

Título

ESTUDIO DE LA SOLUBILIZACIÓN, ABSORCIÓN Y TRANSFORMACIONES A LO LARGO DEL TRACTO DIGESTIVO DE LAS ESPECIES QUÍMICAS DE MERCURIO

Resumen

Los elementos traza tóxicos están presentes en los alimentos debido a causas naturales o antropogénicas. Entre estos, el mercurio (Hg) ha suscitado en los últimos años la atención de la comunidad científica y de los organismos internacionales responsables de la seguridad alimentaria y de la salud. Dado que el Hg llega al organismo humano principalmente a través de los alimentos, su presencia en estas matrices, y todos los procesos que experimentan desde su ingesta hasta su llegada a la circulación sistémica donde ejerce su efecto tóxico, son temas que requieren un estudio detallado.

El Hg, a diferencia de otros elementos traza tóxicos, se encuentra en los alimentos en distintas formas químicas, principalmente como Hg inorgánico o metilmercurio (MeHg). El grado de toxicidad, la acumulación celular y tisular, y la tasa de metabolismo dependen de la forma química en la que se encuentre. Aunque ambas formas químicas presentan toxicidad, los órganos diana son distintos. El MeHg se considera un potente neurotóxico, mientras que el Hg inorgánico afecta principalmente al sistema renal. Teniendo en cuenta el diferente efecto tóxico de las especies de Hg, es clave evaluar en las matrices alimentarias los contenidos de las formas químicas y no los contenidos totales del elemento, para tener una idea más precisa de los posibles riesgos asociados a la ingesta. Por otro lado, la exposición real a un elemento tóxico no se puede medir únicamente por los contenidos totales o de sus formas en el alimento, es necesario evaluar qué cantidad del mismo llega a la circulación sistémica y en qué forma llega. Por tanto, dentro de la evaluación del riesgo asociado a la exposición oral a un tóxico es necesario evaluar su solubilización en el tracto digestivo y la magnitud de su absorción intestinal, así como los factores que afectan a estos procesos. En ese sentido, los estudios sobre las formas mercuriales presentes en los alimentos son muy escasos.

El objetivo de esta tesis doctoral es el estudio de la solubilización, absorción y transformaciones a lo largo del tracto digestivo de las especies químicas de mercurio existentes en los alimentos. Adicionalmente se evaluará si los procesos de absorción y solubilización están afectados por la presencia de otros componentes de la dieta o de distintos complementos dietéticos.

Antecedentes y estado actual

El hombre está expuesto al mercurio (Hg) a través de la dieta y en menor medida como consecuencia de su actividad laboral. Las principales fuentes dietarias de metilmercurio (MeHg) son los productos pesqueros, en concreto los pescados considerados grandes depredadores (pez espada, atún, tiburón), mientras que la exposición oral a Hg inorgánico se debe principalmente al consumo de vegetales y cereales (SANCO, 2004). Tras su ingesta, las formas químicas del Hg pueden experimentar transformaciones a su paso por el tracto gastrointestinal que podrían suponer cambios tanto en el carácter tóxico de las mismas como

en su absorción. Se ha visto que los microorganismos intestinales son capaces de transformar el MeHg en Hg inorgánico (Rowland et al., 1980), especie con una menor grado de absorción intestinal que la forma orgánica, existiendo en este caso un efecto protector de la flora microbiana. Sin embargo se desconoce si la interacción del Hg solubilizado durante la digestión con el resto de componentes de la dieta o con los factores propios del tracto digestivo (enzimas, sales biliares..) puede suponer cambios en las formas de Hg ingeridas. Existen datos que indican que las formas químicas de Hg son altamente reactivas y pueden unirse a moléculas o macromoléculas que presenten grupos sulfhidrilo (GSH, polipéptidos, proteínas) (Zalups y Ahmad, 2005), dando lugar a complejos con mayor o menor grado de toxicidad que las formas no conjugadas. Así, el efecto *in vitro* del MeHg unido a residuos de cisteína (MeHg-Cys) se ha demostrado que puede ser menor que el observado para el MeHg (Oyama et al., 2000). Por tanto, es necesario llevar a cabo estudios encaminados a conocer las especies de Hg que mayoritariamente se solubilizan tras el proceso de digestión gastrointestinal y son absorbidas, así como las transformaciones que pueden sufrir estas especies a su paso por el tracto digestivo y los factores que las favorecen.

Las transformaciones de las formas químicas de Hg durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal, además de suponer cambios en los perfiles que llegan a la circulación sistémica y por tanto cambios en los posibles efectos tóxicos que finalmente ejerzan sobre los órganos diana, también puede afectar al propio tracto gastrointestinal. Las especies solubilizadas y absorbidas podrían llegar a afectar la funcionalidad de la mucosa gástrica e intestinal y por tanto a los procesos de digestión y absorción de nutrientes y los de protección frente a patógenos y otras sustancias tóxicas, papeles principales de esta mucosa. Únicamente un estudio en ratones pone de manifiesto que exposiciones a Hg inorgánico durante tiempos prolongados pueden producir inflamación del intestino e hiperplasia del estómago (NTP, 1993). Estos efectos pueden ser el resultado del contacto continuo de las capas externas de la pared intestinal con las formas mercuriales durante su paso por el tracto o de la acumulación tisular de las mismas. Los datos sobre estos efectos no se han estudiado con detalle. Por otro lado, los posibles efectos tóxicos de un componente alimentario pueden ser a veces reducidos o contrarrestados por otros componentes alimentarios antagonistas. En el caso del Hg se ha descrito que el selenio (Se) puede reducir su efecto tóxico (Newland y col., 2006). Este efecto antagónico puede deberse a que actúe directamente sobre los mecanismos de toxicidad o a que interfiera en la absorción y transformaciones del Hg en su paso por el tracto intestinal y los órganos diana. Este efecto antagónico se ha evaluado a nivel del sistema nervioso y para el MeHg (Newland y col., 2006), pero no existen datos para el Hg inorgánico y para otros órganos.

Los antecedentes comentados, ponen de manifiesto las lagunas de conocimiento existente para este contaminante alimentario en aspectos relacionados con su digestión gastrointestinal y absorción, transformaciones durante el tránsito digestivo y efectos tóxicos sobre la mucosa gastrointestinal.

Bibliografía

JECFA, 2010. Seventy-second meeting of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf).

Newland, M. C., Reed, M. N., LeBlanc, A., Donlin, W. D., 2006. Brain and blood mercury and selenium after chronic and developmental exposure to methylmercury. *Neurotoxicology*, 27, 710-720.

NTP (National Toxicology Program). 1993. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS No. 7487-94-7) in F344 rats and B3C3F1 mice (gavage studies).

Oyama, Y., Yamazaki, Y., Okada, Y., Takahama, K., Satoh, M., Hayashi, H., 2000. Toxicity of methylmercury conjugated with l-cysteine on rat thymocytes and human leukemia K562 cells in comparison with that of methylmercury chloride. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 9, 49-55.

Rowland, I.R., Davies, M.J., Evans, J.G., 1980. Tissue content of mercury in rats given methylmercuric chloride orally: influence of intestinal flora. *Arch. Environ. Health*, 35, 155-160.

SANCO, 2004. Directorate-General Health and Consumer Protection. Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States. Report on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.11. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-11_heavy_metals_report_en.pdf [acceso: 25-01-2012].

Zalups, R.K; Ahmad, S., 2005. Transport of N-acetylcysteine s-conjugates of methylmercury in Madin-Darby canine kidney cells stably transfected with human isoform of organic anion transporter 1. *J. Pharmacol. Experim. Theraphy*, 314, 1158-1168.

EFSA, 2012. Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal*, 10(12), 2985 [241 pp.].

Hipótesis y objetivos

La principal vía de exposición a mercurio (Hg) son los alimentos, donde éste se presenta en distintas formas químicas de diferente toxicidad. El presente proyecto de tesis doctoral parte de la hipótesis de que tras la ingesta de alimentos con Hg, la digestión gástrica e intestinal, el metabolismo de las células epiteliales, así como la acción de la flora y de toda una serie de compuestos de origen endógeno o exógeno presentes en el tracto gastrointestinal, podrían modificar la forma química inicial de este contaminante. Estos procesos podrían afectar tanto a la toxicidad como a la cantidad y formas del tóxico que se absorben y que finalmente llegan a la circulación sanguínea.

El objetivo de esta tesis doctoral es el estudio de la solubilización, absorción y transformaciones a lo largo del tracto digestivo de las especies químicas de mercurio existentes en los alimentos. Asimismo se pretende evaluar el efecto sobre estos parámetros de

componentes alimentarios y complementos dietéticos, factores fisicoquímicos y componentes del quimo.

Este objetivo general se abordará a través de los siguientes objetivos específicos:

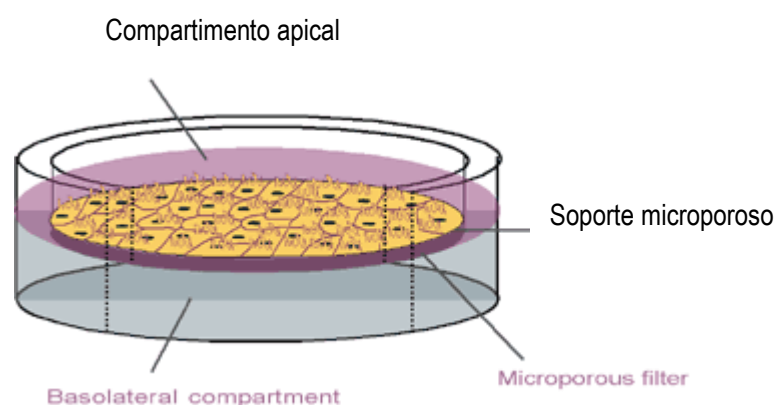
1. Estudio *in vitro* e *in vivo* de la solubilización y las posibles transformaciones del mercurio presente en los alimentos durante el proceso de digestión.
2. Estudio *in vitro* e *in vivo* de la absorción intestinal de mercurio y las posibles transformaciones del mercurio durante el proceso absorbivo.
3. Estudio *in vitro* e *in vivo* del efecto de componentes alimentarios o complementos dietéticos sobre la solubilización, transformación y absorción de las formas mercuriales.

Metodología a utilizar

A lo largo de la tesis doctoral se emplearán una serie de metodologías que se modificarán dependiendo del objetivo a alcanzar. En este apartado se presentan de forma general estas metodologías, a saber:

1) Ensayos *in vitro* del proceso de digestión gastrointestinal. Se empleará un método de digestión gastrointestinal ampliamente empleado y validado para Hg en el laboratorio del Instituto de Agroquímica y Tecnología de alimentos (IATA) donde desarrollo mi tesis doctoral. Las muestras de alimentos, tras su homogenización, se acidificarán (pH 2.0) para emular el pH gástrico y se tratarán con una solución de pepsina (0.02 g de pepsina/10 g de muestra) a 37 °C durante 2 h en continua agitación (120 golpes/min). Tras la simulación de la etapa gástrica, el pH del digerido se aumentará a 6.5 (pH intestinal) y se añadirá una mezcla de pancreatina y extracto biliar (0.0025 g de pancreatina y 0.015 g de extracto biliar/10 g de muestra), incubándose a 37 °C durante 2 h en agitación. Tras la digestión, las muestras se centrifugarán a 10000 rpm durante 30 minutos. En la fracción soluble obtenida (bioaccesible) se cuantificarán los contenidos totales de Hg y sus especies y se determinará la bioaccesibilidad

2) Ensayos *in vitro* de transporte y acumulación de las formas mercuriales. Se emplearán dos líneas celulares (Caco-2, NCM460) procedentes de epitelio de colon y que se emplean habitualmente como modelos de epitelio intestinal. Las líneas celulares se sembrarán sobre soportes porosos que crearán un sistema bicameral, donde la monocapa celular separará el compartimento dador del receptor (Transwell®).



Las disoluciones patrón de mercurio se añadirán al compartimento basal y se evaluará el contenido de Hg y sus formas que ha atravesado la monocapa, y que por tanto se ha absorbido. La integridad de la monocapa celular durante el ensayo de permeabilidad se monitorizará mediante la determinación de la resistencia eléctrica transepitelial y de la permeabilidad del marcador de transporte paracelular lucifer yellow. A la finalización de cada uno de los experimentos, el número de células viables se determinará mediante tinción con azul tripán.

3) Ensayos *in vivo* de absorción intestinal. Se emplearán ratas albinas Wistar adultas. Las evaluaciones de la acumulación y absorción se realizarán mediante dosificación oral por sonda nasogástrica (dosis diaria única) a tiempos y concentraciones que serán fijados atendiendo a los datos observados *in vitro*. Tras la exposición, los animales se sacrificarán de acuerdo con los requerimientos de la legislación europea y se recuperarán los distintos tramos del tracto gastrointestinal (estómago, intestino delgado e intestino grueso). Los tejidos se homogenizarán y se determinarán los contenidos totales de Hg y sus formas mercuriales, y se realizará un análisis metalómico de los mismos. Asimismo, se determinará la biodisponibilidad oral mediante el análisis de los contenidos de Hg del plasma recogido a distintos tiempos tras la dosificación oral.

4) Metodología analítica para la determinación de Hg y sus formas químicas. El Hg se determinará por digestión ácida en microondas y detección por vapor frío (CV)-espectroscopía de fluorescencia atómica (AFS). Las especies de Hg se analizarán mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a CV-AFS. La extracción de las especies se llevará a cabo mediante extracción asistida con microondas o mediante extracción por agitación/sonicación con disolventes orgánicos. La caracterización de las moléculas en las que aparecen integradas las formas químicas de Hg presentes en los alimentos se realizará por HPLC-MS-MS.

Medios a utilizar

La presente tesis doctoral se enmarca dentro del proyecto nacional concedido en la convocatoria del año 2012 por el Ministerio de Economía Y Competitividad (AGL2012-33461), y por tanto los gastos derivados de la investigación aquí planteada estarán enteramente cubiertos por dicho proyecto.

Por otro lado, el grupo de Elementos Traza del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), donde me he integrado como becario predoctoral, posee la mayor parte de

la infraestructura necesaria para realizar el proyecto presentado (sala de cultivos celulares, equipos de cromatografía líquida, equipos de espectroscopia de absorción y fluorescencia atómica, equipos de tratamiento de muestras para análisis, etc.). Adicionalmente se cuenta con la colaboración científica de otros grupos de investigación, que han suscrito su interés en participar en nuestras investigaciones y que apoyarán esta tesis en distintos aspectos, a saber:

-Grupo de Análisis Metalómico y Medioambiental de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva, dirigido por el profesor José Luis Gómez Ariza. Este grupo tiene a su disposición la técnica de espectrometría de masas en tándem (MS-MS) aplicada a metales, además de contar con el equipamiento analítico tiene una reconocida experiencia en el campo de elementos traza.

- Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, bajo la supervisión de la Dra. Ana Polache Vengut. Este grupo es experto en estudios de absorción intestinal y toxicidad de drogas en animales de experimentación y desde hace tiempo colabora con el grupo de Elementos traza del IATA.

Planificación temporal y utilidad de la investigación

La planificación temporal de las actividades a realizar durante los 4 años de disfrute de mi beca predoctoral se detalla en el cronograma adjunto.

Se prevé que los beneficios del proyecto se materialicen principalmente en forma de contribuciones científicas, las cuales se espera que supongan un avance en el escaso conocimiento existente sobre los procesos presistémicos que tienen lugar previo a la llegada del mercurio a la circulación sistémica tras su ingesta. Entre estos beneficios se pueden citar:

- Publicaciones en revistas científicas. La temática de la revista variará con el tipo de resultados obtenidos, abarcando como principales áreas de conocimiento **Ciencia y Tecnología de los Alimentos** (Journal of Agricultural and Food Chemistry, Food Additives and Contaminants, Food Chemistry, Food Control) y **Toxicología** (Chemical Research in Toxicology, Toxicology and Applied Pharmacology, Toxicology, Toxicology Letters).

- Contribuciones a congresos científicos. Los avances de las investigaciones se presentarán en foros científicos nacionales e internacionales relacionados con la temática. Se seleccionarán congresos de toxicología y de ciencia y tecnología de los alimentos. La trayectoria previa del grupo permite señalar los siguientes congresos preferentes: International IUPAC Symposium on Trace Elements in Food (TEF), EUROTOX, Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Congreso Español de Toxicología, Simposio Internacional sobre Elementos Trazas y Salud.

-Difusión de los resultados a organismos nacionales con competencia en Seguridad Alimentaria. En este sentido, cabe destacar que los informes del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre riesgos asociados a la presencia de mercurio y arsénico en alimentos, incluyen los artículos publicados por nuestro grupo entre la información utilizada para su redacción (Revista del Comité Científico de la

AESAN nº 13 y nº 10). Por otra parte, los documentos recientes de JECFA (2010), EFSA (2009) y EPA (2010) sobre arsénico o mercurio consideran las investigaciones realizadas por nuestro grupo en aspectos referentes a especies arsenicales en alimentos, su bioaccesibilidad y el efecto del cocinado de los alimentos sobre ambos parámetros. En concreto el grupo solicitante ha formado parte del Comité de expertos de FAO/OMS en la reunión que ha dado lugar a la publicación de la monografía sobre As y Hg (JECFA, 2010), debido a su contribución científica en el área de alimentos. Estos antecedentes evidencian la repercusión de las investigaciones realizadas por el grupo solicitante de este proyecto.

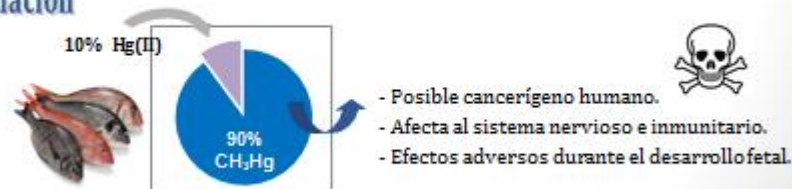
MATERIA DE APOYO



Introducción



Especiación



Objetivo



- El objetivo de esta tesis doctoral es el estudio de la solubilización, absorción y transformaciones a lo largo del tracto digestivo de las especies químicas de mercurio existentes en los alimentos.

Etapas principales del desarrollo de la investigación



1. Estudio *in vitro* e *in vivo* de la solubilización y las posibles transformaciones del mercurio presente en los alimentos durante el proceso de digestión.
2. Estudio *in vitro* e *in vivo* de la absorción intestinal de mercurio y las posibles transformaciones del mercurio durante el proceso absorptivo.
3. Estudio *in vitro* e *in vivo* del efecto de componentes alimentarios o complementos dietéticos sobre la solubilización, transformación y absorción de las formas mercuriales.

Resultados previstos y posibles utilidades

- - Publicaciones en revistas científicas.
- - Contribuciones a congresos científicos.
- - Difusión de los resultados a organismos nacionales con competencia en Seguridad Alimentaria.



GRACIAS