a la activación de las rutas de señalización p-38 MAPK, JNK y NF- κ B.
- ✓ La exposición subcrónica a Hg(II) y MeHg no induce cambios relevantes sobre la composición de la microbiota intestinal bajo las condiciones experimentales ensayadas, aunque el metabolismo microbiano podría verse comprometido.
- ✓ La administración de las cepas de *Lactobacillus* LE1 y LE2 tiene un efecto protector frente al daño ocasionado por la exposición subcrónica a ambas especies Hg, tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*.
- ✓ La cepa LE1 ha demostrado tener un mayor efecto protector, tanto en el modelo *in vitro* como *in vivo*. Este resultado indica la necesidad de determinar diferentes criterios de cribado entre cepas.
- ✓ El modelo *in vitro* Caco-2/HT29-MTX/THP-1 desarrollado en este trabajo es un modelo eficaz para analizar la respuesta a una exposición prolongada a Hg y constituye una buena base para realizar cribados de posibles cepas de microorganismos probióticos.

Referencias bibliográficas

- Abbott, L.C., Nigussie, F., 2021. Mercury toxicity and neurogenesis in the mammalian brain. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7520.
- Abdullah, N., 2020. Mercury in the diet, absorption and bioaccessibility. *Open Access Library Journal* 7, 1-15.
- Aboulgheit, A., Karbasiafshar, C., Zhang, Z., Sabra, M., Shi, G., Tucker, A., Sodha, N., Abid, M.R., Sellke, F.W., 2021. *Lactobacillus plantarum* probiotic induces Nrf2-mediated antioxidant signaling and eNOS expression resulting in improvement of myocardial diastolic function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 321, H839-H849.
- AESAN, 2019. Recomendaciones de consumo de pescado.
- Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X., 2017. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863, 585-597.
- Ajsuvakova, O.P., Tinkov, A.A., Aschner, M., Rocha, J.B.T., Michalke, B., Skalnaya, M.G., Skalny, A.V., Butnariu, M., Dadar, M., Sarac, I., Aaseth, J., Björklund, G., 2020. Sulfhydryl groups as targets of mercury toxicity. *Coordination Chemistry Reviews* 417, 213343.
- Åkerfelt, M., Morimoto, R.I., Sistonen, L., 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 545-555.
- Al-Ghadban, S., Kaissi, S., Homaidan, F.R., Naim, H.Y., El-Sabban, M.E., 2016. Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease. *Scientific Reports* 6, 29783.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., Ma, T., 2011. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 300, G1054-1064.
- Al-Sadi, R., Youssef, M., Rawat, M., Guo, S., Dokladny, K., Haque, M., Watterson, M.D., Ma, T.Y., 2019. MMP-9-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by p38 kinase signaling pathway activation of MLCK gene. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 316, G278-G290.
- Alard, J.E., Dueymes, M., Mageed, R.A., Saraux, A., Youinou, P., Jamin, C., 2009. Mitochondrial heat shock protein (HSP) 70 synergizes with HSP60 in transducing endothelial cell apoptosis induced by anti-HSP60 autoantibody. *Faseb j* 23, 2772-2779.
- Alcántara, C., Crespo, A., Solís, C.L.S., Devesa, V., Vélez, D., Monedero, V., Zúñiga, M., 2020. Lipoteichoic acid depletion in *Lactobacillus* impacts cell morphology and stress response but does not abolish mercury surface binding. *Beneficial Microbes* 11, 791-802.
- Alcántara, C., Jadán-Piedra, C., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga, M., Monedero, V., 2017. Characterization of the binding capacity of mercurial species in *Lactobacillus* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 5107-5113.
- Allaire, J.M., Crowley, S.M., Law, H.T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., Vallance, B.A., 2018. The intestinal epithelium: Central coordinator of mucosal immunity. *Trends in Immunology* 39, 677-696.
- Alshahrani, A., Bin Khunayfir, A., Al Rayih, M., Al Sayed, H., Alsadoon, A., Al Dubayee, M., Zahra, M., Alrumayyan, Y., Al Zayer, M., Nasr, A., Aljada, A., 2017. Phenotypic characterization of human monocytes following macronutrient intake in healthy humans. *Frontiers in Immunology* 8.
- Anderson, J.M., Van Itallie, C.M., 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002584.
- Andres, P., 1984. IgA-IgG disease in the intestine of Brown-Norway rats ingesting

Referencias bibliográficas

mercuric chloride. *Clinical Immunology and Immunopathology* 30, 488-494.

Asbjørnsdóttir, B., Snorraddóttir, H., Andressdóttir, E., Fasano, A., Lauth, B., Gudmundsson, L.S., Gottfredsson, M., Halldorsson, T.I., Birgisdóttir, B.E., 2020. Zonulin-dependent intestinal permeability in children diagnosed with mental disorders: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 12, 1982.

Astolfi, M.L., Protano, C., Schiavi, E., Marconi, E., Capobianco, D., Massimi, L., Ristorini, M., Baldassarre, M.E., Laforgia, N., Vitali, M., Canepari, S., Mastromarino, P., 2019. A prophylactic multi-strain probiotic treatment to reduce the absorption of toxic elements: In-vitro study and biomonitoring of breast milk and infant stools. *Environment International* 130, 104818.

Bain, C.C., Mowat, A.M., 2014. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews* 260, 102-117.

Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W.W., Mowat, A.M., 2013. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunology* 6, 498-510.

Bamford, K.B., 1999. Chronic gastrointestinal inflammation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 24, 161-168.

Barbosa, P., Reis Barbosa, E., 2020. The gut brain-axis in neurological diseases. *International Journal of Cardiovascular Sciences* 33.

Basson, M.D., Turowski, G., Emenaker, N.J., 1996. Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Experimental Cell Research* 225, 301-305.

Begam, M., Sengupta, M., 2015. Immunomodulation of intestinal

macrophages by mercury involves oxidative damage and rise of pro-inflammatory cytokine release in the fresh water fish *Channa punctatus* Bloch. *Fish & Shellfish Immunology* 45, 378-385.

Bernhoft, R.A., 2012. Mercury toxicity and treatment: A review of the literature. *Journal of Environmental and Public Health* 2012, 460508.

Berti, F.C.B., Pereira, A.P.L., Cebinelli, G.C.M., Trugilo, K.P., Brajão de Oliveira, K., 2017. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 34, 1-13.

Bisanz, J.E., Enos, M.K., Mwanga, J.R., Changalucha, J., Burton, J.P., Gloor, G.B., Reid, G., 2014. Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in tanzanian pregnant women and school children. *mBio* 5, e01580-01514.

Bjørklund, G., Crisponi, G., Nurchi, V.M., Cappai, R., Buha Djordjevic, A., Aaseth, J., 2019. A review on coordination properties of thiol-containing chelating agents towards mercury, cadmium, and lead. *Molecules* 24, 3247.

Bjørklund, G., Dadar, M., Mutter, J., Aaseth, J., 2017. The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. *Environmental Research* 159, 545-554.

BOE, 2013. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia., *Boletín Oficial del Estado*.

Boyapati, R.K., Rossi, A.G., Satsangi, J., Ho, G.T., 2016. Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications. *Mucosal Immunology* 9, 567-582.

Bradley, M.A., Barst, B.D., Basu, N., 2017. A review of mercury bioavailability in

- humans and fish. *Int J Environ Res Public Health* 14, 169.
- Branco, V., Godinho-Santos, A., Goncalves, J., Lu, J., Holmgren, A., Carvalho, C., 2014. Mitochondrial thioredoxin system as a primary target for mercury compounds. *Toxicology Letters* 229.
- Bravo, A.G., Cosio, C., 2020. Biotic formation of methylmercury: A biophysico-chemical conundrum. *Limnology and Oceanography* 65, 1010-1027.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2010. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 13, 385-410.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K., 2017. The aging kidney and the nephrotoxic effects of mercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 20, 55-80.
- Browning, T.H., Trier, J.S., 1969. Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. *J Clin Invest* 48, 1423-1432.
- Burbano, L.R.-V., Pilar; Domene, Adrián; Zúñiga, Manuel; Monedero, Vicente, 2022. Bacterias lácticas, una estrategia dietaria para reducir la exposición a mercurio, VI Convención Científica Internacional, Universidad Técnica de Manabí.
- Burke, K., Cheng, Y., Li, B., Petrov, A., Joshi, P., Berman, R.F., Reuhl, K.R., DiCicco-Bloom, E., 2006. Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. *NeuroToxicology* 27, 970-981.
- Buzina, R., Stegnar, P., Buzina-Suboticanec, K., Horvat, M., Petric, I., Farley, T.M.M., 1995. Dietary mercury intake and human exposure in an Adriatic population. *Science of The Total Environment* 170, 199-208.
- Caballero, B., 2005. *Encyclopedia of human nutrition*. Elsevier.
- Cai, Z., Xu, P., Wu, Z., Pan, D., 2018. Anti-inflammatory activity of surface layer protein SlpA of *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074 in LPS-induced RAW 264.7 cells and DSS-induced mice colitis. *Journal of Functional Foods* 51, 16-27.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581-583.
- Camara-Lemarrroy, C.R., Silva, C., Greenfield, J., Liu, W.-Q., Metz, L.M., Yong, V.W., 2020. Biomarkers of intestinal barrier function in multiple sclerosis are associated with disease activity. *Multiple Sclerosis Journal* 26, 1340-1350.
- Cario, E., Rosenberg, I.M., Brandwein, S.L., Beck, P.L., Reinecker, H.C., Podolsky, D.K., 2000. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 164, 966-972.
- Castro-Herrera, V.M., Rasmussen, C., Wellejus, A., Miles, E.A., Calder, P.C., 2020. In Vitro Effects of Live and Heat-Inactivated *Bifidobacterium animalis* Subsp. *Lactis*, BB-12 and *Lactobacillus rhamnosus* GG on Caco-2 Cells. *Nutrients* 12, 1719.
- Chan, M.C., Bautista, E., Alvarado-Cruz, I., Quintanilla-Vega, B., Segovia, J., 2017. Inorganic mercury prevents the differentiation of SH-SY5Y cells: Amyloid precursor protein, microtubule associated proteins and ROS as potential targets. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 41, 119-128.
- Chelakkot, C., Ghim, J., Ryu, S.H., 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine* 50, 1-9.
- Chen, D., Wei, X.-t., Guan, J.-h., Yuan, J.-w., Peng, Y.-t., Song, L., Liu, Y.-h., 2012. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase prevents blood-brain barrier disruption and normalizes the expression of tight junction proteins claudin-5 and ZO-1 in a rat model

Referencias bibliográficas

- of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochirurgica* 154, 1469-1476.
- Chen, P., Chen, F., Zhou, B.H., 2019. Leonurine ameliorates D-galactose-induced aging in mice through activation of the Nrf2 signalling pathway. *Aging (Albany NY)* 11, 7339-7356.
- Chen, W.j., Body, R.L., Mottet, N.K., 1983. Biochemical and morphological studies of monkeys chronically exposed to methylmercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 12, 407-416.
- Chiocchetti, G.M., Jadán-Piedra, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V., 2019. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59, 1534-1545.
- Cieslik, K., Trial, J., Entman, M., 2015. Mesenchymal stem cell-derived inflammatory fibroblasts promote monocyte transition into myeloid fibroblasts via an IL-6-dependent mechanism in the aging mouse heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29.
- Clark, J.A., Coopersmith, C.M., 2007. **INTESTINAL CROSSTALK: A NEW PARADIGM FOR UNDERSTANDING THE GUT AS THE "MOTOR" OF CRITICAL ILLNESS.** *Shock* 28.
- Clifton, J.C., 2007. Mercury exposure and public health. *Pediatric Clinics of North America* 54, 237.e231-237.e245.
- Collins, F.L., Rios-Arce, N.D., Atkinson, S., Bierhalter, H., Schoenherr, D., Bazil, J.N., McCabe, L.R., Parameswaran, N., 2017. Temporal and regional intestinal changes in permeability, tight junction, and cytokine gene expression following ovariectomy-induced estrogen deficiency. *Physiological Reports* 5, e13263.
- Cornick, S., Tawiah, A., Chadee, K., 2015. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* 3, 00-00.
- David, J., Muniroh, M., Nandakumar, A., Tsuji, M., Koriyama, C., Yamamoto, M., 2020. Inorganic mercury-induced MIP-2 expression is suppressed by N-acetyl-L-cysteine in RAW264.7 macrophages. *Biomedical Reports* 12.
- Davidson, P., Myers, G., Weiss, B., 2004. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics* 113, 1023-1029.
- Davis, I.J., Roberts, A.P., Ready, D., Richards, H., Wilson, M., Mullany, P., 2005. Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. *Plasmid* 54, 26-38.
- Davis, N.M., Proctor, D.M., Holmes, S.P., Relman, D.A., Callahan, B.J., 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *bioRxiv*, 221499.
- De Angelis, M., Gobbetti, M., 2016. *Lactobacillus* SPP.: General characteristics, Reference Module in Food Science. Elsevier.
- de Lau, L.M.L., de Vries, J.M., van der Woude, J.C., Kuipers, E.J., Siepman, D.A.M., Sillevius Smitt, P.A.E., Hintzen, R.Q., 2008. Acute CNS white matter lesions in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 15, 576-580.
- de Santa Barbara, P., Brink, G., Roberts, D., 2003. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 1322-1332.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* 54, 2325-2340.
- Desreumaux, P., Ernst, O., Geboes, K., Gambiez, L., Berrebi, D., Müller-Alouf, H., Hafraoui, S., Emilie, D., Ectors, N., Peuchmaur, M., Cortot, A., Capron, M.,

- Auwerx, J., Colombel, J.-F., 1999. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology* 117, 73-81.
- Dickman, K., Hempson, S., Anderson, J., Lippe, S., Zhao, L., Burakoff, R., Shaw, R., 2000. Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 279, G757-766.
- Dickson, B.C., Streutker, C.J., Chetty, R., 2006. Coeliac disease: an update for pathologists. *Journal of Clinical Pathology* 59, 1008.
- Dixon, P., 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 14, 927-930.
- Doi, R., Tagawa, M., 1983. A study on the biochemical and biological behavior of methylmercury. *Toxicology and applied pharmacology* 69, 407-416.
- Dosh, R., Jordan-Mahy, N., Sammon, C., Le Maitre, C., 2017. Tissue engineering laboratory models of the small intestine. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 24.
- Driscoll, C.T., Mason, R.P., Chan, H.M., Jacob, D.J., Pirrone, N., 2013. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environmental Science & Technology* 47, 4967-4983.
- EFSA, 2012. Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal* 10, 2985.
- Elphick, D.A., Mahida, Y.R., 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 54, 1802-1809.
- EPA, 1997. Characterization of human health and wildlife risks from mercury exposure in the United States.
- EPA, 2022. Mercury in consumer products, United States Environmental Protection Agency
- Erridge, C., Attina, T., Spickett, C., Webb, D., 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: Evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American journal of clinical nutrition* 86, 1286-1292.
- Fadda, L.M., Alhusaini, A.M., Al-Qahtani, Q.H., Ali, H.M., Hasan, I.H., 2020. Role of α -tocopherol and *Lactobacillus plantarum* in the alleviation of mercuric chloride-induced testicular atrophy in rat's model: Implication of molecular mechanisms. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 34, e22481.
- Fagan, C., Dapson, R., Horobin, R., Kiernan, J., 2020. Revised tests and standards for Biological Stain Commission certification of alcian blue dyes. *Biotechnic & Histochemistry* 95, 1-8.
- Farina, M., Aschner, M., 2019. Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1863, 129285.
- Finley, M.L.D., Kidd, K.A., Curry, R.A., Lescord, G.L., Clayden, M.G., O'Driscoll, N.J., 2016. A Comparison of mercury biomagnification through lacustrine food webs supporting brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and other salmonid fishes. *Frontiers in Environmental Science* 4.
- Forsyth, D., Casey, V., Dabeka, R., McKenzie, A., 2004. Methylmercury levels in predatory fish species marketed in Canada. *Food additives and contaminants* 21, 849-856.
- Freire, C., Ramos, R., Lopez-Espinosa, M.-J., Díez, S., Vioque, J., Ballester, F., Fernández, M.-F., 2010. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environmental Research* 110, 96-104.
- Fu, Y., Lin, Q., Zhang, Z., Zhang, L., 2020. Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 10, 414-433.

Referencias bibliográficas

- Gao, Z., Wu, N., Du, X., Li, H., Mei, X., Song, Y., 2022. Toxic nephropathy secondary to chronic mercury poisoning: clinical characteristics and outcomes. *Kidney International Reports* 7, 1189-1197.
- Garrett, W.S., Gordon, J.I., Glimcher, L.H., 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140, 859-870.
- Gassler, N., 2017. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 8, 150-160.
- Ghanim, H., Abuaysheh, S., Sia, C., Korzeniewski, K., Chaudhuri, A., Fernandez-Real, J., Dandona, P., 2009. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-Like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal. *Diabetes care* 32, 2281-2287.
- Ghosh, S., Whitley, C.S., Haribabu, B., Jala, V.R., 2021. Regulation of intestinal barrier function by microbial metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 11, 1463-1482.
- Gilmour, C., Henry, E., Mitchell, R., 1992. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environmental Science & Technology - ENVIRON SCI TECHNOL* 26.
- González-Bosch, C., Boorman, E., Zunszain, P.A., Mann, G.E., 2021. Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease. *Redox Biology* 47, 102165.
- Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F., Debes, F., Araki, S., Yokoyama, K., Murata, K., SØRensen, N., Dahl, R., JØRgensen, P.J., 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology* 19, 417-428.
- Gribble, F.M., Reimann, F., 2019. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nature Reviews Endocrinology* 15, 226-237.
- Grondin, J., Kwon, Y., Mehraban Far, P., Haq, S., Khan, W., 2020. Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. *Frontiers in Immunology* 11, 2054.
- Guo, Q., Wu, Y., Hou, Y., Liu, Y., Liu, T., Zhang, H., Fan, C., Guan, H., Li, Y., Shan, Z., Teng, W., 2018. Cytokine secretion and pyroptosis of thyroid follicular cells mediated by enhanced NLRP3, NLRP1, NLRC4, and AIM2 inflammasomes are associated with autoimmune thyroiditis. *Frontiers in Immunology* 9.
- Hacon, S.D., Oliveira-da-Costa, M., Gama, C.D., Ferreira, R., Basta, P.C., Schramm, A., Yokota, D., 2020. Mercury exposure through fish consumption in traditional communities in the Brazilian Northern Amazon. *Int J Environ Res Public Health* 17.
- Han, X., Ding, S., Jiang, H., Liu, G., 2021. Roles of Macrophages in the Development and Treatment of Gut Inflammation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9.
- Harding, G., Dalziel, J., Vass, P., 2018. Bioaccumulation of methylmercury within the marine food web of the outer Bay of Fundy, Gulf of Maine. *PLOS ONE* 13, e0197220.
- Haswell, L.E., Smart, D., Jaunky, T., Baxter, A., Santopietro, S., Meredith, S., Camacho, O.M., Breheny, D., Thorne, D., Gaca, M.D., 2021. The development of an in vitro 3D model of goblet cell hyperplasia using MUC5AC expression and repeated whole aerosol exposures. *Toxicology Letters* 347, 45-57.
- Health, C.s.M.o., 2012. GB 2762-2012. National Food Safety Standard. Maximum Levels of Contaminants in Food.
- Herath, M., Hosie, S., Bornstein, J.C., Franks, A.E., Hill-Yardin, E.L., 2020. The role of the gastrointestinal mucus system in intestinal homeostasis: Implications for

- neurological disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10.
- Hilgers, A.R., Conradi, R.A., Burton, P.S., 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research* 7, 902-910.
- Hintelmann, H., Harris, R., Heyes, A., Hurley, J.P., Kelly, C.A., Krabbenhoft, D.P., Lindberg, S., Rudd, J.W.M., Scott, K.J., St.Louis, V.L., 2002. Reactivity and mobility of new and old mercury deposition in a boreal forest ecosystem during the first year of the METAALICUS study. *Environmental Science & Technology* 36, 5034-5040.
- Hoebler, C., Gaudier, E., De Coppet, P., Rival, M., Cherbut, C., 2006. MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Dig Dis Sci* 51, 381-389.
- Holst, O., Müller-Loennies, S., 2007. 1.04 - Microbial Polysaccharide Structures, in: H. Kamerling (Ed.), *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier, Oxford, pp. 123-179.
- Horgan, G., Dempfle, L., 2002. Relative Expression Software Tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30, e36.
- Houser, M.C., Tansey, M.G., 2017. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *npj Parkinson's Disease* 3, 3.
- Hu, X., Yu, Q., Hou, K., Ding, X., Chen, Y., Xie, J., Nie, S., Xie, M., 2020. Regulatory effects of Ganoderma atrum polysaccharides on LPS-induced inflammatory macrophages model and intestinal-like Caco-2/macrophages co-culture inflammation model. *Food and Chemical Toxicology* 140, 111321.
- IARC, 1993. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry.
- Iizuka, M., Konno, S., 2011. Wound healing of intestinal epithelial cells. *World journal of gastroenterology: WJG* 17, 2161.
- Imam, T., Park, S., Kaplan, M.H., Olson, M.R., 2018. Effector T Helper cell subsets in inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology* 9.
- Jackson, A.C., 2018. Chronic neurological disease due to methylmercury poisoning. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques* 45, 620-623.
- Jadán-Piedra, C., 2017. Estrategias dietéticas para disminuir la biodisponibilidad de mercurio desde alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Jadán-Piedra, C., Alcántara, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., Devesa, V., 2017. The use of lactic acid bacteria to reduce mercury bioaccessibility. *Food Chemistry* 228, 158-166.
- Jadán-Piedra, C., Chiocchetti, G.M., Clemente, M.J., Vélez, D., Devesa, V., 2018. Dietary compounds as modulators of metals and metalloids toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58, 2055-2067.
- Jadán-Piedra, C., Crespo, Á., Monedero, V., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga, M., 2019. Effect of lactic acid bacteria on mercury toxicokinetics. *Food and Chemical Toxicology* 128, 147-153.
- JECFA, 2006. Sixty-first meeting.
- Jiang, X., Gu, S., Liu, D., Zhao, L., Xia, S., He, X., Chen, H., Ge, J., 2018. *Lactobacillus brevis* 23017 Relieves Mercury Toxicity in the Colon by Modulation of Oxidative Stress and Inflammation Through the Interplay of MAPK and NF-κB Signaling Cascades. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., Hansson, G.C., 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a

Referencias bibliográficas

- legislator of host–microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4659-4665.
- Kaarteenaho, R., Merikallio, H., Lehtonen, S., Harju, T., Soini, Y., 2010. Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung. *Respir Res* 11, 59.
- Kalač, P., Svoboda, L.r., 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry* 69, 273-281.
- Kang, C.-H., Kim, J.-S., Kim, H., Park, H.M., Paek, N.-S., 2021. Heat-Killed Lactic Acid Bacteria Inhibit Nitric Oxide Production via Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 Cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 13, 1530-1538.
- Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, S., Tsukita, S., 2008. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell* 19, 2465-2475.
- Kaur, L., Gordon, M., Baines, P.A., Iheozor-Ejiofor, Z., Sinopoulou, V., Akobeng, A.K., 2020. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Kayama, H., Takeda, K., 2012. Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. *International Immunology* 24, 673-680.
- Kim, Y.S., Ho, S.B., 2010. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports* 12, 319-330.
- Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., Saito, T., Kimura, K., 2013. Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology* 164, 701-709.
- Kitamura, H., Cho, M., Lee, B.H., Gum, J.R., Siddiki, B.B., Ho, S.B., Toribara, N.W., Lesuffleur, T., Zweibaum, A., Kitamura, Y., Yonezawa, S., Kim, Y.S., 1996. Alteration in mucin gene expression and biological properties of HT29 colon cancer cell subpopulations. *European Journal of Cancer* 32, 1788-1796.
- Kjellström, T., Kennedy, P., Wallis, S., Stewart, A., Friberg, L., Lind, B., Wutherspoon, T., Mantell, C., 1989. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2: Interviews and psychological tests at age 6.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2012. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41, e1-e1.
- Kobatake, E., Nakagawa, H., Seki, T., Miyazaki, T., 2017. Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasser* SBT2055 against oxidative stress. *PLOS ONE* 12, e0177106.
- Kordulewska, N., Topa, J., Tanska, M., Cieślińska, A., Fiedorowicz, E., Savelkoul, H., Jarmołowska, B., 2020. Modulatory effects of othole on lpolopolysaccharides-induced inflammation in Caco-2 cell monolayer and co-cultures with THP-1 and THP-1 derived macrophages. *Nutrients* 13, 123.
- Lambert, P.A., Hancock, I.C., Baddiley, J., 1975. The interaction of magnesium ions with teichoic acid. *Biochemical Journal* 149, 519-524.
- Lechuga, S., Ivanov, A.I., 2017. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 1183-1194.
- Lee, B., Moon, K.M., Kim, C.Y., 2018. Tight junction in the intestinal epithelium: its association with diseases and regulation

- by phytochemicals. *Journal of immunology research* 2018.
- Lee, M.-R., Shim, D., Yoon, J., Jang, H.S., Oh, S.-W., Suh, S.H., Choi, J.-H., Oh, G.T., 2014. Retnla overexpression attenuates allergic inflammation of the airway. *PLOS ONE* 9, e112666.
- Li, H., Lin, X., Zhao, J., Cui, L., Wang, L., Gao, Y., Li, B., Chen, C., Li, Y.-F., 2019. Intestinal methylation and demethylation of mercury. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102, 597-604.
- Li, J., Li, Q., Gao, N., Wang, Z., Li, F., Li, J., Shan, A., 2021. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* GG alleviate hydrogen peroxide-induced intestinal oxidative damage and apoptosis through the Keap1/Nrf2 and Bax/Bcl-2 pathways in vitro. *Food & Function* 12, 9632-9641.
- Li, P., Chang, M., 2021. Roles of PRR-Mediated Signaling Pathways in the Regulation of Oxidative Stress and Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7688.
- Lichtenstein, L., Avni-Biron, I., Ben-Bassat, O., 2016. Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 30, 81-88.
- Lin, C.-J., Pehkonen, S.O., 1999. The chemistry of atmospheric mercury: a review. *Atmospheric Environment* 33, 2067-2079.
- Lin, H., Peddada, S.D., 2020. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications* 11, 3514.
- Lin, X., Zhang, W., He, L., Xie, H., Feng, B., Zhu, H., Zhao, J., Cui, L., Li, B., Li, Y.-F., 2021. Understanding the hepatotoxicity of inorganic mercury through guts: Perturbance to gut microbiota, alteration of gut-liver axis related metabolites and damage to gut integrity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 225, 112791.
- Lin, X., Zhao, J., Zhang, W., He, L., Wang, L., Chang, D., Cui, L., Gao, Y., Li, B., Chen, C., Li, Y.-F., 2020. Acute oral methylmercury exposure perturbs the gut microbiome and alters gut-brain axis related metabolites in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190, 110130.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C., 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2, 17023.
- Locati, M., Deuschle, U., Massardi, M.L., Martinez, F.O., Sironi, M., Sozzani, S., Bartfai, T., Mantovani, A., 2002. Analysis of the gene expression profile activated by the CC chemokine ligand 5/RANTES and by lipopolysaccharide in human monocytes. *J Immunol* 168, 3557-3562.
- Lönnerdal, B., Iyer, S., 1995. Lactoferrin: Molecular Structure and Biological Function. *Annual Review of Nutrition* 15, 93-110.
- Lueschow, S.R., McElroy, S.J., 2020. The paneth cell: The curator and defender of the immature small intestine. *Frontiers in Immunology* 11.
- Luissint, A.-C., Parkos, C., Nusrat, A., 2016. Inflammation and the intestinal barrier: Leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair. *Gastroenterology* 151.
- M. Tomoyose, K.M.H.I.A.T.K.T., 1998. Role of Interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 33, 435-440.
- Mahapatro, M., Erkert, L., Becker, C., 2021. Cytokine-mediated crosstalk between immune cells and epithelial cells in the gut. *Cells* 10, 111.
- Majlesi, M., Shekarforoush, S.S., Ghaisari, H.R., Nazifi, S., Sajedianfard, J., Eskandari, M.H., 2017. Effect of probiotic *Bacillus Coagulans* and *Lactobacillus Plantarum* on alleviation of mercury toxicity in Rat. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 9, 300-309.

Referencias bibliográficas

- Mansouri, A., Ridgway, L.D., Korapati, A.L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z.H., Mills, G.B., Claret, F.X., 2003. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 19245-19256.
- Marlicz, W., Skonieczna-Żydecka, K., Krynicka, P., Loniewski, I., Rydzewska, G., 2021. Probiotics in irritable bowel syndrome – is the quest for the right strain over? Rapid review of existing guidelines and recommendations. *Gastroenterology Review* 16, 369-382.
- Marsh, K.N., Bevan, J.W., Holste, J.C., McFarlane, D.L., Eliades, M., Rogers, W.J., 2016. Solubility of mercury in liquid hydrocarbons and hydrocarbon mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data* 61, 2805-2817.
- Martin, B.D., Witten, D., Willis, A.D., 2020. MODELING MICROBIAL ABUNDANCES AND DYSBIOSIS WITH BETA-BINOMIAL REGRESSION. *Ann Appl Stat* 14, 94-115.
- Martin, C.R., Osadchiy, V., Kalani, A., Mayer, E.A., 2018. The brain-gut-microbiome axis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 6, 133-148.
- Mas-Bargues, C., Escrivá, C., Dromant, M., Borrás, C., Viña, J., 2021. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 709, 108941.
- Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Di, Y., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R.J., Teixeira, M.M., Mackay, C.R., 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282-1286.
- Matsui, T., Shinozawa, T., 2021. Human organoids for predictive toxicology research and drug development. *Frontiers in Genetics* 12.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8, e61217.
- Minakami, M., Kitagawa, N., Iida, H., Anan, H., Inai, T., 2015. p38 Mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal protein kinase regulate the accumulation of a tight junction protein, ZO-1, in cell-cell contacts in HaCaT cells. *Tissue and Cell* 47, 1-9.
- Mowat, A.M., Agace, W.W., 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology* 14, 667-685.
- Muri, J., Thut, H., Feng, Q., Kopf, M., 2020. Thioredoxin-1 distinctly promotes NF- κ B target DNA binding and NLRP3 inflammasome activation independently of Txnip. *eLife* 9, e53627.
- Murray, P.J., 2017. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology* 79, 541-566.
- Mutter, J., Naumann, J., Sadaghiani, C., Walach, H., Drasch, G., 2004. Amalgam studies: Disregarding basic principles of mercury toxicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 207, 391-397.
- Natividad, J.M.M., Verdu, E.F., 2013. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research* 69, 42-51.
- Naumova, I., Shashkov, A., Tul'skaya, E., Streshinskaya, G., Kozlova, Y., Potekhina, N., Evtushenko, L., Stackebrandt, E., 2006. Cell wall teichoic acids: structural diversity, species specificity in the genus *Nocardopsis*, and chemotaxonomic perspective. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 269-283.
- Ngo, H.K.C., Kim, D.-H., Cha, Y.-N., Na, H.-K., Surh, Y.-J., 2017. Nrf2 mutagenic

- activation drives hepatocarcinogenesis. *Cancer Research* 77, 4797-4808.
- Nielsen, K.M., Zhang, Y., Curran, T.E., Magnuson, J.T., Venables, B.J., Durrer, K.E., Allen, M.S., Roberts, A.P., 2018. Alterations to the intestinal microbiome and metabolome of pimephales promelas and *Mus musculus* following exposure to dietary methylmercury. *Environmental Science & Technology* 52, 8774-8784.
- Niture, S.K., Khatri, R., Jaiswal, A.K., 2014. Regulation of Nrf2—an update. *Free Radical Biology and Medicine* 66, 36-44.
- Nolan, R.A., Reeb, K.L., Rong, Y., Matt, S.M., Johnson, H.S., Runner, K., Gaskill, P.J., 2020. Dopamine activates NF- κ B and primes the NLRP3 inflammasome in primary human macrophages. *Brain, Behavior, & Immunity - Health* 2, 100030.
- Norseth, T., Clarkson, T.W., 1971. Intestinal transport of 203Hg-labeled methyl mercury chloride. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 22, 568-577.
- Ohki, R., Yamamoto, K., Mano, H., Lee, R.T., Ikeda, U., Shimada, K., 2002. Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J Hypertens* 20, 685-691.
- Ohuchida, K., Mizumoto, K., Yamada, D., Fujii, K., Ishikawa, N., Konomi, H., Nagai, E., Yamaguchi, K., Tsuneyoshi, M., Tanaka, M., 2006. Quantitative analysis of MUC1 and MUC5AC mRNA in pancreatic juice for preoperative diagnosis of pancreatic cancer. *International Journal of Cancer* 118, 405-411.
- Olivero-Verbel, J., Alvarez-Ortega, N., Alcalá-Orozco, M., Caballero-Gallardo, K., 2021. Population exposure to lead and mercury in Latin America. *Current Opinion in Toxicology* 27, 27-37.
- Olivero-Verbel, J., Carranza-Lopez, L., Caballero-Gallardo, K., Ripoll-Arboleda, A., Muñoz-Sosa, D., 2016. Human exposure and risk assessment associated with mercury pollution in the Caqueta River, Colombian Amazon. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 20761-20771.
- Orbán, E., Szabó, E., Lotz, G., Kupcsulik, P., Páska, C., Schaff, Z., Kiss, A., 2008. Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors. *Pathol Oncol Res* 14, 299-306.
- Oriach, C.S., Robertson, R.C., Stanton, C., Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2016. Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut-brain axis. *Clinical Nutrition Experimental* 6, 25-38.
- Orlando, A., Linsalata, M., Notarnicola, M., Tutino, V., Russo, F., 2014. Lactobacillus GG restoration of the gliadin induced epithelial barrier disruption: the role of cellular polyamines. *BMC Microbiology* 14, 19.
- Ostos, C., Pérez-Rodríguez, F., Arroyo, B.M., Moreno-Rojas, R., 2015. Study of mercury content in wild edible mushrooms and its contribution to the Provisional Tolerable Weekly Intake in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis* 37, 136-142.
- Otani, T., Furuse, M., 2020. Tight junction structure and function revisited. *Trends in Cell Biology* 30, 805-817.
- Paeslack, N., Mimmler, M., Becker, S., Gao, Z., Khuu, M.P., Mann, A., Malinarich, F., Regen, T., Reinhardt, C., 2022. Microbiota-derived tryptophan metabolites in vascular inflammation and cardiovascular disease. *Amino Acids*.
- Palarea-Albaladejo, J., Martín-Fernández, J.A., 2015. zCompositions — R package for multivariate imputation of left-censored data under a compositional approach. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 143, 85-96.
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M.K., Landskron, G., González, M.J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N., Hermoso, M.A., 2019. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology* 10.

Referencias bibliográficas

- Park, J.-D., Zheng, W., 2012. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. *J Prev Med Public Health* 45, 344-352.
- Peng, L., Li, Z.-R., Green, R.S., Holzman, I.R., Lin, J., 2009. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *The Journal of Nutrition* 139, 1619-1625.
- Peterson, L.W., Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14, 141-153.
- Piotrowski, J.K., Szymańska, J.A., Skrzyńska-Gawrysiak, M., Kotelo, J., Sporny, S., 1992. Intestinal absorption of inorganic mercury in rat. *Pharmacology & Toxicology* 70, 53-55.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schwer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41, D590-D596.
- Rahman, I., Marwick, J., Kirkham, P., 2004. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology* 68, 1255-1267.
- Ramakrishna, B.S., 2013. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28, 9-17.
- Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F.J., Castellote, C., Franch, A., Castell, M., 2008. The bowel: a key component of the immune system. *Rev Esp Enferm Dig* 100, 29-34.
- Rand, M.D., Caito, S.W., 2019. Variation in the biological half-life of methylmercury in humans: Methods, measurements and meaning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1863, 129301.
- Rao, R.K., 2008. Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 7210-7226.
- Reboldi, A., Cyster, J.G., 2016. Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunological Reviews* 271, 230-245.
- Regnell, O., Watras, C.J., 2019. Microbial mercury methylation in aquatic environments: A critical review of published field and laboratory studies. *Environmental Science & Technology* 53, 4-19.
- Reimann, F., Tolhurst, G., Gribble, Fiona M., 2012. G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation. *Cell Metabolism* 15, 421-431.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M., Aggarwal, B., 2011. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol. Med* 49, 1603-1616.
- Rice, L.B., Carias, L.L., 1998. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 180, 714-721.
- Richter, J.F., Hildner, M., Schmauder, R., Turner, J.R., Schumann, M., Reiche, J., 2019. Occludin knockdown is not sufficient to induce transepithelial macromolecule passage. *Tissue Barriers* 7, 1612661.
- Risher, J., 1999. Toxicological profile for mercury.
- Risher, J.F., Nickle, R.A., Amler, S.N., 2003. Elemental mercury poisoning in occupational and residential settings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 206, 371-379.
- Rizzetti, D.A., Corrales, P., Piagette, J.T., Uranga-Ocio, J.A., Medina-Gomez, G., Peçanha, F.M., Vassallo, D.V., Miguel, M., Wiggers, G.A., 2019. Chronic mercury at low doses impairs white adipose tissue plasticity. *Toxicology* 418, 41-50.

- Rochfort, K.D., Cummins, P.M., 2015. Cytokine-mediated dysregulation of zonula occludens-1 properties in human brain microvascular endothelium. *Microvascular Research* 100, 48-53.
- Roh, J.S., Sohn, D.H., 2018. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* 18.
- Ross, D., Siegel, D., 2021. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. *Redox Biology* 41, 101950.
- Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 313-323.
- Roxas, J., Viswanathan, V.K., 2018. Modulation of intestinal paracellular transport by bacterial pathogens. *Comprehensive Physiology* 8, 823-842.
- Ruan, Y., Wu, C., Guo, X., Xu, Z., Xing, C., Cao, H., Zhang, C., Hu, G., Liu, P., 2019. High doses of copper and mercury changed cecal microbiota in female mice. *Biological Trace Element Research* 189, 134-144.
- Samak, G., Rao, R., Rao, R., 2021. *Lactobacillus casei* and Epidermal Growth Factor Prevent Osmotic Stress-Induced Tight Junction Disruption in Caco-2 Cell Monolayers. *Cells* 10, 3578.
- Sato, M., Kondoh, M., 2002. Recent Studies on Metallothionein: Protection Against Toxicity of Heavy Metals and Oxygen Free Radicals. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 196, 9-22.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.
- Schliep, K.P., 2010. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592-593.
- Schülke, S., 2018. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Frontiers in Immunology* 9.
- Seethaler, B., Basrai, M., Neyrinck, A.M., Nazare, J.-A., Walter, J., Delzenne, N.M., Bischoff, S.C., 2021. Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 321, G11-G17.
- Seko, Y., Miura, T., Takahashi, M., Koyama, T., 1981. Methyl mercury decomposition in mice treated with antibiotics. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 49, 259-265.
- Selin, N.E., 2009. Global biogeochemical cycling of mercury: A review. *Annual Review of Environment and Resources* 34, 43-63.
- Sellmann, C., Priebis, J., Landmann, M., Degen, C., Engstler, A.J., Jin, C.J., Gärttner, S., Spruss, A., Huber, O., Bergheim, I., 2015. Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26, 1183-1192.
- Shamlaye, C.F., Marsh, D.O., Myers, G.J., Cox, C., Davidson, P.W., Choisy, O., Cernichiari, E., Choi, A., Tanner, M.A., Clarkson, T.W., 1995. The Seychelles child development study on neurodevelopmental outcomes in children following in utero exposure to methylmercury from a maternal fish diet: background and demographics. *Neurotoxicology* 16, 597-612.
- Shaykhiev, R., 2019. Emerging biology of persistent mucous cell hyperplasia in COPD. *Thorax* 74, 4.
- Sheehan, M.C., Burke, T.A., Navas-Acien, A., Breyse, P.N., McGready, J., Fox, M.A., 2014. Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review. *Bull World Health Organ* 92, 254-269f.

Referencias bibliográficas

- Shen, L., Su, L., Turner, J.R., 2009. Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects. *Digestive Diseases* 27, 443-449.
- Shen, Z.H., Zhu, C.X., Quan, Y.S., Yang, Z.Y., Wu, S., Luo, W.W., Tan, B., Wang, X.Y., 2018. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J Gastroenterol* 24, 5-14.
- Shrestha, D., Massey, N., Bhat, S.M., Jellesjević, T., Sahin, O., Zhang, Q., Bailey, K.L., Poole, J.A., Charavaryamath, C., 2022. Nrf2 activation protects against organic dust and hydrogen sulfide exposure induced epithelial barrier loss and *K. pneumoniae* invasion. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 848773.
- Silverman, J.D., Washburne, A.D., Mukherjee, S., David, L.A., 2017. A phylogenetic transform enhances analysis of compositional microbiota data. *eLife* 6, e21887.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, Puttur D., Manicassamy, S., Munn, David H., Lee, Jeffrey R., Offermanns, S., Ganapathy, V., 2014. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40, 128-139.
- Sohn, S.H., Heo, H.C., Jo, S., Park, C., Sakong, J., 2020. The association between mercury concentrations and lipid profiles in the Korean National Environmental Health Survey (KoNEHS) cycle 3. *Ann Occup Environ Med* 32.
- Soler-Blasco, R., Murcia, M., Lozano, M., Aguinalgalde, X., Iriarte, G., Lopez-Espinosa, M.-J., Vioque, J., Iniguez, C., Ballester, F., Llop, S., 2019. Exposure to mercury among 9-year-old Spanish children: Associated factors and trend throughout childhood. *Environment international* 130, 104835.
- Song, M.O., Freedman, J.H., 2005. Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* 279, 141-147.
- Souza, D.G., Fagundes, C.T., Amaral, F.A., Cisalpino, D., Sousa, L.P., Vieira, A.T., Pinho, V., Nicoli, J.R., Vieira, L.Q., Fierro, I.M., Teixeira, M.M., 2007. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol* 179, 8533-8543.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Seed, B., 2009. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Research* 38, D792-D799.
- Spiller, H.A., 2018. Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity. *Clinical Toxicology* 56, 313-326.
- Storelli, M.M., Storelli, A., Giacomini-Stuffler, R., Marcotrigiano, G.O., 2005. Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. *Food Chemistry* 89, 295-300.
- Takeshi Furuhashi, G.I., 2018. GC/MS detection of short chain fatty acids from mammalian feces using automated sample preparation in aqueous solution, Agilent.
- Team, R.C., 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria.
- Thomas, K.J., Rice, C.V., 2014. Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall. *BioMetals* 27, 1361-1370.
- Thomas, K.J., Rice, C.V., 2015. Equilibrium binding behavior of magnesium to wall teichoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, 1981-1987.

- Torres-Escribano, S., Vélez, D., Montoro, R., 2010. Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Additives & Contaminants: Part A* 27, 327-337.
- Uchida, K., Matsuse, R., Tomita, S., Sugi, K., Saitoh, O., Ohshiba, S., 1994. Immunochemical detection of human lactoferrin in feces as a new marker for inflammatory gastrointestinal disorders and colon cancer. *Clinical Biochemistry* 27, 259-264.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., Tsukita, S., 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126, 741-754.
- UN, 2018. Global mercury assessment, UN Environment Programme.
- UNEP, 1990. Methylmercury - Environmental Health Criteria 101.
- Valdelamar-Villegas, J., Olivero-Verbel, J., 2020. High mercury levels in the indigenous population of the yaigojé Apaporis National Natural Park, Colombian Amazon. *Biological Trace Element Research* 194, 3-12.
- Van Hul, M., Geurts, L., Plovier, H., Druart, C., Everard, A., Ståhlman, M., Rhimi, M., Chira, K., Teissedre, P.L., Delzenne, N.M., Maguin, E., Guilbot, A., Brochot, A., Gérard, P., Bäckhed, F., Cani, P.D., 2018. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 314, E334-e352.
- van Putten, J.P.M., Strijbis, K., 2017. Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer. *Journal of Innate Immunity* 9, 281-299.
- Varona, A., Blanco, L., Perez, I., Gil, J., Irazusta, J., López, J.I., Cadenas, M.L., Pinto, F.M., Larrinaga, G., 2010. Expression and activity profiles of DPP IV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in the human renal cancer are tumor-type dependent. *BMC Cancer* 10, 193.
- Vázquez, M., Vélez, D., Devesa, V., 2014a. In vitro characterization of the intestinal absorption of methylmercury using a Caco-2 cell model. *Chemical Research in Toxicology* 27, 254-264.
- Vázquez, M., Vélez, D., Devesa, V., 2014b. *In vitro* evaluation of inorganic mercury and methylmercury effects on the intestinal epithelium permeability. *Food and Chemical Toxicology* 74, 349-359.
- Vázquez, M., Vélez, D., Devesa, V., 2015a. Participation of b0,+ and B0,+ systems in the transport of mercury bound to cysteine in intestinal cells. *Toxicology Research* 4, 895-900.
- Vázquez, M., Vélez, D., Devesa, V., Puig, S., 2015b. Participation of divalent cation transporter DMT1 in the uptake of inorganic mercury. *Toxicology* 331, 119-124.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., 2015. The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models.
- Vinolo, M.A.R., Rodrigues, H.G., Nachbar, R.T., Curi, R., 2011. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients* 3, 858-876.
- Wang, Q., Zhou, H., Lin, H., Ma, Z., Fan, H., 2020. Porcine circovirus type 2 exploits JNK-mediated disruption of tight junctions to facilitate *Streptococcus suis* translocation across the tracheal epithelium. *Veterinary Research* 51, 31.
- Wang, X., Luo, G., Zhang, K., Cao, J., Huang, C., Jiang, T., Liu, B., Su, L., Qiu, Z., 2018. Hypoxic tumor-derived exosomal miR-301a mediates M2 macrophage polarization via PTEN/PI3K γ to promote pancreatic cancer metastasis. *Cancer Research* 78, 4586-4598.

Referencias bibliográficas

- Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., Seed, B., 2012. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res* 40, D1144-1149.
- Wang, Z., Hua, W., Li, C., Chang, H., Liu, R., Ni, Y., Sun, H., Li, Y., Wang, X., Hou, M., Liu, Y., Xu, Z., Ji, M., 2019. Protective role of fecal microbiota transplantation on colitis and colitis-associated colon cancer in mice Is associated with Treg cells. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Wershil, B.K., Furuta, G.T., 2008. Gastrointestinal mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121, S380-S383.
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer, New York.
- Willis, A., Bunge, J., 2015. Estimating diversity via frequency ratios. *Biometrics* 71, 1042-1049.
- Willis, A.D., Martin, B.D., 2020. Estimating diversity in networked ecological communities. *Biostatistics* 23, 207-222.
- Wittkopf, N., Neurath, M.F., Becker, C., 2014. Immune-epithelial crosstalk at the intestinal surface. *Journal of Gastroenterology* 49, 375-387.
- Worthington, J.J., Reimann, F., Gribble, F.M., 2018. Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunology* 11, 3-20.
- Wright, E.S., 2016. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data. *The R Journal* 8, 352-359.
- Xia, F., Deng, C., Jiang, Y., Qu, Y., Deng, J., Cai, Z., Ding, Y., Guo, Z., Wang, J., 2018. IL4 (interleukin 4) induces autophagy in B cells leading to exacerbated asthma. *Autophagy* 14, 450-464.
- Yamamoto, M., Khan, N., Muniroh, M., Motomura, E., Yanagisawa, R., Matsuyama, T., Vogel, C.F.A., 2017. Activation of interleukin-6 and -8 expressions by methylmercury in human U937 macrophages involves RelA and p50. *Journal of Applied Toxicology* 37, 611-620.
- Yang, J., Chun, J., 2021. Taxonomic composition and variation in the gut microbiota of laboratory mice. *Mammalian Genome* 32, 297-310.
- Yang, J., Lim, S.Y., Ko, Y.S., Lee, H.Y., Oh, S.W., Kim, M.G., Cho, W.Y., Jo, S.K., 2018. Intestinal barrier disruption and dysregulated mucosal immunity contribute to kidney fibrosis in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 34, 419-428.
- Yao, J.Q., Liu, Q.H., Chen, X., Yang, Q., Xu, Z.Y., Hu, F., Wang, L., Li, J.M., 2010. Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the proliferation of ARPE-19 cells. *J Biomed Sci* 17, 30.
- Yeung, C.-Y., Chiang Chiau, J.-S., Chan, W.-T., Jiang, C.-B., Cheng, M.-L., Liu, H.-L., Lee, H.-C., 2013. In vitro prevention of Salmonella lipopolysaccharide-induced damages in epithelial barrier function by various *Lactobacillus* strains. *Gastroenterology Research and Practice* 2013, 973209.
- Yu, H., Huang, X., Ma, Y., Gao, M., Wang, O., Gao, T., Shen, Y., Liu, X., 2013. Interleukin-8 Regulates Endothelial Permeability by Down-regulation of Tight Junction but not Dependent on Integrins Induced Focal Adhesions. *International journal of biological sciences* 9, 966-979.
- Zahedi, A., Hassanvand, M.S., Jaafarzadeh, N., Ghadiri, A., Shamsipour, M., Dehcheshmeh, M.G., 2021. Effect of ambient air PM2.5-bound heavy metals on blood metal(loid)s and children's asthma and allergy pro-inflammatory (IgE, IL-4 and IL-13) biomarkers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 68, 126826.
- Zeng, J., Jiang, J., Zhu, W., Chu, Y., 2016. Heat-killed yogurt-containing lactic acid bacteria prevent cytokine-induced barrier

disruption in human intestinal Caco-2 cells. *Annals of Microbiology* 66, 171-178.

Zhang, B.-B., Liu, Y.-M., Hu, A.-L., Xu, S.-F., Fan, L.-D., Cheng, M.-L., Li, C., Wei, L.-X., Liu, J., 2019. HgS and Zuotai differ from HgCl₂ and methyl mercury in intestinal Hg absorption, transporter expression and gut microbiome in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 379, 114615.

Zhao, C., Dong, H., Zhang, Y., Li, Y., 2019. Discovery of potential genes contributing to the biosynthesis of short-chain fatty acids and lactate in gut microbiota from systematic investigation in *E. coli*. *npj Biofilms and Microbiomes* 5, 19.

Zhao, Y., Zhou, C., Guo, X., Hu, G., Li, G., Zhuang, Y., Cao, H., Li, L., Xing, C.,

Zhang, C., Yang, F., Liu, P., 2021. Exposed to Mercury-Induced Oxidative Stress, Changes of Intestinal Microflora, and Association between them in Mice. *Biological Trace Element Research* 199, 1900-1907.

Zhao, Y., Zhou, C., Wu, C., Guo, X., Hu, G., Wu, Q., Xu, Z., Li, G., Cao, H., Li, L., Latigo, V., Liu, P., Cheng, S., Liu, P., 2020. Subchronic oral mercury caused intestinal injury and changed gut microbiota in mice. *Science of The Total Environment* 721, 137639.

Zheng, D., Liwinski, T., Elinav, E., 2020. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research* 30, 492-506.

Anexo

Listado de publicaciones y contribuciones a congresos

La presente tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones en congresos.

Publicaciones

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Monedero V, Zúñiga M.

Mercury toxic effects on the intestinal mucosa assayed on a bicameral in vitro model: Possible role of inflammatory response and oxidative stress.

Food Chem Toxicol. 2022 Aug; DOI: 10.1016/j.fct.2022.113224. Epub 2022 Jun 11. PMID: 35700822.

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Monedero V, Zúñiga M.

Analysis of the impact on the intestine of mercury oral exposure in a mouse model system. *En vías de publicación.*

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Zúñiga M, Monedero V.

Lactic acid bacteria strains reduce in vitro mercury toxicity on the intestinal mucosa. **Food Chem Toxicol.** 2023 Jan 21;173:113631. doi: 10.1016/j.fct.2023.113631.

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Monedero V, Zúñiga M.

Amelioration of methylmercury-induced intestinal toxicity by lactic acid bacteria. *En vías de publicación.*

Contribuciones a congresos

Rodríguez-Viso P, Domene A, Devesa V, Monedero V, Vélez D, Zúñiga M. Establishment of a 3D cell model for the study of intestinal mercury toxicity. Presentación en formato oral en las **VIII Jornadas de Formación en Toxicología**, celebradas en Valencia (España), en marzo de 2021.

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Monedero V, Zúñiga M. In vivo evaluation of the effect of a subchronic exposure to mercury upon the intestinal mucosa. Póster presentado en el congreso **SOT 2022**, celebrado en San Diego (California) en formato híbrido, en marzo de 2022.

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Monedero V, Zúñiga M. Methylmercury toxicity upon the intestinal mucosa. Póster presentado en las **IX Jornadas de Formación en Toxicología**, celebradas en Valencia (España), en marzo de 2022.

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Monedero V, Zúñiga M. In vitro evaluation of the effect of a subchronic exposure to mercury upon the intestinal epithelium. Póster presentado en el congreso **EUROTOX 2021**, celebrado en Copenhague (Dinamarca) en formato híbrido, en septiembre de 2021.

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Monedero V, Zúñiga M. Análisis in vitro de la capacidad de reducir la toxicidad del metilmercurio en el epitelio intestinal de bacterias lácticas. Presentación en formato oral en la **15ª Reunión de la Red Española de Bacterias Lácticas**, celebrada en Valencia (España), en mayo de 2022.

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Zúñiga M, Monedero V. Protección frente a la toxicidad del mercurio mediante el uso de bacterias lácticas en un modelo epitelial intestinal bicameral. Póster presentado en el

VIII Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana, celebrado en Valencia (España), en junio de 2022.

Rodríguez-Viso P, Domene A, Vélez D, Devesa V, Zúñiga M, Monedero V. Protective effect of lactic acid bacteria against mercury toxicity on the intestinal mucosa. Presentación en formato póster y oral en el **9th PhD Student Symposium**, celebrado en Valencia (España), en octubre de 2022.

Burbano L, Rodríguez-Viso P, Domene A, Zúñiga M, Monedero V. Bacterias lácticas, una estrategia dietaria para reducir la exposición a mercurio. Presentación en formato oral en la **VI Convención Científica Internacional**, celebrada en Manabí (Ecuador), en octubre de 2022.

