

Modelos Alternativos in Vitro para el Estudio y la Evaluación de Neurotoxicidad

Repetto G^{1,2}, Zurita JL¹, Jos A², del Peso A¹, Salguero M¹, Ríos JC³, Repetto M²

¹ Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Avda Dr Fedriani s/n. 41009 Sevilla. repetto@us.es

² Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. Prof. García González 2. 41012 Sevilla

³ CITUC. Pontificia Universidad Católica de Chile

Resumen

La evaluación de la neurotoxicidad de una sustancia química se aborda habitualmente con un conjunto de procedimientos experimentales regulados utilizando animales. Los ensayos básicos debieran amplificarse incluyendo exploraciones neurológicas e histopatológicas. El objetivo de los estudios neurotoxicológicos en células y tejidos in vitro es caracterizar los sustratos moleculares y las rutas que contribuyen a modificar la conducta, alterar la función o inducir cambios patológicos por la exposición a un tóxico. Los métodos *in vitro* en neurotoxicología permiten fundamentalmente investigar mecanismos de toxicidad tratando de reproducir aspectos concretos de la patología tóxica. De acuerdo con las características propias, pueden investigarse alteraciones específicas en la estructura y fisiología de los diferentes tipos celulares. Así se identifican y cuantifican moléculas específicas, enzimas, receptores, y otros componentes celulares. La membrana hematoencefálica, que protege o conecta selectivamente a la mayor parte del sistema nervioso puede ser modelada utilizando cultivos sobre insertos de membranas semipermeables. La gran variedad de sistemas experimentales disponibles y la posibilidad de emplear indicadores cada vez más sensibles y específicos supone una gran esperanza para la paulatina introducción de procedimientos in vitro concretos entre los sistemas de evaluación neurotoxicológica.

Palabras clave: Neurotoxicidad, in vitro, alternativas

Abstract:

The neurotoxicological evaluation of chemicals is usually carried out with a group of regulated experimental procedures using animals. The basic procedures should be amplified to include neurological and pathological examinations. The objective of neurotoxicological studies using cells and tissues in vitro is to characterize the molecular and cellular substrates and pathways that contribute to impaired behaviour, altered function, or pathological changes from the exposure to a toxicant. In vitro methods in neurotoxicology mainly allows the investigation of the mechanisms of toxicity trying to reproduce specific aspects of the toxic pathology. Regarding the own characteristics, specific alterations the structure and the physiology of the different cell types can be investigated. Furthermore, specific molecules, enzymes, receptors and other cellular components are identified and quantified. The blood-brain barrier, witch protects or connect selectively most of the nervous system, can be modelled using cell cultures on inserts with semipermeable membranes. The variety of experimental systems available and the possibility of using more sensitive and specific endpoints may allow the introduction of specific in vitro procedures in the systems of neurotoxicological evaluations.

Key words: Neurotoxicity, in vitro, alternatives

Introducción

El Sistema Nervioso es un órgano diana complejo y único a la acción de las sustancias tóxicas. Depende de la cooperación de billones de células que generan patrones de actividad bioquímica y eléctrica que es expresada en una compleja red neural. El daño tóxico a una zona del sistema puede originar efectos muy graves. A pesar de tal complejidad, es preciso evaluar el riesgo que la exposición a los compuestos químicos presenta para el ser humano [1].

Estudios regulados

La evaluación de la neurotoxicidad de una sustancia química se aborda habitualmente con un conjunto de procedimientos experimentales regulados utilizando animales [2]. En primer lugar, en los ensayos agudos y crónicos se aplican diferentes exámenes básicos conductuales y de reflejos. Sin embargo podría obtenerse mucha más información si se amplificaran incluyendo exploraciones neurológicas e histopatológicas. Ello guiaría en gran medida la realización de procedimientos de evaluación de la neurotoxicidad en roedores, que suponen la base del sistema (UE B43, OECD TG 424, US 870.6200). Los estudios de neurotoxicidad retardada por organofosforados tras exposición aguda se realizan en gallina (UE B.38, OECD TG418, US EPA 870.6100), al igual que los de neurotoxicidad retardada por organofosforados tras 28 días de exposición (UE B.38, OECD TG419, US EPA 870.6100). Por último también se investiga la neurotoxicidad del desarrollo (US EPA 870.6300, OCDE Borrador TG 426, UE).

Sin embargo, la mayoría de los sucesos que ocurren en los procesos neurotoxicológicos in vivo están muy lejos de la directa observación o manipulación por el investigador. Por lo tanto, los toxicólogos utilizan modelos biológicos reduccionistas de las posibles moléculas, células o tejidos implicados en el proceso [3]. Tras exponerlos a diversos compuestos y observar sus respuestas se trata de inferir las correspondientes respuestas in vivo.

Nuevas perspectivas

El objetivo de los estudios neurotoxicológicos en células y tejidos in vitro es caracterizar los sustratos moleculares y las rutas que contribuyen a modificar la conducta, alterar la función o inducir cambios patológicos por la exposición a un tóxico. Estos sustratos forman un amplio espectro que refleja la jerárquica organización biológica [3]. En un extremo del espectro se encuentran los cultivos de células neuronales, y al otro un organismo que presenta conducta y mente. En medio existe una formidable hueco. Sin embargo, es ahora posible avanzar desde el extremo reduccionista de la biología celular y molecular hacia el espacio central, gracias al incremento del conocimiento de las utilidades y limitaciones de diferentes procedimientos in vitro.

La configuración del modelo experimental se basa en dos pilares fundamentales, que son el sustrato biológico y los indicadores de neurotoxicidad [4]. El sustrato biológico es el material orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica el xenobiótico y cuyas reacciones ante tal estímulo queremos comparar con las de los animales superiores y posteriormente extrapolar al hombre. Estas alteraciones se valoran mediante los denominados indicadores de neurotoxicidad, que son los parámetros que determinamos para cuantificar las modificaciones producidas. El valor predictivo del modelo experimental in vitro dependerá de la buena conjunción entre su sustrato biológico y los indicadores de neurotoxicidad aplicados.

Los métodos *in vitro* en neurotoxicología permiten fundamentalmente investigar mecanismos de toxicidad tratando de reproducir aspectos concretos de la patología tóxica. Es posible predecir y comparar la neurotoxicidad para compuestos con un mecanismo de acción definido incluso en sistemas libres de células, como en el caso de los derivados del hexano, con capacidad de unión a grupos pirrólicos de las proteínas, o la inhibición de colinesterasas [5]. En los estudios de neurotoxicidad se han utilizado gran variedad de modelos diferentes de células y tejidos, principalmente cultivos primarios y líneas celulares tumorales (de neuroblastoma, glioma, astrocitoma, feocromocitoma). También se emplean fracciones celulares y cultivos de embriones, en micromasas, de órganos, explantes y reagregados celulares. En muchos casos es posible disponer de material de origen humano, lo que facilita la extrapolación de los resultados. Las células madres se están empleando con profusión, siendo algunas fáciles de obtener, como las procedentes del cordón umbilical [6].

De acuerdo con las características propias, pueden investigarse alteraciones específicas en la estructura y fisiología de los diferentes tipos celulares. Así, mediante métodos inmunocitoquímicos se identifican y cuantifican moléculas específicas, enzimas, receptores, y otros componentes celulares.

Las alteraciones tóxicas de las células del sistema nervioso se investigan controlando específicamente la síntesis, liberación, recaptación y degradación de neurotransmisores (ACh, NA, GABA, DOPA); la densidad, afinidad, sensibilidad y activación o antagonismo de sus receptores; la fosforilación de proteínas; los sistemas de transporte de alta afinidad; los transportadores de membrana y los canales iónicos; el flujo axoplásmico; la composición y fisiología de las membranas neuronales y gliales, etc. Mediante técnicas electrofisiológicas se estudia la despolarización y repolarización neuronal, proceso común a otras células excitables, como las musculares, que pueden expresar *in vitro* contracciones espontáneas o inducidas por diferentes procedimientos [7].

El desarrollo de técnicas de cultivo neuronal ofrece nuevas perspectivas que permiten evaluar efectos tóxicos de forma rápida y sencilla. Pueden emplearse muy diversas técnicas para investigar las alteraciones tóxicas en su morfología, viabilidad, proliferación, actividad metabólica, neurotransmisión, citoesqueleto, conducción del impulso eléctrico, membranas celulares o comunicación intracelular.

Tabla 1. Modelos biológicos empleados *in vitro*

- **Cultivo de embriones**
- **Cultivo y baño de órganos**
- **Cortes**
- **Explantos. Cultivos organotípicos. Micromasas**
- **Cultivo de reagregados celulares**
- **Cultivos de células dispersas**
- **Cultivo de líneas celulares. Clones celulares.**
- **Modelos libres de células**

Mediante técnicas electrofisiológicas se estudia la despolarización y repolarización neuronal, proceso común a otras células excitables, como las musculares, que pueden expresar in vitro contracciones espontáneas o inducidas por diferentes procedimientos. Las técnicas electrofisiológicas son muy sensibles pero requerían de mucho tiempo y preparación técnica. Sin embargo, pueden actualmente utilizarse sistemas de arrays multielectrodo que permiten registrar fácilmente las actividades eléctricas simultáneas en varias zonas cerebrales, por ejemplo de cortes de hipocampo.

Determinadas capacidades de las células neuronales son muy características, como la emisión de prolongaciones debidas a su diferenciación morfológica y bioquímica, que es estimulada por diversos tóxicos, y que presenta implicaciones muy trascendentes en el desarrollo embrionario de las mismas [8, 9].

Tabla 2. Principales bioindicadores usados en procedimientos in vitro

- a) Morfología celular y tisular**
- b) Viabilidad celular**
- c) Proliferación celular**
- d) Actividad metabólica**
- e) Membrana celular**
- f) Comunicación intercelular**
- g) Indicadores específicos**

La membrana hematoencefálica, que protege o conecta selectivamente a la mayor parte del sistema nervioso de los compuestos circulantes en la sangre, puede ser modelada utilizando cultivos sobre insertos de membranas semipermeables de células animales como MDCK o humanas como Caco-2 [10, 11].

Desde un punto de vista práctico también resultan particularmente atractivos los modelos simplificados de diferentes enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer o la Enfermedad de Parkinson.

La gran variedad de sistemas experimentales disponibles y la posibilidad de emplear indicadores cada vez más sensibles y específicos supone una gran esperanza para la paulatina introducción de procedimientos in vitro concretos entre los sistemas de evaluación neurotoxicológica.

Bibliografía

1. Repetto G (2004) Estudios toxicológicos experimentales. Evaluación de Riesgos específicos. Regulaciones aplicables. Capítulo. En: "Toxicología de Postgrado". M. Repetto ed. Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla
2. Ríos JC, Jos A y Repetto G (2004) Ensayos para la Evaluación de la Neurotoxicidad. Capítulo. En: "Toxicología de Postgrado". M. Repetto ed. Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla

3. Tiffany-Castiglioni E, Ehrich M, Dees L, Costa LG, Kodavanti PR, Lasley SM, Oortgiesen M, Durham HD (1999) Bridging the gap between in vitro and in vivo models for neurotoxicology. *Toxicol Sci.* 5:178-83.
4. Repetto G, del Peso A, Salguero M, Repetto M (1999) *Inventory of the Spanish Institutions and Scientists Involved in Alternatives to the use of Laboratory Animals (Refinement, Reduction or Replacement)* *Revista de Toxicología* 16: 50-127.
5. Ríos JC, Repetto G, Galleguillos I, Jos A, del Peso A and Repetto M (2005) High concentrations of pralidoxime are needed for the adequate reactivation of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by dimethoate in vitro. *Toxicology in Vitro.* 19: 893-897
6. Buzanska L, Habich A, Jurga M, Sypecka J, Domanska-Janik K. (2005) Human cord blood-derived neural stem cell line--possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 19: 991-9.
7. Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A, Campbell IL, Classen W, Dorman DC, Galli C, Ray D, Smith RA, Tilson HA (1998) *In Vitro* Techniques for the Assessment of Neurotoxicity. *Environ Health Perspect.* 106, Suppl 1:131-58
8. Kaufmann W (2003) Current status of developmental neurotoxicity: an industry perspective. *Toxicology Letters* 140/141: 161-169
9. Ríos JC, Repetto G, Jos A, del Peso A, Salguero M, Cameán A, Repetto M (2003) Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells *in vitro*". *Toxicology in vitro.* 17: 635-641.
10. Prieto P, Blaauboer BJ, Gerrit de Boer A, Boveri M, Cecchelli R, Clemedson C, Coecke S, Forsby A, Galla A, Garberg P, Greenwood J, Price A, Tähti H (2004) Blood–Brain Barrier *In Vitro* Models and Their Application in Toxicology. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 49. *ATLA*, 32, 37–50
11. Walum E, Hedanderb J, Garberg P (2005) On the relevance of cytotoxicity measurements, barrier passage determinations and high throughput screening in vitro to select potentially hazardous compounds in large sets of chemicals *Toxicology and Applied Pharmacology* 207: S393 – S397