

7. TREBALL ANNEX

7.- TREBALL ANNEX

7.1.- INTRODUCCIÓ

7.1.1.- Els cultius primaris reagregats

El 1972, Garber i Moscona van descriure que les cèl·lules embrionàries dissociades de diferents regions cerebrals, quan són mantingudes en suspensió, tendeixen a agregar-se formant petites esferes (Garber i Moscona 1972). La caracterització d'aquestes esferes (cultius reagregats de cervell) va evidenciar que les cèl·lules del cultiu es diferencien donant lloc a una població madura de neurones, astròcits, oligodendria i microglia; i que s'hi produeix sinaptogènesis i mielinització (Atterwill i Purcell 1999). Aquests cultius presenten activitat elèctrica espontània (Stafstrom *et al.* 1980), sintetitzen i alliberen neurotransmissors, i expressen receptors per a neurotransmissors de manera similar a la situació *in vivo* (Won *et al.* 1992). La longevitat dels cultius primaris reagregats de cervell és significativament més elevada que la dels cultius primaris de teixit neural en monocapa. Si es suplementen amb un antioxidant (per exemple vitamina E) es poden mantenir en cultiu per més de dos mesos (Halks-Miller *et al.* 1981).

A finals dels anys vuitanta es va veure que els cultius reagregats de cervell tenen un gran potencial per a estudis neurotoxicològics, ja que ofereixen 3 característiques principals:

- a) es desenvolupen *in vitro* i per tant permeten provar condicions d'assaig durant diferents estadis del desenvolupament
- b) la seva longevitat *in vitro* permet fer exposicions agudes i cròniques
- c) són un sistema *in vitro* d'estructura complexa

A més, presenten altres característiques interessants com que responen a insults de neurotoxines amb gliosis reactiva de manera similar a com es produeix *in vivo* (Fox *et al.* 1996). Aquests cultius doncs, han estat utilitzats per a investigar un gran nombre d'agents neuro tòxics com poden ser el plom (Zurich *et al.* 2002), el mercuri (Eskes *et al.* 2002), l'alcohol (Vemuri i Chetty 2005) o els plaguicides organofosforats (Zurich *et al.* 2004).

Per les seves característiques, els cultius primaris reagregats de cervell han estat utilitzats també com a model per a estudis de: desmielinització (Loughlin *et al.* 1994;

Pouly *et al.* 2001; Duvanel *et al.* 2003), neurodesenvolupament (Roussa i Krieglstein 2004), tumors cerebrals (Corcoran *et al.* 2003), estrès oxidatiu (Teunissen *et al.* 2002) o senyalització intracel·lular (Teunissen *et al.* 2000).

7.2.- OBJECTIUS

Amb motiu del nostre interès per a efectuar exposicions perllongades a dieldrín, i a altres plaguicides organoclorats, en un model *in vitro* de sistema nerviós central, vam considerar el model dels cultius primaris reagregats de cervell de rata. És per això, que vaig realitzar una estada de tres mesos al departament de Biologia Cel·lular, Molecular i Immunologia de la *Vrije Universiteit* d'Amsterdam (Holanda). En aquest departament i dins el grup de recerca en neuroimmunologia, la doctora C.E. Teunissen utilitza els cultius primaris reagregats de cervell de rata com a model *in vitro* per a l'estudi de l'esclerosi múltiple, una malaltia desmielinitzant. L'objectiu de l'estada va ser doncs el d'aprendre a realitzar els cultius primaris reagregats de cervell de rata, aprendre com treballar-hi i fer les proves inicials amb el plaguicida organoclorat dieldrín.

7.3.- METODOLOGIA

7.3.1.-Cultius primaris reagregats de cervell de rata

S'utilitzaren pel cultiu de 12 a 20 fetus a dia de gestació 15 procedents de 2 rates sacrificades per decapitació després de ser anestesiades amb CO₂/O₂. Els cervells sencers dels fetus es posaren en solució de Hank's freda D2 (138 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.17 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 0.22 mM KH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 0.8 mM MgCl₂·6H₂O, 5.5 mM glucosa, 41.32 mM sucrosa, 14 µM roig de fenol i 10 µg/ml gentamicina). Posteriorment els cervells es transferiren a una bossa de nylon de 200 µm de porus (Nytal®, Merck), es rentaren 3 vegades amb solució D1 (138 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.17 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 0.22 mM KH₂PO₄, 5.5 mM glucosa, 46.52 mM sucrosa, 14 µM roig de fenol i 10 µg/ml gentamicina) i s'extreieren a través d'aquesta malla mitjançant una espàtula aplanada de vidre. La suspensió obtinguda es filtrà a través d'una malla de nylon de 105 µm i es rentà 3 vegades per centrifugació-resuspensió (12 rpm, 5 minuts, 4°C). Les cèl·lules es van suspendre a una densitat de

$1 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml en medi DMEM (Biochrom KG, Berlín, Alemanya) suplementat amb 300 µg/ml de L-glutamina, 10 µg/ml gentamicina i un 10% de sèrum fetal boví. Es cultivaren 3.5 ml de la suspensió de cèl·lules per flascó de vidre de 25 ml (DeLong®). Els flascons de vidre es col·locaren en un agitador orbital a 85 rpm en un incubador a 37°C en una atmosfera humida amb 9% CO₂/91 % aire. A les 48 hores els esferoides, ja formats (esferoides macroscòpics d'aproximadament 200 µm de diàmetre) es transferiren a flascons de 50 ml amb un volum final de medi de 8.5 ml. Tres vegades per setmana es canvien 5 ml de medi dels 8.5 ml totals, per medi fresc. Cada setmana els cultius van ser suplementats amb N-acetilcisteïna 0.5 mM. A les tres setmanes de cultiu, aquests reagregats es poden considerar diferenciats (Teunissen *et al.* 2000). Es van utilitzar cultius de mínim 3 setmanes a no ser que s'indiqui el contrari. Per a exposar els cultius als compostos d'estudi es repartiren els reagregats presents en un flascó en una placa de 6 pous amb un volum de 2 ml per pou.

7.3.2.- Estudi de la viabilitat cel·lular amb el WST-1

El reactiu disulfonat de 4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazoli]-1,3-benzé (WST-1) (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemanya) és una sal de tetrazoli que, a l'igual que el MTT, és reduïda a formazan per les deshidrogenases de les cèl·lules viables. A diferència del MTT, la salt de tetrazoli que es forma és soluble, de manera que no cal solubilitzar les cèl·lules per a mesurar la quantitat de sal de tetrazoli formada, n'hi ha prou amb mesurar l'absorbància del medi de cultiu a 450 nm.

L'assaig de viabilitat es va realitzar en plaques de cultiu de 6 pous. Abans d'incubar els cultius amb WST-1 es va canviar el medi contenint l'agent tòxic per 2 ml de medi fresc. Posteriorment es va afegir als cultius un 5 % (v/v) de WST-1 i es van incubar durant 3 hores a 37 °C en una atmosfera humida amb 9%CO₂/91% aire. Aquestes condicions foren les considerades com a òptimes, després de provar diferents concentracions i temps d'incubació. Després de la incubació es van transferir 100 µl de medi en una placa de 96 pous per triplicat i es va mesurar l'absorbància a 450 nm en un lector de plaques. L'absorbància del blanc (medi amb WST-1) es va substraure.

7.3.3.- Homogeneïzació dels cultius reagregats

Per a obtenir l'homogenat dels cultius, es van transferir els reagregats en tubs eppendorf de 1.5 ml i es van rentar 3 vegades amb solució d'homogeneïzació(10 mM

NaH₂PO₄·2H₂O, 0.5 mM EDTA i 145 mM NaCl a pH 7.0). Els reagregats es van conservar a -20 °C amb aquesta solució fins al moment de l'obtenció de l'homogenat cel·lular. Per a l'obtenció de l'homogenat es van utilitzar 0.5 ml de solució d'homogeneització per aproximadament 50 esferoides i es van homogeneïtzar amb un homogeneïtzador de ganiveta.

7.3.4.-Quantificació de proteïnes

Les proteïnes presents en l'homogenat cel·lular es van determinar amb el mètode de l'àcid bicinconínic (BCA; Pierce, IL, EUA), utilitzant BSA com a estàndard. L'absorbància es va mesurar a 562 nm.

7.3.5.-Assaigs enzimàtics

L'activitat de la glutamina sintetasa (GS) es va mesurar per la transformació enzimàtica de L-glutamina i hidroxamina a glutamilhidroxamat. Aquest forma un complex soluble amb el Fe³⁺ el qual es pot mesurar espectrofotomètricament. (Thorndike i Reif-Lehrer 1971).

L'activitat de la 2', 3'-Nucleòtid cíclic 3'-Fosfodiesterasa (CNPase) es va mesurar mitjançant la hidròlisi de NADP cíclic i acoplant-hi una segona reacció de deshidrogenació de la glucosa-6-fosfat a àcid 6-fosfogluconic, de manera que es mesura la formació de NADPH a 340 nm. El mètode utilitzat ha estat descrit prèviament (Lee et al. 2001).

7.3.6.-Immunohistoquímica contra GFAP

Els reagregats es van fixar en paraformaldehid 4%, es van deshidratar mitjançant una escala d'alcohols i xilè, i es van incloure en parafina. Les immunocitoquímiques es feien en seccions de 7 µm de gruix muntades sobre portes. Després de rehidratar la mostra es procedí a desenmascarar l'antigen mitjançant la incubació en tampó citrat (0.01 M citrat a pH 6 amb NaOH) durant 10 minuts al microones. Posteriorment, es van bloquejar les peroxidases endògenes mitjançant la incubació amb un 0.1 % H₂O₂ durant 10 minuts. Les unions inespecífiques es van bloquejar amb una solució al 10 % de sèrum de conill durant 1 hora a temperatura ambient. L'anticòs primari ratolí anti-rata GFAP (1:1000) es va incubar durant la nit a 4°C. Després dels rentats amb PBS

es va incubar l'anticòs secundari biotinilat conill anti-ratolí IgG (DAKO, Copenhagen, Dinamarca) (1:800) durant 1 hora a temperatura ambient. La immunoreactivitat va ser incrementada mitjançant un complex estreptavidina-biotina-HRP (sABC, Vector) i detectada amb diaminobenzidina (DAB, Sigma) Per a veure el total de cèl·lules es va tenyir també amb hematoxilina. En absència de l'anticòs primari no hi havia tinció del DAB.

7.3.7.-Immunohistoquímica contra la proteïna bàsica de la mielina (MBP22)

Els reagregats es van fixar amb paraformaldehid al 4 %. Posteriorment es van incubar amb una solució de sucrosa al 16 % i després de treure'n l'excés es van congelar en nitrogen líquid. Es van fer seccions al criostat de 7 µm de gruix. El protocol per a la immunocitoquímica va ser el mateix que en l'apartat anterior, excepte en què el desenmascarament de l'antigen no era necessari. L'anticòs primari era un anticòs monoclonal contra la MBP22 humana cedit pel Dr. N. Groome (School for Biological and Molecular Sciences, Oxford, UK) i es va utilitzar a diluït 1:400.

7.4.- RESULTATS I DISCUSSIÓ

7.4.1.- Utilització del WST-1 per a l'estudi de la viabilitat del cultius primaris reagregats de cervell de rata

Tal i com s'ha dit anteriorment, el WST-1 ofereix l'avantatge respecte a altres salts de tetrazoli, que al ser reduït per les cèl·lules forma un compost soluble. Per tant, no és necessari solubilitzar les cèl·lules per a mesurar el formazan format. La utilització d'aquest compost com a mesura de la viabilitat dels cultius reagregats permetria doncs, utilitzar els mateixos reagregats en què s'ha fet l'assaig de viabilitat per a fer immunocitoquímiques o assajos enzimàtics. Es va estudiar doncs, si era possible l'ús d'aquest compost en cultius reagregats.

Per a determinar en reagregats viables si es donava una bona correlació entre la quantitat de proteïna i la senyal obtinguda amb el WST-1, es van separar diferents quantitats de reagregats (aproximadament 30, 50, 150 i 200) en plaques de 6 pous, amb 2 ml de medi fresc. Després de la incubació amb el WST-1 es va mesurar

l'absorbància a 450 nm en un lector de plaques. Els reagregats es van homogeneïtzar per tal de mesurar-ne la proteïna. En la figura A.2 es mostra que va existir una bona correlació entre l'absorbància del medi de cultiu i la quantitat de proteïna. Es va determinar que aproximadament cada esferoide conté 3.5 µg de proteïna.

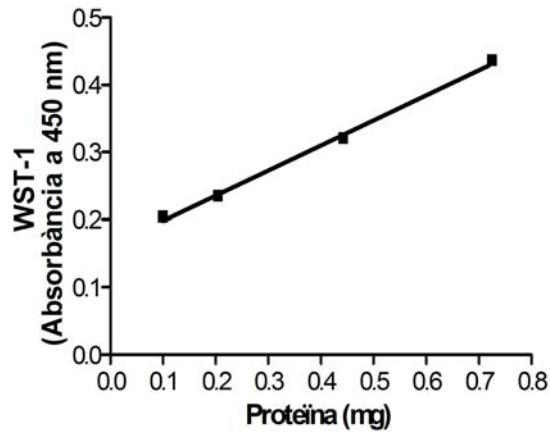


Figura 7.2.- Relació entre la concentració de proteïna en cada pou i l'absorbància a 450 nm del medi de cultiu deguda al formazan format. $r^2 = 0.9972$, $P < 0.05$.

Després de la incubació amb el WST-1, els esferoides presentaven una coloració ataronjada. Fent talls al criostat d'aquests reagregats es va observar que la coloració ataronjada era present també a l'interior de les esferes. Aquest fet juntament amb la bona correlació obtinguda amb la concentració de proteïna demostrava que el WST-1 es podia utilitzar com a assaig de proliferació cel·lular i possiblement de viabilitat cel·lular en cultius primaris reagregats de cervell de rata.

Per a comprovar la resposta del WST-1 en cultius primaris reagregats de cervell de rata amb la viabilitat disminuïda, es van tractar els reagregats amb H_2O_2 . Per això, es van posar aproximadament 50 esferoides en cada pou d'una placa de 6 pous i es van exposar a diferents concentracions de H_2O_2 (0-10 mM) per 24 hores. Finalitzada l'exposició, es va mesurar la viabilitat incubant els cultius amb WST-1 en medi fresc sense H_2O_2 . Els esferoides es van rentar i homogeneïtzar per a utilitzar-los posteriorment. La figura 7.3A mostra com l'exposició dels cultius a concentracions creixents de H_2O_2 va disminuir la capacitat dels cultius per a reduir el WST-1 a formazan, obtenint-se una bona concentració-resposta.

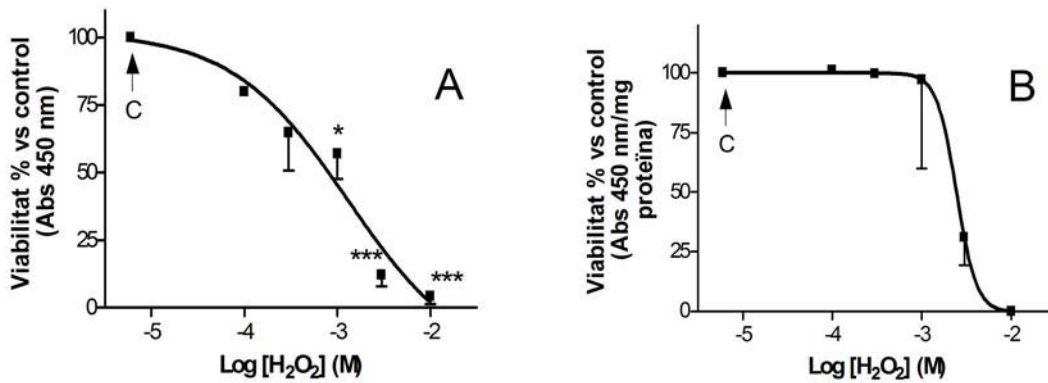


Figura 7.3.- Viabilitat dels cultius primaris reagregats de cervell de rata tractats durant 24 hores amb H_2O_2 . A) La viabilitat es representa com a tant per cent del control de l'absorbància a 450 nm (WST-1) del medi de cultiu respecte el control. B) La viabilitat es representa com a tant per cent del control de l'absorbància a 450 nm (WST-1) del medi de cultiu entre els mg de proteïna de l'homogenat. Les gràfiques representen la mitjana \pm SEM de tres experiments de cultius diferents. C: control

Cal tenir en compte que per a realitzar l'assaig de toxicitat amb H_2O_2 es van separar els reagregats d'un flascó en una placa de 6 pous. Els reagregats precipiten ràpidament dins el medi de cultiu i és doncs difícil posar el mateix nombre d'agregats per pou. A més, no tots els reagregats tenen el mateix tamany. Així doncs, cal considerar que la concentració de proteïna inicial pot ser significativament diferent entre els diferents pous. Si això fos així, la mesura del WST-1 no seria ajustada. Es podria pensar doncs, que la correcció de la senyal obtinguda amb la concentració de proteïna podria ser un índex més ajustat de la viabilitat dels cultius reagregats. Aquest raonament però no seria correcte ja que cal tenir en comte que, en els casos en què la toxicitat és important, es produeix una disminució de la quantitat de proteïna present al cultiu. En aquests casos doncs, el quocient WST-1/concentració de proteïna donaria un valor falsament elevat de viabilitat (veure la figura 7.3B per comparació). Així doncs, l'assaig de toxicitat del WST-1 només serà vàlid en aquells casos en què es parteix d'una concentració de proteïna inicial igual per a totes les condicions. En aquest cas, caldrà considerar la viabilitat com a l'absorbància del medi de cultiu (WST-1), sense corregir-la per la concentració de proteïna.

La majoria d'estudis de neurotoxicitat que utilitzen models de cultius reagregats han utilitzat com a mesura de citotoxicitat general la concentració de proteïna i de DNA, i la mesura de la lactat deshidrogenasa (LDH) alliberada respecte el total (Zurich *et al.*

1994; Fox *et al.* 1996; Zurich *et al.* 2000). En quan a la mesura de la concentració de proteïna com a mesura de toxicitat general, cal també que la concentració de proteïna inicial sigui la mateixa. És, a més, una mesura poc acurada, ja que els cultius poden tenir una viabilitat disminuïda sense que hi hagi disminució de proteïna. Cal tenir present també, que en aquests cultius es produeix astrogliosi reactiva en resposta a agressions neurotòxiques. Per tant, la mesura de proteïna en si mateixa és poc indicativa de la toxicitat, només ho és en casos en que la neurotoxicitat és molt elevada. D'altra banda, la mesura de la LDH serà més representativa del dany citotòxic i no depèn de la concentració inicial de proteïna ja que es calcula com a % de LDH alliberat respecte el total. No obstant, aquest mètode obliga a homogeneïtzar els cultius al final de l'exposició a l'agent neurotòxic, fet, que no és necessari amb el mètode del WST-1.

Els resultats pel que fa a la viabilitat dels cultius primaris reagregats exposats a H₂O₂ són més o menys coincidents amb els reportats per (Fox *et al.* 1996). Aquests autors reporten que en cultius reagregats es va produir un alliberament significatiu de LDH en cultius exposats a H₂O₂ 1 mM, però no a la concentració de 0.1 mM. El temps d'exposició utilitzat en el present treball però és inferior al utilitzat per Fox *et al.* (24 hores contra 2 dies més 2 dies al 50 % de la concentració inicial). La vulnerabilitat al dany induït per H₂O₂ dels cultius reagregats de cervell de rata (EC₅₀: 1.2 mM) seria lleugerament inferior a reportada per cultius monocapa de neurones i d'astròcits exposats també durant 24 hores. (EC₅₀ aproximades 0.5 mM) (Sebastià *et al.* 2004).

7.4.2.- Caracterització d'altres marcadors de toxicitat en cultius primaris reagregats de cervell de rata

L'enzim glutamina sintetasa (GS) és un enzim present als astròcits. El lloc catalític de la GS és sensible a l'oxidació, resultant-ne en una pèrdua de l'activitat enzimàtica. En cervells amb patologia d'Alzheimer s'ha observat una reducció de l'activitat i de la concentració de la GS (Smith *et al.* 1991; Hensley *et al.* 1995). L'activitat de la GS es va mesurar en els homogenats dels esferoides tractats amb H₂O₂, dels quals també es va mesurar la concentració de proteïna. El resultat obtingut es mostra en la figura 7.4.

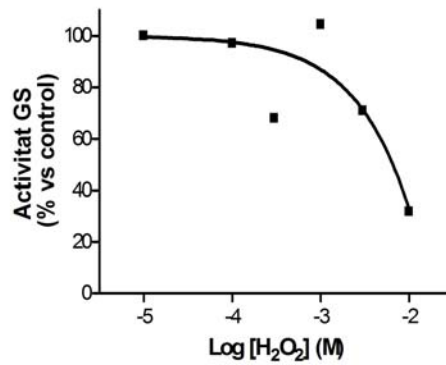


Figura 7.4.- Activitat de la glutamina sintetasa expressat com a U/mg proteïna en % del control en cultius tractats amb H₂O₂ per 24 hores. Els resultats representen 1 experiment.

El resultat representat en la figura 7.4 seria indicatiu de què el tractament amb H₂O₂, causa una disminució de l'activitat de la GS en els cultius. Aquesta disminució de l'activitat podria ser deguda a una inactivació de la GS deguda a l'oxidació del seu centre catalític i/o a una disminució dels astròcits presents en el cultiu.

Els cultius primaris reagregats de cervell de rata són estructures altament dinàmiques. Tal i com s'ha dit anteriorment responen a certs insults amb astrogliosi reactiva. Per tal d'observar si el tractament de 24 hores amb H₂O₂ induïa astrogliosi en cultius reagregats es va realitzar una immunohistoquímica amb l'anticòs anti-GFAP. El resultat de la immunocitoquímica va demostrar que el tractament amb H₂O₂ induïa astrogliosi reactiva en els cultius reagregats (figura 7.5). Així doncs, es dedueix que la disminució de l'activitat de la GS no es deu a una disminució de la població d'astròcits del cultiu.

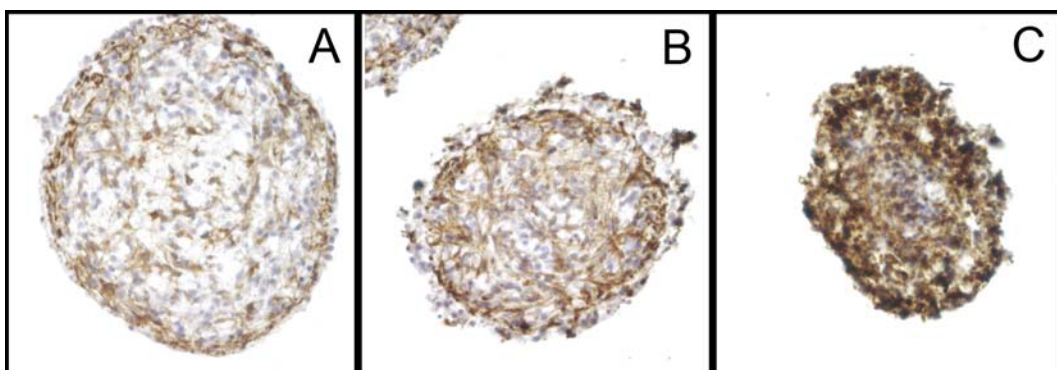


Figura 7.5.- Immunocitoquímica anti-GFAP en cultius primaris reagregats de cervell de rata tractats durant 24 hores amb diferents concentracions de H₂O₂: control (A), 3 mM (B) i 10 mM (C).

Fox *et al.* (1996) van reportar que en cultius primaris reagregats, el tractament amb H_2O_2 1 mM durant 4 dies (els 2 últims dies s'exposaven al 50 % de la concentració inicial de H_2O_2) produïa una disminució significativa de l'activitat de la GS. El mateix tractament, però, no va variar la concentració de GFAP del cultiu (μg GFAP/mg proteïna total). Es demostra doncs, que la GS és oxidada pel H_2O_2 , resultant-ne amb la pèrdua de l'activitat. En el present treball sembla que la pèrdua de l'activitat de la GS es produeix paral·lelament a la disminució de la viabilitat del cultiu i a l'increment de la tinció de la GFAP. Tanmateix, els resultats pel que fa a l'activitat de la GS no són concloents, ja que es tracta d'un sol experiment, en el que es va treballar quasi al límit inferior de detecció de l'assaig.

Un segon model de toxicitat que es va utilitzar va ser el tractament dels cultius durant 6 dies amb lisofosfatidilcolina (LPC). La lisofosfatidilcolina produeix desmielinització en animals d'experimentació (Payne *et al.* 1991) i en talls de cerebel *in vitro* (Birgbauer *et al.* 2004). Per a tractar els reagregats amb LPC es van posar els reagregats en una placa de 6 pous. El tractament amb LPC es va fer durant 6 dies, quan es va canviar el medi per medi fresc es va afegir nou LPC, així que els cultius reagregats van ser tractats tres vegades amb LPC. El tractament amb LPC fins a concentracions de 0.015 % (p/v) (0.05 mg/ml tres vegades) no va produir disminució de la viabilitat cel·lular mesurada pel mètode del WST-1, ni canvis en el marcatge de GFAP (dades no mostrades). El tractament amb LPC, però, va disminuir l'activitat de la 2', 3'-Nucleòtid cíclic 3'-Fosfodiesterasa (CNPase), indicant afectació dels oligodendròcits (figura 7.6).

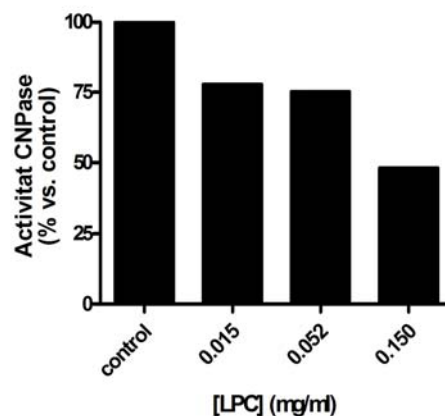


Figura 7.6.- Activitat de la CNPase (U/mg proteïna respecte el control) en cultius reagregats tractats durant 6 dies amb LPC. Les barres representen les dades obtingudes d'un experiment.

L'afectació de la mielina dels cultius reagregats de cervell de rata pel tractament amb LPC, es va demostrar addicionalment pel marcatge reduït de la proteïna bàsica de la mielina (MBP22) (figura 7.7)

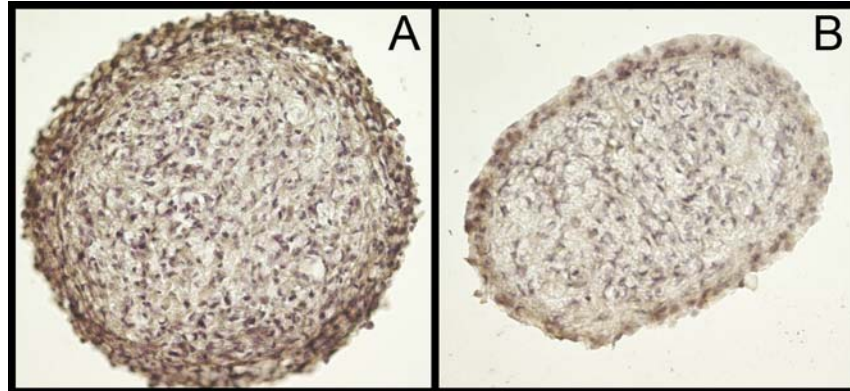


Figura 7.7.- Immunocitoquímica contra la MBP22 en cultius reagregats control (A) i tractats amb LPC a la concentració de 0.15mg/ml durant 6 dies (B)

Així doncs, el model dels cultius reagregats de cervell de rata sembla ser un bon model *in vitro* per a estudiar malalties desmielinitzants. Els dos marcadors de la mielina utilitzats (activitat CNPase i immunocitoquímica contra la MBP22) donen el mateix resultat. Aquests dos marcadors doncs, podrien ser d'utilitats per a l'estudi de neurotòxics que puguin afectar el procés de mielinització.

7.4.3.- Toxicitat induïda per dieldrín

Tal i com s'ha comentat, els cultius primaris reagregats es desenvolupen *in vitro*. Per aquesta característica i pel fet de què presenten una longevitat molt elevada podrien ser un model interessant per a estudiar les alteracions produïdes per plaguicides organoclorats durant exposicions llargues tant en estadis madurs com durant el desenvolupament.

Així doncs, es van tractar els cultius reagregats amb dieldrín des dels 2 dies *in vitro* fins a 1, 2 i 3 setmanes en cultiu. Així, als 2 dies del cultiu, els reagregats d'un flascó es separaren en una placa de 6 pous i es tractaren amb dieldrín. Quan es canviava el medi s'afegia medi fresc amb dieldrín. Possiblement per la dificultat que suposa posar a cada pou de la placa la mateixa quantitat d'esferoides, els resultats de viabilitat general dels cultius (mesurats amb WST-1) presentaven una variabilitat molt elevada.

En la figura 7.8 es mostren els resultats de viabilitat de només aquells experiments en què la concentració de proteïna entre els tractaments i els controls, va ser similar. Tot i així, no hi ha va haver diferències significatives ni entre les diferents concentracions de dieldrín, ni entre els diferents temps d'exposició. La concentració de 30 μM de dieldrín, durant 3 setmanes va disminuir de manera important la viabilitat dels cultius, però al tenir només un experiment per a aquest punt, es va excloure de l'anàlisi estadístic.

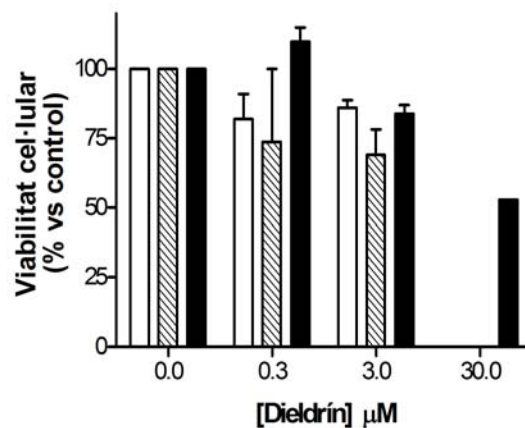


Figura 7.8.- Viabilitat dels cultius exposats a dieldrín durant diferents temps: 1 setmana (barres blanques, 2 setmanes (barres ratllades) i 3 setmanes (barres negres). Els resultats es mostren com a absorbància a 450 nm (WST-1) respecte el control de 2 o 3 experiments, excepte per la concentració de 30 μM de dieldrín que representa només un experiment, fet pel qual va ser exclòs de l'anàlisi estadístic. No hi ha diferències estadístiques.

La immunocitoquímica contra la GFAP en els cultius tractats amb dieldrín va indicar que en una setmana de cultiu, els reagregats no estan suficientment diferenciats, doncs el marcatge de GFAP és pràcticament inexistent. A les dues i tres setmanes, es va observar marcatge de GFAP en els cultius controls i en els tractats amb dieldrín. A les 3 setmanes, aquells cultius tractats amb dieldrín a la concentració de 10 μM presentaven un marcatge més elevat de GFAP, indicant que es podria estar produint astrogliosi reactiva (figura 7.9)

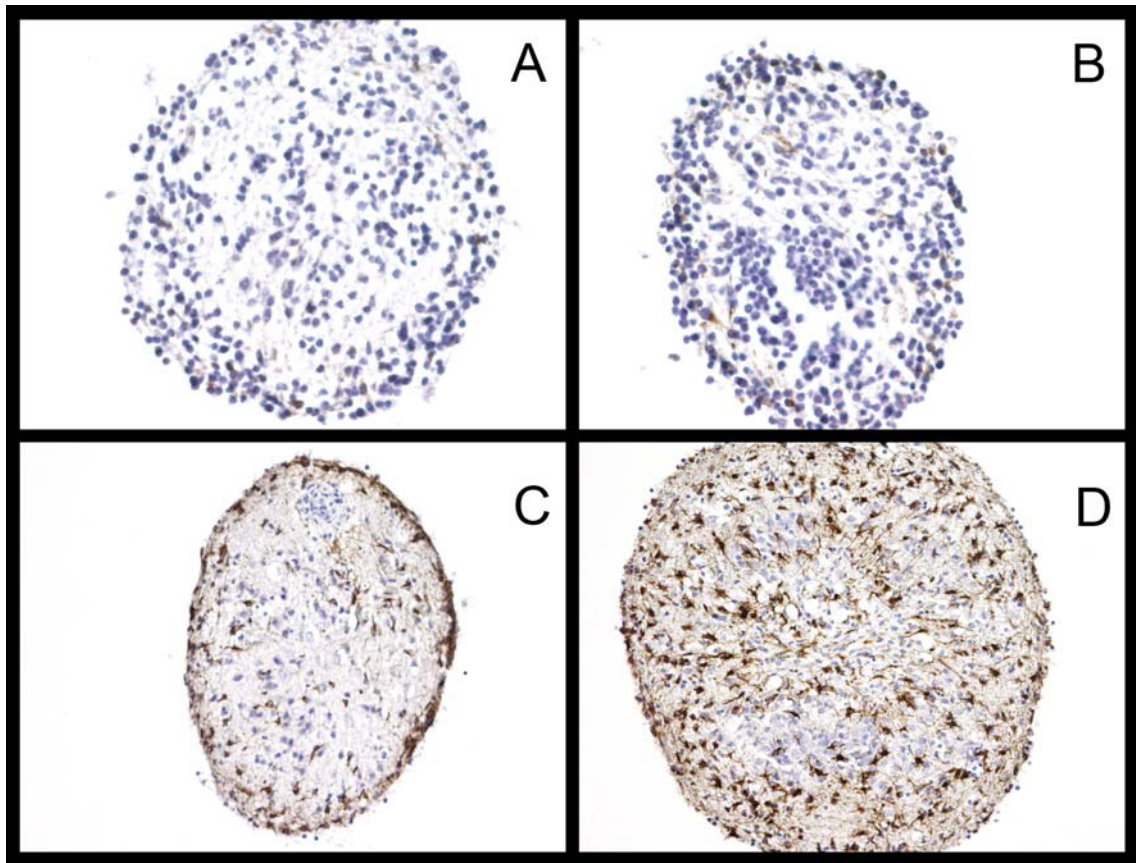


Figura 7.9.-Immunocitoquímica contra la GFAP en cultius control (A i C) i tractats amb dieldrín $10 \mu\text{M}$ (B i D). Les fotografies A i B pertanyen a cultius d'una setmana, mentre que les fotografies C i D pertanyen a cultius de tres setmanes.

En conjunt, les proves pilot realitzades amb el plaguicida organoclorat dieldrín indicarien que els cultius reagregats podrien ser un bon model per a estudis de toxicitat amb aquests compostos; doncs, s'ha vist que l'exposició perllongada es capaç d'induir astrogliosi en els reagregats. Sembla que els cultius serien especialment interessants per a estudis que involucressin exposicions perllongades degut a la seva elevada longevitat en cultiu. Aquests cultius permeten plantejar estudis de tractaments perllongats amb plaguicides que presenten una degradació ràpida com poden ser el lindà o el α -endosulfà. D'aquesta manera es podrien tractar els cultius cada dos dies (quan es canvi el medi) amb baixes concentracions d'aquests compostos, de manera similar al que podrien ser els estudis de tractaments crònics *in vivo*. Malgrat aquests avantatges, el model dels cultius reagregats presenten l'inconvenient de què és necessària la utilització d'un gran nombre d'animals quan es planteja un estudi amb un rang ampli de concentracions a testar.

7.5.-CONCLUSIONS

1.- Els cultius reagregats de cervell de rata ofereixen un model *in vitro* de sistema nerviós central on s'hi produeixen interaccions entre els diferents tipus cel·lulars de manera similar a com es produeix *in vivo*. Serien un bon model *in vitro* quan es volgués conèixer sobre a quin tipus cel·lular afecta preferencialment un compost.

2.- La realització dels cultiu reagregats és senzilla i no és necessària la utilització de massa instrumental específic.

3.- El processament dels cultius reagregats per a fer estudis immunohistoquímics, és el mateix que per a teixit. Això implica que cal treballar amb els cultius fixats, impossibilitant els estudis de microscòpia en teixit fresc. El fet d'haver de fixar, incloure els reagregats i tallar-los allarga el processament de la mostra respecte als cultius en monocapa. D'altra banda el fet d'obtenir vàries seccions dels esferoides ofereix l'avantatge de poder fer múltiples immunocitoquímiques diferents del mateix cultiu.

4.- Per a realitzar exposicions curtes dels cultius reagregats és pràctica la utilització de plaques de 6 pous. D'aquesta manera és possible utilitzar un nombre major de concentracions del compost objecte d'estudi. No obstant, la utilització de plaques de 6 pous no és recomanable per a exposicions llargues. Aquest fet limita el nombre de concentracions diferents del compost objecte d'estudi a utilitzar en exposicions llargues. En conseqüència, no són un bon model quan es pretén fer un estudi de neurotoxicitat general utilitzant un rang ampli de concentracions o de temps d'exposició, ja que implicaria la utilització d'un gran nombre d'animals amb el cost que això comporta.

5.- Són un model prometedor per a l'estudi de malalties desmielinitzants, ja que s'hi produeix mielinització gràcies a la presència d'oligodendròcits. Cal tenir en compte que en els cultius neuronals en monocapa no hi ha mielinització. Adicionalment, s'ha comprovat que la lisofosfatidilcolina produeix desmielinització dels reagregats, de manera similar a la seva acció *in vivo*.

6.- La sal de tetrazoli disulfonat de 4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazoli]-1,3-benzé (WST-1) pot ser utilitzada com a mesura de la viabilitat cel·lular en cultius reagregats. Aquest mètode ofereix l'avantatge de què no cal homogeneïtzar les cèl·lules per a mesurar-ne la viabilitat.