

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 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 mucossecretoras, 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 lumbales 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.