



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Efecto de la exposición a metilmercurio en las vías de
señalización asociadas en la formación de protrusiones durante
el movimiento de células de neuroblastoma”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. José Alberto Hernández Alcántara

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en la Especialidad de
Toxicología**

Directora de tesis:

- Dra. Emma Soraida Calderón Aranda

El presente trabajo se realizó en el laboratorio y bajo la dirección de la Dra. Emma Soraida Calderón Aranda, del departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Este trabajo se desarrolló bajo el financiamiento del Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 152491.

Resumen

Metilmercurio (MeHg) es un neurotóxico que se encuentra ubicuamente en el ambiente, se ha descrito que inhibe la migración neuronal. Este proceso requiere de varios pasos entre los cuales está la formación de protrusiones (lamelipodios y filopodios) y el recambio de las adhesiones focales. FAK y Src son proteínas críticas que regulan los procesos antes mencionados, el complejo FAK-Src promueve la activación de Rac1 y Cdc42, dos GTPasas involucradas en el remodelamiento del citoesqueleto de actina. En este trabajo se evaluó el efecto del MeHg a bajas concentraciones (1-1000 nM) en la migración y movimiento celular, la formación de protrusiones, la localización de las adhesiones focales y la activación de FAK, Src, Rac1 y Cdc42 usando la línea SH-SY5Y de neuroblastoma humano estimulada con PDGF. Nuestros resultados mostraron que el MeHg (1-500 nM) inhibió la migración celular estimulada con PDGF. Asimismo, el organometal disminuyó la velocidad de movimiento celular, inhibió la formación de protrusiones e incrementó el tamaño de los agregados de p-FAK^{Y397}. El MeHg también inhibió la activación de FAK y Src, y a 100 nM inhibió la activación de Rac1 y Cdc42. Nuestros resultados sugieren que el MeHg a bajas concentraciones inhibe la migración de las células SH-SY5Y por la activación y desensamble de FAK afectando la activación de Src, Rac1 y Cdc42, proteínas críticas en la regulación del movimiento celular, estos efectos pueden estar relacionados con la inhibición mediada por el MeHg de la migración celular, la formación de protrusiones y el desensamble de las adhesiones focales.

Abstract

Methylmercury (MeHg) is an environmental neurotoxicant that inhibits neuronal migration. This process requires several cyclic steps involving the formation of membrane protrusions (lamellipodia and filopodia) and focal adhesion turnover. FAK and Src are critical proteins that regulate both processes. The FAK-Src complex promotes the activation of Rac1 and Cdc42, two GTPases involved in the remodeling of the actin cytoskeletal network. Here, we studied the effect of MeHg (1, 100, 500 and 1000 nM) on cell migration, the formation of cell protrusions, focal adhesion location and the activation of FAK, Src, Rac1 and Cdc42 using the SH-SY5Y neuroblastoma cell line stimulated with PDGF. The data showed that MeHg (1-500 nM) inhibited PDGF-stimulated cell migration. MeHg (100-1000 nM) inhibited PDGF-stimulated cell velocity. In PDGF-stimulated cells, MeHg (100-1000 nM) decreased protrusions and increased the size of the p-FAKY397 clusters. MeHg (100-1000 nM) also inhibited PDGF-induced FAK and Src activation and at 100 nM, MeHg inhibited the activation of Rac1 and Cdc42. Altogether, the findings show that low concentrations of MeHg inhibit SH-SY5Y cell migration by disrupting the activation and disassembly of FAK. This negatively affects the activation of Src, Rac1 and Cdc42, all of which are critical proteins for the regulation of cell movement. These effects could be related to the MeHg-mediated inhibition of PDGF-induced formation of lamellipodia and filopodia, focal adhesion disassembly and PDGF-induced movement.

Dedicatorias

A mi madre y a mis hermanos por su apoyo incondicional.

A toda mi familia que me estuvo apoyando a lo largo de este periodo de arduo trabajo.

Agradecimientos

A la Dra. Emma Calderón Aranda por transmitirme sus conocimientos, consejos, paciencia, por el apoyo moral que me brindó, por abrirme las puertas de su laboratorio y por ser una gran tutora.

A la Dra. Esther López Bayghen sus sugerencias y comentarios para el mejoramiento del proyecto.

A la Dra. Ana María Salazar Martínez por sus sugerencias y comentarios para el mejoramiento del proyecto.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por sus sugerencias y comentarios para el mejoramiento del proyecto.

Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar por sus sugerencias y comentarios para el mejoramiento del proyecto.

Al Dr. Olivier Barbier por su apoyo, comentarios y sugerencias para el mejoramiento del proyecto.

A Rocío Castillo por el apoyo y asesoramiento para la realización de diversas técnicas empleadas en este trabajo.

A mis amigas de generación Mary Pam y Yazmin por el apoyo mutuo que nos hemos brindado.

A Damaris, Naye, Miri y Lili por transmitirme sus conocimientos, y por los buenos consejos que siempre me daban.

A mis amigas Lili Arlet y Yazmin por permitirme hacer de esta estancia algo más agradable y por todo el apoyo que me brindaron.

A todo el colegio de profesores del departamento de Toxicología por sus enseñanzas y conocimientos.

A mi mama Bertha y mis hermanos Ángel y Jesús.

A Víctor por el apoyo técnico brindado en el laboratorio.

A la M. Sc. Leonor C. Acosta Saavedra por el apoyo en las metodologías realizadas en este trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A DIOS por permitirme culminar otra etapa en mi vida

Índice General

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Introducción | 1 |
| 1.1. | Mercurio..... | 1 |
| 1.1.1 | Generalidades..... | 1 |
| 1.1.2 | Fuentes de exposición | 1 |
| 1.1.3 | Normatividad del MeHg..... | 1 |
| 1.1.4 | Mercurio en México | 2 |
| 1.1.4.1 | Oferta y demanda..... | 2 |
| 1.1.4.2 | Contenido de mercurio en peces en México..... | 3 |
| 1.1.4.3 | Estudios poblacionales..... | 5 |
| 1.1.5 | Toxicocinética del MeHg | 6 |
| 1.1.6 | Mecanismos de toxicidad | 7 |
| 1.1.7 | MeHg altera la migración neuronal..... | 9 |
| 1.2 | Migración neuronal | 10 |
| 1.3 | Protrusiones, indispensables para la migración celular | 13 |
| 1.4 | La dinámica de las adhesiones focales promueve el movimiento celular . | 14 |
| 1.5 | Proteínas críticas en el movimiento celular..... | 15 |
| 1.5.1 | Rho GTPasas, reguladoras en la organización de actina. | 15 |
| 1.5.2 | RhoA | 17 |
| 1.5.3 | Rac1 y Cdc42..... | 17 |
| 1.5.4 | FAK..... | 19 |
| 1.6 | Efecto del PDGF en las proteínas asociadas al movimiento celular | 19 |
| 1.6.1 | PDGF promueve el movimiento celular..... | 19 |
| 1.6.2 | PDGF y Rho GTPasas | 21 |
| 1.6.3 | PDGF y Src | 22 |
| 1.6.4 | Src y Rho GTPasas..... | 23 |
| 1.7 | Justificación | 25 |
| 1.8 | Hipótesis | 25 |
| 1.9 | Objetivo general | 25 |
| 1.10 | Objetivos particulares | 26 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2 | Metodología | 27 |
| 2.1 | Diseño experimental | 27 |
| 2.2 | Materiales y reactivos | 28 |
| 2.2.1 | Línea celular..... | 30 |
| 2.2.1.1 | Cultivo de la línea SH-SY5Y..... | 30 |
| 2.2.1.2 | Tratamientos..... | 31 |
| 2.3 | Ensayo MTT | 31 |
| 2.4 | Ensayo scratch (recuperación de la herida)..... | 32 |
| 2.5 | Time lapse | 32 |
| 2.6 | Inmunofluorescencias | 33 |
| 2.6.1 | Análisis de las imágenes de fluorescencia..... | 33 |
| 2.7 | Western blot..... | 34 |
| 2.8 | Activación de Rac1 y Cdc42 | 34 |
| 2.9 | Análisis estadístico | 35 |
| 3 | Resultados | 35 |
| 3.1 | MeHg no afecta la viabilidad de las células SH-SY5Y | 35 |
| 3.2 | MeHg inhibe la migración inducida por el PDGF de las células SH-SY5Y..... | 36 |
| 3.3 | MeHg inhibe la formación de protrusiones y promueve la formación de agregados de p-FAK ^{Y397} en células SH-SY5Y estimuladas con PDGF. | 40 |
| 3.4 | MeHg inhibe la fosforilación inducida por el PDGF de FAK ^{Y397} | 42 |
| 3.5 | MeHg inhibe la fosforilación de Src ^{Y419} inducida por el PDGF..... | 44 |
| 3.6 | MeHg inhibe la activación de Rac1 y Cdc42 inducida por el PDGF | 45 |
| 4 | Discusión | 47 |
| 4.1 | El MeHg no afecta la viabilidad de las células SH-SY5Y..... | 47 |
| 4.2 | MeHg inhibe la migración celular inducida por el PDGF..... | 48 |
| 4.3 | El MeHg inhibe la formación de protrusiones inducida por el PDGF y el desensamble de las adhesiones focales | 49 |
| 4.4 | MeHg inhibe la activación de FAK y Src..... | 50 |
| 4.5 | MeHg inhibe la activación de Rac1 y Cdc42..... | 52 |
| 5 | Conclusiones | 55 |
| 6 | Perspectivas | 55 |
| 7 | Referencias | 56 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Organización de la corteza cerebral. | 12 |
| Figura 2. Organización y participación de las diferentes proteínas involucradas en la formación de los filamentos de actina durante la formación de protrusiones..... | 14 |
| Figura 3. Ciclo de activación y desactivación de las Rho GTPasas..... | 16 |
| Figura 4. MeHg inhibe la migración inducida por el PDGF. | 37 |
| Figura 5. MeHg disminuye la velocidad de movimiento de las células SH-SY5Y estimuladas con PDGF.. . . . | 38 |
| Figura 6. El pre-tratamiento con MeHg inhibe la migración celular inducida por el PDGF. | 39 |
| Figura 7. MeHg inhibe la formación de protrusiones y modifica la distribución subcelular de p-FAK ^{Y397} en las células SH-SY5Y estimuladas con PDGF | 41 |
| Figura 8. MeHg incrementa el área de los “clusters” y disminuye la intensidad de fluorescencia de p-FAKY397 en células estimuladas con PDGF..... | 42 |
| Figura 9. MeHg inhibe la fosforilación de FAK ^{Y419} inducida por el PDGF | 43 |
| Figura 10. MeHg inhibe la fosforilación de SrcY419 inducida por el PDGF | 44 |
| Figura 11. Efecto del MeHg en la activación de Rac1 y Cdc42 en las células SHSY5Y estimuladas con PDGF. | 46 |
| Figura 12. Modelo sugerido de los efectos inducidos por el metilmercurio en las células SH-SY5Y estimuladas con PDGF..... | 54 |

Índice de tablas

| | |
|---------------|----|
| Tabla 1. | 4 |
| Tabla 2..... | 36 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| ADP | Adenosine diphosphate |
| AEP | Anterior entopeduncular area |
| AF | Adhesiones focales |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ASCT2 | Glutamine/amino acid transporter |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| ATSDR | Agency for toxic substances and disease registry |
| BDNF | Brain derived neurotrophic factor |
| BSA | Bovine serum albumin |
| Ca ²⁺ | Calcio |
| CCA | Comisión para la cooperación ambiental |
| Cdc42 | Cell division control protein 42 homolog |
| CGCs | Células gliales corticales |
| CP | Cortical plate |
| Crk | Adapter molecule Crk |
| CRM | Consejo de recursos minerales |
| CSF-1 | Colony stimulating factor 1 |
| CTCF | Corrected Total Cell Fluorescence |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| Dock180 | Dedicator of cytokinesis protein 1 |
| EC50 | Half maximal effective concentration |
| EGFr | Epidermal growth factor receptor |
| EGTA | Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid |
| ELMO1 | Engulfment and cell motility protein 1 |
| EPA | Enviromental Protection Agency |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase |
| ERM | Ezrin, radixin and moesin |
| FAK | Focal Adhesion Kinase |

| | |
|-------------------|--|
| FDA | Food and drug administration |
| FERM | Four-point-one, ezrin, radixin, moesin |
| GD | Gestation day |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| GEF | Guanine nucleotide exchange factor |
| GSH | Glutation |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| Hg | Mercurio |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| IGF | Insuline-like growth factor |
| IZ | Intermediate zone |
| LARG | Leukemia-associated Rho GEF) |
| LAT | L-amino acid transporter |
| LGE | Lateral ganglionic eminence |
| LIMK | LIM domain kinase |
| MEC | Matriz extracelular |
| MeHg | Metimercurio |
| MgCl ₂ | Cloruro de Magnesio |
| MGE | Medial ganglionic eminence |
| MLC | Myosin light-chain |
| MLCK | MLC kinase |
| MTT | (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) |
| MZ | Marginal zone |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaF | Fluoruro de sodio |
| Nck1 | Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 |
| NGF | Nerve growth factor |
| NHANES | National health and nutrition examination survey |
| NMDA | N-methyl-D-aspartate |

| | |
|-----------------------|---|
| N-WASP | Neural wiskott-aldrich syndrome protein |
| p130Cas | Crk-associated substrate, CAS |
| p65PAK | Serine/threonine-protein kinase 1 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| PAK | Serine/threonine protein kinase |
| Par6 | Partitioning-defective protein 6 |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| PDGFr | Platelet-derived growth factor receptor |
| PDZ | Discs-large homologous regions (DHR) |
| p-FAK ^{Y397} | FAK ^{Y397} fosforilada |
| PH | Pleckstrin homology domain |
| PI(4,5)P ₂ | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |
| PI3K | Phosphoinositide 3-kinase |
| PKC ζ | Atypical protein kinase C |
| PKL | Paxillin kinase linker |
| PLC- γ | Phospholipase C- γ |
| PND | Postnatal day |
| p-Src ^{Y419} | Src ^{Y419} fosforilada |
| PTB | Phosphotyrosine-binding domain |
| PTP-1 | Tyrosine-protein phosphatase |
| PTP-PEST | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride |
| Rac1 | Ras-related C3 botulinum toxin s substrate 1 |
| RGCs | Radial glial cells |
| RhoA | Ras homolog gene family, member A |
| RIPA buffer | Radioimmunoprecipitation assay buffer |
| ROCK | RhoA kinase |
| ROS | Reactive oxigen species |
| SDS | Sodium dodecyl sulfata |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SFKs | Src Family |

| | |
|-----------------|--|
| SH- | Grupos sulfhidrilo |
| SH2 | Src homology 2 |
| SH3 | Src homology 3 |
| SH4 | Src homology 4 |
| SHP-2 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 |
| SP | Subplate |
| Src | Proto oncogene tyrosine protein kinase, Src |
| SVZ | Sub-ventricular zone |
| Ton | Toneladas |
| TRITC-faloidina | Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate |
| Vav2 | Guanine nucleotide exchange factor |
| VZ | Ventricular zone |
| WASP | Wiskott-aldrich syndrome protein |
| WHO | World health organization |
| Y | Tyrosine |
| ZF21 | Zinc finger FYVE domain-containing protein 21 |
| β -PIX | p21-activated kinase [Pak]-interacting exchange factor |

1 Introducción

1.1. Mercurio

1.1.1 Generalidades

El mercurio (Hg) es un metal que se presenta ubicuamente en el ambiente principalmente en 3 formas: mercurio metálico (conocido como mercurio elemental), mercurio inorgánico (Hg^{1+} , Hg^{2+}) y mercurio orgánico cuya especie más común es el metilmercurio (MeHg) (ATSDR, 1999). El MeHg es de particular interés debido a que puede bioacumularse y biomagnificarse en peces y mamíferos marinos. A lo largo de la historia, el Hg ha tenido diversos usos como en la producción de sosa cáustica, gas clorado o en la extracción de oro y plata; también este metal es utilizado en la elaboración de amalgamas, termómetros, barómetros, baterías e interruptores eléctricos (ATSDR, 1999).

1.1.2 Fuentes de exposición

La exposición a metilmercurio (MeHg) se da por fuentes naturales y antropogénicas. Entre las fuentes antropogénicas que han sido identificadas están las plantas cloro-álcali (las cuales descargan los desechos que contienen Hg inorgánico en cuerpos de agua), la combustión de combustibles fósiles, la incineración de desechos sólidos. Adicionalmente, la contaminación de los sedimentos acuáticos ocurre alrededor del mundo debido a la actividad minera para la extracción de oro en donde son usadas grandes cantidades de mercurio (Clarkson, 2002). Por otra parte, las erupciones volcánicas son una de las principales fuentes naturales de emisión de este metal (Fitzgerald y Clarkson, 1991). Se estima que aproximadamente 15 000 toneladas se liberan por año.

1.1.3 Normatividad del MeHg

En peces para su comercialización y consumo humano, la agencia de sustancias tóxicas y registro de enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés, 1999) ha establecido una concentración máxima de 1 ppm de MeHg. Hoy en día la dosis de referencia corresponde a 0.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$, aunque en décadas anteriores la WHO (World Health Organization por sus siglas en inglés) había establecido una dosis

de referencia de 0.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ (equivalente el consumo tolerable semanal de 30 $\mu\text{g Hg}/\text{Kg}/\text{día}$), que corresponden a niveles de 5.8 $\mu\text{g Hg}/\text{L}$ en sangre y 1.4 $\mu\text{g Hg}/\text{g}$ en cabello (Clarkson and Magos, 2006). Cabe destacar que la dosis de referencia de la agencia de protección ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) se basó en estudios en la etapa prenatal, etapa en la cual el cerebro se encuentra en desarrollo. Con lo que respecta a la normatividad mexicana, la NOM-027-SSA1-1993, describe que el límite máximo permisible de MeHg en pescados es de 0.5 ppm, sin embargo, este análisis se debe de realizar siempre y cuando el mercurio total supere el nivel de referencia establecido que es de 1 ppm.

1.1.4 Mercurio en México

1.1.4.1 Oferta y demanda

Durante el periodo 2001-2007 existió una oferta aparente de 216.46 toneladas de Hg secundario, es decir, 30.86 toneladas anuales en promedio. Cabe destacar que también hay una producción primaria, aunque a pequeña escala y no reconocida oficialmente, por lo que aún no se ha cuantificado (Castro, 2011). De acuerdo con el consejo de recursos minerales (CRM), desde 1994 no se ha reportado la extracción primaria de Hg en México y oficialmente las actividades se suspendieron por la caída de los precios de Hg resultantes de la decreciente demanda del metal. Los principales estados donde se ha extraído mercurio son: Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas. Basándose en datos de emisiones y en datos oficiales sobre producción en 1999, se ha estimado que las emisiones anuales generadas por el sector de extracción y refinación de oro son del orden de 11.27 toneladas, mientras que el sector de fundiciones de metales ferrosos y no ferrosos contribuye con 1.89 toneladas (Asociados, 2001). Durante el periodo 2005-2008, México exportó a América Latina 93.8 toneladas de Hg: 2005 (5.9 ton), 2006 (8.1 ton), 2007 (21.3 ton) y 2008 (58.3 ton). Durante el mismo periodo México importó 67 toneladas de Estados Unidos. Este mismo autor señala que las posibles reservas de mercurio en México rondan las 26,892.339 toneladas distribuidas en los estados de: Zacatecas (14,902 ton), Querétaro (11,570 ton)) (Castro, 2011). A

continuación se presentan los principales productos y procesos que presentan los mayores volúmenes de Hg en México: 1) Sector biofarmacéutico y de producción de sustancias químicas, 2) Sector de servicios dentales y hospitalarios, 3) Sector de fabricación de equipo, aparatos y componentes eléctricos, 4) Sector de servicios profesionales, científicos y técnicos, 5) Sector de fabricación de productos diversos, 6) Sector de fabricación de computadoras y aparatos electrónicos (Castro, 2011).

1.1.4.2 Contenido de mercurio en peces en México

Debido a que la principal vía de exposición a MeHg se da por vía oral por el consumo de peces y mamíferos marinos, se han realizado diversos estudios para conocer la concentración de Hg en diversos peces a lo largo del territorio nacional. Boucher (2013) describió el contenido de Hg en diversas especies de peces a lo largo de la república mexicana. En este estudio se recopiló información de diferentes trabajos: estudio de un mercado de Veracruz (datos de la Université du Québec à Montréal y la universidad de Ottawa), el informe sobre la literatura gris de la Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA), un estudio sobre el lago de Zapotitlan y el estudio Raptor (datos del servicio canadiense de vida silvestre). En la siguiente tabla se describen los resultados encontrados:

Tabla 1. Contenido de mercurio en diversas especies de peces en México

| Estado | Especies analizadas | Muestras analizadas | Especies con Hg superior a 0.25 ppm | Especies con nivel más alto de MeHg |
|--------------------|---------------------|---------------------|---|-------------------------------------|
| Sonora | 4 | 22 | Bagre congo, Medregal amarilla | Medregal cola amarilla (0.76 ppm) |
| Baja California | 2 | 33 | Ninguna | Brótola negra (0.14 ppm) |
| Sinaloa | 27 | 292 | Jurel toro, faja, burro papagallos, delgado, tiburón, pámpano | Jurel toro (0.66 ppm) |
| Nayarit | 4 | 28 | Ninguna | Sardinias (0.24 ppm) |
| Jalisco | 5 | 148 | Ninguna | Sierra del Pacífico |
| Colima | 1 | 48 | Ninguna | 0.05 ppm (no menciona la especie) |
| Oaxaca | 2 | 7 | Ninguna | Chulin (0.13 ppm) |
| Campeche | 4 | 17 | Ninguna | Bagre (0.13 ppm) |
| Veracruz | 6 | 45 | Ninguna | Chhucumite (0.18 ppm) |
| Veracruz (mercado) | 12 | 12 | Mojarron mexicana, barracuda | Mojarron (1.88 ppm) |

Como se observa en la tabla 1, dos especies sobrepasan el límite establecido por la norma canadiense que es de 0.5 ppm: el medregal cola amarilla de Sonora y el jurel toro de Sinaloa, mientras que en Veracruz el mojarron sobrepasa el límite

establecido por la administración de alimentos y medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) que es de 1 ppm.

1.1.4.3 Estudios poblacionales

De Lourdes Soto-Ríos et al., (2010) evaluaron en mujeres mayores de 12 años la variabilidad del mercurio urinario que está asociado con las diversas fuentes y formas de mercurio ambiental en distintas regiones de México donde existen niveles elevados de Hg. Describió que la edad es un factor determinante en los niveles de mercurio en orina, ya que mujeres con mayor edad tenían concentraciones más elevadas de Hg, también observó que las personas que residen en los sitios más contaminados tenían niveles más altos de creatinina (41%) que las personas residentes de los sitios menos contaminados. Este efecto puede ser explicado en gran parte debido a que la creatinina es uno de los productos de residuo metabólico y se acumula en la misma proporción que el número de nefronas destruidas por lesiones renales progresivas cuando los individuos están expuestos a niveles elevados de mercurio ambiental (EPA, 1997)

Basu y colaboradores (2014) determinaron niveles de Hg en sangre de cordón umbilical en mujeres embarazadas en la ciudad de México. En dicho estudio se detectó una concentración media de Hg de 4.7 $\mu\text{g/L}$ y un valor de 7.6 $\mu\text{g/L}$ correspondiente al percentil 90. Los autores compararon los resultados obtenidos con diversos estudios alrededor del mundo, observando que los niveles de Hg detectados son elevados, sin embargo, estos son menores comparados con los niveles encontrados en grupos sensibles como los consumidores frecuentes de pescado. Asimismo, en sangre materna se encontró una concentración promedio de Hg de 3-4 $\mu\text{g/L}$ y un valor de 5.2-6.6 $\mu\text{g/L}$ correspondiente al percentil 90, valores que resultaron mayores que las concentraciones encontradas en mujeres de Estados Unidos expuestas a Hg. La mediana de la concentración de mercurio en mujeres en edad reproductiva (16-49 años) según el National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) es de 0.86 $\mu\text{g/L}$ (CDC, 2004), valor es levemente más alto que los valores mínimos encontrados y más bajo que el valor correspondiente al percentil 10 reportado en este estudio. A partir del estudio de

Basu et al., (2014) demostró que las mujeres embarazadas de la ciudad de México tienen niveles 3-4 veces más altos que las mujeres estadounidenses. La EPA ha establecido una dosis de referencia de 5.8 µg/L en sangre de cordón umbilical. También en el estudio de Basu et al., (2014) se determinó que 28.6-39.2 % de las participantes excedieron este parámetro. Asimismo, se evaluaron los niveles de Hg en sangre, orina y cabello de los niños recién nacidos y se encontró que los valores de los 3 biomarcadores fueron 3-5 veces más altos que los reportados en Estados Unidos (CDC, 2013; McDowell et al., 2004) y Canadá (Wong and Lye, 2008).

1.1.5 Toxicocinética del MeHg

Cerca del 95% de MeHg que ingresa al organismo por vía oral, es absorbido en el tracto gastrointestinal, sin embargo, se desconoce el sitio exacto de absorción, posteriormente el organometal se distribuye en todos los tejidos en un lapso aproximado de 30 h, cerca del 5% se encuentra en la sangre y 10% en el cerebro (Clarkson, 2002). Asimismo, el MeHg es capaz de atravesar la barrera placentaria y los niveles en el cerebro fetal son de 5 a 7 veces mayores que en la sangre materna (Cernichiari et al., 1995). Se ha descrito que el MeHg tiene una elevada afinidad hacia los grupos sulfhidrilo (SH-) ó aminoácidos que contienen grupos tioles, dicha afinidad llega a ser del orden de 10^{15-23} (Aschner and Aschner, 1990). El transporte del MeHg después de una inyección subcutánea está estrechamente relacionado con su unión al grupo tiol del aminoácido cisteína, formando un complejo en el cual los enlaces del átomo de mercurio se unen a los átomos de hierro y azufre formando un ángulo de 180° creando así una estructura similar a la del aminoácido metionina (Clarkson, 1995), de esta manera el MeHg cruza la barrera hemato-encefálica, mimetizando un sustrato de los transportadores de aminoácidos neutros (LAT, por sus siglas en inglés) (Simmons-Willis et al., 2002). LAT1 y LAT2 se encuentran expresados en numerosos tejidos, incluyendo el cerebro y median el transporte de los aminoácidos neutros, pero cabe destacar que LAT1 es altamente expresado en las membranas luminales y abluminales de las células endoteliales que forman la barrera hemato-encefálica (Duelli et al., 2000; Matsuo et al., 2000). Respecto al metabolismo del MeHg, este es

pobremente metabolizado a su forma inorgánica principalmente por la microflora en los intestinos (se estima que cerca del 1% del total de MeHg se elimina por esta vía). Además la desmetilación también puede ocurrir en células fagocíticas, sin embargo el mecanismo es desconocido (Clarkson, 2002). Finalmente, este compuesto puede entrar al ciclo enterohepático ya que es secretado en la bilis y es reabsorbido parcialmente en la recirculación portal regresando al hígado, sin embargo, la mayoría del MeHg es eliminado mediante las heces (90%). La excreción urinaria de MeHg es despreciable, ya que es menor al 10% de la excreción total. El MeHg tiene una vida media de 70 días.

1.1.6 Mecanismos de toxicidad

El MeHg tiene una elevada afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas, existen células como las células de Purkinje que contienen niveles elevados de grupos SH- los cuales actúan como sitios inertes secuestrando al Hg y disminuyendo así su toxicidad en la célula, y por tanto incrementando la tolerancia al metal (Passow et al., 1961; Rothstein, 1959). Asimismo, se reportó que los niveles de metalotioneina aumentaron después de la exposición a MeHg en células gliales de Bergmann, células de Purkinje, astrocitos y células gliales de la materia blanca, mientras que en células granulares no se observó cambio (Leyshon-Sorland et al., 1994). Cabe destacar que las metalotioneinas contienen un nivel elevado de cisteínas las cuales dan a la proteína una elevada capacidad para quelar metales debido a que se unen a los grupos SH-, entonces las metalotioneinas son importantes para reducir la unión del MeHg a grupos SH- funcionalmente críticos.

Otro de los mecanismos por los cuales el MeHg induce toxicidad es la generación de especies reactivas de oxígeno y la disminución del glutatión (GSH). El balance entre procesos oxidantes o reductivos es crítico para la toxicidad inducida por el MeHg. Se ha descrito una disminución en los niveles de GSH y un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) después de la exposición a MeHg (Sarafian and Verity, 1991). El incremento de GSH en astrocitos corticales, en comparación con los niveles en astrocitos cerebelares,

disminuye la producción de ROS inducidos por el MeHg (Kaur et al., 2007). Entonces, los cambios en la concentración de MeHg junto con la modulación de los niveles de GSH pueden explicar en parte, el incremento en la susceptibilidad de ciertos tipos celulares hacia el estrés oxidante inducido por el MeHg (Kaur et al., 2007). Se ha descrito que el MeHg inhibe al transportador de amino ácidos neutros (ASCT2, por sus siglas en inglés) (Oppedisano et al., 2010). Este transportador tiene como substratos a L-serina, L-glutamina, L-cisteína y L-glutamato, por lo tanto tiene un papel primordial en los niveles de GSH intracelular (Gliddon et al., 2009). Cabe destacar que el MeHg es capaz de acumularse en astrocitos, esto puede contribuir a una inhibición en el influjo de glutamato a la célula y estimular su eflujo (Allen et al., 2001; Qu et al., 2003). Esto resulta en un incremento en los niveles de glutamato en el fluido extracelular ocasionando un daño excitotóxico en las neuronas.

Por otra parte, el calcio (Ca^{2+}) juega un papel primordial en la viabilidad celular ya que un aumento en los niveles intracelulares Ca^{2+} promueve la muerte celular vía apoptosis o necrosis. Incrementos de los niveles de Ca^{2+} han sido encontrados en varios tipos celulares después de la exposición a MeHg (Fahrion et al., 2012). Cabe destacar que bajas concentraciones de MeHg ($0.2\text{-}5\ \mu\text{M}$) causan incrementos prolongados de Ca^{2+} en el citosol (Marty and Atchison, 1997), el cual se ha planteado, puede ser un efecto secundario a los incrementos de glutamato extracelular (Aschner et al., 2007). Como se mencionó, el glutamato es un blanco molecular del MeHg lo cual conlleva a una excitotoxicidad de la célula durante el desarrollo del sistema nervioso central. Este efecto inducido por el MeHg en la vía glutamatérgica puede interferir en la proliferación y diferenciación celular. Cabe destacar que el MeHg incrementa la respuesta de los receptores NMDA lo cual puede hacer a las neuronas corticales más susceptibles a la neurotoxicidad del MeHg. En síntesis, se ha propuesto que uno de los mecanismos de neurotoxicidad del MeHg, es el incremento de los niveles de glutamato extracelular, y la sobreactivación de los receptores NMDA (N-methyl-D-aspartate), lo que ocasiona un influjo de Ca^{2+} en las neuronas permitiendo la activación de vías involucradas en la muerte celular.

El citoesqueleto es una estructura susceptible a la toxicidad del MeHg. En la red del citoesqueleto, los microtúbulos juegan un rol crucial en múltiples eventos como el transporte dendrítico y axonal, el crecimiento y la diferenciación neuronal, el mantenimiento estructural y la migración celular (Choi et al., 1980). El MeHg a concentraciones micromolares es capaz de unirse a los grupos SH-microtubulares, causando una depolimerización que resulta en un desensamble de los microtúbulos, causando una degeneración neuronal (Choi et al., 1980; Sager et al., 1983). Asimismo, en un estudio proteómico de células gliales corticales (CGCs) expuestas a concentraciones de MeHg menores a 1 μM por varios días reveló que el MeHg puede afectar el balance entre la forma fosforilada y no fosforilada de cofilina, una proteína encargada de disociar los polímeros de F-actina (Vendrell et al., 2010) para promover la formación de protrusiones. De igual manera, se ha descrito que la inhibición de la vía Rho/ROCK restaura la incoordinación de la extensión/retracción neurítica además previene la degeneración neuronal y apoptosis de las células neuronales expuestas a MeHg 100 nM (Fujimura et al., 2011).

1.1.7 MeHg altera la migración neuronal

Estudios epidemiológicos realizados desde la década de los 50s han asociado la exposición a MeHg con una variedad de efectos que van desde alteraciones en el comportamiento infantil, hasta la muerte. (NRC, 2000). De acuerdo con los casos reportados a partir del desastre de Minamata, se describieron alteraciones en la migración neuronal y en la organización cortical laminar en las cortezas cerebrales y cerebelares de sujetos expuestos a MeHg (Choi et al., 1978).

Diversos estudios han demostrado que la exposición prenatal a MeHg resulta en la aparición de efectos adversos en el desarrollo del cerebro y la organización, comparado con el daño relativamente restringido observado cuando la exposición ocurre en la etapa adulta (Choi et al., 1978; Hamada et al., 1993; Matsumoto et al., 1965).). Kunimoto y Suzuki (1997) demostraron que la migración de las células granulares hacia la capa granular interna es inhibida por el MeHg en cultivos organotípicos de cerebelo de ratón de manera dosis dependiente (3-10 μM).

Estudios *in vivo* e *in vitro*, monitoreando el movimiento celular, mostraron que el MeHg inhibe la migración de las células granulares de manera concentración dependiente, independiente del modo de migración. Adicionalmente se encontró que los efectos inhibitorios del MeHg en la migración de las células granulares incrementa por el aumento en las frecuencias de los picos de Ca^{2+} vía cAMP e IGF (insuline-like growth factor) (Fahrion et al., 2012). Guo y colaboradores (2013) observaron alteraciones en la laminación de la neocorteza de ratas expuestas a MeHg a dosis de 0.1 mg/kg/día y 1 mg/kg/día. La exposición *in utero* a MeHg (0.1-1mg/kg/día) disminuyó la expresión de Rac1, Cdc42 y RhoA, las cuales juegan papeles críticos en la migración de neuronas cerebrocorticales durante etapas tempranas del desarrollo del cerebro, sugiriendo que las alteraciones del MeHg en la laminación de la neocorteza se puede deber a defectos en las vías de señalización de las Rho GTPasas.

1.2 Migración neuronal

La migración neuronal es un proceso indispensable durante el desarrollo del sistema nervioso central, en el cual neuronas jóvenes se desplazan hacia la superficie para la formación de las diferentes estructuras y circuitos neuronales del cerebro. En este proceso las neuronas que se generaron primero ocupan las capas más profundas y las neuronas generadas al último ocupan las capas más superficiales. Las neuronas surgen del epitelio proliferativo que cubre el espacio ventricular, a través del tubo neural, esta área es conocida como la zona ventricular (VZ, por sus siglas en inglés); ahí las neuronas nacientes (neuronas excitatorias e interneuronas) desarrollan 2 tipos de movimientos para desplazarse: migración radial y migración tangencial (Hatten, 1993; Marín and Rubenstein, 2003). Las neuronas excitatorias son generadas en la zona proliferativa del telencéfalo dorsal y migran radialmente para formar la neocorteza, mientras que las interneuronas inhibitorias se producen en la zona proliferativa del telencéfalo ventral y migran tangencialmente hacia la neocorteza en donde se co-ensamblan con las neuronas excitatorias para formar circuitos funcionales. Se ha descrito que la principal forma de movimiento de las neuronas ocurre como migración radial, un tipo de movimiento muy importante para el desarrollo de las regiones corticales

(Pestronk, 1997). En este proceso juegan un papel importante las neuronas postmitóticas y las fibras gliales radiales debido a que sirven como andamio para las migraciones direccionadas en el cerebro; diversos estudios han demostrado que el 80-90% de los precursores neuronales en la corteza de mamíferos migran a través de la glia radial (Gao and Hatten, 1993; Hatten, 1993; Rakic, 1971a, 1971b). Durante el desarrollo, las células gliales asumen formas y funciones que apoyan el desarrollo de las neuronas, además de que son la vía primaria para las migraciones dirigidas (Rakic, 1972). En la migración radial, las neuronas se desplazan de manera perpendicular a la superficie ventricular a través de las fibras gliales radiales (RGCs, por sus siglas en inglés) que actúan como andamio ó como “sustrato” para el movimiento de las neuronas. Las RGCs además de que juegan un papel fundamental en la migración radial, son precursores de las neuronas piramidales (Noctor et al., 2001). El soma de las RGCs se encuentra en la zona ventricular, mientras que las extensiones de su membrana cruzan toda la neocorteza en desarrollo; esto es aprovechado por las neuronas que están en locomoción ya que usan estas fibras como una guía para llegar a la placa cortical (CP) (Campbell and Gotz, 2002; Rakic, 1971a) (Figura 1A). Durante el proceso de migración radial, la neurona experimenta 3 procesos principales que les permite el desplazamiento: 1) la extensión del frente director que explora el ambiente inmediato a través de la detección de señales de atracción o repulsión, 2) nucleocinesis ó el movimiento del núcleo hacia el frente director, y 3) la retracción de la parte trasera de la célula. La extensión del proceso director esta mediado por la polimerización y reorganización de los microfilamentos de actina los cuales son controlados por las Rho GTPasas (de Curtis, 2001; Ridley, 2001a). Además, los microtúbulos también son fundamentales para la nucleocinesis (Lambert de Rouvroit y Goffinet, 2001) y durante este proceso, el núcleo se mueve en dirección del frente director de la células por mecanismos que involucran la participación de microtúbulos y de otras proteínas motoras como la miosina. Todo ello resultando en la formación de un frente director corto y un proceso trasero largo (trailing process) (Morris et al., 1998). Por otra parte, las neuronas (interneuronas) que migran de manera tangencial se mueven de manera paralela a la superficie

ventricular y ortogonal a la glía radial, este movimiento lo realizan hasta alcanzar la neocorteza dorsal; a partir de ese momento migran radialmente hasta llegar a su posición laminar final (Lavdas et al., 1999; Nery et al., 2002)(Figura 1B). En este tipo de migración no son necesarias las fibras gliales radiales, entonces las interneuronas migran hacia la corteza de manera tangencial por rutas ya establecidas en la zona marginal (MZ, por sus siglas en inglés), en la subplaca (SP, por sus siglas en inglés) y la zona intermedia/zona subventricular (IZ/SVZ) (Lavdas et al., 1999). La habilidad para que estas interneuronas migren tangencialmente se debe a que se generan diversas ramificaciones del proceso director y este puede estar unido a una guía. Aquí juegan un papel muy importante los quimioatrayentes y los quimiorepelentes ya que inducen de manera parcial la formación de nuevos frentes directores orientados a favor ó en contra de la dirección que tome la interneurona respecto a la molécula fuente (Martini et al., 2009; Ward et al., 2005). Esto permite que las neuronas cambien rápidamente de dirección sin la reorientación de las ramificaciones ya existentes. Se ha descrito que las neuronas que migran tangencialmente pueden hacerlo en grupo, como es el caso de las interneuronas del bulbo olfatorio ó individualmente como las interneuronas corticales y las células Cajal-Retzius.

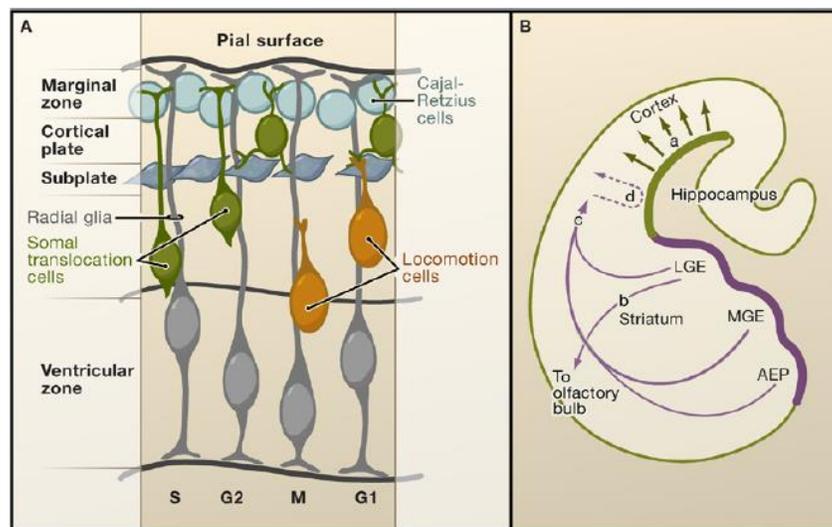


Figura 1. Organización de la corteza cerebral. A) Neuronas que nacen de las células gliales radiales (RGCs) en la zona ventricular y migran radialmente a través de las fibras gliales radiales

hacia la superficie, estas neuronas siguen principalmente 2 distintas formas de migración: translocación somal ó locomoción. B) Principales rutas de la migración tangencial y radial. Las neuronas piramidales migran radialmente de la zona ventricular dorsal (a). interneuronas que surgen de estructuras del subpallium como lo son la eminencia gangliónica lateral (LGE, por sus siglas en inglés), eminencia gangliónica media (MGE, por sus siglas en inglés) y el área entopeduncular anterior (AEP, por sus sigles en inglés), y migran radialmente dentro del bulbo olfatorio (c y d) ó a la corteza (b), cuando las interneuronas llegan a la neocorteza algunas se dirigen a la zona ventricular antes de migrar radialmente a la corteza (tomado de Ayala et al., 2007).

1.3 Protrusiones, indispensables para la migración celular

Los filamentos de actina están intrínsecamente polarizados con segmentos que crecen rápidamente y segmentos que crecen de manera lenta y esta polaridad inherente es utilizada para conducir a la protrusión. Sin embargo, la organización de los filamentos depende del tipo de protrusión. En el lamelipodio, los filamentos de actina forman una red dendrítica ramificada, mientras que en el filopodio están organizados en paquetes largos paralelos (Welch and Mullins, 2002). A continuación se describe, a grandes rasgos, el proceso de la formación de protrusiones en el frente director (Figura 2): 1) Comienza con la recepción de señales extracelulares para activar receptores, 2) las vías de señalización asociadas a estos receptores activan a las Rho GTPasas y PIP₂ que a su vez, 3) activan a proteínas de la familia WASP/Scar, 4) estas proteínas se unen y activan al complejo Arp 2/3 el cual comienza con la polimerización de F-actina en ramificaciones ya existentes para formar nuevos filamentos, 5) el rápido crecimiento de los filamentos nacies en las ramificaciones 6) los filamentos empujan la membrana hacia adelante. 7) las proteínas “capping” o de cubierta, finalizan el crecimiento de los extremos nascentes, 8) los filamentos van envejeciendo debido a la hidrólisis de ATP unido a cada subunidad de actina seguido de la disociación de un fosfato, 9) ADF/cofilina promueve la disociación para que posteriormente ADP-actina se disocie del filamento nascente, 10) la proteína llamada profilina cataliza el intercambio de ADP por ATP y 11) promueve la movilización de G-actina-ATP a las pozas citoplasmáticos de esta proteína que todavía se encuentra unida a profilina, la cual está lista para servir como monómero para polimerizar los filamentos nascentes. 12) Rho GTPasas también

activan a PAK y LIMK, las cuales fosforilan a ADF/cofilina, permitiendo el recambio de los filamentos (Pollard y Borisy, 2003).

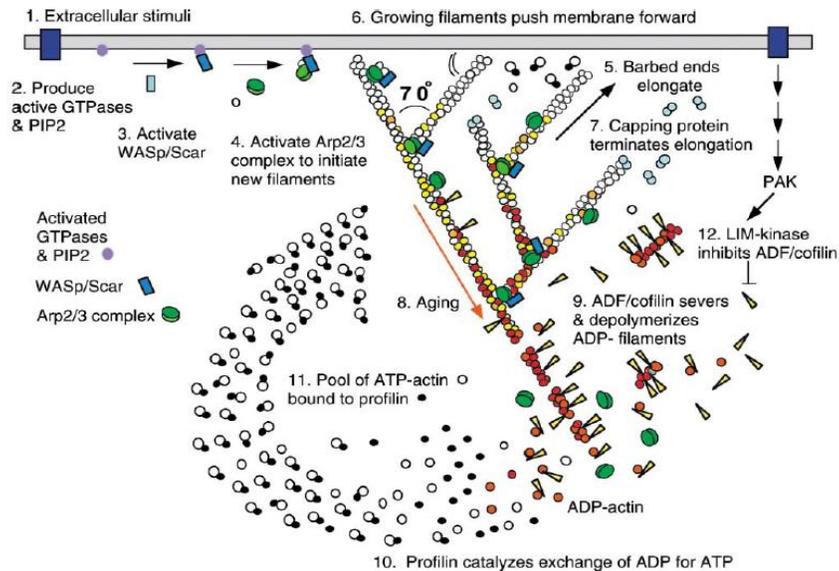


Figura 2. Organización y participación de las diferentes proteínas involucradas en la formación de los filamentos de actina durante la formación de protrusiones (tomado de Pollard y Borisy, 2003).

1.4 La dinámica de las adhesiones focales promueve el movimiento celular

Al igual que la formación de protrusiones, el recambio de las adhesiones focales es un proceso fundamental para la regulación de la migración celular y otros procesos fundamentales como la proliferación, supervivencia, morfología y diferenciación. En este complejo multi-proteico participan diversas proteínas adaptadoras como: talina, paxilina, tensina, p130Cas (crk-associated substrate, p130Cas) y α -actinina las cuales proveen fuertes uniones con el citoesqueleto de actina conectando a las células con la matriz extracelular (MEC) (Burridge et al., 1992; Geiger et al., 2001; Gluck and Ben-Ze'ev, 1994; Horwitz et al., 1986; Humphries et al., 2007). Esta unión mejora la generación de la tensión necesaria para alterar la morfología celular y la fuerza de tracción necesaria para mover a la célula durante la migración (Nagano et al., 2012). Asimismo, diversas proteínas de señalización son reclutadas cuya función es transmitir señales desde la matriz extracelular hacia las vías que controlan el movimiento celular. Cabe destacar que existen 2 proteínas que juegan un rol primordial en estos procesos: FAK (focal

adhesion kinase, por sus siglas en inglés) y Src (Proto oncogene tyrosine protein kinase, Src). FAK y Src actúan como interruptores (switches) moleculares que disparan una gran variedad de respuestas celulares vía los complejos de adhesión.

La formación de los complejos de adhesión comienza con la adhesión de las células a la matriz extracelular. Aquí, una gran variedad de proteínas están involucradas en la adhesión celular mediada por las integrinas, formando el adhesoma (Whittaker et al., 2006; Zaidel-Bar, 2009; Zaidel-Bar et al., 2007) cuya vida es muy corta. Entonces la adhesión de estas células promoverá una morfología extendida. En contraste, la desestabilización de las adhesiones reducirá la adhesión a la matriz extracelular promoviendo una morfología celular redonda no adherente. Durante la migración celular, las adhesiones focales (AF) se unen a la matriz extracelular para generar fuerzas que empujen a la célula hacia adelante, posteriormente, las células se liberaran de la MEC para continuar con el movimiento celular (Nagano et al., 2012). La migración direccional requiere una continua y coordinada formación y recambio de AF en el frente director de la célula y la liberación de las adhesiones en la zona trasera de las células (Broussard et al., 2008; Webb et al., 2002). El agrupamiento de integrinas es el paso inicial para la adhesión celular y es estabilizada para formar las AF por la unión de las fibras de estrés, en contraste, la extensión de microtúbulos en las AF promueve el desensamble de estas e induce la subsecuente internalización de integrinas (Ezratty et al., 2009, 2005).

1.5 Proteínas críticas en el movimiento celular

1.5.1 Rho GTPasas, reguladoras en la organización de actina.

Como se ha descrito, las Rho GTPasas son proteínas indispensables para la dinámica de actina. En los humanos existen aproximadamente 20 GTPasas, de las cuales, RhoA, Rac1 y Cdc42 son las más estudiadas (Heasman y Ridley, 2008). Estas proteínas pertenecen a la gran familia de Ras. Las Rho GTPasas son reguladores pivote de la actina, de la organización de la adhesión y el control para

la formación del filopodio y lamelipodio. Están reguladas por la unión a GTP (guanosine triphosphate, por sus siglas en inglés) y GDP (guanosine diphosphate, por sus siglas en inglés); cuando se unen a GTP, estas proteínas son activadas e interactúan río abajo con sus proteínas efectoras, las cuales pueden ser cinasas, enzimas modificadoras de lípidos, y activadores del complejo Arp2/3 (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Las Rho GTPasas son activadas por GEFs (guanine nucleotide exchange factors, por sus siglas en inglés), los cuales catalizan la liberación de GDP e inducen la unión a GTP, regulando a las GTPasas para que interactúen con sus efectores (Rossman et al., 2005) e inactivadas por GAPs (GTPase activating proteins, por sus siglas en inglés), las cuales promueven la hidrólisis de GTP (figura 3).

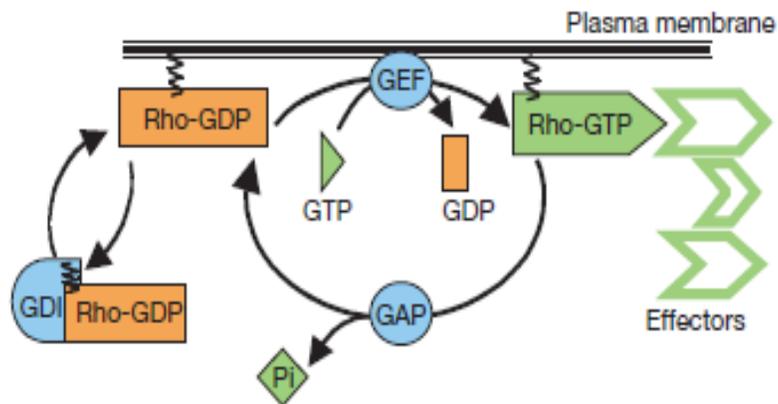


Figura 3. Ciclo de activación y desactivación de las Rho GTPasas (tomado de Etienne-Manneville, 2002).

Asimismo, Rho A (Ras-homologous member A, por sus siglas en inglés) actúa como un “switch” molecular para vías particulares de transducción de señales asociadas a receptores de la membrana con el citoesqueleto. Por su parte, Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, por sus siglas en inglés) puede ser activado por distintos agonistas (PDGF, insulina, etc.) permitiendo el ensamble de una red de filamentos de actina en la periferia de la célula para formar el lamelipodio. En tanto, Cdc42 (Cell-division cycle 42, por sus siglas en inglés)

participa en la inducción de protrusiones ricas en actina en la superficie llamados filopodios (Nobes y Hall, 1995). A continuación, se describen las principales funciones de Rho, Rac y Cdc 42.

1.5.2 RhoA

La señalización de Rho permite la polimerización de actina, depolimerización, y la contracción de acto-miosina. Esta proteína se une a ROCK (Rho-associated protein kinase 1, por sus siglas en inglés) e induce la contracción de acto-miosina a través de la fosforilación de MLC (Myosin light-chain, por sus siglas en inglés), regulando la retracción de la cola celular (Pertz et al., 2006). Las vías específicas neuronales activadas por RhoA no han sido completamente elucidadas, aunque efectores clave como ROCK han mostrado un papel importante en el remodelamiento de actina en el cono de crecimiento neuronal. Además de que ROCK y MLCK (MLC kinase, por sus siglas en inglés) fosforilan a la familia de proteínas ERM (ezrin, radixin and moesin, por sus siglas en inglés) para activar su función como conectores entre F-actina y múltiples proteínas transmembranales, las cuales estabilizan la red de actina cortical (Niggli and Rossy, 2008). En las neuronas, la activación de RhoA se cree que permite el colapso a través de la contracción de la miosina, pero también aumentando la activación de cofilina a través de ROCK-LIMK (LIM-domain-containing kinase, por sus siglas en inglés) (Govek et al., 2005). Cabe señalar que cofilina incrementa la disociación de las subunidades de los extremos finales de los filamentos (Carlier y Pantaloni, 1997) y actúa principalmente en F-actina bloqueando la elongación de las ramificaciones (Pollard, 2007). Por otra parte, se sabe que las fibras de estrés y los complejos de adhesión son ensamblados cuando Rho es activado. La actividad de Rho es requerida para mantener las adhesiones focales en las células adheridas.

1.5.3 Rac1 y Cdc42

Rac1 y Cdc42 son proteínas requeridas para la migración celular, una de las funciones de Rac1 es generar fuerzas protrusivas (lamelipodios) a través de la polimerización localizada de actina, asimismo, Cdc42 induce la polimerización de

actina para generar filopodios en el frente director de las células en proceso migratorio (Nobes y Hall, 1995). Se ha descrito que p65PAK (serine/threonine-protein kinase 1) es activada por Rac1 o Cdc42 y se cree que esta proteína tiene un papel importante en la regulación de la dinámica de actina y la adhesión celular durante la migración. Por otra parte, los miembros de la familia WASp/SCAR/WAVE también son reguladores de la polimerización de actina. En su estado activado estas proteínas estimulan el complejo Arp2/3, el cual inicia la polimerización de actina ya sea *de novo*, en los filamentos finales o en los ya existentes. Debido a esta dinámica, se genera la morfología dendrítica de la actina lamellipodial (Weaver et al., 2003). Cdc42 activa directamente a WASP (wiskott-aldrich syndrome protein) y N-WASP (neural wiskott-aldrich syndrome protein), aunque el lípido PI(4,5)P₂ es un cofactor esencial (Rohatgi et al., 2000). Asimismo, Rac1 activa la familia Scar/WAVE indirectamente y esto envuelve al complejo adaptador Nck1 (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1) (Eden et al., 2002).

Cabe destacar que Cdc42 juega un papel crucial en la polaridad celular con respecto al ambiente externo, un estudio realizado por Ridley (2001b) describió que la inhibición de Cdc42 en macrófagos bloquea la habilidad de estos de estar bajo quimiotaxis hacia el gradiente de CSF-1 (colony stimulating factor 1), aunque no se inhibe el movimiento. Aún se desconoce el mecanismo por el cual Cdc42 regula la quimiotaxis, sin embargo, un trabajo realizado por Weiner et al., (2002) en neutrófilos sugiere que existe una regulación positiva entre Rac1 y PIP₃, requerido para establecer una asimetría celular y polaridad, y es probable que Cdc42 organice estas actividades con respecto a un gradiente quimiotáctico externo. Por otra parte, Cdc42 regula la reorientación de los microtúbulos y el centrosoma (Etienne-Manneville y Hall, 2001; Nobes y Hall, 1999). En su estado activo, Cdc42 activa a Par6 (partitioning-defective protein 6) y la proteína cinasa C atípica (PKC ζ , por sus siglas en inglés) La activación específica de este complejo en el frente director de las células es esencial para determinar la orientación de la célula durante la migración.

1.5.4 FAK

FAK (focal adhesión kinase, por sus siglas en inglés) es una proteína tirosina cinasa la cual está involucrada en diversos procesos celulares, aquí se mencionarán aquellos relacionados con la migración celular. FAK es capaz de reclutar a diversas proteínas en regiones cercanas a la membrana en donde se encuentran las integrinas; el complejo formado transmitirá señales de la MEC hacia el citoesqueleto a través de las integrinas (Cox et al., 2006) o vías de señalización asociadas a los receptores de algunos factores de crecimiento como PDGFr y EGFr. El dominio amino-terminal de FAK (dominio FERM) es el responsable de las interacciones con las integrinas así como con EGFr y PDGFr (Sieg et al., 2000). Por otra parte, el dominio carboxilo-terminal contiene sitios de unión para proteínas que participan en el complejo de adhesión como paxilina o talina. La activación de FAK comienza por la autofosforilación del residuo Y³⁹⁷ (p-FAK^{Y397}); esta fosforilación es un sitio de unión para Src la cual es reclutada en esta región. La unión de Src a Y³⁹⁷ de FAK promueve la fosforilación de Y⁵⁷⁶/Y⁵⁷⁷ en el dominio cinasa de FAK, proceso esencial para la máxima activación y actividad cinasa de FAK (Hanks et al., 2003). El complejo Src-FAK promueve la fosforilación de otras proteínas involucradas en la adhesión y en la dinámica del citoesqueleto de actina como paxilina y p130Cas. Asimismo, este complejo interrumpe la maduración de las adhesiones por la promoción del desensamble induciendo el recambio de las adhesiones (Webb et al., 2004). La actividad de FAK puede repercutir en otros procesos como lo son la dinámica de actina y microtúbulos, además de afectar la formación de contactos célula-célula. FAK regula la actividad de las Rho GTPasas a través de la interacción directa o la fosforilación de proteínas activadoras o inhibitoras de las Rho GTPasas, y por lo tanto, modula la formación de fibras de estrés, lamelipodios y filopodios, (Mitra et al., 2005)

1.6 Efecto del PDGF en las proteínas asociadas al movimiento celular

1.6.1 PDGF promueve el movimiento celular

El citoesqueleto de actina media un gran espectro de funciones celulares, dando lugar al marco estructural de la morfología celular, migración celular, polaridad,

citocinesis, formación de complejos de adhesión y muchos otros eventos celulares (Hall, 1998; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Se ha descrito que el citoesqueleto es uno de los principales blancos para los factores de crecimiento y promueve muchas respuestas celulares a señales extracelulares (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Hall, 1998; Ridley, 2001a; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) es un potente agente estimulante del crecimiento y motilidad en tejido conectivo, fibroblastos, células del músculo liso células endoteliales y neuronas (Heldin and Westermark, 1999; Raines et al., 1990). Se ha descrito que PDGF es una molécula polipeptídica dimérica formada de una cadena α y una cadena β , creando homodímeros (PDGF-AA, PDGF-BB) y heterodímeros (PDGF-AB). Estas isoformas ejercen diferentes efectos en las células, median respuestas similares pero no idénticas. Después de la activación, los receptores para PDGF (PDGF-R) estimulan la proliferación celular y el re-arreglo de los filamentos de actina, en forma de lamelipodios y la reducción de fibras de estrés, además de la inducción de estructuras tipo vello en la periferia celular (Heldin et al., 1998). Se ha descrito que la activación el receptor β incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular, fenómeno que no sucede con los receptores α ; cabe destacar en las células SH-SY5Y se da una expresión mayoritaria de receptores tipo PDGF-BB (Pola, 2003).

Los receptores PDGF (PDGF-R) se autofosforilan, esto gracias a una dimerización que promueve la activación del receptor. Sucede cuando se yuxtapone las partes intracelulares de los receptores lo cual permite la transfosforilación entre los 2 receptores del complejo (Kelly et al., 1991). Ésto inicia la transducción de señales intracelulares que involucran interacciones directas entre componentes de diferentes vías de señalización; estas interacciones son ejercidas por dominios específicos como: dominios SH2 (Src homology 2, por sus siglas en inglés), dominios de unión a fosfotirosinas (PTB, por sus siglas en inglés), dominios SH3 (Src homology 3) los cuales reconocen dominios ricos en prolina, dominios de homología a pleckstina (PH) los cuales reconocen fosfolípidos de membrana y

dominios PDZ que reconocen residuos C-terminales de valina y secuencias específicas río arriba (Pawson and Scott, 1997). Cabe destacar que existen más de 10 diferentes moléculas las cuales contienen dominios SH2 que se unen a diferentes sitios de autofosforilación en el receptor a PDGF, incluyendo moléculas de transducción de señales con actividad enzimática como PI3K (phosphoinositide 3-kinase), PLC- γ (phospholipase C gamma), la familia Src y la tirosin fosfatasa SHP-2 (Heldin et al., 1998). Respecto a Src, es un miembro prototipo de una familia de tirosina cinasas; los miembros se caracterizan por la presencia de dominios SH2 y SH3 además del dominio cinasa (Erpel and Courtneidge, 1995). Src tiene un residuo de tirosina en la región C-terminal (Y⁵²⁷), que al fosforilarse media la interacción intramolecular con el dominio SH2 manteniendo a la cinasa inactiva. Se ha descrito que los miembros de la familia Src se unen y son activados por receptores de PDGF (Kypta et al., 1990). La unión ocurre cuando se fosforila Y⁵⁷⁹ y Y⁵⁸¹ en el receptor β de PDGF. La activación de las Src cinasas involucra el desplazamiento de Y⁵²⁷ del dominio SH2 y la fosforilación de otros residuos de tirosina localizados en los dominios SH2 y SH3 (Broome and Hunter, 1997; Stover et al., 1996). Otra cinasa que se une directamente a PDGF-R es PI3K, la activación de PI3K media la división y supervivencia celular, pero también participa en la regulación de los cambios en el citoesqueleto, como la formación del lamelipodio inducida por PDGF (Wennstrom et al., 1994). Cabe destacar que ciertas respuestas a PI3K están mediadas por Ras (Hu et al., 1995; Satoh et al., 1993), y se ha descrito que Ras es capaz de activar a las Rho GTPasas (Khosravi-Far et al., 1995; Olson et al., 1995; Qiu et al., 1997, 1995).

1.6.2 PDGF y Rho GTPasas

Diversos estudios han demostrado la estrecha relación que tiene PDGF y las Rho GTPasas para favorecer el movimiento celular. En estudios en células epiteliales de la lente (SRA01/04), se observó que la adición de PDGF (20 ng/mL) durante 1 h, promueve la activación de Rho-GTP en un 66% comparado con las células control, además de una fuerte inducción de formación de fibras de estrés que se

localizaron predominantemente en las regiones corticales del cuerpo celular. Asimismo la estimulación con PDGF promovió la inducción de intensas adhesiones focales. Por otra parte cuando se pre-trataron a las células (10 min) con un inhibidor de ROCK (Y-27632) se redujo la formación de fibras de estrés y adhesiones focales. Asimismo, se observó que PDGF también es capaz de activar Rac-GTP (Maddala et al., 2003). Otro estudio realizado por Jiménez et al., (2000) describe que PDGF-R activa a Cdc42 y su efector N-WASP induciendo la formación de filopodios, una disminución de la formación de fibras de estrés y una reducción en los complejos de adhesión focal en fibroblastos. Asimismo, se describió que p85 α , la subunidad reguladora de PI3K, es capaz de activar la vía Cdc42/N-WASP, uniendo la estimulación de PDGF-R con la activación de Cdc42. Cabe destacar que la activación de Cdc42 requiere la asociación directa de p85 con Cdc42, de tal forma que la activación de Cdc42 inducida por PDGF, probablemente involucra una proteína adicional que directamente controla la activación de esta GTPasa como una GEF (Lim et al., 1996).

1.6.3 PDGF y Src

La familia Src juega un papel muy importante en la diferenciación celular, motilidad, proliferación y supervivencia (Thomas and Brugge, 1997). Src se encuentra compuesta de un grupo miristilo de 14 carbonos en el extremo N-terminal, un dominio SH4 (Src homology 4), un segmento "único", dominio SH3, un dominio SH2, un dominio tirosina cinasa y una cola reguladora C-terminal. Src se expresa ubicuamente en células de vertebrados, sin embargo, en el cerebro, osteoclastos y plaquetas se expresa de 5 a 200 veces más que en las otras estirpes celulares (Brown and Cooper, 1996). Src puede unirse directamente a PDGF-R (Kypta et al., 1990). El dominio SH2 de Src se une a dos residuos fosfotirosina en la región yuxtamembranal de PDGF-R (p-Y⁵⁷⁹ y p-Y⁵⁸¹ para β y p-Y⁵⁷² y p-Y⁵⁷⁴ para α) (Mori et al., 1993). Entonces la autofosforilación estimulada por PDGF crea un sitio de unión al dominio SH2 de Src, el cual desplazará la interacción intramolecular de su dominio que la regula negativamente y así activar

a Src. Se ha descrito en respuesta a PDGF, Src es fosforilado en 2 residuos de serina, un residuo de tirosina en la región N-terminal y un residuo de tirosina en el dominio catalítico (Y⁴¹⁶) (Broome and Hunter, 1997; Ralston and Bishop, 1985; Stover et al., 1996). Se ha encontrado que la fosforilación del sitio de autofosforilación de Src (Y⁴¹⁶ en pollos y v-Src) puede ser detectada después del tratamiento con PDGF. Estudios con células con mutaciones en Y⁴¹⁶ sugieren que este residuo juega un papel muy importante en la regulación de la actividad catalítica de Src (Thomas and Brugge, 1997). Independientemente, se demostró que PDGF-R media la fosforilación de Src en Y²¹³ en el dominio SH2 en cultivos de células Balb/c (Stover et al., 1996), y que esta fosforilación permite que PDGF-R incremente al doble la activación de Src, gracias a que la fosforilación en Y²¹³ disminuye la habilidad del dominio SH2 para formar una unión intramolecular con pY527 y así permitir la activación de Src.

1.6.4 Src y Rho GTPasas

Como se ha descrito a lo largo de este apartado, en el movimiento celular existen vías de señalización que se interconectan unas con otras y hay proteínas que convergen en estas vías como las Rho GTPasas, Src, PDGF-R, FAK, entre otras.

Existe una estrecha relación entre la familia Src (SFKs, por sus siglas en inglés) y las Rho GTPasas; se ha demostrado que las SFKs pueden regular a GEFs y GAPs, las cuales actúan sobre las Rho GTPasas promoviendo la dinámica de movimiento celular. Un complejo que es crítico para que ocurra el movimiento celular es el complejo Src-FAK el cual activa a Rac1 a través del reclutamiento y fosforilación de p130Cas (también conocida como Bcarl) (Chodniewicz and Klemke, 2004). P130Cas fosforilada recluta a Dock180 (dedicator of cytokinesis protein 1) y ELMO1 (engulfment and cell motility protein 1), a través de la asociación con Crk (adapter molecule Crk). El complejo Dock180-ELMO1 funciona como un GEF no convencional para Rac1 y promueve la formación de protrusiones (Brugnera et al., 2002; Kiyokawa et al., 1998). El complejo Src-FAK también fosforila a paxilina, la cual recluta a PKL (paxillin kinase linker) y al GEF para Rac1 y Cdc42 que es β -PIX (también conocido como Cool1 y GEF7).

Entonces β -PIX (PAK-interacting Exchange factor beta) recluta y activa a Rac1 a través de una interacción directa con las adhesiones focales y los lamelipodios (Ten Klooster et al., 2006). Cabe destacar que PKL y β -PIX pueden ser fosforiladas por Src, la cual puede modular sus actividades en respuesta a integrinas o factores de crecimiento o que se encuentren río arriba de Src (Brown et al., 2005; Feng et al., 2006). Por otra parte, el complejo Src-FAK puede estimular las protrusiones membranales e inhibir la contractilidad del citoesqueleto, facilitando la extensión celular. Cuando esta extensión finaliza, la actividad de RhoA incrementa gradualmente de manera concomitante con la formación de fibras de estrés y la maduración de las adhesiones focales. Los GEFs p115RhoGEF, LARG (leukemia-associated Rho GEF) y p190RhoGEF están implicados en estos procesos, pero se desconoce qué es lo que promueve su actividad (Dubash et al., 2007; Lim et al., 2008).

Existen receptores como integrinas ó EGFR (epidermal growth factor receptor) que pueden promover la activación de Src. Las integrinas pueden promover la activación de Rac1 y la extensión celular en células no hematopoyéticas por la estimulación de la fosforilación de RacGEF Vav2 (guanine nucleotide exchange factor Vav2) dependiente de Src (Marignani and Carpenter, 2001). La activación de EGFR por medio de integrinas está involucrada en la inducción de la actividad de Rac1 durante la adhesión celular a través de PI3K y Vav2 promoviendo la formación de lamelipodio y la extensión celular (Marcoux and Vuori, 2003). La estimulación por EGF, induce la formación de un complejo Src, mDia1 y DIPI el cual estimula la actividad de Rac1 a través de Vav2 y suprime la actividad de RhoA a través p190RhoGAP (Meng et al., 2004). Por otra parte, se ha descrito que el reclutamiento de paxilina por el complejo Src-FAK puede modular la motilidad celular, gracias a los efectos de paxilina en las vías de señalización que promueven un incremento en los niveles de Rac-GTP y Cdc42-GTP, ó a través de la vía de señalización que regula el recambio de la adhesión en el frente director de las células que se encuentran migrando (paxilina-ERK (extracellular signal-regulated kinase)-MLCK (MLC kinase)) (Klemke et al., 1997; Webb et al., 2004).

1.7 Justificación

- La migración neuronal en el neurodesarrollo es un proceso primordial.
- El MeHg es un compuesto neurotóxico capaz de inhibir la migración neuronal.
- La dinámica de las adhesiones focales y las protrusiones son procesos fundamentales para la migración neuronal.
- El MeHg altera proteínas involucradas en las adhesiones focales como Paxilina, vinculina y JNK.
- Las Rho GTPasas (Rac1 y Cdc42) son importantes para la formación de protrusiones.
- FAK y Src participan en la dinámica de las adhesiones focales y la formación de protrusiones.
- El efecto del MeHg sobre la migración neuronal es bien conocido, sin embargo, aún se desconoce el efecto en procesos primordiales para la migración como lo son las adhesiones focales, la formación de protrusiones y vías de señalización asociadas a estos, en los cuales participan proteínas como FAK, Src, Rac1 y Cdc42.

1.8 Hipótesis

La exposición a metilmercurio altera la activación de las Rho GTPasas (Rac1 y Cdc42) y la fosforilación de Src y FAK, repercutiendo negativamente en la formación de protrusiones y el recambio de las adhesiones focales, procesos indispensables para el movimiento y por ende, para la migración neuronal.

1.9 Objetivo general

Estudiar el efecto del MeHg sobre la activación de FAK, Src, Rac1 y Cdc42, y sobre la formación de protrusiones y adhesiones focales, procesos indispensables en el movimiento de células de neuroblastoma.

1.10 **Objetivos particulares**

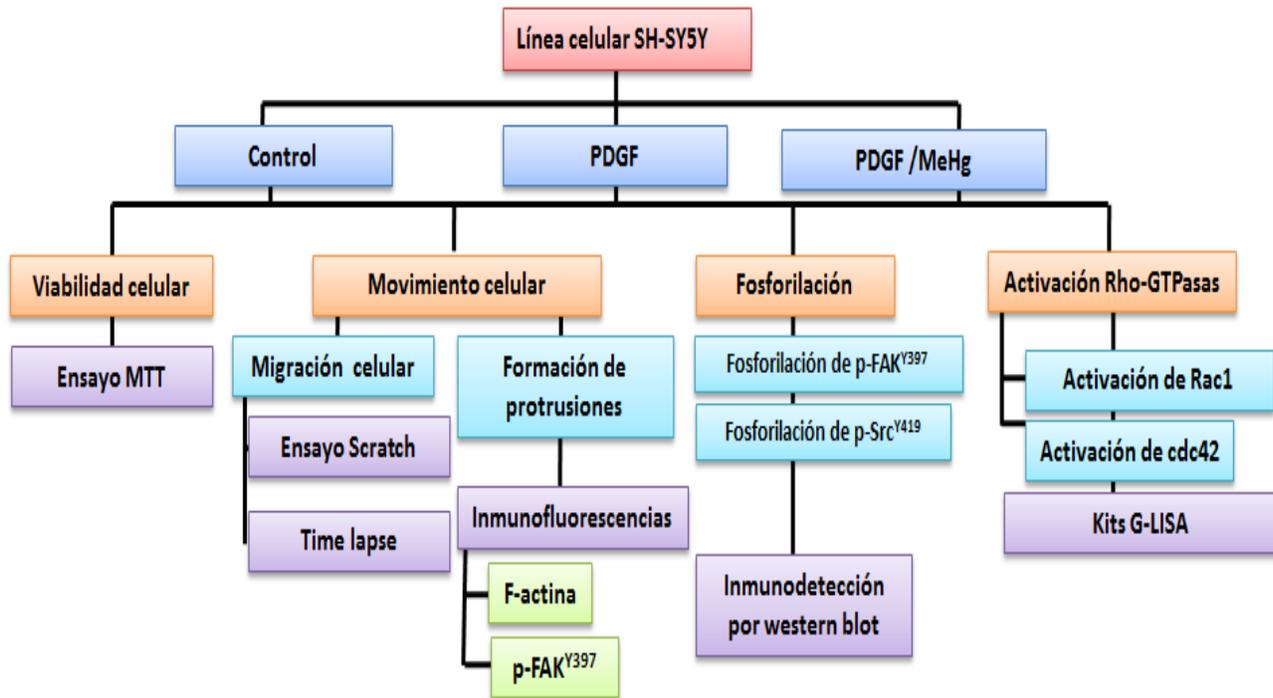
Determinar el efecto del MeHg en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano estimulada a migrar con PDGF-BB, sobre:

- La viabilidad celular.
- El movimiento celular.
- Formación de protrusiones (lamelipodios y filopodios).
- El desensamble de las adhesiones focales.
- La fosforilación de FAK^{Y397}.
- La fosforilación de Src^{Y419}.
- La activación de Rac1.
- La activación de Cdc42.

2 Metodología

2.1 Diseño experimental

En el siguiente diagrama se describen las principales condiciones y las técnicas utilizadas en nuestro trabajo.



2.2 Materiales y reactivos

| Material o reactivo | Casa comercial |
|----------------------------|---------------------------------|
| Línea celular SH-SY5Y | ATCC, USA |
| Medio DMEM:F12 | GIBCO-BRL, NY, USA |
| Suero fetal bovino (SFB) | GIBCO-BRL, NY, USA |
| Piruvato de sodio | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| L-glutamina | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Aminoácidos no esenciales | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Penicilina/Estreptomicina | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| PDGF | Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA |
| Cloruro de metilmercurio | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Mesilato de imatinib | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| CGP77675 | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| CASIN | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| NCS23766 | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Reactivo MTT | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| DMSO | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Mitomicina C | TEVA, CDMX, México |
| Camaras Nunc™ Lab tek™ II | Thermo Fisher, SCIENTIFIC, USA |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Albumina de suero bovino | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Anti-FAK total | Santa Cruz Biotechnology, USA |
| Anti-FAK ^{Y397} | Santa Cruz Biotechnology, USA |
| Anti-Src total | Santa Cruz Biotechnology, USA |

| | |
|------------------------------|---|
| Anti-Src ^{Y419} | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| Anti-Rac1 | Santa Cruz Biotechnology, USA |
| Anti-Cdc42 | Santa Cruz Biotechnology, USA |
| Anti-β actina | Donado por el Dr. Hernández Depto. de Biología Celular. Cinvestav-IPN |
| Anti-ratón peroxidado | BIO-RAD, Hercules, CA, USA |
| Anti-conejo peroxidado | BIO-RAD, Hercules, CA, USA |
| Anti-conejo-Alexa488 | Thermo Fisher, SCIENTIFIC, USA |
| Faloidina-TRITC | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| DAPI | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Medio de montaje Vectashield | Vector Laboratories, USA |
| NACl | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| EGTA | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Ortovanadato de sodio | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| NaF | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Pirofosfato de Sodio | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Glicerol | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| MgCl ₂ | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| SDS | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| PMSF | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Deoxicolato de sodio | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Leupeptina | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Antipaina | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |

| | |
|----------------------|----------------------------------|
| Quimiostatina | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Benzamidina | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Pepstatina | Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA |
| Membranas PVDF | Millipore Corporation, USA |
| Luminol | BIO-RAD, Hercules CA, USA |
| Films X-ray | Kodak, Palo Alto, CA, USA |
| Kit G-LISA Rac1-GTP | Cytoskeleton, Denver CO, USA |
| Kit G-LISA Cdc42-GTP | Cytoskeleton, Denver CO, USA |
| Placas Fluorodish | World Precision Instruments, USA |

2.2.1 Línea celular.

Se utilizó la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, la cual es derivada de la línea celular SH-SY5 subclona de la línea SH-SY (Biedler et al., 1978). Esta última estirpe proviene de la línea SY-N-SH que derivó de un neuroblastoma de médula ósea de una niña de 4 años de edad. Entre las características principales de la línea SH-SY5Y está que presentan un crecimiento mixto, es decir, pueden crecer como células adherentes o en suspensión; en su forma adherente presentan una morfología de tipo epitelial. Estas células forman agrupamientos de células neuroblásticas con procesos celulares múltiples, cortos o finos que son neuritas (ATCC).

2.2.1.1 Cultivo de la línea SH-SY5Y

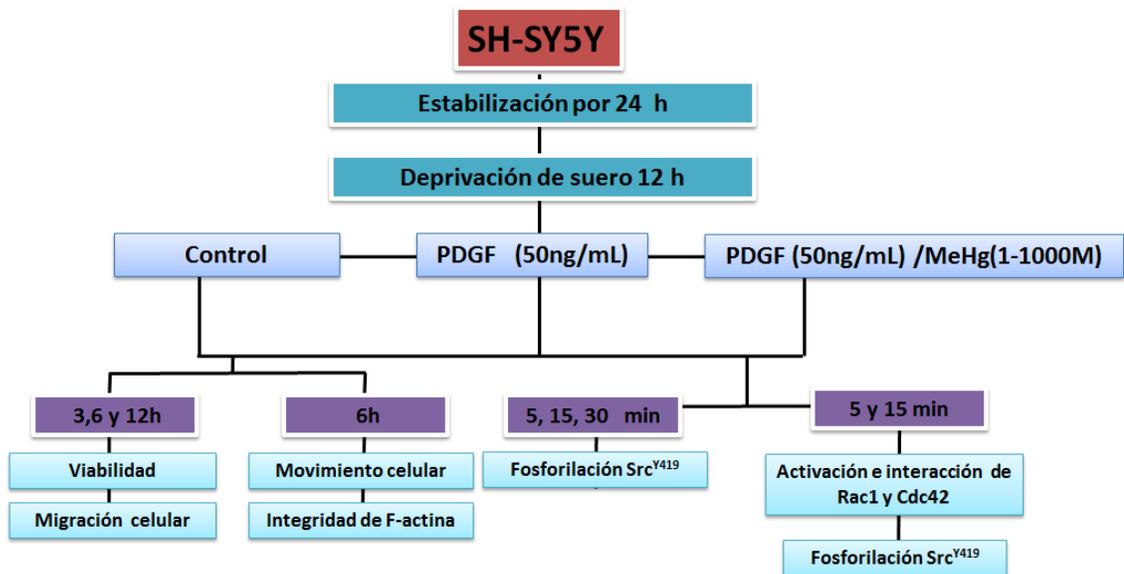
La línea celular SH-SY5Y se adquirió de ATCC, USA. Las células se mantuvieron en botellas de cultivo de 25 cm² ó 75 cm² en medio completo consistente de una mezcla 1:1 de los medios DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) y el medio Ham's F12, suplementado con suero fetal bovino a una concentración final del 10%, 1% de penicilina-estreptomocina, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de

sodio y 1% de aminoácidos no esenciales. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂ y ambiente húmedo.

2.2.1.2 Tratamientos

Para el desarrollo de los diferentes protocolos experimentales, los cultivos celulares se estabilizaron por 24 h y se privaron de suero por 12 h. Después de la privación, las células fueron estimuladas con PDGF (50 ng/mL) y tratadas de manera simultánea con cloruro de metilmercurio, lo cual denominaremos MeHg, a diferentes concentraciones. Los inhibidores Imatinib (4µM, inhibidor de la actividad tirosina cinasa de PDGFr), CGP77675 (2 µM, inhibidor de la fosforilación de Src^{Y419}), CASIN (5 µM, inhibidor específico de la activación de Cdc42), NSC23766 (50 µM, inhibidor específico de la activación de Rac1) se adicionaron 1 h antes de agregar el PDGF y MeHg, en las condiciones experimentales que así se indique.

Los tiempos de exposición en las diferentes condiciones experimentales y los parámetros evaluados se presentan en el siguiente diagrama de flujo



2.3 Ensayo MTT

El ensayo MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) fue usado para evaluar la viabilidad celular medida como la actividad mitocondrial a

partir de la actividad de la succinato deshidrogenasa (Mosmann, 1983). Las células se estimularon con PDGF y se trataron con MeHg (1, 10, 50, 100, 500 y 1000 nM) por 3, 6 y 12 h. Tres horas antes de la medición, el MTT fue adicionado y terminado este periodo, los cristales de formazan fueron solubilizados con DMSO (dimetil-sulfoxido). Posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm en un espectrofotómetro de microplacas (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). El valor de las muestras control fue tomado como el 100% de viabilidad en cada uno de los tiempos analizados. Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado.

2.4 Ensayo scratch (recuperación de la herida)

Las células fueron cultivadas en placas de 30 mm de diámetro hasta alcanzar una monocapa confluyente. En seguida se privaron de suero por 12 h. Dos horas antes de la adición de los tratamientos se agregó mitomicina C (50 µg/mL) para inhibir la proliferación celular. Posteriormente se realizó la herida en la monocapa con una punta de 200 µL y se hicieron 2 lavados con medio suplementado sin SFB. En seguida, las células fueron incubadas con los diferentes tratamientos por 12 h, se tomaron imágenes a las 0, 3, 6 y 12 h en un microscopio Nikon ECLIPSE Ci-L acoplado a un sistema de imágenes digital. El porcentaje de recuperación de la herida después de las 3, 6 y 12 h se calculó respecto a la distancia total de la herida en el tiempo 0 en la misma área de análisis. Se realizaron 4 experimentos por duplicado.

2.5 Time lapse

Se cultivaron las células en placas "fluorodish" hasta alcanzar un 30% de confluencia, se estabilizaron por 24 h y se privaron por 12 h. En seguida se adicionaron los respectivos tratamientos y se tomaron imágenes cada 5 minutos durante 6 h para documentar la velocidad de movimiento de las células individuales en condiciones controladas (5% CO₂, 37°C). Las imágenes se

tomaron en un microscopio Olympus FSX-100 y se realizó su análisis mediante el software ImageJ.

2.6 Inmunofluorescencias

Las células fueron cultivadas en cámaras Nunc™ Lab-tek™ II hasta alcanzar el 30% de confluencia, se privaron de suero por 12 h. En seguida, se adicionaron los tratamientos por 6 h. Las células fueron fijadas en 4% de paraformaldehído por 30 minutos a 37°C. Se permeabilizaron con 0.1% de triton X-100 por 10 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con 0.1% de BSA por 1 h a 37°C. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-fosfo-FAK^{Y397} (p-FAK^{Y397}) toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado al fluorocromo Alexa488 y con faloidina acoplada a TRITC por 2 h a 37°C. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de cada incubación se realizaron lavados con PBS (phosphate buffered saline por sus siglas en inglés). Finalmente se adicionó Vectashield como medio de montaje y se tomaron las imágenes en un microscopio confocal TCS SP8 (Leica Microsystems).

2.6.1 Análisis de las imágenes de fluorescencia

Todas las imágenes de fluorescencia de p-FAK^{Y397} fueron tomadas en la misma sección óptica con 5 μM de grosor de la parte basal hacia arriba de la muestra, con la misma ganancia y parámetros de exposición. El número y área de los clusters de p-FAK^{Y397} fue cuantificado usando el software ImageJ siguiendo el protocolo descrito por Horzum et al. (2014). Para cuantificar la intensidad de fluorescencia de p-FAK^{Y397} se utilizó el parámetro CTCF (corrected total cell fluorescence, por sus siglas en inglés) usando la siguiente fórmula: CTCF = densidad integrada - (área de la célula x la media de fluorescencia del background) mediante el software ImageJ. Se analizaron al menos 25 células por grupo de 3 experimentos independientes.

2.7 Western blot

Después de que se realizaron los tratamientos, las células fueron lisadas con el buffer RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM ortovanadato de sodio, 100 mM NaF, 10 mM pirofosfato de sodio, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sodio, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptina, 5 µg/mL antipaina, 5 µg/mL quimostatina, 5 µg/mL benzamidina, and 1 µg/mL pepstatina). Los lisados fueron centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 12 min y se colectaron los sobrenadantes para su análisis por Western blot. Se cargaron 30 µg de proteína por pozo en un gel (SDS-PAGE, aL 10 % de acrilamida/bisacrilamida) y se realizó la electroforesis a un voltaje constante de 80V. Posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride, por sus siglas en inglés) usando una cámara semiseca de transferencia Hoefer con una corriente constante de 130 mA. Enseguida se bloquearon las membranas con 5% de leche libre de grasa en PBS tween al 0.1% por 1 h. Las membranas fueron incubadas toda la noche, a 4°C, con anticuerpos contra: FAK (1:1000), p-FAK^{Y397} (1:1000), Src (1:1000), p-Src^{Y419} (1:1000), Rac1 (1:2000), Cdc42 (1:2000) y β-actina (1:1500). Al día siguiente, se lavaron las membranas con PBS tween 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón-HRP ó anti-conejo-HRP según sea el caso, durante 2 h, se realizaron 3 lavados con PBS tween 0.1% y finalmente las bandas se visualizaron con luminol y películas radiográficas Kodak. Los autoradiogramas fueron escaneados con un sistema de imágenes Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, USA) para su posterior análisis con el software ImageJ. Se realizaron 3 experimentos por duplicado.

2.8 Activación de Rac1 y Cdc42

La activación de Rac1 y Cdc42 se determinó por medio de los kits G-LISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se estabilizaron las células y se privaron cuando se alcanzó el 50% de confluencia, se adicionaron los distintos tratamientos por 5 y 15 minutos, enseguida las células se lisaron en el

buffer de lisis del kit y los extractos proteicos fueron incubados en las placas G-LISA para Rac1 y Cdc42. La activación de Rac1 y Cdc42 se detectó con Ac primarios específicos para cada proteína y anticuerpos secundarios conjugados con HRP. La absorbancia se midió a 490 nm en un espectrofotómetro de microplacas SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los niveles de activación se compararon con las muestras no tratadas.

2.9 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba *post hoc* de Tukey para evaluar la diferencia entre los tratamientos. Todos los valores con $p < 0.05$ fueron considerados significativos. El análisis fue realizado mediante el software Graph Pad Prism versión 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego CA, USA).

3 Resultados

3.1 MeHg no afecta la viabilidad de las células SH-SY5Y

Se determinó la citotoxicidad del MeHg a diferentes concentraciones en las células SH-SY5Y antes de evaluar el efecto en la migración, movimiento, formación de protrusiones y proteínas claves involucradas en estos procesos. Las células fueron estimuladas con PDGF y simultáneamente se expusieron a 1, 10, 100, 500 y 1000 nM de MeHg durante 3, 6 y 12 h. Los efectos inducidos por el MeHg fueron evaluados a través del ensayo MTT, el cual mide la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa. Los resultados mostraron que el MeHg no afecta la viabilidad de las SH-SY5Y a los tiempos y concentraciones evaluadas (Tabla 2).

Tabla 2. MeHg no afecta la viabilidad celular (% del control) de las células SH-SY5Y después de 3, 6 y 12 h de exposición.

| Tratamientos | Tiempo de exposición | | |
|-------------------------------|----------------------|--------------|---------------|
| | 3 h | 6 h | 12 h |
| Control | 100 | 100 | 100 |
| PDGF (50 ng/mL) | 100.5 ± 3.15 | 108.6 ± 3.85 | 97.52 ± 1.23 |
| PDGF (50 ng/mL) + MeHg 1nM | 99.2 ± 3.65 | 106.6 ± 3.85 | 95.51 ± 1.23 |
| PDGF (50 ng/mL) + MeHg 10 nM | 110.6 ± 4.21 | 108.4 ± 1.96 | 97.82 ± 1.010 |
| PDGF (50 ng/mL) + MeHg 100 nM | 99.61 ± 1.99 | 107.4 ± 2.80 | 96.28 ± 2.59 |
| PDGF (50 ng/mL) + MeHg 500 nM | 103.7 ± 2.54 | 99.55 ± 1.99 | 100.2 ± 2.08 |
| PDGF (50 ng/mL) + MeHg1000nM | 99.84 ± 1.48 | 97.04 ± 3.52 | 95.81 ± 2.26 |

La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo MTT. Se analizaron los datos usando ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc Tukey. Los datos corresponden a la media ± ES de tres experimentos independientes por triplicado.

3.2 MeHg inhibe la migración inducida por el PDGF de las células SH-SY5Y

En la migración celular evaluada mediante el ensayo scratch (recuperación de la herida), las células fueron estimuladas a migrar con PDGF y simultáneamente expuestas a 1, 10, 100 y 500 nM de MeHg por 3, 6 y 12 h. Los resultados mostraron que PDGF incremento significativamente la migración celular a las 6 y 12 h comparado con el grupo control. En contraste, el MeHg (1, 10, 100 y 500 nM) inhibió significativamente la migración inducida por el PDGF a las 6 y 12 h de exposición (Figura 4A). Imágenes representativas de cada condición se muestran en la Figura 4B.

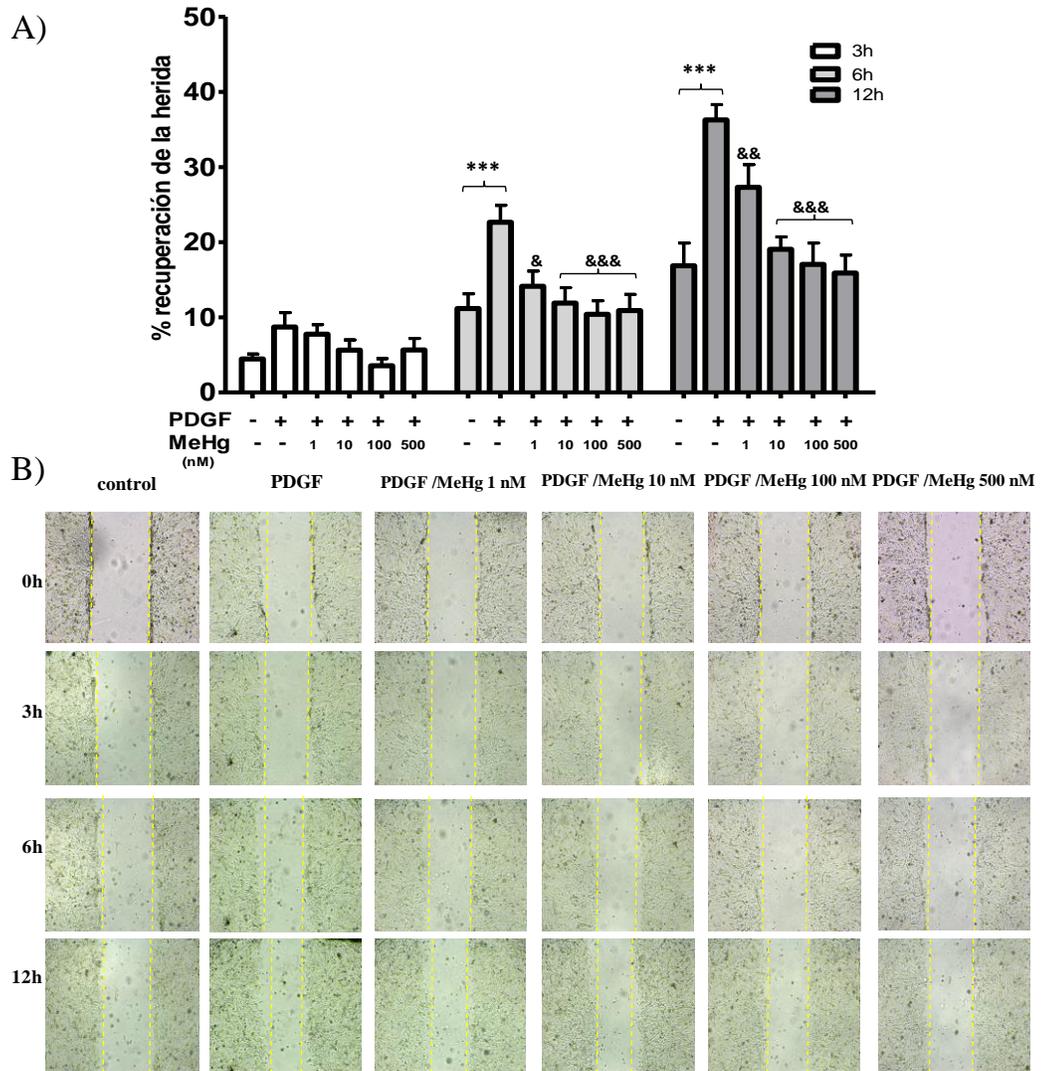


Figura 4. MeHg inhibe la migración inducida por el PDGF. Las células fueron estimuladas a migrar con PDGF y expuestas a 1, 10, 100 y 500 nM de MeHg, la migración celular fue evaluada mediante el ensayo scratch, se tomaron imágenes a las 0, 3, 6 y 12 h. A) La gráfica representa la media \pm ES de 3 experimentos independientes. *** $p < 0.001$ comparado con el control. & $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$ comparado con el grupo estimulado con PDGF. Los datos fueron analizados usando ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* Tukey. B) imágenes representativas de cada tratamiento a los diferentes tiempos evaluados.

3.3 MeHg disminuye la velocidad de movimiento celular de manera concentración dependiente

Para determinar la velocidad de movimiento celular se utilizó la técnica de time-lapse para seguir el movimiento de las células estimuladas con PDGF y tratadas simultáneamente con 100, 500 y 1000 nM de MeHg durante 6 h. Se determinó que el PDGF incrementó de manera significativa la velocidad de movimiento celular (6.3 $\mu\text{m}/\text{h}$) respecto al grupo control (4.85 $\mu\text{m}/\text{h}$), en contraste, MeHg disminuyó la velocidad de movimiento de manera concentración dependiente (3.8, 2.8 y 1.5 $\mu\text{m}/\text{h}$ respectivamente) (Figura 5).

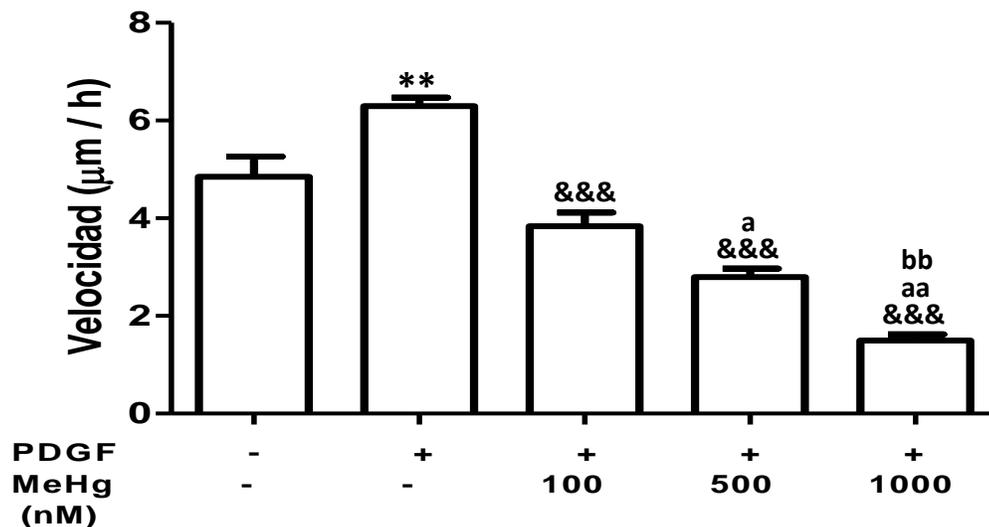


Figura 5. MeHg disminuye la velocidad de movimiento de las células SH-SY5Y estimuladas con PDGF. Las células fueron estimuladas a migrar con PDGF y expuestas a 100, 500 y 1000 nM de MeHg, el movimiento celular fue evaluado mediante el ensayo de time-lapse durante 6 h. Los datos se expresan como velocidad ($\mu\text{m}/\text{h}$) a partir del tiempo inicial (t_0) de cada tratamiento. La gráfica representa la media \pm ES de 3 experimentos independientes. ** $p < 0.001$ comparado con el control. &&& $p < 0.001$ comparado con el grupo estimulado con PDGF. a $p < 0.05$, aa $p < 0.01$ comparado con el grupo de MeHg 100 nM. bb $p < 0.01$ comparado con el grupo de MeHg 500 nM. Los datos fueron analizados usando ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* Tukey.

Para descartar que el efecto observado en la migración sea debido a que el MeHg interfiere directamente en la actividad del PDGF, se realizó el pre-tratamiento por 1 h con MeHg (1,10, 100 y 500 nM). En seguida se lavaron las células y posteriormente se adicionó el PDGF y se mantuvo el tratamiento por 6 y 12 h. Los resultados mostraron que el MeHg a las 4 concentraciones evaluadas, inhibió la migración inducida por el PDGF (Figura 6).

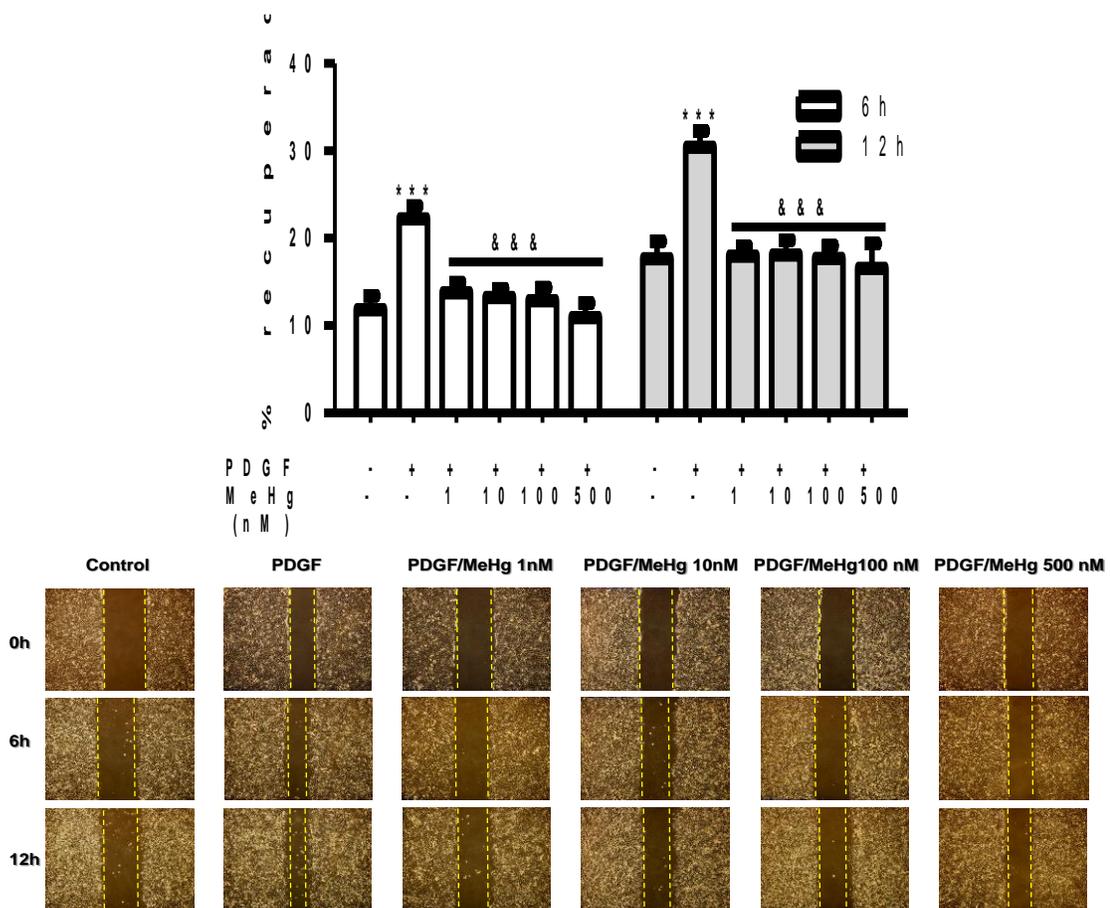


Figura 6. El pre-tratamiento con MeHg inhibe la migración celular inducida por el PDGF. Las células SH-SY5Y fueron deprivadas de suero por 12 h y pre-tratadas con 1, 10 100 y 500 nM de MeHg, posteriormente las células fueron lavadas con medio sin suplementar y estimuladas a migrar con PDGF (50 ng/mL). Se evaluó la migración mediante el ensayo scratch a las 6 y 12 h. Los datos representan el % de recuperación de la herida comparado con el tiempo inicial (t0) de cada tratamiento. Las barras representan la media \pm ES de 4 experimentos independientes por duplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control, &&& $p < 0.001$ comparado con el grupo solo estimulado con PDGF. Los datos fueron analizados usando ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc Tukey. Las imágenes corresponden a los diferentes tratamientos a los tiempos evaluados.

3.3 MeHg inhibe la formación de protrusiones y promueve la formación de agregados de p-FAK^{Y397} en células SH-SY5Y estimuladas con PDGF.

Se determinó la formación de protrusiones a través de la tinción de los filamentos de actina mediante faloidina-TRITC. Se observó una morfología redonda en las células control con pequeñas y finas extensiones. Cuando las células se estimularon con PDGF, se observó una morfología extendida con la formación de protrusiones lamelipodiales y filopodiales. En contraste, el MeHg (100, 500 y 1000 nM) inhibió la formación de protrusiones (lamelipodios y filopodios) inducidas por el PDGF (Figura 7), además de observarse una morfología similar a la de las células control. Asimismo, se evaluó la distribución y localización de p-FAK^{Y397} debido a que es un evento pivote para la motilidad celular y la localización de los contactos focales (Mitra et al., 2005). En todas las condiciones p-FAK^{Y397} fue localizada en el centro de la célula con una orientación hacia las extensiones. Sin embargo, en las células que fueron estimuladas con PDGF y tratadas con MeHg 100, 500 y 1000 nM, el tamaño de los agregados (“clusters”) de p-FAK^{Y397} se incrementó (Figura 7). Por ello, se evaluó el número, área e intensidad de fluorescencia de los “clusters” de p-FAK^{Y397}. Como se muestra en la Figura 8A, el área de los “clusters” de p-FAK^{Y397} se incrementó significativamente en las células tratadas con MeHg en comparación con las células solo estimuladas con PDGF. En contraste, el número de p-FAK^{Y397} fue menor en las células tratadas con MeHg. La comparación de la intensidad de fluorescencia mostró que PDGF incrementó significativamente la intensidad de fluorescencia comparado con el grupo control, mientras que en las células tratadas con MeHg y estimuladas con PDGF la intensidad de fluorescencia disminuyó significativamente con respecto a PDGF sin MeHg (Figura 8B).

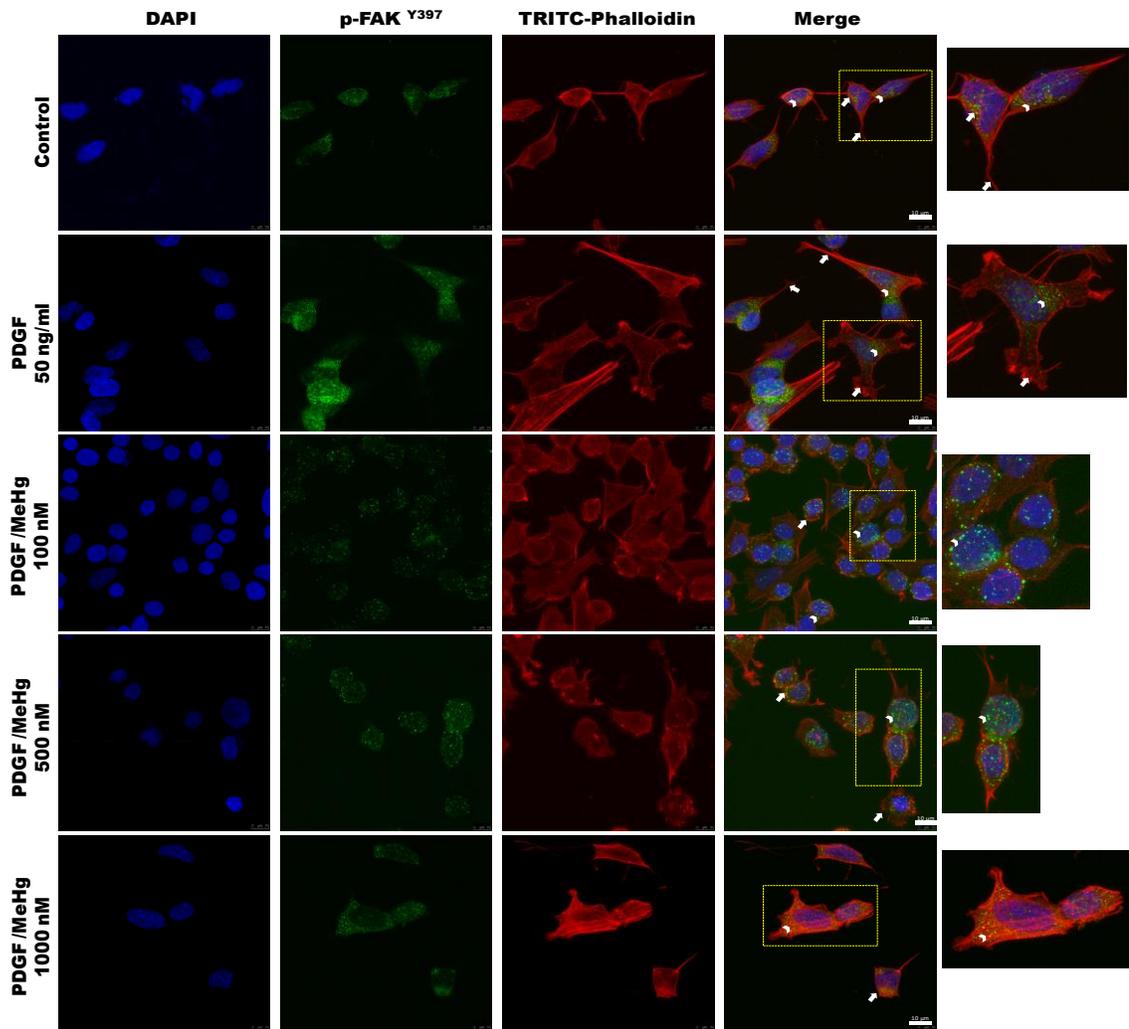


Figura 7. MeHg inhibe la formación de protrusiones y modifica la distribución subcelular de p-FAK^{Y397} en las células SH-SY5Y estimuladas con PDGF. Las células fueron estimuladas con PDGF y expuestas a 100, 500 y 1000 nM de MeHg durante 6 h. posteriormente las células se fijaron y se tiñeron con un Ac específico contra p-FAK^{Y397} el cual fue marcado con un Ac secundario acoplado al fluorocromo Alexa488 (verde). Faloidina-TRITC fue utilizada para detectar los filamentos de actina (rojo) y DAPI para teñir los núcleos. La detección se realizó por inmufluorescencias a través de microscopía confocal, las imágenes fueron tomadas a una magnificación de 100x (barra de escala= 10 μ m). En las células control, las flechas indican células redondas con extensiones cortas y finas mientras que las puntas de flecha indican una distribución perinuclear de p-FAK^{Y397}. En las células estimuladas con PDGF, las flechas indican la formación de protrusiones lamelipodiales y filopodiales mientras que las puntas de flecha muestran una distribución perinuclear de p-FAK^{Y397}. A las concentraciones de 100, 500 y 1000 nM el MeHg inhibe la morfología inducida por el PDGF (flechas) además de inhibir la formación de protrusiones y promover la formación de “clusters” de p-FAK^{Y397} (puntas de flecha).

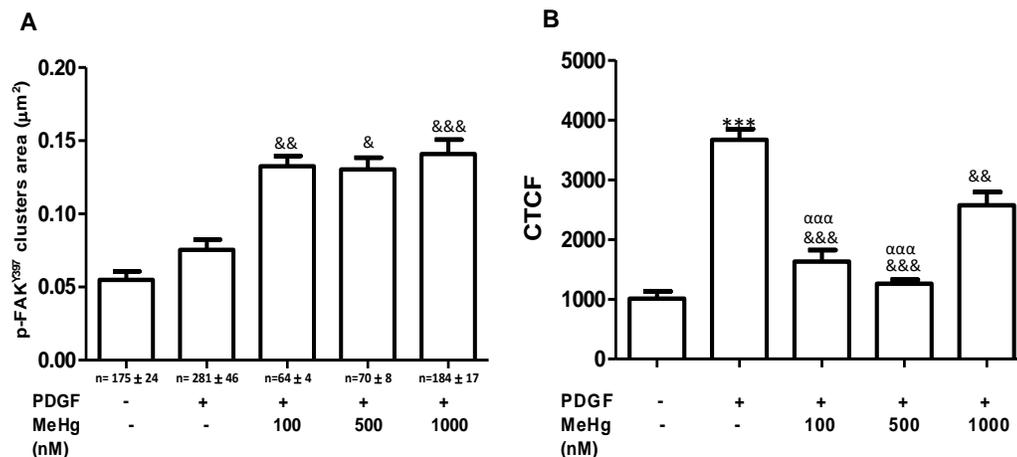


Figura 8. MeHg incrementa el área de los “clusters” y disminuye la intensidad de fluorescencia de p-FAKY397 en células estimuladas con PDGF. Las imágenes de fluorescencia de p-FAKY397 fueron analizadas mediante el software ImageJ y (A) se determinó el área de los contactos focales, la gráfica representa la media \pm ES de los “clusters” de p-FAKY397, en la parte inferior de la gráfica se indica el n=número de “clusters” por célula. B) la intensidad de fluorescencia de p-FAKY397 fue cuantificada por la medición de la fluorescencia celular total corregida (CTCF), la gráfica representa la media \pm ES de la CTCF. *** $p < 0.001$ comparado con el control, & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ y &&& $p < 0.001$ comparado con el grupo estimulado con PDGF, $\alpha\alpha\alpha$ $p < 0.001$ comparado con el grupo PDGF/MeHg 1000 nM. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* Tukey. El análisis se realizó en al menos 25 células por grupo de 3 experimentos independientes.

3.4 MeHg inhibe la fosforilación inducida por el PDGF de FAK^{Y397}

Se ha descrito que FAK participa en la formación de protrusiones y en el recambio de las adhesiones focales. Por ello, se evaluó el efecto del MeHg en la fosforilación de FAK^{Y397} inducida por el PDGF a los 5 y 15 minutos de exposición. A los 5 minutos de exposición no se observó algún efecto ni con la estimulación con PDGF ni con el MeHg (Figura 9A). Sin embargo, a los 15 minutos de exposición PDGF incrementó de manera significativa la fosforilación de FAK^{Y397}, en tanto que, el MeHg (100, 500 y 1000 nM) disminuyó de manera significativa la fosforilación inducida por el PDGF (Figura 9B). Para determinar si p- FAK^{Y397} es dependiente de PDGFr o la actividad de Src, la células se pre-trataron con Imatinib

(4 μ M) un inhibidor de la actividad tirosin cinasa de PDGFr o CGP77675 (2 μ M) un inhibidor de la autofosforilación de Src^{Y416}. Se observó que ambos inhibidores disminuyeron de manera significativa la fosforilación inducida por el PDGF (Figura 9B).

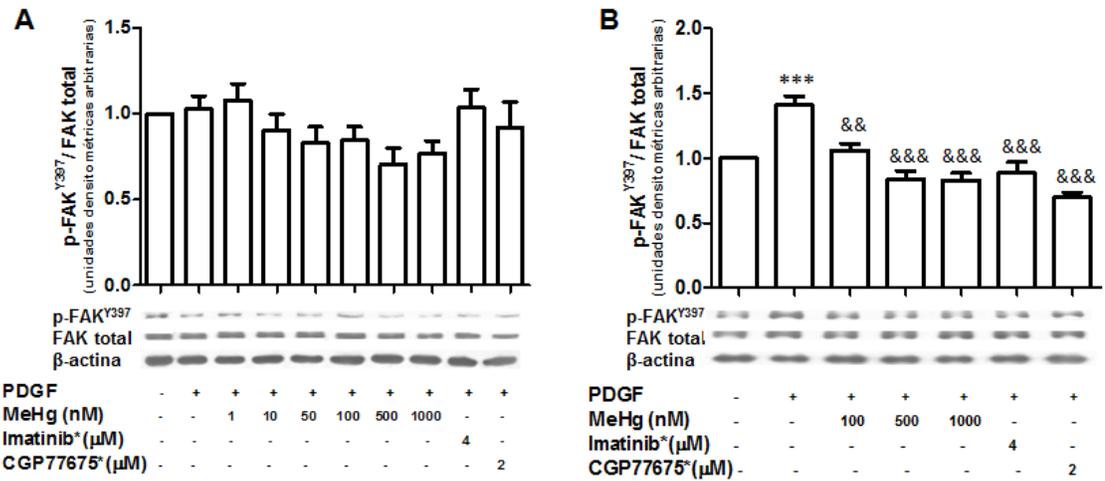


Figura 9. MeHg inhibe la fosforilación de FAK^{Y397} inducida por el PDGF. Se presentan los blots representativos y el análisis densitométrico de la fosforilación de FAK^{Y397} en las células SH-SY5Y estimuladas con PDGF después de (A) 5 minutos de exposición a 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 nM de MeHg y (B) 15 minutos de exposición a 100, 500 y 1000 nM de MeHg.* las células fueron pre-tratadas 1 h con Imatinib y CGP77675. Los datos son presentados como la media \pm ES de 3 experimentos independientes por duplicado. ***p<0.001 comparado con el control. && p<0.01 y &&& p<0.001 comparado con el grupo estimulado con PDGF. Los datos se analizaron a través de ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* Tukey.

3.5 MeHg inhibe la fosforilación de Src^{Y419} inducida por el PDGF

La fosforilación de Src^{Y416} (Src^{Y419} en humanos) es un evento clave para la actividad de Src (Roskoski, 2004). Src activa puede unirse a FAK, este complejo puede promover la formación, desensamble y maduración de las adhesiones focales (Webb et al., 2004) promoviendo la motilidad celular. En este estudio, se observó que PDGF incrementó significativamente la fosforilación de Src (Figura 10), mientras que MeHg (100, 500 y 1000 nM) inhibió esta fosforilación inducida por el PDGF en todos los tiempos evaluados. Asimismo, el pre-tratamiento con Imatinib y CGP77675 inhibió la fosforilación inducida por el PDGF (Figura 10).

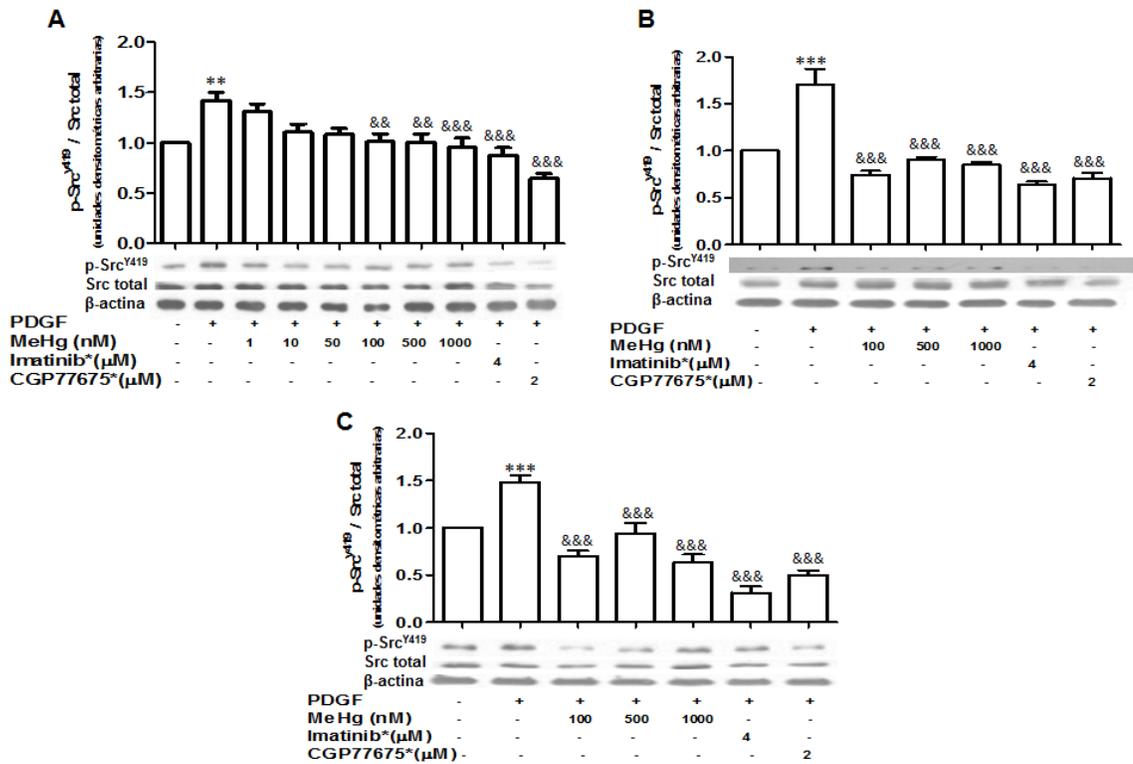


Figura 10. MeHg inhibe la fosforilación de Src^{Y419} inducida por el PDGF. Se presentan los blots representativos y el análisis densitométrico de la fosforilación de Src^{Y419} en las células SHSY5Y estimuladas con PDGF después de (A) 5 minutos de exposición a 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 nM de MeHg, (B) 15 minutos y (C) 30 minutos de exposición a 100, 500 y 1000 nM de MeHg.* Las células fueron pre-tratadas durante 1 h con Imatinib ó CGP77675. Los datos se presentan como la media ±

ES de 3 experimentos independientes por duplicado. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con el control; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ y &&& $p < 0.001$ comparado con el grupo estimulado con PDGF. Los datos se analizaron a través de ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* Tukey.

3.6 MeHg inhibe la activación de Rac1 y Cdc42 inducida por el PDGF

La siguiente etapa de nuestro trabajo fue evaluar si la activación de Rac1 y Cdc42 se encontraba afectada debido a la exposición a MeHg ya que estas proteínas son reguladoras clave de la dinámica de actina y por ende, de la formación de protrusiones. El nivel de activación se determinó mediante el uso de paquetes comerciales G-LISA. Se observó que el PDGF incrementó la activación de Rac1 a los 5 y 15 minutos de exposición, sin embargo, este aumento no fue significativo. En contraste, el MeHg (100 nM) disminuyó a los niveles basales el aumento inducido por el PDGF (Figura 10A y 10B). Para determinar si la activación de Rac1 era dependiente de PDGFr o Src, se pre-trataron a las células con Imatinib o CGP77675. Los resultados mostraron que ambos inhibidores disminuyeron significativamente la activación inducida por el PDGF (Figura 11A y 11B). Asimismo, se utilizó como control negativo de la activación de Rac1 el inhibidor NSC23766 el cual inhibe específicamente la activación de Rac1. Respecto a la activación de Cdc42, se observó que PGDF incremento significativamente la activación de Cdc42 solo a los 15 minutos de exposición (Figura 11D), además se observó que 100 nM de MeHg inhibió significativamente la activación inducida por el PDGF. Cabe destacar que Imatinib y CASIN (inhibidor específico de la activación de Cdc42) inhibieron significativamente la activación de Cdc42 inducida por el PDGF (Figura 11D).

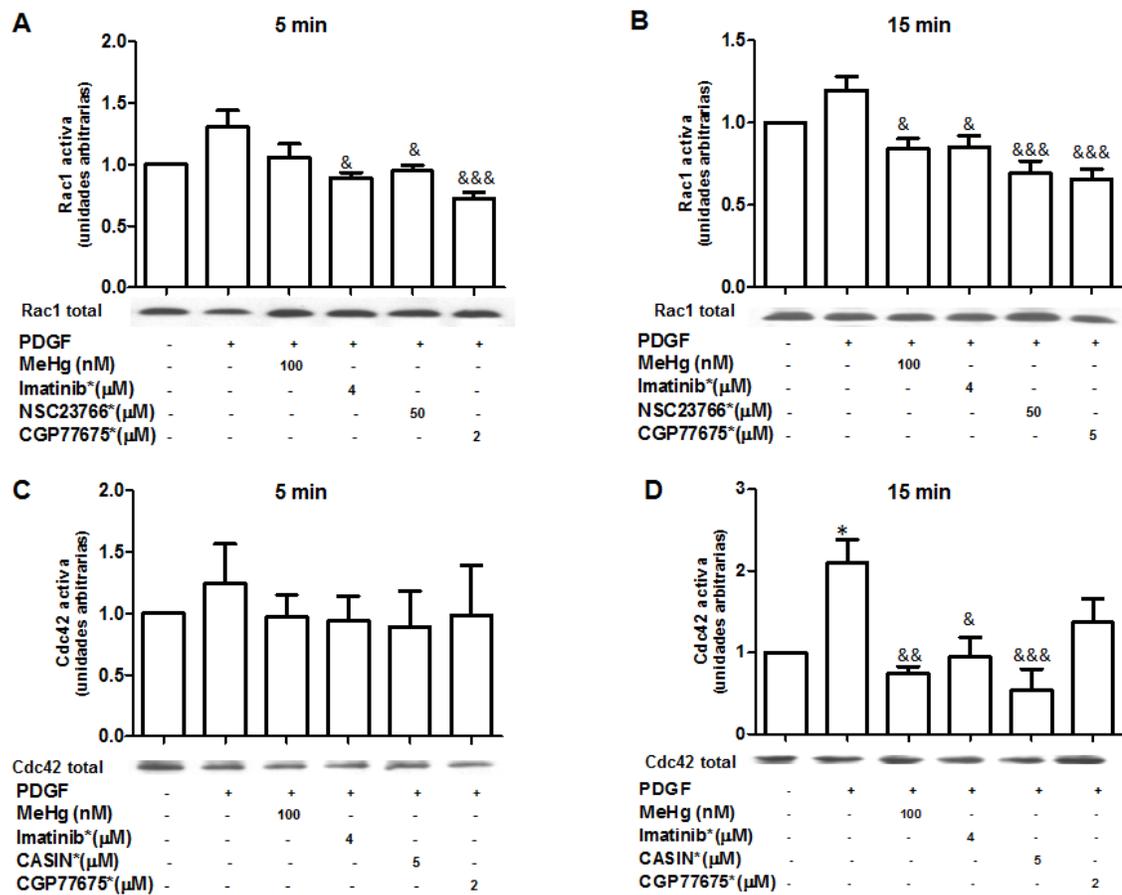


Figura 11. Efecto del MeHg en la activación de Rac1 y Cdc42 en las células SHSY5Y estimuladas con PDGF. Los niveles de actividad de Rac1-GTP (A y B) y Cdc42-GTP (C y D) fueron determinados mediante kits G-LISA después de los 5 y 15 minutos del tratamiento simultaneo con MeHg y PDGF. Los niveles de proteína de Rac1 y Cdc42, fueron detectadas por Western blot y se presenta en la parte inferior de las barras. * Las células fueron pre-tratadas durante 1 h con Imatinib, CGP77675, NSC23766 y CASIN. Los datos están expresados como la media \pm ES de 3 experimentos independientes por duplicado. * $p < 0.05$ respecto al control; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$ respecto al grupo estimulado con PDGF. Se analizaron los datos usando ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* Tukey.

4 Discusión

Los efectos del MeHg en la migración neuronal han sido extensivamente estudiados, sin embargo, los mecanismos moleculares afectados por este organometal aún no son bien entendidos. En este trabajo se describieron los efectos del MeHg en la migración, la formación de protrusiones y adhesiones focales además del efecto en proteínas clave de la vía de señalización de PDGF, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Se ha descrito que las isoformas del PDGF y sus receptores están expresados en la corteza cerebral, en etapas embrionarias y maduras del sistema nervioso central en desarrollo (Funa and Sasahara, 2014). Asimismo, se ha observado que el PDGF induce quimiotaxis en células troncales de la corteza embrionaria de rata de manera dosis-dependiente (Forsberg-nilsson et al., 1998), además la activación del PDGFr-B estimula la migración de diversos tipos celulares como neuroprogenitores, neuroesferas y células de neuroblastoma (Smits et al., 1991). Debido a estas evidencias se decidió utilizar al PDGF como estímulo para el movimiento celular.

4.1 El MeHg no afecta la viabilidad de las células SH-SY5Y

El MeHg a bajas concentraciones (1, 10, 100, 500 y 1000 nM) a las 3, 6 y 12 h de exposición, no afectó la viabilidad de las células SH-SY5Y. Toimela y Tähti (2004) describieron valores similares de EC_{50} de MeHg en células SH-SY5Y a los 15 minutos, 24 y 48 h de exposición, Ellos reportaron valores de EC_{50} de 28.62 a 40.92 μ M a los 15 minutos, 1.14 a 1.28 μ M a las 24 h y de 0.72 a 0.86 μ M a las 48 h. Asimismo, estos autores reportaron un incremento en la apoptosis después de la incubación con 100 nM de MeHg, sin embargo, este efecto solo se observó a las 24 h de exposición. Otros estudios han evaluado el efecto del MeHg en la viabilidad de las células SH-SY5Y, sin embargo, el efecto citotóxico solo se observa a las 24 y 48 h (Petroni et al., 2012; Toyama et al., 2010). Estos resultados soportan el hecho de que las concentraciones y tiempos evaluados en este estudio no afectan la viabilidad celular.

4.2 MeHg inhibe la migración celular inducida por el PDGF

Una vez que se evaluó la citotoxicidad del MeHg, se procedió a evaluar el efecto en la migración y el movimiento celular a través del ensayo scratch y el ensayo de “time-lapse” respectivamente. Se demostró que efectivamente, el MeHg inhibe la migración celular. Existen estudios en donde se ha demostrado que el MeHg inhibe el movimiento neuronal (Jacobs et al., 1986; Kunimoto y Suzuki, 1997; Mancini et al., 2009) a través de 2 procesos principalmente: la inhibición de la iniciación del movimiento y la reducción de la distancia media de movimiento (Sass et al., 2001). Para descartar que el MeHg estuviera actuando directamente en el PDGF y este efecto fuese el responsable de los efectos inhibitorios del MeHg, se pre-trataron a las células con MeHg y posteriormente se adicionó el estímulo. En estas condiciones, se observó el mismo efecto que cuando se adicionó simultáneamente ambos tratamientos, es decir, el MeHg inhibió la migración inducida por el PDGF. Estos resultados sugieren que el MeHg está actuando directamente en las proteínas involucradas en la vía de señalización de PDGF, sin embargo, no se puede establecer si el efecto es sobre el PDGFr, a nivel de las vías intracelulares o ambos. Para determinar si el efecto involucra la unión del MeHg al receptor es necesario realizar estudios específicos que aborden esta área.

Es importante mencionar que, existen estudios relacionados con el efecto del MeHg y su posible interacción con factores de crecimiento neuronales, un estudio realizado por Colquhoun y cols. (2009) evaluó si el MeHg interfiere con la conformación y actividad del BDNF (brain derived neurotrophic factor) y NGF (nerve growth factor), de la misma manera que el catión divalente Hg^{2+} interactúa a través de la unión a los grupos thioles. Los resultados mostraron que el MeHg no afectó la estructura y función del NGF y BDNF (factores de crecimiento con estructuras proteicas similares al PDGF). El MeHg tiene una elevada afinidad por los grupos SH- de las proteínas, el monómero PDGF-B contiene 8 cisteínas (Cys), 4 Cys forman uniones disulfuro intracatenarias (Cys 16, Cys 49, Cys 60 y Cys 97) y 4 conforman uniones disulfuro intercatenarias (Cys 43, Cys 52, Cys 53 y Cys 99) entre los monómeros del dímero PDGF-BB (Giese et al., 1987; Haniu et al., 1993;

Kenney et al., 1994). Por ello, existe la posibilidad de que el MeHg pueda afectar al PDGF así como a su receptor, sin embargo, son necesarios más estudios para establecer una relación directa con la estructura y función de estas proteínas. En este trabajo, nos enfocamos en algunas proteínas (FAK, Src, Rac1 y Cdc42) involucradas en la vía de señalización del PDGF.

4.3 El MeHg inhibe la formación de protrusiones inducida por el PDGF y el desensamble de las adhesiones focales

PDGF es un potente promotor de la motilidad e invasividad de las células SH-SY5Y (Pola, 2003); este factor de crecimiento induce la formación de adhesiones focales (Maddala et al., 2003), promueve la formación de protrusiones celulares como lamelipodios periféricos, lamelipodios circulares dorsales (Andrae et al., 2008; Huang et al., 2011) y espinas filopodiales (Lee et al., 2005). Como era de esperarse, en este trabajo se observaron efectos similares en las células SH-SY5Y estimuladas con PDGF. Las células presentaron una morfología extendida con protrusiones lamelipodiales y filopodiales. En contraste, cuando las células se estimularon con PDGF y se trataron con MeHg (100, 500 y 1000 nM), las células presentaron una morfología redonda (morfología similar de las células control) con cortas y finas extensiones, sugiriendo que el MeHg afecta la dinámica del citoesqueleto de actina inhibiendo la formación de lamelipodios y filopodios. Respecto a esto, pocos estudios han mostrado la capacidad del MeHg a bajas concentraciones (concentraciones nM), para dañar el citoesqueleto. De hecho, la mayoría de los pocos estudios previamente realizados, se han enfocado en los efectos de MeHg o Hg sobre la red microtubular. Se ha demostrado que el MeHg es un potente inhibidor del ensamble de los microtúbulos (Vogel et al., 1985), promueve la pérdida de microtúbulos citoplasmáticos de manera dosis-dependiente después de la exposición a 10 y 15 μM de MeHg por 1 h, acompañada de una morfología celular redonda en fibras nerviosas (Miura et al., 2000). De manera similar, Castoldi y cols. (2000) observó una fragmentación de la red neuronal y una depolimerización microtubular después de la exposición a 1 μM

de MeHg, lo cual generó daño en las neuritas, en tiempos de exposición prolongados, desencadenando una completa disolución de los microtúbulos y los procesos neuronales.

Otro proceso crítico para el movimiento celular es el recambio de las adhesiones focales, un proceso complejo que requiere la interacción coordinada de actina, proteínas de unión a actina, moléculas de señalización, proteínas estructurales, integrinas, moléculas adaptadoras y microtúbulos (Webb et al., 2002). En este trabajo se evaluó la formación y el recambio de las adhesiones focales mediante la detección de p-FAK^{Y397} debido a que esta fosforilación desencadena la activación de muchas proteínas involucradas en el ensamble y desensamble de las adhesiones focales, promoviendo la migración celular (Cox et al., 2006; Mitra et al., 2005; Nagano et al., 2012; Sieg et al., 1999; Webb et al., 2002). Los resultados mostraron que el MeHg (100, 500 y 1000 nM) incrementó el tamaño de los clústeres de p-FAK^{Y397}, sin embargo, estos disminuyeron en número. Nuestros resultados sugieren que la fosforilación de FAK^{Y397} es blanco del MeHg e inhibe su desensamble bloqueando el recambio de las adhesiones focales. De manera interesante, Webb et al., (2004) ha descrito que FAK es fosforilada en Y397 en las adhesiones dinámicas y que esta fosforilación modula el eficiente desensamble de las adhesiones. De hecho, se ha reportado que el número de adhesiones que sufrieron recambio en las regiones protrusivas de células FAK^{-/-}, fue menor que en los MEFs de células no mutados en FAK. Existen otros factores involucrados en el desensamble de las adhesiones focales como: microtúbulos, quinesina-1, dinamina, ZF21, calpaina-2 y fosfatasas que median la defosforilación de FAK^{Y397} como PTP-PEST, SHP-2 y PTP-1 (Nagano et al., 2012). Consideramos importante evaluar en el futuro, si estas proteínas son blancos potenciales del MeHg.

4.4 MeHg inhibe la activación de FAK y Src

FAK es una proteína indispensable en el recambio de las adhesiones focales, la formación de protrusiones y la morfología celular (Mitra et al., 2005). Nosotros evaluamos los niveles de FAK^{Y397} fosforilada en células estimuladas con PDGF y

tratadas con MeHg debido a que esta fosforilación promueve la activación y función de la proteína. Se observó que el PDGF indujo p-FAK^{Y397} de exposición, mientras que el MeHg inhibió la fosforilación de FAK^{Y397} inducida por el PDGF. Se ha descrito que la estimulación con el PDGF puede promover la activación (Hunger-Glaser et al., 2004) y reclutamiento de FAK en el complejo activo de señalización de PDGFr y que p-FAK^{Y397} es requerida para la motilidad celular inducida por el PDGF (Sieg et al., 2000). Cabe destacar que la activación de Src es necesaria para la máxima actividad catalítica de FAK (Mitra et al., 2005). Para corroborar que PDGF fosforila a FAK^{Y397} y que la activación de Src estaba involucrada en la actividad de FAK, se pre-trataron a las células con imatinib, un inhibidor de la actividad cinasa de PDGFr y CGP77675, un inhibidor específico de la activación de Src. Se observó que ambos inhibidores bloquearon la fosforilación de FAK^{Y397} inducida por el PDGF. Esto sugiere que PDGF induce la fosforilación de FAK^{Y397} y que la activación de Src está involucrada en la regulación de FAK. Se ha reportado que en fibroblastos donde FAK no es expresada se tiene una tasa de migración reducida, una tasa de extensión reducida y un incremento en el número y tamaño de las adhesiones localizadas en la periferia de las células (Ilić et al., 1995): Además, la autofosforilación de FAK (Y397) es necesaria para la migración celular (Sieg et al., 1999). Así, nuestros resultados sugieren que la disminución de la fosforilación de FAK^{Y397} por la exposición a MeHg puede desencadenar los efectos inhibitorios en los procesos analizados anteriormente. Asimismo, se evaluaron los niveles de Src fosforilada en Y419 (p-Src^{Y419}) en células estimuladas con PDGF y tratadas con MeHg. La fosforilación de Src^{Y416} (Src^{Y419} en humanos) es un evento crítico para la activación de Src (Thomas and Brugge, 1997), y en este trabajo se observó que PDGF indujo p-Src^{Y419} en todos los tiempos evaluados. Estudios previos han mostrado que Src se une y es activada por PDGFr (Kypta et al., 1990; Mori et al., 1993) promoviendo la fosforilación de Src en Y416 y mediando la migración inducida por el PDGF en células mesenquimales (Wagner and Gorin, 2014). El tratamiento de las células con Imatinib y CGP77675, mostró que ambos inhibidores bloquearon la fosforilación de Src^{Y419}, apoyando que el PDGF promueve la fosforilación de

Src^{Y419} y que este evento es crucial para la migración de las células SH-SY5Y. Asimismo, cuando se trató a las células con MeHg (100, 500 y 1000 nM), la fosforilación de Src^{Y419} inducida por el PDGF fue inhibida, sugiriendo que la inhibición de p-Src^{Y419} inducida por el MeHg puede ser un factor crítico para la inhibición de la migración celular por el MeHg. Estos datos, apoyan, que p-Src^{Y419} y p-FAK^{Y397} son blancos del efecto del MeHg, y la inhibición de estas fosforilaciones puede estar asociada con la inhibición de la migración celular. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto del MeHg en la interacción FAK-Src para fortalecer nuestros resultados.

4.5 MeHg inhibe la activación de Rac1 y Cdc42

Otras moléculas que juegan un papel crítico en la dinámica de actina y de las adhesiones focales, son las Rho GTPasas específicamente Rac1 y Cdc42. Por ello, en este estudio se evaluó la activación de Rac1 y cdc42 en células estimuladas con PDGF y tratadas con MeHg. Se ha descrito que Rac1 y Cdc42 regulan la polimerización de actina promoviendo la formación de protrusiones lamelipodiales y filopodiales respectivamente (Nobes and Hall, 1995; Raftopoulou and Hall, 2004). Además, se conoce que PDGF promueve la activación de Rac1 y cdc42 e induce la formación de protrusiones (Hawkins et al., 1995; Huang et al., 2011; Jiménez et al., 2000). En este trabajo se observó que el PDGF induce la formación de lamelipodios, filopodios y la activación de Cdc42, sin embargo, no afectó significativamente la activación de Rac1. A pesar de que el PDGF no indujo una significativa activación de Rac1, el MeHg disminuyó los niveles de activación de Rac1 a los niveles basales. Asimismo, el MeHg inhibió la activación de Cdc42 inducida por el PDGF. Estudios previos han mostrado que el MeHg suprime los niveles proteicos de Rac1 y Cdc42 (Fujimura et al., 2009; Fujimura and Usuki, 2012; Guo et al., 2013), sin embargo, en esos estudios, los tiempos evaluados fueron más largos y las concentraciones mayores. Por ello, a partir de nuestros resultados podemos sugerir que el MeHg afecta la activación de Rac1 y Cdc42

antes de afectarse los niveles proteicos totales y esta alteración puede contribuir a la inhibición de la formación de lamelipodios y filopodios.

Se evaluó el papel del PDGFr y Src en la regulación de Rac1 y cdc42, debido a que observamos que el MeHg afecta proteínas involucradas en la señalización del PDGF y estas proteínas (FAK y Src) juegan un papel importante en la actividad de Rac1 y Cdc42 (Chiariello et al., 2001; Cox et al., 2006; Huveneers and Danen, 2009; Sanchez et al., 2010; Schlaepfer and Mitra, 2004; Servitja et al., 2003; Timpson et al., 2001; Wu et al., 2004). El uso de inhibidores específicos de la actividad de Rac1, Cdc42, PDGF, y de Src demostraron la fuerte relación entre las Rho GTPasas y la vía de señalización de PDGF debido a que imatinib inhibió la activación de Rac1 y Cdc42 inducida por el PDGF. Asimismo, observamos que Src juega un rol en la activación de Rac1 principalmente, pero la inhibición de Src no afectó de manera significativa la activación de Cdc42.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que el MeHg afecta la activación y desensamble de FAK, la activación de Src, Rac1 y Cdc42, todas ellas proteínas críticas para el movimiento celular. Estos efectos pueden estar relacionados con la inhibición de la formación de protrusiones inducidas por el PDGF y la inhibición del desensamble de las adhesiones focales lo que conlleva a la inhibición de la migración celular inducida por el PDGF (Figura 12).

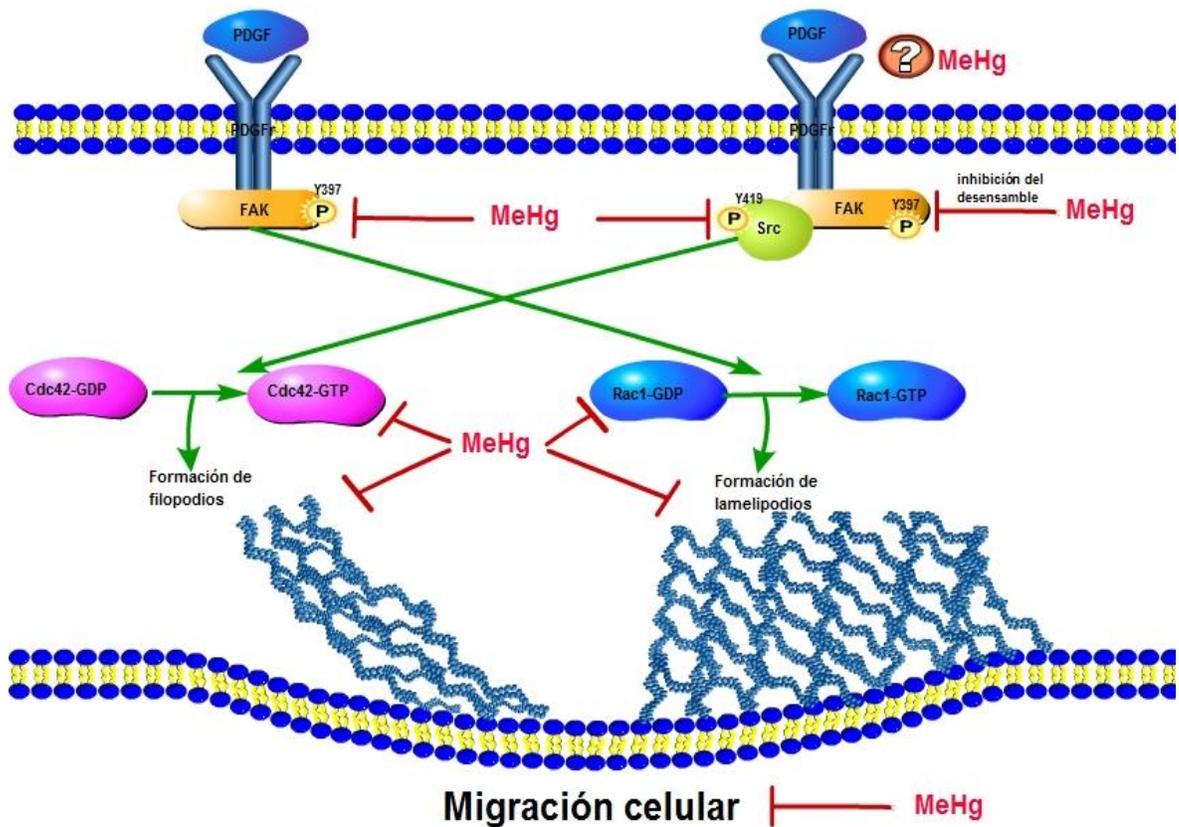


Figura 12. Modelo sugerido de los efectos inducidos por el metilmercurio en las células SH-SY5Y estimuladas con PDGF. El MeHg inhibe la fosforilación de FAK^{Y397} y Src^{Y419} inducida por el PDGF e inhibe el desensamblaje de p- FAK^{Y397} de las adhesiones focales. Asimismo, el organometal inhibe la activación de Rac1 y Cdc42 inducida por el PDGF, estos efectos pueden estar relacionados con la inhibición de la formación de protrusiones y por ende, de la migración celular.

5 Conclusiones

- El MeHg inhibe la migración de las células SH-SY5Y inducida por el PDGF.
- El MeHg inhibe la formación de protrusiones inducidas por PDGF.
- El MeHg inhibe el desensamble de las adhesiones focales.
- El MeHg inhibe la activación de FAK, Src, Rac1 y Cdc42 inducida por el PDGF.
- La inhibición de la activación de proteínas como FAK, Src, Rac1 y Cdc42 por el MeHg puede afectar procesos indispensables para el movimiento celular como lo son la formación de protrusiones y el recambio de las adhesiones focales, culminando en la inhibición de la migración celular.

6 Perspectivas

- Determinar el efecto del MeHg en la unión del complejo FAK-Src, ya que esta interacción es crítica para la formación de protrusiones y el recambio de las adhesiones focales.
- Determinar el efecto del MeHg en la actividad del receptor de PDGF.
- Evaluar el efecto del MeHg en la actividad del PDGF.
- Determinar el efecto del MeHg en la interacción del PDGF/PDGFr
- Determinar el efecto del MeHg en proteínas involucradas en el desensamble de las adhesiones focales.
- Por medio de métodos analíticos (cromatografía, espectrometría) determinar la unión del MeHg a las proteínas en cuestión.
- Realizar estudios *in silico* para determinar la unión directa del MeHg con las proteínas en cuestión: PDGF, PDGFr, FAK, Src, Rac1, Cdc42.

7 Referencias

- Allen, J.W., El-Oqayli, H., Aschner, M., Syversen, T., Sonnewald, U., 2001. Methylmercury has a selective effect on mitochondria in cultured astrocytes in the presence of [U-(13)C]glutamate. *Brain Res.* 908, 149–154.
- Andrae, J., Gallini, R., Betsholtz, C., 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22, 1276–1312.
doi:10.1101/gad.1653708.revealing
- Aschner, M., Aschner, J.L., 1990. Mercury neurotoxicity: Mechanisms of blood-brain barrier transport. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14, 169–176.
doi:10.1016/S0149-7634(05)80217-9
- Aschner, M., Syversen, T., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., Farina, M., 2007. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 40, 285–291.
- Asociados, A. y, 2001. Inventario Preliminar de Emisiones Atmosféricas de Mercurio en México, in: *Comision Para La Cooperación Ambiental.* pp. 1–43.
- ATSDR, 1999. Toxicological Profile for Mercury. *ATSDR's Toxicol. Profiles.*
doi:10.1201/9781420061888_ch109
- Ayala, R., Shu, T., Tsai, L.-H., 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29–43. doi:10.1016/j.cell.2006.12.021
- Basu, N., Tutino, R., Zhang, Z., Cantonwine, D.E., Goodrich, J.M., Somers, E.C., Rodriguez, L., Schnaas, L., Solano, M., Mercado, A., Peterson, K., Sánchez, B.N., Hernández-Avila, M., Hu, H., Maria Téllez-Rojo, M., 2014. Mercury levels in pregnant women, children, and seafood from Mexico City. *Environ. Res.* 135, 63–69. doi:10.1016/j.envres.2014.08.029
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L.S., 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38, 3751–3757.

- Boucher S. (2013). Informe resumido sobre contenido de mercurio en tejidos de peces de México. México. Disponible en <http://www3.cec.org/islandora/es/item/11248-synthesis-report-mercury-in-fish-tissue-from-mexico> [consultado en Marzo 2017].
- Broome, M. a, Hunter, T., 1997. The PDGF receptor phosphorylates Tyr 138 in the c-Src SH3 domain in vivo reducing peptide ligand binding. *Oncogene* 14, 17–34. doi:10.1038/sj.onc.1200798
- Broussard, J.A., Webb, D.J., Kaverina, I., 2008. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 85–90. doi:10.1016/j.ceb.2007.10.009
- Brown, M.C., Cary, L.A., Jamieson, J.S., Cooper, J.A., Turner, C.E., 2005. Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness. *Mol. Biol. Cell* 16, 4316–4328. doi:10.1091/mbc.E05-02-0131
- Brown, M.T., Cooper, J.A., 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1287, 121–149.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.-C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R., Ravichandran, K.S., 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 574–582. doi:10.1038/ncb824
- Burridge, K., Turner, C.E., Romer, L.H., 1992. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* 119, 893–903.
- Campbell, K., Gotz, M., 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25, 235–238.
- Carlier, M.F., Pantaloni, D., 1997. Control of actin dynamics in cell motility. *J. Mol. Biol.* 269, 459–467. doi:10.1006/jmbi.1997.1062
- Castoldi, A.F., Barni, S., Turin, I., Gandini, C., Manzo, L., 2000. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar

- granule neurons exposed to methylmercury. *J. Neurosci. Res.* 59, 775–787. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(20000315)59:6<775::AID-JNR10>3.0.CO;2-T
- Castro Díaz Jose, 2011. Informe sobre el mercado del mercurio en México 2009, in: Comision Para La Cooperación Ambiental. pp. 1–98.
- CDC, 2004. Blood mercury levels in young children and childbearing-aged women-United States, 1999-2002. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 53, 1018–1020.
- CDC, 2013. Fourth report on human exposure to environmental chemicals, updated tables (September, 2013). U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
- Cernichiari, E., Brewer, R., Myers, G.J., Marsh, D.O., Lapham, L.W., Cox, C., Shamlaye, C.F., Berlin, M., Davidson, P.W., Clarkson, T.W., 1995. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. *Neurotoxicology* 16, 705–710.
- Chiariello, M., Marinissen, M.J., Gutkind, J.S., 2001. Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases. *Nat. Cell Biol.* 3, 580–586. doi:10.1038/35078555
- Chodniewicz, D., Klemke, R.L., 2004. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1692, 63–76. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.03.006
- Choi, B.H., Cho, K.H., Lapham, L.W., 1980. Effects of methylmercury on DNA synthesis of human fetal astrocytes: A radioautographic study. *Brain Res.* 202, 238–242. doi:10.1016/S0006-8993(80)80053-9
- Choi, B.H., Lapham, L.W., Amin-Zaki, L., Saleem, T., 1978. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 37, 719–733.
- Clarkson, T.W., 2002. The three modern faces of mercury. *Environ. Health Perspect.* 110, 11–23. doi:10.1289/ehp.02110s111

- Clarkson, T.W., 1995. Environmental contaminants in the food chain. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 682S–686S.
- Clarkson, T.W., Magos, L., 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609–662.
doi:10.1080/10408440600845619
- Colquhoun, A., Eibl, J.K., Krol, K.M., Chan, H.M., Ross, G.M., 2009. Conformational analysis of the effects of methylmercury on nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 298–302. doi:10.1016/j.etap.2008.10.012
- Cox, B.D., Natarajan, M., Stettner, M.R., Gladson, C.L., 2006. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J. Cell. Biochem.* 99, 36–52. doi:10.1002/jcb.20956
- de Curtis, I., 2001. Cell migration: GAPs between membrane traffic and the cytoskeleton. *EMBO Rep.* doi:10.1093/embo-reports/kve072
- de Lourdes Soto-Ríos, M., Rothenberg, S.J., Juárez-Pérez, C.A., Aguilar-Madrid, G., 2010. Variability of Mercury in Urine Among Mexican Women Residing in a Mining Area. *J. Occup. Environ. Med.* 52, 62–66.
doi:10.1097/JOM.0b013e3181c75469
- Dubash, A.D., Wennerberg, K., Garcia-Mata, R., Menold, M.M., Arthur, W.T., Burridge, K., 2007. A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin. *J. Cell Sci.* 120, 3989–3998. doi:10.1242/jcs.003806
- Duelli, R., Enerson, B.E., Gerhart, D.Z., Drewes, L.R., 2000. Expression of large amino acid transporter LAT1 in rat brain endothelium. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1557–1562. doi:10.1097/00004647-200011000-00005
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V, Mann, M., Kirschner, M.W., 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790–793. doi:10.1038/nature00859
- Erpel, T., Courtneidge, S.A., 1995. Src family protein tyrosine kinases and cellular

- signal transduction pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 176–182.
- Etienne-Manneville, S., Hall, A., 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635. doi:10.1038/nature01148
- Etienne-Manneville, S., Hall, A., 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell* 106, 489–498. doi:10.1016/S0092-8674(01)00471-8
- Ezratty, E.J., Bertaux, C., Marcantonio, E.E., Gundersen, G.G., 2009. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J. Cell Biol.* 187, 733–747. doi:10.1083/jcb.200904054
- Ezratty, E.J., Partridge, M.A., Gundersen, G.G., 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat. Cell Biol.* 7, 581–590. doi:10.1038/ncb1262
- Fahrion, J.K., Komuro, Y., Li, Y., Ohno, N., Littner, Y., Raouf, E., Galas, L., Vaudry, D., Komuro, H., 2012. Rescue of neuronal migration deficits in a mouse model of fetal Minamata disease by increasing neuronal Ca²⁺ spike frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5057–5062. doi:10.1073/pnas.1120747109
- Feng, Q., Baird, D., Peng, X., Wang, J., Ly, T., Guan, J.-L., Cerione, R.A., 2006. Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nat. Cell Biol.* 8, 945–956. doi:10.1038/ncb1453
- Fitzgerald, W.F., Clarkson, T.W., 1991. Mercury and monomethylmercury: Present and future concerns. *Environ. Health Perspect.* 96, 159–166. doi:10.1289/ehp.9196159
- Forsberg-nilsson, K., Behar, T., Afrakhte, M., Barker, J., McKay, R., 1998. Platelet-Derived Growth Factor Induces Chemotaxis of Neuroepithelial Stem Cells. *J. Neurosci. Res.* 530, 521–530.
- Fujimura, M., Usuki, F., 2012. Differing effects of toxicants (methylmercury, inorganic mercury, lead, amyloid ??, and rotenone) on cultured rat cerebrocortical neurons: Differential expression of rho proteins associated with

- neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* 126, 506–514. doi:10.1093/toxsci/kfr352
- Fujimura, M., Usuki, F., Kawamura, M., Izumo, S., 2011. Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250, 1–9. doi:10.1016/j.taap.2010.09.011
- Fujimura, M., Usuki, F., Sawada, M., Rostene, W., Godefroy, D., Takashima, A., 2009. Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1 and leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. *Neurotoxicology* 30, 16–22. doi:10.1016/j.neuro.2008.10.002
- Funa, K., Sasahara, M., 2014. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 9, 168–181. doi:10.1007/s11481-013-9479-z
- Gao, W.Q., Hatten, M.E., 1993. Neuronal differentiation rescued by implantation of Weaver granule cell precursors into wild-type cerebellar cortex. *Science* 260, 367–369.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M., 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 793–805. doi:10.1038/35099066
- Giese, N.A., Robbins, K.C., Aaronson, S.A., 1987. The role of individual cysteine residues in the structure and function of the v-sis gene product. *Science* (80-). 236, 1315 LP-1318.
- Gliddon, C.M., Shao, Z., LeMaistre, J.L., Anderson, C.M., 2009. Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. *J. Neurochem.* 108, 372–383. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05767.x
- Gluck, U., Ben-Ze'ev, A., 1994. Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 7, 1773–1782.
- Govek, E.-E., Newey, S.E., Van Aelst, L., 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1–49. doi:10.1101/gad.1256405

- Guo, B.-Q., Yan, C.-H., Cai, S.-Z., Yuan, X.-B., Shen, X.-M., 2013. Low level prenatal exposure to methylmercury disrupts neuronal migration in the developing rat cerebral cortex. *Toxicology* 304, 57–68.
doi:10.1016/j.tox.2012.11.019
- Hall, A., 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509–514.
- Hamada, R., Yoshida, Y., Nomoto, M., Osame, M., Igata, A., Mishima, I., Kuwano, A., 1993. Computed tomography in fetal methylmercury poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 31, 101–106. doi:10.3109/15563659309000377
- Haniu, M., Rohde, M.F., Kenney, W.C., 1993. Disulfide Bonds in Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor BB Dimer: Characterization of Intermolecular and Intramolecular Disulfide Linkages. *Biochemistry* 32, 2431–2437. doi:10.1021/bi00060a039
- Hanks, S.K., Ryzhova, L., Shin, N.-Y., Brabek, J., 2003. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front. Biosci.* 8, d982-96.
- Hatten, M.E., 1993. The role of migration in central nervous system neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 38–44.
- Hawkins, P.T., Eguinoa, A., Qiu, R.G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennström, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M., Stephens, L., 1995. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* 5, 393–403. doi:10.1016/S0960-9822(95)00080-7
- Heasman, S.J., Ridley, A.J., 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.
doi:10.1038/nrm2476
- Heldin, C.H., Ostman, a, Rönstrand, L., 1998. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1378, F79–F113.
doi:10.1016/S0304-419X(98)00015-8
- Heldin, C.H., Westermark, B., 1999. Mechanism of action and in vivo role of

- platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* 79, 1283–1316.
- Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C., Burridge, K., 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature* 320, 531–533. doi:10.1038/320531a0
- Horzum, U., Ozdil, B., Pesen-Okvur, D., 2014. Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions. *MethodsX* 1, 56–59. doi:10.1016/j.mex.2014.06.004
- Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A.J., Fantl, W.J., Williams, L.T., 1995. Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* 268, 100–102.
- Huang, M., Satchell, L., DuHadaway, J.B., Prendergast, G.C., Laury-Kleintop, L.D., 2011. RhoB links PDGF signaling to cell migration by coordinating activation and localization of Cdc42 and Rac. *J. Cell. Biochem.* 112, 1572–1584. doi:10.1002/jcb.23069
- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., Ballestrem, C., 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* 179, 1043–1057. doi:10.1083/jcb.200703036
- Hunger-Glaser, I., Fan, R.S., Perez-Salazar, E., Rozengurt, E., 2004. PDGF and FGF induce focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation at Ser-910: Dissociation from Tyr-397 phosphorylation and requirement for ERK activation. *J. Cell. Physiol.* 200, 213–222. doi:10.1002/jcp.20018
- Huveneers, S., Danen, E.H.J., 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* 122, 1059–1069. doi:10.1242/jcs.039446
- Jacobs, A.J., Maniscalco, W.M., Finkelstein, J.N., 1986. Effects of methylmercuric chloride, cycloheximide, and colchicine on the reaggregation of dissociated mouse cerebellar cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 86, 362–371. doi:10.1016/0041-008X(86)90363-7
- Jiménez, C., Portela, R.A., Mellado, M., Rodríguez-Frade, J.M., Collard, J., Serrano, A., Martínez-A, C., Avila, J., Carrera, A.C., 2000. Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J. Cell*

Biol. 151, 249–261. doi:10.1083/jcb.151.2.249

Kaur, P., Aschner, M., Syversen, T., 2007. Role of glutathione in determining the differential sensitivity between the cortical and cerebellar regions towards mercury-induced oxidative stress. *Toxicology* 230, 164–177.

doi:10.1016/j.tox.2006.11.058

Kelly, J.D., Haldeman, B.A., Grant, F.J., Murray, M.J., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Cooper, J.A., Kazlauskas, A., 1991. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit transphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266, 8987–8992.

Kenney, W.C., Haniu, M., Herman, A.C., Arakawa, T., Costigan, V.J., Lary, J., Yphantis, D.A., Thomason, A.R., 1994. Formation of mitogenically active PDGF-B dimer does not require interchain disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 269, 12351–12359.

Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Clark, G.J., Kinch, M.S., Der, C.J., 1995. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6443–6453.

Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., Matsuda, M., 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12, 3331–3336. doi:10.1101/gad.12.21.3331

Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., Cheresch, D.A., 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* 137, 481–492.

Kunimoto, M., Suzuki, T., 1997. Migration of granule neurons in cerebellar organotypic cultures is impaired by methylmercury. *Neurosci. Lett.* 226, 183–186. doi:10.1016/S0304-3940(97)00273-5

Kypta, R.M., Goldberg, Y., Ulug, E.T., Courtneidge, S.A., 1990. Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell* 62, 481–492. doi:10.1016/0092-8674(90)90013-5

Lambert de Rouvroit, C., Goffinet, A.M., 2001. Neuronal migration. *Mech. Dev.*

105, 47–56.

- Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., Parnavelas, J.G., 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19, 7881–7888.
- Lee, J.S., Kang Decker, N., Chatterjee, S., Yao, J., Friedman, S., Shah, V., 2005. Mechanisms of nitric oxide interplay with Rho GTPase family members in modulation of actin membrane dynamics in pericytes and fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 166, 1861–1870. doi:10.1016/S0002-9440(10)62495-9
- Leyshon-Sorland, K., Jasani, B., Morgan, A.J., 1994. The localization of mercury and metallothionein in the cerebellum of rats experimentally exposed to methylmercury. *Histochem. J.* 26, 161–169.
- Lim, L., Manser, E., Leung, T., Hall, C., 1996. Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur. J. Biochem.* 242, 171–185.
- Lim, Y., Lim, S.-T., Tomar, A., Gardel, M., Bernard-Trifilo, J.A., Chen, X.L., Uryu, S.A., Canete-Soler, R., Zhai, J., Lin, H., Schlaepfer, W.W., Nalbant, P., Bokoch, G., Ilic, D., Waterman-Storer, C., Schlaepfer, D.D., 2008. PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *J. Cell Biol.* 180, 187–203. doi:10.1083/jcb.200708194
- Ilić, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T., Aizawa, S., 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* doi:10.1038/377539a0
- Maddala, R., Reddy, V.N., Epstein, D.L., Rao, V., 2003. Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* 9, 329–336. doi:v9/a46 [pii]
- Mancini, J.D., Autio, D.M., Atchison, W.D., 2009. Continuous exposure to low concentrations of methylmercury impairs cerebellar granule cell migration in

organotypic slice culture. *Neurotoxicology* 30, 203–208.
doi:10.1016/j.neuro.2008.12.010

Marcoux, N., Vuori, K., 2003. EGF receptor mediates adhesion-dependent activation of the Rac GTPase: a role for phosphatidylinositol 3-kinase and Vav2. *Oncogene* 22, 6100–6106. doi:10.1038/sj.onc.1206712

Marignani, P.A., Carpenter, C.L., 2001. Vav2 is required for cell spreading. *J. Cell Biol.* 154, 177–186.

Marín, O., Rubenstein, J.L.R., 2003. CELL MIGRATION IN THE FOREBRAIN. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 441–483.
doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058

Martini, F.J., Valiente, M., Lopez Bendito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolmillos, M., Marin, O., 2009. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136, 41–50.
doi:10.1242/dev.025502

Marty, M.S., Atchison, W.D., 1997. Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar granule cells following in vitro exposure to methyl mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 319–330. doi:10.1006/taap.1997.8262

Matsumoto, H., Koya, G., Takeuchi, T., 1965. Fetal Minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 24, 563–574.

Matsuo, H., Tsukada, S., Nakata, T., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Cha, S.H., Inatomi, J., Yorifuji, H., Fukuda, J., Endou, H., Kanai, Y., 2000. Expression of a system L neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Neuroreport* 11, 3507–3511.

McDowell, M.A., Dillon, C.F., Osterloh, J., Bolger, P.M., Pellizzari, E., Fernando, R., Montes de Oca, R., Schober, S.E., Sinks, T., Jones, R.L., Mahaffey, K.R., 2004. Hair mercury levels in U.S. children and women of childbearing age: reference range data from NHANES 1999-2000. *Environ. Health Perspect.* 112, 1165–1171.

- Meng, W., Numazaki, M., Takeuchi, K., Uchibori, Y., Ando-Akatsuka, Y., Tominaga, M., Tominaga, T., 2004. DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src-dependent manner. *EMBO J.* 23, 760–771. doi:10.1038/sj.emboj.7600095
- Mitra, S.K., Hanson, D. a, Schlaepfer, D.D., 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 56–68. doi:10.1038/nrm1549
- Miura, K., Himeno, S., Koide, N., Imura, N., 2000. Effects of methylmercury and inorganic mercury on the growth of nerve fibers in cultured chick dorsal root ganglia. *Tohoku J. Exp. Med.* 192, 195–210.
- Mori, S., Rönstrand, L., Yokote, K., Engström, A., Courtneidge, S.A., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., 1993. Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J.* 12, 2257–64.
- Morris, N.R., Efimov, V.P., Xiang, X., 1998. Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.* 8, 467–470.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., Seiki, M., 2012. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 1–12. doi:10.1155/2012/310616
- Nery, S., Fishell, G., Corbin, J.G., 2002. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.* 5, 1279–1287. doi:10.1038/nn971
- Niggli, V., Rossy, J., 2008. Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 344–349. doi:10.1016/j.biocel.2007.02.012
- Nobes, C.D., Hall, A., 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and

- adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235–1244.
- Nobes, C.D., Hall, A., 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62. doi:10.1016/0092-8674(95)90370-4
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., Kriegstein, A.R., 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714–720. doi:10.1038/35055553
- NRC (National Research Council), 2000. Toxicological Effects of Methylmercury. National Academy Press, Washington, DC.
- Olson, M.F., Ashworth, A., Hall, A., 1995. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269, 1270–1272.
- Oppedisano, F., Galluccio, M., Indiveri, C., 2010. Inactivation by Hg²⁺ and methylmercury of the glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: Prediction of the involvement of a CXXC motif by homology modelling. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1266–1273. doi:10.1016/j.bcp.2010.06.032
- PASSOW, H., ROTHSTEIN, A., CLARKSON, T.W., 1961. The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol. Rev.* 13, 185–224.
- Pawson, T., Scott, J.D., 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075–2080.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., Hahn, K.M., 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069–1072. doi:10.1038/nature04665
- Pestronk, A., 1997. Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates. *Neurol.* 48, 299–300. doi:10.1212/WNL.48.1.299-b
- Petroni, D., Tsai, J., Agrawal, K., Mondal, D., George, W., 2012. Low-dose methylmercury-induced oxidative stress, cytotoxicity, and tau-

- hyperphosphorylation in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Environ. Toxicol.* 27, 549–555. doi:10.1002/tox.20672
- Pola, S., 2003. Anti-migratory and Anti-invasive Effect of Somatostatin in Human Neuroblastoma Cells: INVOLVEMENT OF RAC AND MAP KINASE ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* 278, 40601–40606. doi:10.1074/jbc.M306510200
- Pollard, T.D., 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 451–477. doi:10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936
- Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465. doi:10.1016/S0092-8674(03)00120-X
- Qiu, R.G., Abo, A., McCormick, F., Symons, M., 1997. Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3449–3458.
- Qiu, R.G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., Symons, M., 1995. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374, 457–459. doi:10.1038/374457a0
- Qu, H., Syversen, T., Aschner, M., Sonnewald, U., 2003. Effect of methylmercury on glutamate metabolism in cerebellar astrocytes in culture. *Neurochem. Int.* 43, 411–416.
- Raftopoulou, M., Hall, A., 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* 265, 23–32. doi:10.1016/j.ydbio.2003.06.003
- Raines, E.W., Bowen-Pope, D.F., Ross, R., 1990. Platelet-Derived Growth Factor, in: Sporn, M.B., Roberts, A.B. (Eds.), *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 173–262. doi:10.1007/978-3-642-49295-2_5
- Rakic, P., 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145, 61–83. doi:10.1002/cne.901450105
- Rakic, P., 1971a. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex.

- Brain Res. 33, 471–476.
- Rakic, P., 1971b. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J. Comp. Neurol.* 141, 283–312.
doi:10.1002/cne.901410303
- Ralston, R., Bishop, J.M., 1985. The product of the protooncogene c-src is modified during the cellular response to platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7845–9.
- Ridley, A.J., 2001a. Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114, 2713–2722.
- Ridley, A.J., 2001b. Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS Lett.* 498, 168–171.
- Rohatgi, R., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* 150, 1299–1310.
- Roskoski, R., 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1155–1164. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.171
- ROTHSTEIN, A., 1959. Cell membrane as site of action of heavy metals. *Fed. Proc.* 18, 1026–1038.
- Sager, P.R., Doherty, R.A.F., Olmsted, J.B., 1983. Interaction In Vitro of Methylmercury with Microtubules in Cultured Cells and [1 , 21 and a teratogen [3 , 41 in the mass poisonings in Japan [S] and Iraq [6]. The developing CNS appears to be more sensitive to MeHg than is that of adults , and the 146, 127–137.
- Sanchez, A.M., Flamini, M.I., Baldacci, C., Goglia, L., Genazzani, A.R., Simoncini, T., 2010. Estrogen receptor- α promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. *Mol. Endocrinol.* 24, 2114–2125. doi:10.1210/me.2010-0252
- Sarafian, T., Verity, M.A., 1991. Oxidative mechanisms underlying methyl mercury

- neurotoxicity. *Int. J. Dev. Neurosci.* 9, 147–153.
- Sass, J.B., Haselow, D.T., Silbergeld, E.K., 2001. Methylmercury-induced decrement in neuronal migration may involve cytokine-dependent mechanisms: A novel method to assess neuronal movement in vitro. *Toxicol. Sci.* 63, 74–81. doi:10.1093/toxsci/63.1.74
- Satoh, T., Fantl, W.J., Escobedo, J.A., Williams, L.T., Kaziro, Y., 1993. Platelet-derived growth factor receptor mediates activation of ras through different signaling pathways in different cell types. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3706–3713.
- Schlaepfer, D.D., Mitra, S.K., 2004. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 92–101. doi:10.1016/j.gde.2003.12.002
- Servitja, J.M., Marinissen, M.J., Sodhi, A., Bustelo, X.R., Gutkind, J.S., 2003. Rac1 function is required for Src-induced transformation: Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J. Biol. Chem.* 278, 34339–34346. doi:10.1074/jbc.M302960200
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., Schlaepfer, D.D., 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* 2, 249–256. doi:10.1038/35010517
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Schlaepfer, D.D., 1999. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 1, 2677–2691.
- Simmons-Willis, T. a, Koh, A.S., Clarkson, T.W., Ballatori, N., 2002. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochem. J.* 367, 239–246. doi:10.1042/BJ20020841
- Smits, A., Kato, M., Westermark, B., Nistér, M., Heldin, C.H., Funa, K., 1991. Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF): Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8159–63. doi:10.1073/pnas.88.18.8159

- Stover, D.R., Furet, P., Lydon, N.B., 1996. Modulation of the SH2 binding specificity and kinase activity of Src by tyrosine phosphorylation within its SH2 domain. *J. Biol. Chem.* 271, 12481–12487. doi:10.1074/jbc.271.21.12481
- Ten Klooster, J.P., Jaffer, Z.M., Chernoff, J., Hordijk, P.L., 2006. Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor ??-Pix. *J. Cell Biol.* 172, 759–769. doi:10.1083/jcb.200509096
- Thomas, S.M., Brugge, J.S., 1997. Cellular Functions Regulated By Src Family Kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513–609. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.513
- Timpson, P., Jones, G.E., Frame, M.C., Brunton, V.G., 2001. Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase activity. *Curr. Biol.* 11, 1836–1846. doi:10.1016/S0960-9822(01)00583-8
- Toimela, T., Tähti, H., 2004. Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. *Arch. Toxicol.* 78, 565–574. doi:10.1007/s00204-004-0575-y
- Toyama, T., Shinkai, Y., Sumi, D., Kumagai, Y., 2010. Carbon monoxide derived from heme oxygenase-2 mediates reduction of methylmercury toxicity in SH-SY5Y cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 249, 86–90. doi:10.1016/j.taap.2010.08.021
- Van Aelst, L., D'Souza-Schorey, C., 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11, 2295–2322. doi:10.1101/gad.11.18.2295
- Vendrell, I., Carrascal, M., Campos, F., Abi??n, J., Su??ol, C., 2010. Methylmercury disrupts the balance between phosphorylated and non-phosphorylated cofilin in primary cultures of mice cerebellar granule cells A proteomic study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 109–118. doi:10.1016/j.taap.2009.09.022
- Vogel, D.G., Margolis, R.L., Mottet, N.K., 1985. The effects of methyl mercury binding to microtubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80, 473–486.

doi:10.1016/0041-008X(85)90392-8

- Wagner, B., Gorin, Y., 2014. Src tyrosine kinase mediates platelet-derived growth factor BB-induced and redox-dependent migration in metanephric mesenchymal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 306, F85-97.
doi:10.1152/ajprenal.00371.2013
- Ward, M.E., Jiang, H., Rao, Y., 2005. Regulated formation and selection of neuronal processes underlie directional guidance of neuronal migration. *Mol. Cell. Neurosci.* 30, 378–387. doi:10.1016/j.mcn.2005.08.002
- Weaver, A.M., Young, M.E., Lee, W.-L., Cooper, J.A., 2003. Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 23–30.
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., Horwitz, A.F., 2004. FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6, 154–161.
doi:10.1038/ncb1094
- Webb, D.J., Parsons, J.T., Horwitz, A.F., 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* 4, E97-100. doi:10.1038/ncb0402-e97
- Weiner, O.D., Neilsen, P.O., Prestwich, G.D., Kirschner, M.W., Cantley, L.C., Bourne, H.R., 2002. A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat. Cell Biol.* 4, 509–513.
doi:10.1038/ncb811
- Welch, M.D., Mullins, R.D., 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 247–288. doi:10.1146/annurev.cellbio.18.040202.112133
- Wennstrom, S., Hawkins, P., Cooke, F., Hara, K., Yonezawa, K., Kasuga, M., Jackson, T., Claesson-Welsh, L., Stephens, L., 1994. Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr. Biol.* 4, 385–393.
- Whittaker, C.A., Bergeron, K.-F., Whittle, J., Brandhorst, B.P., Burke, R.D., Hynes, R.O., 2006. The echinoderm adhesome. *Dev. Biol.* 300, 252–266.

doi:10.1016/j.ydbio.2006.07.044

Wong, S.L., Lye, E.J.D., 2008. Lead, mercury and cadmium levels in Canadians. *Heal. reports* 19, 31–36.

Wu, X., Suetsugu, S., Cooper, L.A., Takenawa, T., Guan, J.L., 2004. Focal Adhesion Kinase Regulation of N-WASP Subcellular Localization and Function. *J. Biol. Chem.* 279, 9565–9576. doi:10.1074/jbc.M310739200

Zaidel-Bar, R., 2009. Evolution of complexity in the integrin adhesome. *J. Cell Biol.* 186, 317 LP-321.

Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B., 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* 9, 858–867.
doi:10.1038/ncb0807-858