

Elementos traza como factores ambientales moduladores de la expresión epigenética para la destreza manual, habilidades cognitivas de lecto-escritura y asimetría cerebral

Ratti, S.^{1,4}, Armentano, V.¹, Carignano, C.², Cioccale, M.³, Alvarez, E.O.^{1,2}

(1) Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, (2) CONICET, (3) Universidad Nacional de Córdoba y (4) Instituto de Ciencias de la Salud, Fundación H. Barceló, sede La Rioja.

Introducción

La Geología Médica es una disciplina nueva que trata sobre la relación de los factores geológicos naturales, la salud en el hombre y los animales, entendiendo la influencia de factores ambientales ordinarios en la distribución geográfica de problemas de salud (Selinus, O., 2004). Se conocen 25 elementos en cantidades traza de ocurrencia natural que son esenciales para la vida tanto vegetal como animal incluyendo al hombre. Son elementos traza porque su abundancia natural sobre la tierra generalmente son muy bajas (concentraciones de mg/kg en la mayoría de los suelos). Dentro de los efectos biológicos que son capaces de condicionar los elementos traza nos interesó estudiar la participación de los mismos en los mecanismos epigenéticos, que se definen como aquellos que controlan la expresión de los genes sin modificar la estructura primaria del ADN.

Para ello se seleccionó el gen HSR (*Hand Skill Relative*) descrito como *improntado* y cuya alteración del fenotipo involucra trastornos del lenguaje, pérdida de la dominancia para el uso de la mano derecha y pérdida de la asimetría cerebral.

Si bien no se ha descrito hasta el momento los mecanismos que desencadenan el patrón de *impronta* normal, se han encontrado evidencias que el yodo participaría en la génesis de ciertas áreas de SNC sin ser parte constitutiva de la hormona tiroidea (Vega-Núñez et al., 1995). Este hecho resalta la importancia que los elementos trazas podrían tener en la regulación de estos mecanismos que actualmente son muy poco conocidos y muy poco estudiados.

Evidencias de alteraciones de la expresión del gen HSR

En estudios anteriores (Proyecto de investigación, “Bociógenos como alteradores de factores epigenéticos”, Subsidio IUCS, Fundación Barceló, 2003-2005, Ratti et al., 2007), se dividió a la provincia de La Rioja en dos regiones debido a sus características geológicas diferenciales: Región 1, ubicada al sur-este de la provincia y la Región 2 al nor-oeste, ésta última caracterizada por ser una zona minera. En esta zona se han detectado numerosos minerales con perspectiva de tener algún papel en los mecanismos regulatorios fisiológicos (Kudrin, 2000). Los resultados obtenidos de este estudio han mostrado que la Región 1 es comparable con las características fenotípicas descriptas a nivel mundial para el gen HSR, por lo que se consideró que reunía los requisitos de un grupo control (Ratti et al., 2006). En la región 2 se encontraron proporciones alteradas del uso de la mano derecha, el giro del remolino del cabello y trastornos de lecto-escritura (Ratti et al., 2004; Ratti et al., 2005). Lo más relevante de la Región 2, que está en estrecha relación con las fallas escolares, fue la detección de un 44.7% de trastornos de escritura asociados a la pérdida del sentido del giro del remolino central del cabello, como expresión indirecta de la pérdida de la asimetría cerebral (Ratti et al., 2005). Estos resultados apoyan fuertemente la idea que un posible gen o regulador génico podría estar involucrado en las alteraciones encontradas. A un grupo de niños de ambas regiones se les extrajo sangre

periférica para análisis molecular de los patrones de metilación del ADN. A todos estos niños se les realizó examen físico médico y se les confeccionó la historia clínica con orientación en genética médica. Se procedió posteriormente a la extracción de ADN con el método de extracción salina (Current Protocols in Human Genetics, 2000) y posterior corte con enzimas de restricción que reconocen secuencias CCGG: MspI enzima que corta la secuencia CCGG independientemente de que esté o no metilada la segunda citosina y la enzima Hpa II selectiva de la secuencia CCGG pero que no reconoce la secuencia si la segunda citosina se encuentra metilada (Moore, 2002). Nuestros primeros resultados muestran que el corte con la enzima Msp I no muestra cambios en las muestras de ADN de la región 1 y la región 2, pero el corte con la enzima Hpa II muestra aumento de bandas en las muestras de ADN de la región 1 lo que permite inferir que el ADN extraído de los niños de la región 2 se encuentra más metilado. Estos resultados preliminares no son concluyentes, por lo que actualmente estamos aplicando en estas mismas muestras la técnica de electroforesis capilar que nos permitirá comparar nuevamente densidad de citosinas metiladas de la región 1 y la región 2 para el posterior análisis comparativo. Estos análisis confirman la descripción publicada con anterioridad (Francks, et al, 2004) de que el gen HSR está regulado en su transcripción por el mecanismo epigenético de impronta genómica y que podría ser susceptible de ser alterado por algún factor ambiental que explicaría la regionalización de las anomalías.

Evidencias que sustentan la hipótesis de la participación de los elementos trazas en la expresión del gen HSR

La provincia de La Rioja, especialmente su región montañosa oeste, presenta procesos de mineralización (metalogenética) que constituyen una excelente fuente de materias primas minerales. El último relevamiento (SEGEMAR, 1999) indica que en la Región 2 existen mineralizaciones de: Ba, Be, Ca, Co, Cr, Ni, Sb, Sr, Fe, Mn, Mo, Au, Ag, Pb, Zn, Se, U y W, como así también asociados a este tipo de yacimientos minerales, en menores concentraciones, otros elementos. Los análisis químicos de aguas superficiales, sedimentos y vegetación realizados por Fernández-Turiel et al. (1995) en el cordón serrano de Famatina, encontraron altos contenidos de metales (Cu, Cd, Rb, Zn, Sn, Be, Cr, Sb, Ag, Au, Co, Ni, Bi, Li, Ba, Cs, Sr, As, Hg, Th, Y, U, Mo, B, Rb, Hf y Tierras Raras).

De acuerdo con estos antecedentes, es bastante razonable suponer la existencia de una relación funcional entre la expresión génica del HSR con las características geoquímicas de las regiones de La Rioja. Para encontrar un nexo mucho más causal y directo se hizo necesario desarrollar un modelo animal para evaluar la posible interferencia de los elementos traza en la expresión de características fenotípicas similar al HSR en un animal experimental como es la rata, donde nuestro laboratorio tiene experiencia.

Estudios en ratas. Una propuesta experimental

La experiencia en niños en la provincia de La Rioja permiten plantear un modelo experimental que extendiendo los alcances de las hipótesis de las modificaciones de la expresión del gen HSR, permitan más directamente evaluar la posibilidad que los elementos trazas podrían explicar la naturaleza de los hallazgos observados en humanos (Ratti et al, 2007). Aún cuando no se ha descrito el gen HSR en la rata, los estudios del ADN en varias especies han mostrado que existen regiones cromosómicas equivalentes o semejantes en diversas especies que podrían regular expresiones fenotípicas similares. Una de las principales expresiones del gen HSR en los humanos está relacionada con la lateralidad y esta propiedad está presente en aves, mamíferos y primates no humanos (Abrego & Alvarez, 2007, Alvarez y Banzan, 2006, 2007). Por lo tanto, es posible que ciertos aspectos de lateralidad en los animales puedan ser una aproximación aceptable para estudiar el putativo regulador génico de estas funciones y eventualmente,

proyectar estos resultados al hombre. Estas ideas se están actualmente desarrollando en nuestro laboratorio y sus resultados aún no están disponibles para su análisis. El esquema experimental que se está aplicando es el siguiente:

Se utilizan ratas hembras preñadas de la cepa Holtzman y sus respectivas crías, sin distinción de sexo. El día del nacimiento (aproximadamente 21 días después de la fertilización), se designa como día 0. Todas las crías permanecen con sus madres hasta el día 21, fecha donde se separan definitivamente de las madres y se agrupan de 5-7 animales en jaulas separadas. Hay 2 grupos de ratas: (i) Control, que tienen dieta normal y agua potable pura y (ii) tratados con elementos trazas, dieta normal y elementos trazas en el agua. Al día 30, todos los grupos se someterán al estudio de pruebas de lateralidad, cognición, relación social y conductas de defensa.

1) Pruebas de lateralidad:

Como modelo de lateralidad, se utilizó el protocolo de las conductas de decisiones preferenciales espaciales frente a estímulos ambientales novedosos (Alvarez & Abrego., 2007). Estas consisten:

Laberinto en T (LT).

Consistente en 2 pasillos, dispuestos en 90° entre si en tal forma que uno termina en la mitad del otro, donde en cada extremo existe un refugio, protegido de la luz. Los animales se colocarán en el inicio y serán expuestos a una luz intensa. El mayor número de veces que el animal elija uno de los refugios se contará como decisión preferencial.

Laberinto Doble de Elecciones Múltiples (LEM).

Consistente en una caja rectangular dividida por compartimientos en serie dispuestos perpendicularmente al eje longitudinal de la caja. Cada compartimiento tiene una puerta de comunicación con el siguiente, donde a su vez hay dos puertas separadas entre si, ubicadas a la derecha y a la izquierda del compartimiento y que comunican con la unidad siguiente. La mayor elección de una sobre la otra puerta, se contabilizará como decisión preferencial.

Laberinto Doble Holeboard Lateral (LDHBL).

Consistente en una caja rectangular formada por un compartimiento de espera que por una puerta abierta comunica a un pasillo que tiene a ambos lados paredes con agujeros. La exploración espontánea del animal permite que explore pared y/o los agujeros del lado izquierdo o del derecho. *Head-dipping*, olfateos, *rearing* y caminatas en uno de los lados mayor que el otro se considerará como decisión preferencial y prueba de lateralidad.

2) Pruebas de cognición:

Los diferentes grupos serán expuestos al aprendizaje de una respuesta de evitación condicionada a un tono de ultrasonido que anticipa un golpe eléctrico en las patas del animal, como se ha descrito en detalle en publicaciones anteriores (Alvarez & Banzan, 1995)

3) Pruebas de interacción social:

Los diferentes grupos serán testados en forma individual en una caja de interacción social. La prueba se inicia colocando al animal que va a ser estudiado como huésped, durante 2 min en la caja de interacción social. Al min 3 se le coloca un animal intruso y en los próximos 3 min se estudian los parámetros de interacción social del huésped con el animal intruso.

4) Pruebas de defensa y supervivencia:

Se utilizará la prueba de natación forzada en ambos grupos, como modelo de evaluación de las conductas de defensa y supervivencia, como se ha descrito en publicaciones anteriores (Fracchia et al., 1992)

En conjunto, todas estas pruebas pretenden caracterizar los distintos aspectos de la expresión fenotípica HSR-simil en la rata.

Análisis y discusión

Si se detecta que el tratamiento con los elementos traza, induce una alteración de las conductas en las pruebas seleccionadas en el diseño de conductas simil-HSR en el grupo tratado, se tendrá una evidencia altamente sugerente que estos elementos podrían estar actuando en los

mecanismos cerebrales internos que regulan la expresión de estas conductas. Un análisis molecular efectuado en tejido cerebral de algunas estructuras del sistema límbico de estos animales, permitiría mostrar si paralelo a estas modificaciones conductuales, además existe una modificación de los patrones de metilación que son índice de regulación epigenética de las características HSR-símil en la rata. Con estos posibles resultados, se podrá postular que los elementos trazas pueden ser agentes modificadores de procesos epigenéticos determinados, como en la proyección humana lo muestran los cambios atribuibles al gen HSR.

Agradecimientos

Este trabajo ha recibido el apoyo del Instituto de Ciencias de la Salud, Fundación H. Barceló, sede La Rioja y de la Secretaría de Investigación de Ciencia, Tecnología y Postgrado de la Universidad Nacional de Cuyo.

Referencias bibliográficas

Abrego VA, Alvarez EO (2007) Evidence that rats show preferential choice of exploratory responses when exposed to novel environments: preliminary evidence . *BioCell* 31 (1): 178

Alvarez EO, Abrego VA (2007) Conductas exploratorias espontáneas de decisión preferencial en la rata: Papel del hipocampo. *Medicina* 67: 160

Alvarez EO, Banzan AM (1995) Effects of localized histamine microinjections into the hippocampal formation on the retrieval of a conditioned avoidance response in rats. *The Journal of Neural Transmission* 101: 201-211

Alvarez EO, Banzan AM (2007) Activación de los circuitos neuronales histaminérgicos de la amígdala baso-lateral en la expresión lateralizada de la conducta exploratoria en la rata. *Medicina* 67: 160

Alvarez EO, Banzan AM. (2006) Lateralidad en el comportamiento exploratorio de ambientes novedosos en ratas. *XX Jornadas de Investigación y II de Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo, Libro de Resúmenes, Tomo II, pp. 217-218, Editorial EDIUNC*

Fernández-Turiel JL, López-Soler AM, Llorens JF, Querol X. (1995) Environmental monitoring using surface water, river sediments, and vegetation: a case study in the Famatina range, La Rioja, NW Argentina. *Environmental International*. 21: 807-820.

Fracchia LN, González-Jatuff A, Alvarez EO (1992) The effect of chronic unpredictable stress on locomotor and exploratory activity in male rats with different endogenous prolactin levels. *The Journal of Neural Transmission* 89: 179-192

Francks C, Maegawa S, McAuley EZ, Richardson AJ, Stein JF, Oshimura M, Monaco AP. (2004) A novel imprinted locus on chromosome 2p12 associated with relative hand skill in humans. Abstract. XIIth World Congress of Psychiatric Genetics, Burlington Hotel, Dublin, Ireland, 9th-13th October.

Kudrin, A. V. (2000) Trace elements in regulation of NF-kB activity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 14, pp 129-142 .

Moore Tom (2002) Southern Analysis Using Methyl-Sensitive Restriction Enzymes. Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, New Jersey, Cap. 14, pag. 193-203

Ratti SG, Rearte MI, Colla R, Fuenzalida L, Miranda E, Oyola ML, Robledo ML, Alvarez EO (2004) Estudio de la expresión fenotípica del gen HSR (Hand Skill Relative) en una muestra de niños con escolaridad primaria en La Rioja. Medicina 64 (Suppl II): 353

Ratti SG, Rearte SN, Alvarez EO (2006) Perspectivas filogenéticas del uso de la mano, asimetría cerebral y capacidad de lecto escritura. Revista Médica Universitaria 2 (2): pp1-9, (<http://revista.medicina.edu.ar/>)

Ratti SG, Rearte SN, Alvarez EO. (2005) Handedness, brain asymmetry, and writing capacity in children from 2 regions of La Rioja (Argentina): an association analysis. Biocell 29: 376

Ratti, SG, Cordoba P, Rearte S, Alvarez EO. (2007) Differential expression of Handedness, Scalp Hair-whorl direction, and cognitive abilities in primary school children. International Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration 4: 52-60

Selinus Olle (2004) Geología Médica: Una especialidad emergente. Terre, Vol. 1 (1), (A1-A8)

Vega-Núñez E, Menéndez-Hurtado A, Garesse R, Santos A, Pérez-Castillo A. (1995) Thyroid hormone regulated brain mitochondrial genes revealed by differential cDNA cloning. J Clin Invest 96: 893-899