

R.15398

T. 1148

**EVALUACION *IN VITRO* DE LA
CITO Y NEUROTOXICIDAD DE COMPUESTOS
ORGANICOS**

***M^a ISABEL ANDRES MARTIN
SEVILLA, 1994***

C19433554

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA
Y TOXICOLOGIA**

AREA DE TOXICOLOGIA

**EVALUACION *IN VITRO* DE LA
CITO Y NEUROTOXICIDAD DE COMPUESTOS
ORGANICOS**

**Memoria presentada por la
Lda. *M^a Isabel Andrés Martín*
para optar al grado de
Doctora en Farmacia**

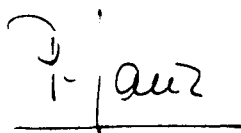
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA
Y TOXICOLOGIA**

AREA DE TOXICOLOGIA

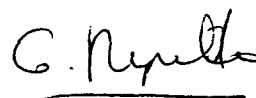
TESIS DOCTORAL:

**EVALUACION *IN VITRO* DE LA CITO Y NEUROTOXICIDAD DE
COMPUESTOS ORGANICOS**

**VºBº
LOS DIRECTORES**

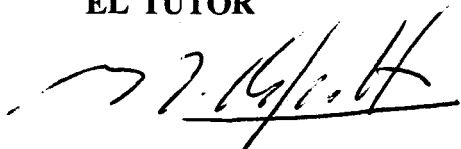


Fdo.: Dra. P. Sanz



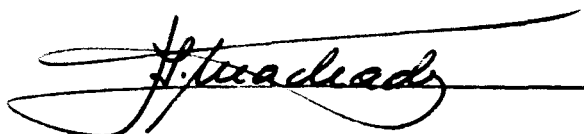
Fdo.: Dr. G. Repetto

**VºBº
EL TUTOR**



Fdo.: Prof. M. Repetto

**VºBº
EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO**




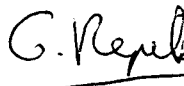
Fdo.: Prof. A. Machado de la Quintana

La autora de la presente memoria es becaria del Ministerio de Educación y Ciencia desde enero de 1992, dentro del Programa Sectorial de Formación del Profesorado Universitario (convocatoria BOE nº 271, 12 noviembre 1991).


ANEXO 14

IMPRESO DE PRESENTACION DE LA TESIS DOCTORAL

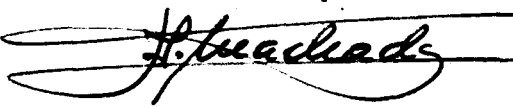
APELLIDOS Andrés Martín NOMBRE M^a Isabel
PROGRAMA DE DOCTORADO Bioquímica y Toxicología
DEPARTAMENTO EN QUE HA REALIZADO LA TESIS Bioquímica, Bromatología y Toxicología
TITULO DE LA TESIS Evaluación in vitro de la cito y neurotoxicidad de compuestos orgánicos.
D^a/D^{ña} Pilar Sanz Nicolás y D. Guillermo Repetto Kuhn
del Departamento de Sevilla del Instituto Nacional de Toxicología, como Director de la Tesis de referencia autoriza su presentación.

Firma:  
Sevilla 16 de Mayo de 1994

D.^{XX} Manuel Repetto Jiménez
Profesor Asociado del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología
del Departamento de Sevilla del Instituto Nacional de Toxicología, como Director de la Tesis Tutor del alumno de referencia autoriza su presentación.

Firma: 
Sevilla 16 de Mayo de 1994

El Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología
con fecha 16 de Mayo de 1994 autoriza la presentación de la Tesis de referencia.

El Director del Departamento

Firmado:
Sevilla 16 de Mayo de 1994

(1) Catedrático, Profesor Titular, Catedrático E.U., etc.

(2) Táchese lo que no proceda. Este apartado se rellenará sólo en el caso de ser dos los Directores de Tesis, o de que el Director de la Tesis no sea Profesor del Departamento responsable.



D. Alberto Machado de la Quintana, Director del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología. Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que la Memoria titulada "Evaluación *in vitro* de la cito y neurotoxicidad de compuestos orgánicos" correspondiente a los trabajos de Tesis Doctoral realizados por Dña. M^a Isabel Andrés Martín, reúne los requisitos necesarios, por lo que doy mi conformidad para su presentación.

Sevilla, 16 de Mayo de 1994

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Machado de la Quintana', written over a horizontal line.

Sr. Presidente de la Comisión de Doctorado.



D. Manuel Repetto Jiménez, Profesor Asociado de Toxicología del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, en calidad de Tutor de la Tesis Doctoral de Dña. M^a Isabel Andrés Martín, manifiesta que ratifica su autorización para que los Dres. Dña. Pilar Sanz Nicolás y D. Guillermo Repetto Kuhn sean los directores de la mencionada Tesis, en razón de su capacitación y de las disponibilidades metodológicas y materiales a su alcance.

Al propio tiempo hace constar su conformidad con el desarrollo y forma de la presente Memoria, considerándola merecedora de ser presentada y defendida ante Tribunal.

Sevilla, 16 de Mayo de 1994




Sr. Presidente de la Comisión de Doctorado.




INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA
DEPARTAMENTO REGIONAL

A. POSTAL 863
41080 - SEVILLA

DOÑA PILAR SANZ NICOLAS, DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, JEFE DE LA SECCION DE BIOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE SEVILLA DEL INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA, Y DON GUILLERMO REPETTO KUHN, DOCTOR EN MEDICINA, FACULTATIVO DE LA SECCION DE BIOLOGIA DEL MISMO INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA DE SEVILLA,

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral, titulada: "EVALUACION *IN VITRO* DE LA CITO Y NEUROTOXICIDAD DE COMPUESTOS ORGANICOS", que presenta la Lda. M^a Isabel Andrés Martín, ha sido realizada en este centro bajo nuestra dirección, y aprovechando instalaciones e instrumentos del Instituto Nacional de Toxicología, de Sevilla. A nuestro juicio, reúne todos los requisitos exigidos por la normativa vigente para la elaboración y presentación de memorias de tesis doctorales, y ser defendida ante Tribunal.

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Sevilla, a 16 de Mayo de 1994




AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi reconocimiento al Prof. Dr. D. Alberto Machado de la Quintana, Director del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología, por haberme permitido presentar la Tesis Doctoral en este departamento.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. D. Manuel Repetto Jiménez, a la Dra. Dña. Pilar Sanz Nicolás y al Dr. D. Guillermo Repetto Kuhn, por las facilidades que han puesto a mi disposición para la elaboración de la presente Tesis Doctoral, tanto desde el punto de vista material, como por sus enseñanzas, dirección, apoyo y ánimo continuo. Sin su ayuda, el presente trabajo no hubiera llegado a término.

Al Dr. D. Antonio Garfia González, por su inestimable ayuda en el estudio microfotográfico de esta memoria.

Quisiera incluir aquí un muy especial... ¡" gracias "!, a todas aquellas personas que han convivido conmigo en el trabajo durante este tiempo en el Instituto de Toxicología, donde se realizó todo el trabajo. No quisiera agradecerles tanto su ayuda en el laboratorio, en el ordenador, las consultas de estadística, los etc, etc, como la amistad que se ha creado entre nosotros consecuencia de tanto escucharnos problemas y alegrías del laboratorio, del trabajo en general y de un sin fin de cosas. Tener a todas estas personas ha sido bueno, divertido y un estímulo en muchas ocasiones.

Y por último, quisiera **AGRADECER** tantas y tantas cosas a dos personas muy queridas para mí a las que dedico esta memoria,

A mis padres

TABLA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterasa
ChAT	acetilcolintransferasa
ADP	adenosina- 5'-difosfato
AMP	adenosina- 5'-monofosfato
AMPC	adenosina- 5'-monofosfato cíclico
ANOVA	análisis de la varianza
AP4	receptor ácido 2-amino-4-fosfobutanoico
ATCC	American Type Culture Collection
ATMG	ATPasa magnésica
ATP	adenosina- 5'-trifosfato
ATTO	ATPasa total
BPL	buena práctica de laboratorio
CAS	Chemical Abstracts Service
CE-50	concentración efectiva media
CI-50	concentración inhibitoria media
CK	creatinquinasa
CL ₅₀	concentración letal media
CL _m	concentración letal mínima
CRRN	captación relativa de rojo neutro
DE	desviación estándar
D-I	días alternos
DL ₅₀	dosis letal media
DL _m	dosis letal mínima
D _{máx}	máxima diferencia encontrada
DMSO	dimetilsulfóxido
DT ₅₀	dosis tóxica media
DT _m	dosis tóxica mínima
EE	error estándar
EEC	Comunidad Económica Europea
EINECS	inventario europeo de sustancias químicas comerciales existentes
EDAC	clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	etilendiaminotetraacético
EMEM	medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle
ENL	enolasa
EPA	Environmental Protection Agency (USA)
F	factor F de Snedecor
F1P	fructosa-1-fosfato
F6P	fructosa-6-fosfato

FAD	flavín adenín dinucleótido
FADH ₂	flavín adenín dinucleótido reducido
FDP	fructosa-1,6-difosfato
FRAME	Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments
GABA	ácido gamma amino butírico
GAL	β -galactosidasa
ip	intraperitoneal
LDH	lactato-deshidrogenasa
LSD	dietilamida del ácido lisérgico
MAO	monoamino-oxidasa
mg/D	miligramos por día
mg/m ³ /2h	miligramos por metro cúbico en dos horas
mg/m ³ /30M	miligramos por metro cúbico en 30 meses
MTT	bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difenil tetrazolio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NADH ₂	nicotín adenín dinucleótido reducido
NNE	enolasa no neuronal
NR	rojo neutro
NSE	enolasa específica neuronal
NTE	esterasa diana de neurotoxicidad
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
PBS A	solución salina tamponada con fosfato exento de calcio y magnesio
PEP	fosfoenolpiruvato
PFK	fosfofructoquinasa
2PG	2-fosfoglicerato
Pm	peso molecular
PR	proteínas
r	coeficiente de correlación lineal de Pearson
Rib1,5P ₂	ribosa-1,5-difosfato
RTECS	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (USA)
SDH	succinato-deshidrogenasa
-SH	grupo sulfhidrilo
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SOPs/PNT	procedimientos normalizados de trabajo
TH	tirosina-hidroxilasa
VSCC	canales de calcio dependientes de voltaje
Z	número de datos asociados en el análisis de regresión
μ	media
σ^2	varianza

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	4
I.- BASES DEL CONOCIMIENTO	5
1.- ESTUDIOS DE TOXICIDAD - ENSAYOS DE NEUROTOXICIDAD	6
2.- NECESIDAD DE METODOS ALTERNATIVOS	7
3.- ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	13
3.1.- Justificación de los ensayos in vitro	
3.2.- Ventajas e inconvenientes de los sistemas <i>in vitro</i>	
3.3.- Propiedades de los sistemas <i>in vitro</i>	
3.4.- Desarrollo, validación y aceptación de los ensayos de toxicidad <i>in vitro</i>	
3.5.- Interpretación de resultados anómalos	
4.- ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE NEUROTOXICIDAD	22
4.1.- Sustrato biológico	
4.2.- Indicadores de toxicidad	
II.- DISEÑO DEL MODELO	28
A.- Sustrato biológico	29
1.- CRITERIOS DE SELECCION	30
1.1.- Consideraciones Biológicas	
1.2.- Consideraciones Prácticas	
2.- CARACTERIZACION DEL SUSTRATO BIOLOGICO	31
2.1.- Origen	
2.2.- Descripción	
2.3.- Características morfológicas	
2.4.- Actividad metabólica	
2.5.- Neurotransmisión	
3.- APLICACIONES TOXICOLOGICAS PREVIAS	41

B.- Indicadores de toxicidad empleados	42
1.- PROLIFERACIÓN CELULAR. CONTENIDO PROTEICO TOTAL	44
1.1.- Introducción	
1.2.- Interés toxicológico	
2.- CAPTACION RELATIVA DE ROJO NEUTRO	45
2.1.- Introducción	
2.2.- Características del ensayo utilizado	
2.3.- Interés toxicológico	
3.- ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA	46
3.1.- Introducción	
3.2.- Propiedades catalíticas y estructurales	
3.3.- Regulación	
3.4.- Interés toxicológico	
4.- ACTIVIDAD ENOLASA	49
4.1.- Introducción	
4.2.- Propiedades catalíticas y estructurales	
4.3.- Regulación	
4.4.- Interés toxicológico	
5.- ACTIVIDAD SUCCINATO-DESHIDROGENASA	52
5.1.- Introducción	
5.2.- Propiedades catalíticas y estructurales	
5.3.- Regulación	
5.4.- Interés toxicológico	
6.- ACTIVIDAD ATPasa	55
6.1.- Actividad ATPasa Na ⁺ -K ⁺	
6.1.1.- Introducción	
6.1.2.- Propiedades catalíticas y estructurales	
6.1.3.- Regulación	

6.1.4.- Interés toxicológico	
6.2.- Actividad basal ATPasa Mg ⁺²	
7.- ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA	59
7.1.- Introducción	
7.2.- Propiedades catalíticas y estructurales	
7.3.- Regulación	
7.4.- Interés toxicológico	
8.- ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA	64
8.1.- Introducción	
8.2.- Propiedades catalíticas y estructurales	
8.3.- Regulación	
8.4.- Interés toxicológico	
III.- SUSTANCIAS ENSAYADAS	67
1.- CLORPROMAZINA	68
1.1.- Historia. Usos y aplicaciones	
1.2.- Propiedades fisicoquímicas	
1.3.- Farmaco-toxicocinética	
1.4.- Farmaco-toxicodinamia	
2.- CICLOHEXIMIDA	79
2.1.- Historia. Usos y aplicaciones	
2.2.- Propiedades fisicoquímicas	
2.3.- Farmaco-toxicocinética	
2.4.- Farmaco-toxicodinamia	
3.- DINITROFENOL	84
3.1.- Historia. Usos y aplicaciones	
3.2.- Propiedades fisicoquímicas	
3.3.- Farmaco-toxicocinética	
3.4.- Farmaco-toxicodinamia	

4.- ACIDO IODOACETICO	90
4.1.- Historia. Usos y aplicaciones	
4.2.- Propiedades fisicoquímicas	
4.3.- Farmaco-toxicocinética	
4.4.- Farmaco-toxicodinamia	
5.- ACIDO KAINICO	93
5.1.- Historia. Usos y aplicaciones	
5.2.- Propiedades fisicoquímicas	
5.3.- Farmaco-toxicocinética	
5.4.- Farmaco-toxicodinamia	
6.- OUABAINA	99
6.1.- Historia. Usos y aplicaciones	
6.2.- Propiedades fisicoquímicas	
6.3.- Farmaco-toxicocinética	
6.4.- Farmaco-toxicodinamia	
HIPOTESIS DE TRABAJO	105
OBJETIVOS	107
PLAN DE TRABAJO	109
PARTE EXPERIMENTAL	111
I.- MATERIAL	112
1.- LINEA CELULAR ESTABLECIDA	113
2.- MEDIOS DE CULTIVOS Y SUERO	113
3.- PRODUCTOS QUIMICOS Y REACTIVOS	113
4.- MATERIAL ESPECIFICO	115
5.- INSTRUMENTOS	116
6.- SOPORTE INFORMATICO	117

II.- METODOS	118
1.- <u>DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL.</u>	119
1.1.- SUSTRATO BIOLOGICO	119
1.1.1.- Línea celular.	
1.1.2.- Soporte de ensayo.	
1.1.3.- Elección de la densidad de cultivo celular.	
1.1.4.- Siembra.	
1.1.5.- Aclimatación y adhesión.	
1.2.- EXPOSICION A LOS TOXICOS	125
1.2.1.- Concentraciones ensayadas.	
1.2.2.- Período de exposición a los tóxicos.	
1.3.- INDICADORES DE TOXICIDAD	127
1.3.1.- Puesta a punto. Modificaciones introducidas.	
1.3.1.1.- <u>CONTENIDO PROTEICO TOTAL</u>	
1.3.1.2.- <u>CAPTACION DE ROJO NEUTRO</u>	
1.3.1.3.- <u>ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA</u>	
1.3.1.4.- <u>ACTIVIDAD ENOLASA</u>	
1.3.1.5.- <u>ACTIVIDAD SUCCINATO DESHIDROGENASA</u>	
1.3.1.6.- <u>ACTIVIDAD ATPasa</u>	
1.3.1.7.- <u>ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA</u>	
1.3.1.8.- <u>ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA</u>	
1.3.2.- Linealidad de los indicadores.	
1.3.3.- Procedimientos normalizados (SOPs) para la determinación de los indicadores de toxicidad.	
2.- <u>TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS Y ESTUDIO ESTADISTICO</u> ...	153
2.1.- ESTUDIO ESTADISTICO PRELIMINAR	153
2.2.- TRANSFORMACION DE VARIABLES	153
2.3.- SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS	154

2.4.- RELACION CONCENTRACION-EFECTO	154
2.5.- ESTIMACION DE LA CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA . .	155
2.6.- ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCION	155
3.- <u>OBSERVANCIA DE LAS BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO</u>	155
3.1.- FUNDAMENTO	155
3.2.- PROCEDIMIENTO	156
III.- RESULTADOS	157
DISCUSION	233
CONCLUSIONES	252
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	255

INTRODUCCION

Durante las últimas décadas se ha hecho cada vez más patente para los toxicólogos la necesidad de desarrollar nuevos métodos alternativos a la experimentación animal para evaluar la seguridad de los nuevos compuestos (medicamentos, aditivos alimentarios, cosméticos, etc) requisito imprescindible para su registro y comercialización. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* están destinados a conocer la capacidad intrínseca de los compuestos para producir lesiones celulares, utilizando tanto células diferenciadas como indiferenciadas. Se ha desarrollado una gran variedad y número de ensayos de viabilidad celular; en cambio, los efectos sobre funciones órgano-específicas se estudian en células representativas de dichos órganos, a concentraciones que no comprometen la vida de las células. Los estudios de toxicidad *in vitro* sobre los órganos diana permiten a su vez investigar los mecanismos que median la acción tóxica de los compuestos. Se han desarrollado y legislado ensayos *in vitro* para evaluar efectos cancerígenos y mutagénicos de los compuestos, basados en la detección de alteraciones en el ADN (Roberfroid y Goethals, 1992).

Los organismos internacionales han impulsado los métodos alternativos. El Consejo de Europa propuso en 1971 el establecimiento de un centro de documentación e información sobre los citados procedimientos y la Comunidad Europea instó en 1986 a los países miembros a que proporcionen su legislación en tal sentido, creando recientemente el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM).

Todo ello estimuló nuestro interés por esta nueva metodología. Así, nuestro objetivo fundamental ha sido desarrollar un sistema biológico alternativo a los ensayos de toxicidad con animales, que puede ser representativo de la toxicidad real de los compuestos químicos en humanos; estudiar las posibilidades del modelo para detectar alteraciones neuroespecíficas;

comprobar la capacidad del modelo experimental, para investigar los mecanismos de acción de los compuestos químicos a nivel celular, y contribuir al conocimiento de la acción cito y neurotóxica de los compuestos ensayados.

Con el presente trabajo se ha desarrollado un modelo *in vitro* para valorar diferentes aspectos toxicodinámicos de sustancias químicas de reconocida toxicidad *in vivo*. Además se ensaya la capacidad del modelo para reproducir aspectos conocidos de los mecanismos de acción y se intenta conocer las posibilidades de aplicarlo a varios compuestos citotóxicos y neurotóxicos previamente seleccionados.

Para ello, mediante cultivos en microplacas de la línea celular establecida de neuroblastoma de ratón Neuro-2a, se han analizado diferentes parámetros celulares y bioquímicos, tanto de toxicidad general como específicamente neuronales, que nos permitan evaluar los efectos celulares de cada uno de los tóxicos ensayados y profundizar en el conocimiento de su mecanismo de acción.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

I.- BASES DEL CONOCIMIENTO

1.- ESTUDIOS DE TOXICIDAD - ENSAYOS DE NEUROTOXICIDAD

Cualquier sustancia absorbida por el organismo se incorpora en su maquinaria metabólica, originando efectos beneficiosos o no según la naturaleza de aquella y de la dosis absorbida; puede eliminarse sin producir ningún efecto en el organismo o puede causar un desequilibrio que, si no se compensa con los mecanismos homeostáticos, ocasiona daño celular.

La Toxicología es la ciencia que estudia las sustancias químicas y los fenómenos físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad (Repetto, 1988). Nuestro interés se centra en estos momentos en la metodología utilizada para alcanzar este último propósito.

La toxicidad de una sustancia se determina experimentalmente para conocer los mecanismos por los que se produce la acción tóxica y los efectos adversos que ésta induce, además de obtener una información cuantitativa que relacione las dosis de la misma que originan una respuesta tóxica concreta. Para realizar la evaluación del riesgo tóxico que ésta presenta para el hombre, los datos así obtenidos sobre la potencialidad tóxica, junto con otros como las características fisicoquímicas y el uso previsto para esa sustancia, se someten a un complejo proceso de extrapolación (Klaassen, 1986). La información de esta forma acumulada no sólo tiene interés científico, sino que determina además si la sustancia podrá utilizarse

ampliamente, o si estará afectada por normativas nacionales o supranacionales que impongan restricciones a su producción y empleo.

Para comercializar nuevas sustancias es necesario conocer previamente su perfil toxicológico (Directivas 67/548/EEC, 76/768 EEC y sus sucesivas enmienda). Para ello se efectúan ensayos o pruebas de toxicidad, que se clasifican en estudios de toxicidad aguda, subcrónica y crónica, de la capacidad irritativa y sensibilizante, de las características toxicocinéticas, de la toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo, de mutagenicidad y carcinogenicidad, estudios ecotoxicológicos y estudios especiales.

Entre éstos últimos figuran los estudios de la modificación del comportamiento, de adicción y de órganos diana, siendo el sistema nervioso el órgano más complejo y probablemente más importante del organismo. Como la patología tóxica puede aparecer a cualquier nivel del sistema nervioso central o periférico, los métodos para detectar su afectación son muy variados. Comprenden desde exploraciones clínicas exhaustivas hasta técnicas electrofisiológicas, pasando por determinaciones bioquímicas. Esta última aproximación permite identificar las estructuras diana de los tóxicos y los marcadores que pueden emplearse para su identificación.

2.- NECESIDAD DE METODOS ALTERNATIVOS

En la investigación biomédica se ha empleado, desde tiempos remotos, la experimentación *in vivo* con animales para investigación básica y aplicada, enseñanza y valoración de las acciones y efectos producidos por compuestos químicos. Sin embargo, no encontramos normas para una práctica adecuada hasta que en la primera mitad del siglo XIX, el fisiólogo inglés Marshall Hall estableció una serie de principios que tendían a evitar la duplicación de experimentos y el sufrimiento innecesario de los animales (Manuel, 1987). Posteriormente, en 1959, Russell y Burch publican "Los Principios de la Técnica de Experimentación Humana", centrados sobre lo que conocemos como métodos alternativos y cuya expansión es creciente desde aquel momento.

En 1967 se creó en USA, "The United Action for Animals" (UAA), para promover las alternativas y fundamentalmente la sustitución de los métodos *in vivo* y, en 1969, se establece en Inglaterra FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments), con el fin de impulsarlas entre organizaciones científicas (Rowan y Andrutis, 1990).

En 1971, la Resolución 621 del Consejo de Europa propone el establecimiento de un centro de documentación e información en métodos alternativos y bancos de tejidos para investigación.

Finalmente, en 1986, mediante la Directiva 86/609/EEC, la Comunidad Europea insta a sus Estados miembros para que promuevan la legislación en torno a las "tres erres" (3R), lo que vienen haciendo desde entonces aunque con diferente diligencia. Las **3R** corresponden a las letras iniciales de los tres principios básicos que identifican a los métodos alternativos: **Reemplazo** de los procedimientos que emplean animales por otros que no los precisen; **Reducción** en el número de animales utilizados y **Refinamiento** de los métodos usados (Russell y Burch, 1959). Posteriormente se ha añadido una cuarta R, para referirse a la Responsabilidad del toxicólogo en la aplicación de la mejor Ciencia posible con el mínimo uso de animales, pero que permita garantizar la seguridad de los humanos que serán expuestos a los compuestos ensayados (Gad, 1989).

El concepto de alternativas adquiere un sentido especial en este contexto e incluye a todos los métodos o técnicas que pudieran sustituir o al menos complementar a los experimentos realizados con animales, reducir el número de animales empleados, o mejorar procedimientos ya existentes para disminuir el estrés y evitar el sufrimiento infligido a los animales (Balls, 1983).

Deseamos hacer constar aquí que, aunque el fin último del empleo de los métodos alternativos es sustituir a los estudios con animales, estamos lejos aún de poder prescindir absolutamente de éstos, lo que no puede perseguirse de forma obsesiva, pero hay que destacar

que la mera búsqueda de alternativas está proporcionando un mejor trato a los animales, una importante reducción en el número de los utilizados, y una mayor profesionalidad en los conocimientos alcanzados.

Algunos de los modelos alternativos que pretenden **sustituir** el uso de animales en experimentación son:

- 1.- *Cultivo de tejidos.* a) Cultivo de células y de órganos. En el primer caso las células de los tejidos del ser humano o del animal se cultivan fuera del cuerpo después de separarlas del tejido original u órgano. En el caso del cultivo de órganos, se utiliza un fragmento del órgano (explante) en el que la estructura normal del mismo se mantiene y, debido a las reacciones intercelulares, los efectos de una sustancia sobre la unidad orgánica puede probarse con resultados similares a los de un organismo intacto. Pueden ser usados en bioquímica, investigación sobre el cáncer, genética, inmunología, microbiología, farmacología, fisiología, radiación, toxicología y producción de vacunas. b) Placenta. Normalmente es desechada tras el alumbramiento, pero puede ser usada para practicar técnicas de cirugía microvascular y para ensayar productos químicos.

- 2.- *Cultivo de bacterias y estudios con protozoos.* Muchas especies de bacterias reaccionan de la misma manera que las células de organismos superiores frente a los tóxicos. Los protozoos, por ser eucariotas, tienen una química celular aún más parecida y se utilizan en la investigación de la nutrición. Estos organismos se reproducen con extremada rapidez y son fácilmente controlables a través de diversas generaciones. Los cultivos de bacterias y los estudios con protozoos pueden ser usados en investigaciones sobre el cáncer, defectos de nacimiento, envejecimiento, enfermedades del corazón, para el estudio de la contaminación de las aguas, mediante técnicas de ingeniería genética para la producción de insulina y otras hormonas, interferón, antivirus, y en el desarrollo de vacunas.

- 3.- *Huevos*. Los huevos de pájaros, reptiles y otros embriones son utilizados para estudiar el desarrollo normal del feto y los efectos de las drogas en el mismo, así como para el cultivo de virus y producción de vacunas.
- 4.- *Distintas especies de animales inferiores*, como son los invertebrados (ej. cucarachas, moscas, etc.)
- 5.- *Modelos matemáticos y por ordenador*. Los primeros se pueden utilizar para realizar predicciones directas de las funciones del sistema humano, mientras que los modelos de ordenador, a través de simulación, suministran información que no puede obtenerse en experimentos con seres vivos. También se usan en estudios de sistemas anatómicos, funciones de órganos, células nerviosas, ataques cardíacos e investigaciones neuromusculares. El estado de todos los elementos en el modelo puede examinarse a tiempos concretos y resolverse sus interacciones. Estos experimentos son altamente precisos.
- 6.- *Guías audiovisuales y ayudas*. Películas, documentales, circuitos cerrados de televisión y cintas de vídeo como ayuda en la enseñanza, preservan a miles de animales de la repetición continua del mismo experimento.
- 7.- *Modelos mecánicos*. Se utilizan sobre todo para reproducir choques de vehículos y pruebas con material antiinflamable, con un simulador que incluye un sistema de circulación cardíaca, pulmonar y aparato respiratorio. También se pueden analizar las respuestas a drogas y las funciones del riñón, eliminando la necesidad de animales.

Existen modelos que **reducen** el número de animales mediante:

- 1.- *Eliminación de pruebas o experimentos*, evitando repeticiones innecesarias. Este caso afecta muy especialmente al desarrollo de los cosméticos (Directiva 76/768 EEC, y su sexta enmienda del 14 junio 1993).
- 2.- *Uso de radioisótopos* que permiten incorporar en el organismo la sustancia marcada con un análogo radiactivo a un compuesto biológico y realizar un seguimiento cinético con un reducido número de animales.
- 3.- *Estudios de relación estructura actividad*. Hacen posible prever efectos tóxicos mediante la comparación con moléculas de estructura parecida y toxicidad conocida. Permiten diseños experimentales muy ajustados (refinamiento y reducción).
- 4.- *Estudios clínicos y epidemiológicos*. Mediante datos de voluntarios humanos que asisten a revisiones y estudios clínicos, análisis estadísticos ligados a la observación clínica de la enfermedad, informes de autopsias, etc.

De todas estas posibilidades, el desarrollo de nuevos métodos para las investigaciones y ensayos toxicológicos se ha centrado principalmente en las preparaciones de tejidos como, por ejemplo, órganos completos aislados, zonas o rodajas de órganos, cultivos celulares y fracciones subcelulares. En algunos casos se han encontrado muy útiles los modelos matemáticos. Actualmente los modelos más usados son los celulares (Walum, 1990).

Como consecuencia del gran desarrollo de las técnicas de cultivo celular como técnica alternativa, se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos celulares de toxicidad y está surgiendo una nueva rama, la **Toxicología Celular**, que puede definirse como el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos adversos de los factores químicos y físicos sobre las células, incluyendo el nivel de toxicidad, extrapolación al organismo completo y

evaluación del riesgo (Walum, 1990).

De hecho, la idea de la toxicología celular no distingue entre modelos *in vivo* e *in vitro*. Consecuentemente, la toxicología celular no es solamente sinónimo de alternativa a los estudios con animales en toxicología (Walum, 1990). La mayoría de las sustancias químicas ejercen su acción por interferir con las funciones básicas celulares (Ekwall, 1983). Estas funciones son fundamentales para la vida de la célula, y se expresan de forma similar en todas las células independientemente de si están *in vivo* o *in vitro*. Basándonos en esto, se puede ensayar la toxicidad aguda de diversos compuestos químicos incluso en sistemas de cultivos de células muy simples. Si se considera la carencia que existe en los cultivos celulares de la complejidad funcional y estructural intercelular, se esperaría una pobre correlación entre la toxicidad *in vivo* e *in vitro*. No obstante, se han obtenido coeficientes de correlación bastante altos al comparar los valores de citotoxicidad *in vitro* con los valores de DL_{50} .

Las funciones básicas celulares se expresan en grados diferentes en los distintos tipos celulares; por ejemplo las células nerviosas dependen completamente de la glucosa para la producción de energía, y la velocidad de la síntesis proteica es muy alta en las células hepáticas. Por tanto, la correlación global se puede incrementar si los ensayos de toxicidad basados en células indiferenciadas se combinan con estudios de los efectos sobre las funciones basales en células altamente diferenciadas de cultivos primarios o células aisladas. Los compuestos químicos que ejercen efectos bioquímicos similares desarrollan su acción por mecanismos iguales o relacionados. Un sistema de ensayos debe desarrollarse tras establecer las propiedades cinéticas y metabólicas y las lesiones bioquímicas responsables del efecto de uno o varios modelos de sustancias. El parámetro bioquímico más relevante se usa entonces como indicador ("endpoint") (Walum, 1990).

El objetivo fundamental de la evaluación toxicológica es poder predecir el daño en humanos. Las técnicas *in vitro* permiten disponer de gran número de modelos celulares humanos procedentes de tejidos de distintas fuentes como: fetos abortados, tejidos normales o neoplásicos obtenidos quirúrgicamente, biopsias, autopsias o material de lavados que

arrastran células, por ejemplo pulmonares, placenta y sangre.

3.- ENSAYOS *IN VITRO*

Una de las áreas de las ciencias biológicas más expandidas durante los últimos 30 años ha sido la Toxicología. En este mismo período ha ocurrido el desarrollo acelerado de las técnicas *in vitro* de cultivo de células y tejidos. Por tanto es lógico que los toxicólogos se hayan adherido a estas nuevas técnicas para profundizar en los mecanismos celulares de toxicidad y desarrollar métodos de criba para el ensayo de nuevos compuestos (Leslie y Johnson, 1987).

Los métodos *in vitro* se basan en que los efectos de las sustancias químicas que producen enfermedad y muerte a los animales se ejercen, en última instancia, por interacción molecular (Grisham y Smith, 1984).

Inicialmente los sistemas *in vitro* fueron utilizados para estudios de biotransformación, y estudios mecanísticos básicos, pero en la actualidad su ámbito de aplicación se ha ido extendiendo al desarrollo de modelos que permitan evaluar la potencial toxicidad organo-específica (toxicidad para el sistema nervioso, hígado, riñón, sistema inmunitario etc.), la irritación local y la teratogenicidad (Ekwall, 1992).

Según su finalidad, los ensayos *in vitro* pueden ser pruebas sustitutivas, o bien pruebas de criba ("screening"), o complementarias para mejorar la sensibilidad y especificidad ("specifity") de los estudios con animales: son las tres eses con las cuales se pretende complementar a las tres erres (Purchase, 1990).

A continuación se desarrollan diferentes aspectos básicos en la consideración de esta metodología como herramienta de trabajo para la evaluación tóxica de las sustancias químicas.

3.1.- Justificación de los ensayos *in vitro*

Las principales razones por las que los métodos *in vitro* tienden a sustituir en lo posible a la experimentación animal son:

* *morales y éticas*, ya que en ésta se somete a sufrimiento a seres vivos (Sprigge, 1987; Repetto, 1989).

* *económicas*, debido a que el coste de los ensayos de toxicidad con animales, especialmente los que utilizan perros o primates, es tan alto que impide o retrasa el desarrollo de muchos medicamentos y compuestos químicos. Según Goldberg y Frazier (1989), el coste de la evaluación toxicológica completa de un producto oscila entre 500.000 y 1.500.000 dólares. Además, al requerir mucho tiempo para las evaluaciones (2-3 años), retrasan enormemente el lanzamiento comercial de los productos (Balls, 1983).

* *científicas*, porque se ha comprobado que desde la implantación de las sistemáticas de evaluación de la toxicidad de compuestos químicos en animales, se han producido importantes errores en los resultados. Las principales causas de los fallos han sido la no consideración de determinados tipos de efectos tóxicos, como los teratogénicos inducidos por la talidomida, o el empleo de métodos inadecuados (Zbinden, 1987). Por todo ello, es necesario un abordaje menos empírico y más científico, que recoja los avances técnicos y toxicológicos producidos en las dos últimas décadas y que mejore los métodos de extrapolación (Roberfroid y Goethals, 1990).

* *logísticas*, ya que aunque los ensayos con animales fueran capaces de predecir correctamente el riesgo para el hombre, sólo habría suficiente número de animales, laboratorios, técnicos y científicos para evaluar una mínima parte de los más de 1000 nuevos compuestos que se introducen cada año en el medio ambiente.

* *socio-políticas*, debidos a la presión de diferentes grupos sociales que exigen su abolición.

* *legales*, ya que la legislación europea y española establece que "No deberá realizarse un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio y contrastado que permita obtener las mismas conclusiones, sin implicar la utilización de animales" (Directiva del Consejo 86/609/CEE; Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo).

3.2.- Ventajas e inconvenientes de los sistemas *in vitro*

Las ventajas e inconvenientes más importantes de los sistemas *in vitro* en los ensayos toxicológicos, con especial énfasis en los cultivos celulares, son (Leslie y Johnson, 1987; Tyson, 1992; Frazier, 1992; Repetto y Repetto, 1994):

* VENTAJAS

- Eficiencia mejorada, mayor rapidez y coste reducido.
- Reducción del uso de animales de experimentación.
- Posibilidad de usar células humanas.
- Consumo de menor cantidad del compuesto químico.
- Producción de menor cantidad de desechos tóxicos.
- Mayor control sobre la naturaleza de la población celular. Estudio de una población celular específica aislada de otras.
- Control directo sobre el medio extracelular, la concentración de la sustancia química y la duración de la exposición.
- No interferencia de factores de confusión potenciales como las hormonas, sistemas nervioso o inmunitario. Eliminación de efectos sistémicos interactivos.
- Homogeneidad del sustrato celular por disponibilidad de células siempre a partir del mismo lote de reserva.
- Reducción de la variabilidad entre experimentos.
- Utilización de gran número de organismos (células) de ensayo por concentración.
- Posibilidad de medidas simultáneas y/o repetidas en el tiempo.
- Complemento para los estudios *in vivo* y más aceptables éticamente.

* INCONVENIENTES

- Pérdida de la morfología del órgano *in vivo*.
- Pérdida selectiva de las funciones órgano-específicas *in vivo*.
- Pérdida de posibles influencias moduladoras como las hormonas, sistemas nervioso o inmunitario.
- Eliminación de los factores toxicocinéticos (absorción, distribución, metabolismo y excreción).
- Generalmente son sistemas estáticos que acaban en una pérdida progresiva de nutrientes y un acúmulo de productos metabólicos o *detritus*.
- Generalmente son sistemas de corta duración, por lo que suelen utilizarse en ensayos de toxicidad aguda; la detección de toxicidad crónica o retardada es de más difícil interpretación.

3.3.- Propiedades de los sistemas *in vitro*

Las propiedades de los distintos sistemas que pueden utilizarse en la experimentación *in vitro* se exponen a continuación en forma de tabla, lo que permite una visión global y comparativa de éstos. En ella se intenta reflejar una valoración semicuantitativa de las características propias de cada sistema mediante una escala de cruces (Tyson, 1992 modificada):

Propiedades	Nivel de organización tisular	Reproducibilidad	Expresión similar a <i>in vivo</i>	Alteración genética*	Control del entorno
Sistema de ensayo					
Organismo intacto	++++	++ a +++	++++	+	+
Cultivo de órgano (sin influencias del organismo completo)	++++	++ a +++	+ a +++	+	++
Cultivo de tejido (sin influencias del organismo completo)	+++	+++	+ a +++	+	+++
Cultivo primario de células	0	+++	+ a +++	+	++++
Líneas celulares (reduce las relaciones intercelulares)	0	++++	+ a +++	+ a +++++	++++

Grado: +++++ = alto; +++ = moderado; ++ = modesto; + = algo; 0 = nada

* por mutación y/o selección

3.4.- Desarrollo, validación y aceptación de los ensayos de toxicidad *in vitro*

Los sistemas *in vitro* están siendo cada vez más usados en la investigación toxicológica. Sin embargo, el uso de distintos modelos en varias condiciones experimentales y la evaluación de efectos citotóxicos por una gran variedad de indicadores, hace difícil estimar la predictividad de un ensayo *in vitro*. Es necesario estandarizar y validar las técnicas antes de la generalización de su uso y de su aceptación por entidades reguladoras. La validación requiere estudios multicéntricos que usen protocolos experimentales bien definidos (Balls y col., 1990; Fautrel y col., 1991; Balls y col., 1994).

En la actualidad, el objetivo de muchos laboratorios es, no solo desarrollar tests *in vitro*, sino también demostrar su validez como método complementario y/o alternativo a la experimentación en animales. El término validación engloba una serie de estudios encaminados a demostrar la idoneidad y relevancia de un test de toxicidad *in vitro* y a conseguir su aceptación por parte de las autoridades correspondientes. A la hora de validar un test, es necesario tener en cuenta tres factores fundamentales:

- 1.- La selección de los compuestos químicos utilizados en el proceso de validación. Estos compuestos no deben ser seleccionados en función de su facilidad para ser estudiados en los modelos *in vitro* y es recomendable que sean productos químicos de composición definida, y no mezclas complejas ni productos de escasa pureza (calidad reactivo o técnicos).
- 2.- Los datos *in vivo* disponibles, ya que servirán como referencia de los resultados obtenidos *in vitro*. Dado que el objetivo final de los tests *in vitro* es su utilización para estimar la toxicidad potencial de un nuevo compuesto para el hombre se tiende a que los resultados *in vitro* se puedan comparar con la toxicidad en el hombre, mejor que con los modelos animales.

- 3.- El método para analizar, comparar los datos *in vitro* e *in vivo* e interpretar los resultados. La comparación debe ser cuantitativa y requiere la aplicación de modelos de análisis matemático que tengan en cuenta todos los posibles parámetros toxicocinéticos o efectos tóxicos que no puedan ser medidos directamente en los tests *in vitro*.

La validación de un ensayo de toxicidad por parte de un único laboratorio es una tarea ardua, costosa y en muchos casos imposible. Es más, la generalización de este tipo de métodos y su eventual reconocimiento, exigen controlar la reproducibilidad inter-laboratorios. En la actualidad se están imponiendo los programas multicéntricos de validación dado que son más económicos, tienen una mayor credibilidad científica, y permiten disponer de una amplia base de datos en la que se centraliza la información obtenida con múltiples modelos *in vitro* y los datos toxicológicos en el hombre, para un posterior análisis multivariable. Además los programas interlaboratorio posibilitan la evaluación de diferentes tipos de toxicidad (sistémica, organo-específica, teratogénica, etc.) y analizar el grado de predictividad para cada binomio modelo *in vitro*- parámetro medido (Ekwall, 1992).

Programas de validación multi-laboratorios existentes en la actualidad (Ekwall, 1992):

<u>Organización</u>	<u>Tipo de toxicidad</u>	<u>Año de inicio</u>	<u>Nº Productos</u>	<u>Nº laboratorios</u>	<u>Especies con las que se compara</u>
FRAME- U.K. Fundación para reemplazar los animales en los experimentos médicos	sistémica aguda, irritación ocular	1982	150/56	6	ratón, rata
MEIC- Sociedad escandinava de toxicidad celular	sistémica aguda, dérmica, etc	1987	50	200*	hombre
MRES- Ministerio francés de investigación	hepática	1989**	30	8(6)	roedores
SDA- U.S. Asociación del jabón y detergentes	irritación ocular	1988	59	14-6	conejo
CFTA- U.S. Asociación de los cosméticos, fragancias y artículos de aseo	irritación ocular	1990	10+10	23-30*	conejo
EC- Comisión de la comunidad europea	irritación ocular	1989	21	5	conejo
ZEBET- Ministerio de salud alemán	irritación ocular	1989	35+150	2(12)	conejo, hombre
OPAL- Organización francesa para auxilio a los animales de laboratorio	irritación ocular	1990**	40	2	conejo
JSAAE- Sociedad japonesa para las alternativas a los experimentos con animales	irritación ocular	1990	52	2	conejo

* Programas todavía abiertos a nuevos laboratorios o métodos

** Completado en 1991

3.5.- Interpretación de resultados anómalos

A veces, los datos *in vitro* parecen no predecir los resultados de estudios previos *in vivo*. Algunas de las posibles causas que ayudan a explicar la discrepancia son (Gad, 1992):

- 1.- El producto químico no se absorbe en absoluto o se absorbe pobremente en los estudios *in vivo* o *in vitro*.
- 2.- El producto químico se absorbe bien pero está sujeto a un metabolismo de primer paso en el hígado o en otro órgano o tejido.
- 3.- El producto químico se distribuye de tal forma que al tejido diana llega menos (o más) de lo que se puede predecir basándose en la absorción.
- 4.- El producto químico se metaboliza rápidamente en un metabolito activo o inactivo que tiene un perfil de acción diferente o distinta duración de la acción que el producto original. Existe la posibilidad de cocultivar células con hepatocitos o bien añadirles la fracción S9 pudiendo así obtener los metabolitos *in vitro*.
- 5.- El producto químico se elimina rápidamente (ej. a través de mecanismos secretores).
- 6.- Las especies empleadas en los dos ensayos son distintas.
- 7.- Las condiciones experimentales de los ensayos *in vivo* e *in vitro* son distintas y pueden llevar a efectos distintos de los esperados. Estas incluyen factores tales como temperatura, edad, sexo y raza del animal.
- 8.- Los efectos manifestados *in vitro* e *in vivo* por el producto químico ensayado difieren en sus características.
- 9.- Los ensayos usados para medir respuestas *in vivo* e *in vitro* pueden diferenciarse bastante, y los tipos de datos obtenidos pueden no ser comparables.
- 10.- En los estudios *in vitro* no se usaron los controles adecuados (ej. pH, tipo de vehículo usado y volumen de éste administrado), produciéndose artefactos más que resultados.
- 11.- Los datos *in vitro* no pueden predecir el volumen de distribución en los compartimientos centrales o periféricos.

- 12.- Los datos *in vitro* no pueden predecir las constantes de velocidad de los movimientos del producto entre los compartimientos centrales o periféricos.
- 13.- Los datos *in vitro* no pueden predecir las constantes de velocidad de eliminación del producto.
- 14.- Los datos *in vitro* no pueden predecir si la cinética será lineal o no lineal con dosis concretas de un producto *in vivo*.
- 15.- Los parámetros farmacocinéticos (ej. biodisponibilidad, concentración plasmática máxima, tiempo de vida media) no puede predecirse basándose sólo en estudios *in vitro*.
- 16.- Los efectos *in vivo* de los productos se deben a una alteración en el orden de integración más alto de un sistema de animal intacto, que no puede reflejarse en un sistema menos complejo.

4.- ENSAYOS *IN VITRO* DE NEUROTOXICIDAD

Como ya hemos expuesto, los métodos *in vitro* son de reconocida utilidad en la investigación de los mecanismos de toxicidad. Es posible incluso diseñar modelos que permitan profundizar en mecanismos específicos, entre ellos los de neurotoxicidad. Dentro del interés en los últimos años de su uso en los ensayos de criba previos a la comercialización, en el caso del desarrollo de un sistema *in vitro* de criba de compuestos potencialmente neurotóxicos es necesario que se cumplan los siguientes requisitos: 1) el método propuesto debe tener unas sólidas bases científicas; 2) debe ser posible reconocer uno o varios indicadores reales de neurotoxicidad; 3) el método debe ser minuciosamente comprobado usando neurotóxicos cuya diana se encuentre en distintas regiones del sistema nervioso; y 4) el sistema debe mostrar alto valor predictivo. En la actualidad, ningún test o batería de tests de neurotoxicidad *in vitro* está validado adecuadamente (Atterwill y col., 1991).

La configuración de los modelos experimentales se basa en dos pilares fundamentales, que son el *sustrato biológico* y los *indicadores de toxicidad* general y de toxicidad específica (neurotoxicidad).

El **sustrato biológico** es el material orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica el xenobiótico y cuyas reacciones queremos comparar con las de los animales superiores y posteriormente extrapolar al hombre; evidentemente la posibilidad de esta extrapolación será función de la representatividad que para la fisiología general del individuo tenga el órgano o tejido de donde proceden las células empleadas como sustrato; deben tenerse en cuenta las diferencias estructurales, metabólicas y funcionales de las células de distinta localización. Estas alteraciones se valoran mediante los denominados **indicadores de toxicidad**, que son los parámetros que determinamos para cuantificar las modificaciones producidas. El conjunto de los indicadores de toxicidad medidos forman una batería de ensayos, útil para la interpretación global de los resultados.

4.1.- Sustrato biológico

Las técnicas *in vitro* para la evaluación de la neurotoxicidad de los compuestos químicos utilizan embriones completos, cultivos de tejidos (órgano entero, explantes y rodajas), reagregados cerebrales, cultivos celulares (cultivos primarios, células dispersas y líneas celulares establecidas) y fracciones subcelulares (Repetto, 1981; Davenport y Morgan, 1988/89; Grisham y Smith, 1984; Repetto y Repetto, 1994). Todos estos tipos de sustratos biológicos se recogen en el esquema siguiente (Tabla 1) (Atterwill y col., 1992; Atterwill y col., 1991; Garattini, 1990):

Tabla 1.- Tipos de Cultivos del Sistema Nervioso.

<u>Tipo</u>	<u>Detalles adicionales</u>	<u>Ventajas/inconvenientes</u>
Cultivos de células dispersas (incluido micromasas)	<p>* <i>Primarias</i> Monocapas- Mezcladas o enriquecidas con neuronas, astrocitos, oligodendrocitos.</p> <p>* <i>Secundarias</i> Derivadas de las primarias o líneas celulares, procedentes de explantes.</p>	Buena reproducibilidad y grandes cantidades. Se pueden realizar en células aisladas ensayos electrofisiológicos. Se diferencian, pero se pueden desdiferenciar con el tiempo. A menudo no organotípicas.
Líneas celulares tumorales	Monocapas- neuroblastoma, Schwannoma y glioma.	Grandes cantidades de tipos celulares no contaminadas, peor desdiferenciadas. Se pueden diferenciar químicamente.
Explantos de órganos	De diferentes regiones del SNC.	Se preserva bien la citoarquitectura para los estudios morfológicos. No son posibles todavía de todas las áreas del SNC. Técnica bastante especializada.
Órganos completos	Gánglios autónomos del SNP.	Se pueden cultivar más células maduras. Cantidad limitada de células.
Cultivo de embriones	Generalmente de rata.	Técnica muy especializada; metabolismo fetal intacto y desarrollo cerebral cerca del normal. Desarrollo intensivo pero durante períodos cortos y definidos.
Reagregados celulares mediante rotación	Cultivos organotípicos en suspensión.	Asociación de células organotípicas con características neuroquímicas. Altamente reproducible; posibles ensayos morfológicos; se pueden cultivar grandes cantidades de tejido.

4.2.- Indicadores de neurotoxicidad

La naturaleza del fenómeno tóxico va más allá de la mera descripción de las alteraciones que pueden tener lugar en un ser vivo al entrar en contacto con un xenobiótico. Para explicar cómo actúa un determinado xenobiótico y comprender por qué puede producir efectos tóxicos es básico conocer los mecanismos moleculares implicados en las sucesivas etapas que van desde su interacción con las células hasta la manifestación de las alteraciones metabólicas que pueden llevarlas a la muerte (Jover y col., 1992).

La investigación *in vitro* de los mecanismos implicados en la acción tóxica de un determinado xenobiótico es técnicamente compleja por las limitaciones del propio sistema. No obstante, es posible investigar algunos fenómenos directamente en células en cultivo mediante la utilización de microtécnicas, que es necesario adaptar a cada modelo experimental: cada tipo de célula tiene unas características bioquímicas y un bagaje enzimático que las caracteriza, lo que condiciona las posibilidades de los indicadores; por otra parte el soporte de cultivo introduce variaciones significativas de tipo técnico que delimitan el tipo y método de ensayo de cada indicador y viceversa.

Cualquier batería de ensayos debe incluir indicadores de toxicidad general (citotoxicidad), e indicadores de toxicidad específica (en nuestro caso, neurotoxicidad). Los indicadores de citotoxicidad reflejan las funciones basales requeridas por cualquier célula para mantener su viabilidad, mientras que los indicadores de toxicidad específica reflejan aquellas funciones propias de ese tipo de células (Veronesi, 1992). Puede definirse el daño neurotóxico como cualquier cambio en la morfología, la bioquímica o en las funciones propias del sistema nervioso central o periférico (Garattini, 1990).

A continuación relacionamos los indicadores de toxicidad usados en toxicología *in vitro* y adaptados sólo a algunos modelos existentes (Nardone, 1983; Veronesi, 1992; Bendford, 1987; Rönnback y Hansson, 1987; Dewar, 1983; Bridges y Garattini, 1990; Rowan y col., 1990; Jover y col., 1992):

A) Indicadores de citotoxicidad

- 1.- Viabilidad celular: inclusión o exclusión de colorantes, contenido en proteínas y ácidos nucleicos.
- 2.- Proliferación celular: recuentos celulares, contenido y velocidad de síntesis de macromoléculas, incorporación de precursores marcados.
- 3.- Morfología celular mediante microscopía óptica y electrónica.
- 4.- Metabolismo energético: niveles de ATP, etc.
- 5.- Algunas actividades enzimáticas: lactato deshidrogenasa (LDH), esterasas totales, enolasa, etc.
- 6.- Integridad de la membrana: incorporación o liberación de compuestos marcados o liberación al medio de enzimas intracelulares.
- 7.- Concentración intracelular del ión calcio.

B) Indicadores de neurotoxicidad

- 1.- Morfología: organización microtubular en neuritas, formación de vesículas.
- 2.- En reagregados cerebrales: topografía y distribución en células gliales y neuronales.
- 3.- Incorporación de moléculas específicas marcadas radiactivamente.
- 4.- Estado de receptores y sus interacciones.
- 5.- Liberación y reabsorción de neurotransmisores.

Actividades enzimáticas específicas: enolasa específica neuronal, esterasa diana de neurotoxicidad (NTE), acetilcolinesterasa (AChE), acetilcolintransferasa (AChT), tiroxina hidroxilasa (TH), β -galactosidasa, etc.
- 6.- Determinación de cofactores específicos.
- 7.- Daño genético.

La mayoría de estos indicadores son cuantitativos y pueden usarse para realizar curvas dosis-respuesta. Esto facilita comparaciones interlaboratorios y la aplicación de métodos de control de calidad que aseguren la credibilidad de los resultados obtenidos (Rowan y col., 1990).

Queda todavía por adaptar a las técnicas *in vitro* un gran número de indicadores de toxicidad utilizados *in vivo*, que pueden aportar mayor riqueza a esta metodología, además del desarrollo de sus posibilidades intrínsecas. Todo ello ayudaría a profundizar en los mecanismos de toxicidad y a proporcionar herramientas de gran utilidad para la regulación de las sustancias tóxicas.

El valor predictivo del modelo experimental *in vitro* dependerá de la buena conjunción entre su sustrato biológico y los indicadores de neurotoxicidad aplicados.

II.- DISEÑO DEL MODELO

A.- Sustrato biológico

Nuestro objetivo ha sido aplicar un modelo experimental *in vitro* alternativo a los ensayos de toxicidad realizados *in vivo* para evaluar la cito y neurotoxicidad de los compuestos orgánicos. De entre las distintas posibilidades de modelos citados en el apartado 4.1 de "bases del conocimiento", decidimos rechazar de entrada aquellas que suponen sustratos directamente extraídos de animales (cultivos primarios, etc), reduciéndose las posibilidades al uso de líneas celulares establecidas, que presenta además otras ventajas sobre el resto de las opciones: a) uso de métodos estandarizados de cultivo y mantenimiento, b) disponibilidad de cantidades suficientes y homogéneas del sustrato biológico, c) que los resultados sean muy reproducibles y d) que las células se adapten con facilidad a los indicadores bioquímicos de cito y neurotoxicidad, según la experiencia previa en nuestro laboratorio de cultivos celulares (Repetto, 1992).

1.- CRITERIOS DE SELECCION

1.1.- Consideraciones Biológicas:

- Población homogénea exclusivamente neuronal, sin aportación glial.
- Completa caracterización morfológica, bioquímica, electrofisiológica y genética.
- Propagación continua.
- Estabilidad en cultivo.
- Buena reproducibilidad (Balls y Bridges, 1985).
- Posibilidad de uso de gran variedad de indicadores de neurotoxicidad.

- Satisfactorios resultados en investigaciones anteriores.

1.2.- Consideraciones Prácticas:

- Velocidad de proliferación suficientemente alta y reproducible (Knox y col., 1986).
- Disponibilidad comercial a largo plazo.
- Ausencia de requerimientos especiales de crecimiento.
- Facilidad de cultivo y manipulación.
- Suficiente adhesión al soporte.
- Posibilidad de conservación.

2.- CARACTERIZACION DEL SUSTRATO BIOLOGICO.

Siguiendo los criterios mencionados en el apartado anterior, y las razones que a continuación exponemos, hemos seleccionado como sustrato biológico la **línea celular establecida Neuro-2a** procedente de neuroblastoma de ratón.

Tras revisar la bibliografía, hemos localizado 571 publicaciones entre 1969 y 1994 en las que se han empleado células de neuroblastoma, cuyas propiedades fundamentales exponemos a continuación:

2.1.- Origen

En 1967 se establecieron las primeras líneas celulares de neuroblastoma a partir del tumor de neuroblastoma de ratón C1300 (Klebe y Ruddle, 1969; Augusti-Tocco y Sato, 1969). Consiste en una proliferación originada espontáneamente en un ratón albino y mantenida desde 1940 en el Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) mediante

trasplantes seriados en ratones A/J. Este tumor espontáneo y maligno de la infancia se origina a partir de células de la cresta neural, muchas de las cuales son precursoras de las células de los ganglios simpáticos (Pockedly, 1977).

En noviembre de 1967, Klebe y Rudle, en el Departamento de Biología de la Universidad de Yale (New Haven, Connecticut, USA), lo adaptaron al cultivo *in vitro*, denominando "Neuro" a la línea celular obtenida. Tras tres sucesivos clonados en agarosa comprobaron que todos los clones mantenían estables las funciones diferenciadas y conservaban sus características neuronales. Uno de esos clones fue denominado Neuro-2a.

2.2.- Descripción

Estas células presentan las siguientes peculiaridades:

Genéticamente, el clon Neuro-2a posee un cariotipo inestable con 94 a 98 cromosomas de media. Todas las células contienen de 6 a 10 cromosomas grandes metacéntricos y acrocéntricos y de 2 a 4 cromosomas pequeños.

Las células de neuroblastoma expresan más información genética que otros tipos celulares, y se ha sugerido que se deba a que conservan gran número de los genes expresados normalmente en el cerebro (Kaplan y col., 1982).

Mantiene sus características de tumorigenicidad, ya que un inóculo subcutáneo de 4×10^6 células Neuro-2a es capaz de inducir tumores a los 7 días en todos los ratones albinos cepa A tratados (ATCC).

Es susceptible a ciertos virus como los de la estomatitis vesicular (Indiana) y herpes simplex. No es susceptible al virus de la polio tipo I.

De especial interés son sus características de crecimiento: un inóculo de 10^5 células viables/ml incubado a 37°C , se multiplica 15 veces en 7 días (ATCC). El tiempo de generación de las células Neuro-2a es de 10.30 ± 0.4 horas (Mummery y col., 1981), permitiendo obtener con gran facilidad un gran número de células.

2.3.- Características morfológicas

En tumores subcutáneos y en cultivos en suspensión, la forma de estas células es esférica, indiferenciada y neuroblastoide. Sin embargo, cuando disponen de una superficie a la que adherirse, muchos clones de neuroblastoma experimentan un cambio estructural, produciéndose la extensión desde el cuerpo celular de una a cuatro elongaciones citoplásmicas de unos $50 \mu\text{m}$ de longitud, que se denominan neuritas o axones. Tras unos días en cultivo, las neuritas crecen hasta un máximo de 2 mm a una velocidad de $75\text{-}125 \mu\text{m/hora}$ (Seeds y col., 1970) formando una complicada red de interconexiones que dan a las células la apariencia de neuronas diferenciadas.

Al diferenciarse, las células incrementan su volumen celular, extienden sus neuritas, se convierten en excitables eléctricamente y se vuelven mortales al inhibirse la división celular (Hafke y Seeds, 1975).

La capacidad de la mayoría de los clones de neuroblastoma de diferenciarse en cultivo depende del tipo de clon y de las condiciones de cultivo, entre las que destacamos la presencia de suero y de diferentes agentes químicos y físicos (Prasad, 1980).

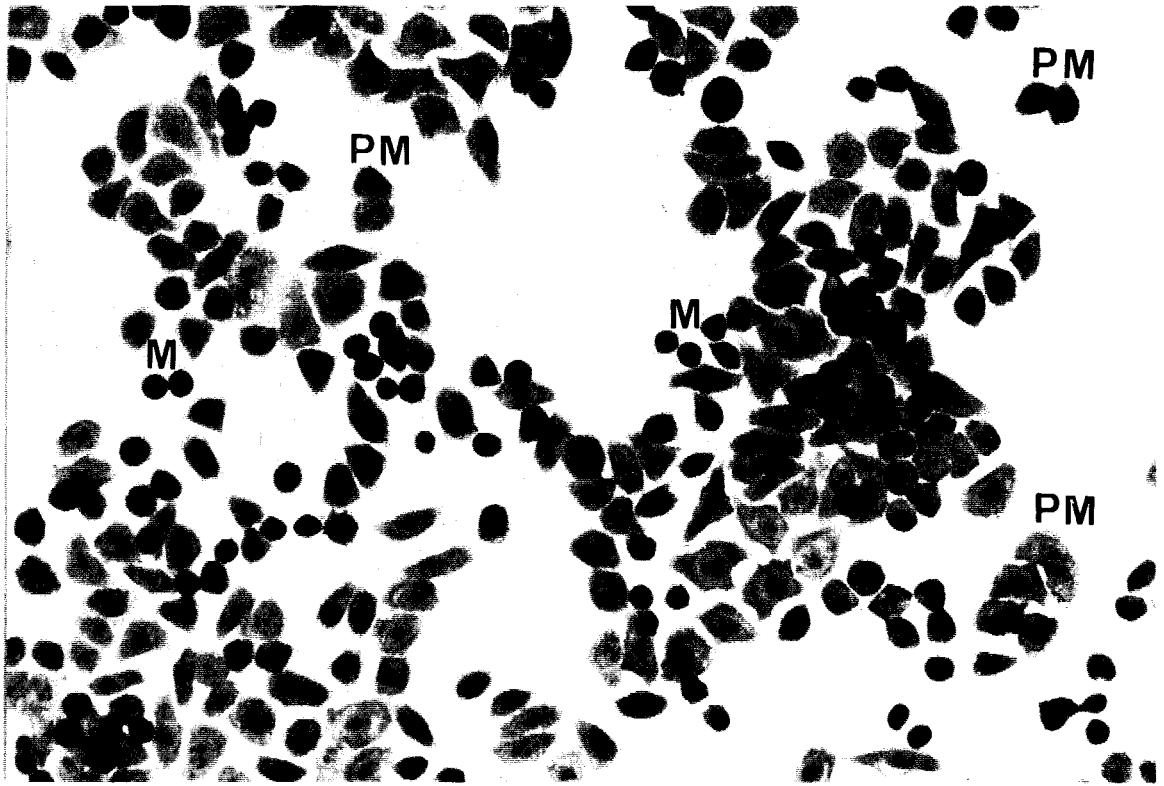
Existen muchos agentes químicos conocidos que inducen la diferenciación de las células de neuroblastoma, tales como fluorodesoxiuridina (Klebe y Rudle, 1969) bromodesoxiuridina (Clementi, 1987) citosín-arabinósido, medio hipertónico, dimetilsulfóxido, hexanodiacetamida, vitamina E (Sue y col., 1988), etc.

Los agentes físicos, como los rayos X también inducen la diferenciación (Prasad, 1980), lo mismo que la existencia de hipoxia o hiperoxia (Erkell, 1980), o de una gran densidad celular.

Al reducirse la diferenciación cuando las células están en perfusión continua con nuevo medio de cultivo, podemos concluir que existe una relación inversa entre el grado de diferenciación y la calidad de las condiciones de cultivo. En este sentido, las células de neuroblastoma responderían a condiciones subóptimas de cultivo o a determinadas sustancias químicas, extendiendo sus neuritas (Peterson y Walum, 1983).

Se ha observado, mediante microscopía electrónica, que las neuritas contienen gran cantidad de microtúbulos y de neurofilamentos característicos de los axones y dendritas de neuronas maduras.

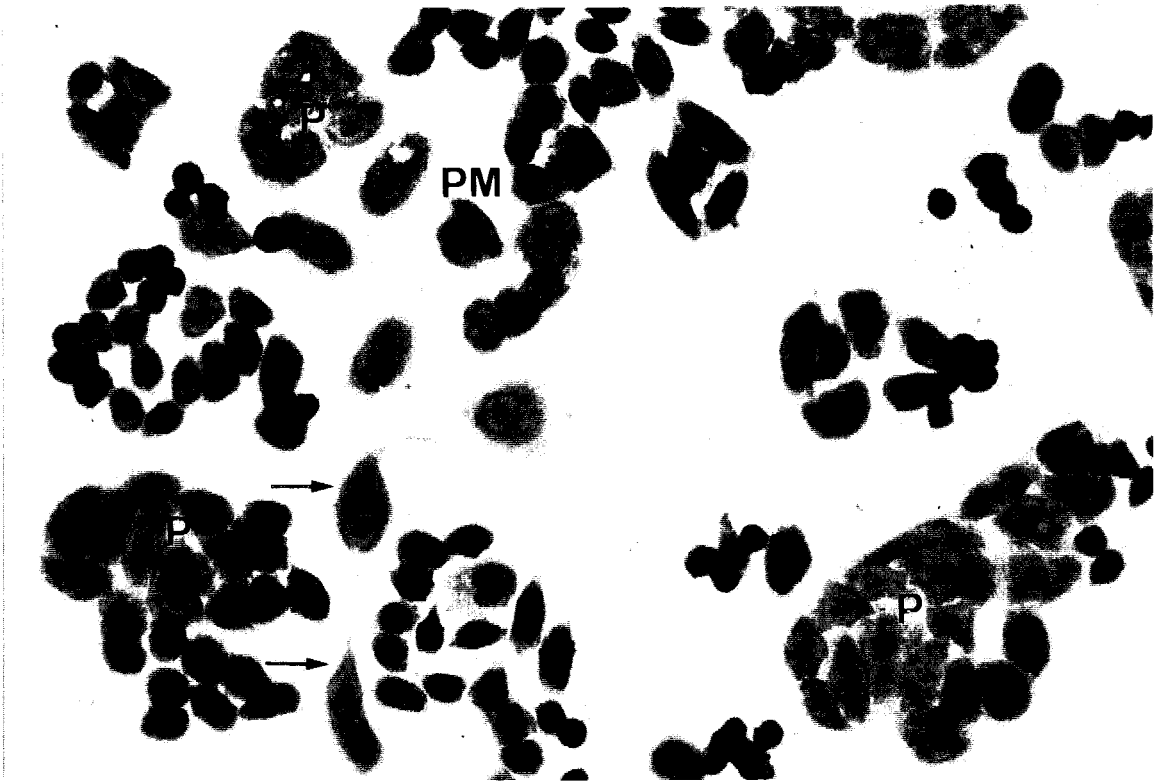
En nuestro trabajo se han utilizado las células sin inducir su diferenciación por productos químicos, conservando sus propiedades metabólicas. Las características morfológicas del cultivo, según el período de crecimiento (24, 48, 72 y 96 h), se observan en las fotomicrografías siguientes:



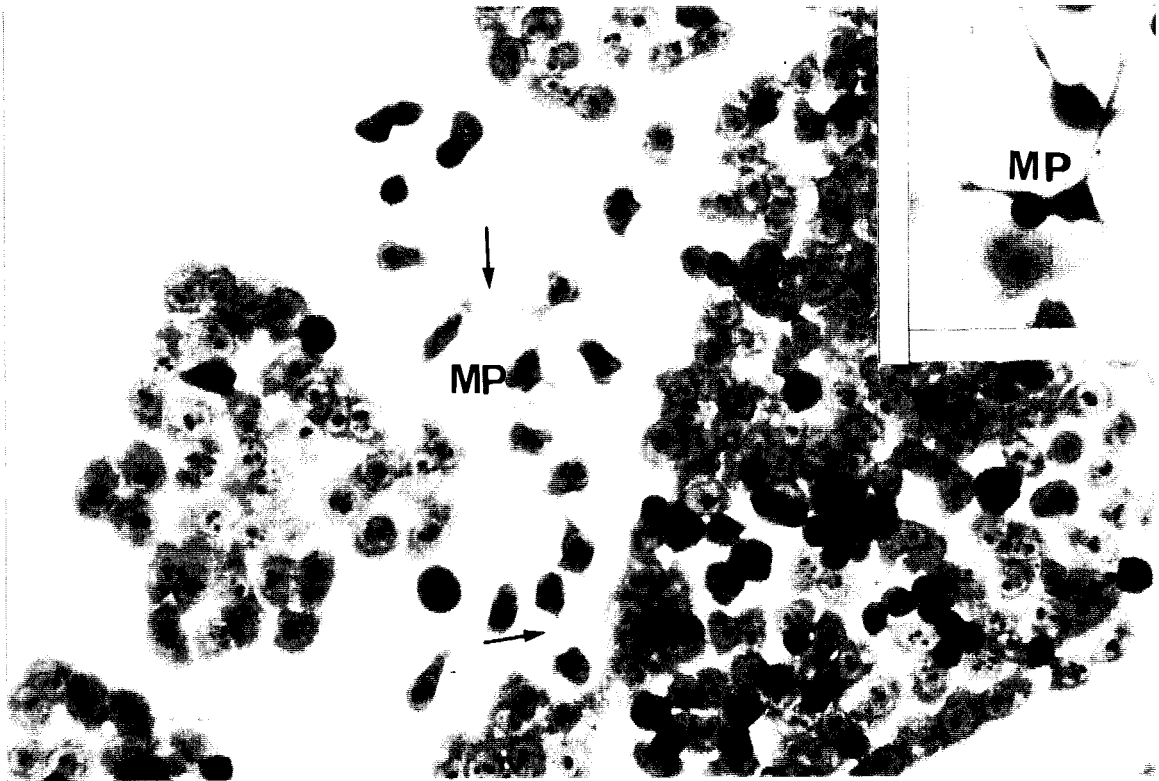
Fotomicrografía 1.- Cultivo control de 24 h de células de neuroblastoma Neuro-2a: cultivo proliferativo con predominio de células mitóticas (M) y postmitóticas (PM). Giemsa. 200x.



Fotomicrografía 2.- Cultivo control de 48 h de células de neuroblastoma Neuro-2a: cultivo de tipo proliferativo con predominio de células postmitóticas (PM) y formación de placas de células poligonales (→). Obsérvese el aumento de tamaño de algunos neuroblastos (N). Giemsa. 200x.



Fotomicrografía 3.- Cultivo control de 72 h de células de neuroblastoma Neuro-2a: cultivo proliferativo postmitótico con formación de placas (P), abundantes células postmitóticas (PM) y neuroblastos monopolares diferenciados (→). Giemsa. 200x.



Fotomicrografía 4.- Cultivo control de 96 h de células de neuroblastoma Neuro-2a: numerosas células diferenciadas multipolares (MP) y contactos sinápticos (→). Giemsa. 200x. Recuadro con detalle de células multipolares. Giemsa. 200x.

2.4.- Actividad Metabólica

Las células de neuroblastoma son capaces de cambiar rápidamente su metabolismo energético aerobio hacia uno anaerobio (Nissen y col., 1972; Nissen y col., 1973). Este mecanismo compensatorio las protege, por ejemplo, de la inhibición de la fosforilación oxidativa producida por KCN, incrementando la glucólisis (Walum y Peterson, 1984).

La captación de nutrientes puede ponerse de manifiesto con 2-desoxiglucosa (Walum y col., 1976); se incrementa con la diferenciación al ser estas células casi completamente dependientes de la oxidación de glucosa para la producción de energía, y tener muy altos requerimientos de ésta (Sokoloff, 1981; Nyberg y Walum, 1984).

La actividad ATPasa sódico-potásica presenta oscilaciones durante el ciclo de crecimiento celular del clon Neuro-2a, (Moolenaar y col., 1981b) al igual que la síntesis de ADN y proteínas (Mummery y col., 1981), y el transporte de sodio (Mummery y col., 1982), potasio y rubidio (Boonstra, 1981a y b).

La enolasa específica neuronal se encuentra a niveles no muy altos, pero tras la diferenciación se incrementa, predominando sobre la forma no neuronal (Herschman y col., 1973; Marangos y col., 1978). También la esterasa de implicación neurotóxica (NTE) se incrementa con la diferenciación (Fedalei y Nardone, 1983), aunque carece de la fracción de alta afinidad por el mipafox encontrada *in vivo* (Carrington y col., 1985).

Otras actividades enzimáticas de interés en estas células son la β -galactosidasa, α y β glucosidasas, hidroxilasa, hexosaminidasa (Repetto y col., 1993), galactocerebrosidasa (Singer y Tiemeyer, 1985) y somanasa (Ray y col., 1988).

2.5.- Neurotransmisión

2.5.1.- Composición de la membrana neuronal

Aunque la composición proteica y lipídica de la membrana neuronal es muy importante en los fenómenos de diferenciación, morfogénesis y conducción del impulso eléctrico, se ha comprobado que los glucoesfingolípidos de las células diferenciadas y no diferenciadas de neuroblastoma son idénticos. Lo mismo ocurre con los glucopéptidos de superficie, aunque existen diferencias entre los clones capaces de emitir neuritas y los que no pueden hacerlo.

2.5.2.- Permeabilidad iónica

Los canales iónicos y receptores asociados más interesantes que se conocen en las células de neuroblastoma son:

a) Canales iónicos dependientes de voltaje

a.1) Canales de sodio:

Su apertura provoca la fase rápida de despolarización del potencial de acción. Son bloqueados por la tetrodotoxina, potente toxina del pez globo. Se conocen al menos 5 lugares posibles de interacción con diferentes neurotóxicos.

a.2) Canales de potasio:

Se han caracterizado en células de neuroblastoma dos tipos de receptores responsables de la fase de repolarización del potencial de acción. Su relevancia toxicológica es limitada dado que se conocen muy pocos compuestos que afecten a la corriente de potasio (Boonstra y col., 1981a).

a.3) Canales de calcio:

Se distingue uno de tipo transitorio, involucrado en la despolarización, y otro persistente, relacionado con potenciales de membrana más despolarizados.

b) Canales iónicos operados por receptores

b.1) Receptores de acetilcolina:

Se han caracterizado estos receptores como receptores nicotínicos de "tipo neural", en contraposición a los de "tipo placa motora" (Oortgiesen y Vijverberg, 1989). También se sugiere la presencia de dos tipos de receptores muscarínicos.

b.2) Receptores de serotonina:

Se conocen 5 tipos, que median la corriente rápida desensibilizante de entrada y probablemente están acoplados a varias clases de canales no selectivos para cationes monovalentes. Su significado toxicológico no es conocido.

b.3) Receptores de glutamato:

Las células Neuro-2a diferenciadas expresan receptores para el glutamato (Van der Valk y Vijverberg, 1990).

c) Canales activados por calcio y por iones metálicos:

En las células de neuroblastoma se conocen dos tipos. El canal grande mantiene la homeostasis del calcio y es bloqueado por las sales de tetraetil-amonio. El tipo pequeño participa en la regulación de la frecuencia del potencial de acción durante estímulos mantenidos, es bloqueado por una de las toxinas de la abeja, la apamina, y activado por plomo.

2.5.3.- Neurotransmisores

Los clones celulares de neuroblastoma se corresponden con neuronas del sistema simpático, y pueden clasificarse en cuatro tipos de acuerdo con la síntesis de neurotransmisores:

- I.- Clones estrictamente colinérgicos, que contienen niveles altos de colina-acetiltransferasa (ChAT).
- II.- Clones adrenérgicos estrictos, con alto contenido en tirosina-hidroxilasa (TH).
- III.- Clones incapaces de sintetizar acetilcolina y catecolaminas (Amano y col., 1972).
- IV.- Clones que sintetizan ambos tipos de neurotransmisores.

El clon Neuro-2a pertenece al tipo II adrenérgico estricto.

Todos los clones contienen acetilcolinesterasa, que se incrementa retirando el suero, y por productos como fluorodesoxiuridina (Prasad, 1980), citosinarabinósido (Prasad, 1980), dibutiril-AMPC o irradiación con rayos X. Ello es debido a que retardan el crecimiento y promueven la diferenciación, por lo que la AChE puede utilizarse como marcador bioquímico de diferenciación celular en estas células. Sin embargo, durante la fase de crecimiento logarítmico, la cantidad de acetilcolinesterasa se incrementa como consecuencia de la síntesis general de ARN y proteínas (Blume y col., 1970).

En relación con el metabolismo de las aminas biógenas y otros neurotransmisores, se ha estudiado la monoamino-oxidasa (MAO) (Donnelly y col., 1976; Skaper y col., 1984) y se conoce la regulación de la actividad AChE por diversos factores en este tipo de células (Blume, 1970), al igual que su secreción (McGee y col., 1978).

2.5.3.- Receptores

Además de los receptores de acetilcolina y de serotonina citados, en el clon Neuro-2a se han caracterizado receptores para encefalinas, GABA, α y β adrenérgicos (Singer y Tiemeyer, 1985) y receptores del ácido kaínico (Van der Valk y Vijverberg, 1990).

También se han estudiado receptores que interaccionan con diferentes xenobióticos como los de los antiepilépticos, prostaglandinas y bradiquinina. Presentan receptores H_1

de la histamina que son bloqueados por los antidepresivos tricíclicos (Richelson, 1978) y antagonizados por varios alucinógenos como la dietilamida del ácido lisérgico (LSD).

3.- APLICACIONES TOXICOLOGICAS PREVIAS

Las líneas celulares de neuroblastoma han sido utilizadas para el estudio de los mecanismos de acción y de la capacidad tóxica de numerosas sustancias. Al realizar la revisión bibliográfica hemos encontrado 178 referencias, en las que los clones más utilizados han sido N1E115 y Neuro-2a, ambos de ratón.

En resumen, podemos concluir que las células de neuroblastoma suponen un sustrato biológico muy interesante para estudios de neurotoxicidad *in vitro* ya que se conocen ampliamente sus características genéticas, morfológicas, metabólicas, de crecimiento y de las funciones neurotransmisoras. Así mismo, han permitido profundizar en los mecanismos de acción de diversos tipos de compuestos tóxicos con óptimos resultados, por lo que consideramos que reúne todos los requisitos necesarios para ser empleadas, con suficiente garantía, como sustrato biológico de nuestro método experimental.

B.- Indicadores de toxicidad empleados

Para detectar y cuantificar la capacidad tóxica de los productos químicos se utilizan distintas determinaciones que se denominan marcadores o indicadores de toxicidad.

Internacionalmente se consideran diversos criterios de selección de los indicadores utilizados *in vitro*: deben ser sencillos de realización (Stark y col., 1986), rápidos y precisos en su desarrollo (Bradlan, 1986), económicos (Bernson, 1986) y suficientemente sensibles (Veronesi, 1992). Los indicadores no se valoran o interpretan de forma aislada, sino conjuntamente varios de ellos, en lo que se denomina "batería".

En toda batería de indicadores de toxicidad que pretenda diferenciar entre compuestos citotóxicos y compuestos de toxicidad específica, es necesario incluir indicadores para ambos tipos de acción. Los más comunes indicadores de citotoxicidad cuantifican de forma directa e inespecífica alteraciones de las funciones basales que afectan a la viabilidad celular. Así se mide, por ejemplo, la capacidad de absorción de colorantes vitales, o la inhibición de la proliferación celular. Frente a estos indicadores de viabilidad/letalidad, se usan otros más específicos para detectar alteraciones en la síntesis de macromoléculas, la regulación de la energía, las reacciones biosintéticas, los procesos de transporte, los cambios en enzimas específicas, la pérdida de iones o cofactores, etc.

En una línea celular neuronal, pueden utilizarse indicadores neuroespecíficos. Estos indicadores específicos neuronales, que representan funciones neuroquímicas, neuromorfológicas y de neurotransmisión, pueden identificar ciertos compuestos neurotóxicos y diferenciarlos de los citotóxicos. Ningún indicador por sí solo puede cubrir todo el rango

de mecanismos de acción de distintos neurotóxicos. Por ello, en un programa de criba de neurotóxicos deben incluirse varios indicadores específicos de neurotoxicidad. Como los compuestos neurotóxicos pueden actuar sobre los sistemas de neurotransmisión tanto en la liberación presináptica como sobre los receptores postsinápticos, los ensayos para valorar enzimas neuronales tales como la actividad glutamato-descarboxilasa, dopamina-hidroxilasa, actividad enolasa específica neuronal, actividad de la esterasa diana de neuropatía (NTE) y AChE, colina acetiltransferasa, tirosina-hidroxilasa, y otras enzimas relevantes, son indicadores válidos y relativamente fáciles de llevar a cabo (Veronesi, 1992; Atterwill, 1990).

De entre todos los indicadores de cito y neurotoxicidad existentes, hemos seleccionado ocho, que aunque no pueden abarcar todos los mecanismos posibles, pensamos que reflejan algunos de los más interesantes.

1.- PROLIFERACION CELULAR. CONTENIDO PROTEICO TOTAL

1.1.- Introducción

Las células que crecen en cultivo proliferan a un ritmo óptimo, que puede alterarse por compuestos químicos que interfieran una o varias de las funciones celulares esenciales, como la actividad mitocondrial, la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis proteica o el mantenimiento de las membranas. Por ello, independientemente del mecanismo por el que actúen, una de las consecuencias directas es la disminución en el crecimiento de las células y el retraso de la división.

1.2.- Interés toxicológico

La gran ventaja de utilizar la proliferación celular como índice de toxicidad, es que al ser un indicador absolutamente inespecífico del estado de salud celular, es muy sensible a cualquier tipo de tóxico.

Como indicador indirecto de la proliferación celular, empleamos la cuantificación del contenido en proteínas totales porque presenta la ventaja de ser más sensible que el recuento y más simple y estandarizada que la valoración del ARN o ADN. Además, la cuantificación de las moléculas proteicas presentes en la célula, a diferencia de la valoración de una actividad enzimática, no se afecta por la presencia del tóxico en el medio. Su interés lo apoya el hecho de haber sido escogida como el indicador de citotoxicidad empleado en el Programa Interlaboratorio de Toxicología *in vitro* auspiciado por FRAME (Balls y Bridges, 1984).

Quizás el único inconveniente del ensayo del contenido proteico total como medida de proliferación celular es que puede sobreestimar la toxicidad de los compuestos que interfieren la síntesis proteica y los que alteran el ADN (Shopsis y Eng, 1985).

2.- CAPTACION RELATIVA DE ROJO NEUTRO

2.1.- Introducción

El ensayo de captación del colorante supravital rojo neutro (NR), fue desarrollado en la Universidad Rockefeller (Nueva York) (Borenfreund y Puerner, 1984). Estandarizado inicialmente con células de mamífero (Borenfreund y Puerner, 1985a), ha sido usado para evaluar la citotoxicidad aguda de surfactantes (Borenfreund y Puerner, 1985b), agentes bacteriostáticos (Borenfreund y Shopsis, 1985), sales metálicas inorgánicas (Borenfreund y Puerner, 1986), etc.

2.2.- Características del ensayo utilizado

El ensayo del rojo neutro se basa en la incorporación del colorante supravital, rojo neutro, en los lisosomas de las células viables no dañadas tras incubar el cultivo celular con productos químicos tóxicos. Este colorante débilmente catiónico penetra a través de las

membranas celulares por difusión no iónica, y se une intracelularmente a grupos carboxílicos y/o fosfatos de la matriz lisosomal. Los xenobióticos que dañan las membranas plasmática o lisosomal disminuyen la absorción, y subsecuentemente la retención del colorante (Babich y Borenfreund, 1987).

2.3.- Interés toxicológico

En ausencia de factores extraños, la captación de rojo neutro es proporcional al número de células viables, ya que las células muertas no lo retienen (Parish y Mullbacher, 1983). Pero en presencia de tóxicos que alteren la membrana plasmática o lisosomal, la acumulación del mismo disminuye (Bitensky, 1963), sirviéndonos como un buen indicador del estado funcional de las células y de los mecanismos homeostáticos que las regulan.

Para evaluar exclusivamente la función lisosomal sin las interferencias provocadas por la modificación de la proliferación celular, como ocurre en el ensayo clásico, expresamos los resultados como captación relativa de rojo neutro (relativa al contenido proteico total del cultivo) de acuerdo con la propuesta de Repetto y Sanz (1993).

3.- ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA

3.1.- Introducción

La fosfofructoquinasa (ATP: D-fructosa-6-P-1-fosfotransferasa, EC 2.7.1.11; PFK) cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP al hidroxilo del C-1 de la fructosa-6-fosfato (F6P), produciendo fructosa-1,6-difosfato (FDP). La reacción catalizada por esta enzima representa el primer y más importante paso regulatorio de la glucólisis. Por tanto, no es de sorprender que la enzima esté regulada por varios metabolitos, de tal forma que controla la glucólisis de acuerdo con la necesidad celular de energía o de intermediarios glucolíticos (Bloxham y Lardy, 1973).

3.2.- Propiedades catalíticas y estructurales

La fosfofructoquinasa es una enzima con gran especificidad por el sustrato fructosa-6-fosfato (F6P). Esta enzima cataliza la fosforilación de la fructosa-1-fosfato (F1P) a una velocidad del 5 % respecto de la velocidad de la reacción cuando el sustrato es la F6P. La F1P es un inhibidor competitivo de la fosforilación de la F6P, lo cual indica que ambos azúcares compiten por el mismo centro activo.

En contraste con el alto grado de especificidad por el azúcar, la PFK puede usar una gran variedad de nucleósidos trifosfatos como donadores de fosforilos en la reacción catalítica. (ej: ATP, GTP, ITP, CTP, VTP, dATP, TTP. Las K_m son distintas según la fuente o individuo y el nucleósido utilizado) (Bloxham y Lardy, 1973).

Todas las reacciones de transferencia de grupos fosforilos donde el ATP está implicado requieren un complejo ión divalente-ATP como sustrato activo. El complejo con Mg^{+2} es generalmente el más efectivo. La reacción es endergónica ($\Delta G = -4.0$ Kcal/mol) y prácticamente irreversible (Herrera, 1986).

Como muchas enzimas alostéricas, la PFK posee un peso molecular bastante elevado (380.000) que contrasta con el tamaño relativamente pequeño de muchas quinasas. La enzima está formada por cuatro subunidades.

3.3.- Regulación

La fosfofructoquinasa es una enzima alostérica y su actividad se halla modulada por un gran número de efectores. Entre los de mayor interés, en cuanto a la regulación de la glucólisis, caben destacar como moduladores negativos: ATP, citrato, Ca^{+2} , Mg^{+2} , fosfoenolpiruvato, 1,3-difosfoglicerato y palmitato. Como moduladores positivos: el más importante es la fructosa-2,6-difosfato; pero también, AMP, ADP y fructosa-1,6-difosfato

(producto de la reacción). La velocidad de la reacción muestra *in vitro* una cinética sigmoideal respecto a la concentración de fructosa-6-fosfato, que se desplaza a la derecha o izquierda según haya, respectivamente, efectores negativos o positivos (Herrera, 1986).

En las vías metabólicas, las enzimas que catalizan reacciones esencialmente irreversibles son posibles puntos de control. En la glucólisis, las reacciones catalizadas por hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa son prácticamente irreversibles, de modo que cabe esperar que tengan funciones tanto catalíticas como regulatorias. De hecho, las tres enzimas son lugares de control.

La fosfofructoquinasa es el elemento de control más importante en la vía glucolítica en los mamíferos. La enzima hepática se inhibe por niveles altos de ATP, que hacen disminuir la afinidad de la enzima por la fructosa-6-fosfato. Una concentración de ATP elevada convierte la curva hiperbólica del enlace enzima-fructosa-6-P en una curva sigmoidea. Este efecto alostérico se consigue mediante la unión del ATP a un centro regulador específico, diferente del centro catalítico. La acción inhibitoria del ATP se contrarresta por el AMP, de modo que la actividad de la enzima aumenta cuando disminuye la relación ATP/AMP. En otras palabras, cuando la carga de energía de la célula es baja, la glucólisis se estimula. La fosfofructoquinasa también se inhibe por el H^+ , lo que evita la formación excesiva de lactato y una caída brusca del pH sanguíneo (acidosis).

La glucólisis también suministra los esqueletos carbonados para la biosíntesis, de modo que cabe esperar que la fosfofructoquinasa pueda ser regulada por una señal que indique si los sustratos de las reacciones biosintéticas abundan o escasean. De hecho, la fosfofructoquinasa se inhibe por el citrato, uno de los compuestos iniciales del ciclo del ácido cítrico. Un nivel elevado de citrato significa que los precursores biosintéticos abundan, de modo que no debe degradarse más glucosa con este fin. El citrato inhibe la fosfofructoquinasa, potenciando el efecto inhibitorio del ATP (Stryer, 1990).

Un nuevo activador transitorio de la PFK, la ribosa-1,5-difosfato, ha sido encontrado en cerebro cuando la glucólisis se acelera al extraer la porción suprasensorial del cerebro con un chorro de aire usando el dispositivo de "brain-blowing". (Ogushi y col., 1990). Esta ribosa-1,5-diP se forma rápidamente durante el inicio de la glucólisis, y desaparece en 20 segundos (Ishikawa y col., 1990).

3.4.- Interés toxicológico

La glucólisis es una vía metabólica de especial interés en neuronas (Cremer, 1981). El alto consumo de ATP por estas células hace que la glucólisis se encuentre más activa que en el resto de las células, puesto que todo el metabolismo neuronal depende de los carbohidratos. La fosfofructoquinasa es la enzima reguladora del paso más importante de la glucólisis, y además no se encuentra formando parte de otros procesos metabólicos. Por tanto, a pesar de la poca extensión de su uso *in vitro*, consideramos importante incluir su estudio en nuestra batería de indicadores de toxicidad, como índice de afectación de la 1ª fase de la glucólisis.

4.- ACTIVIDAD ENOLASA

4.1.- Introducción

La enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa o fosfopiruvato hidratasa; EC 4.5.1.11; ENL) cataliza la deshidratación del 2-fosfo-D-glicerato para dar fosfoenolpiruvato. La reacción es rápidamente reversible. Al ser una enzima incluida en las vías glucolíticas y fermentativa, es probablemente ubicua en el mundo biológico.

4.2.- Propiedades catalíticas y estructurales

En mamíferos, las moléculas de enolasa son dímeros con pesos moleculares de alrededor de 100000, y compuestos por tres subunidades distintas (α , β y γ). Tras realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida adicionado de dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS) de la enolasa purificada, cada preparación mostró una sola banda, con una movilidad relativa correspondiente a pesos moleculares de 46000, 44000 y 46000 para las subunidades α , β y γ respectivamente (Shimizu y col., 1983).

In vivo, la distribución de la enolasa depende de las subunidades que la formen. Así la $\alpha\alpha$ se distribuye por varios tejidos, mientras que las $\beta\beta$ y $\alpha\beta$ se encuentran en tejido muscular y corazón; y las $\gamma\gamma$ y $\alpha\gamma$ se localizan principalmente en tejido nervioso y células neuroendocrinas. Por esta distribución característica de las subunidades β y γ en tejidos o células, se ha encontrado interés clínico en estas enolasas como posible marcador antigénico de algunas enfermedades (Shimizu y col., 1983).

El dímero $\gamma\gamma$ se llama enolasa específica neuronal (NSE) y el $\alpha\alpha$, enolasa no neuronal (NNE). En cerebro, el dímero NNE se localiza en células gliales. Como se sabe que en rata la proliferación de células neuronales ocurre prenatalmente, y que la NSE aparece postnatalmente, se asume que las neuronas relativamente sin diferenciar contienen el dímero NNE. La rápida aparición del dímero NSE en el período postnatal temprano sugiere que, al irse diferenciando la neurona, se va desarrollando el paso de NNE a NSE (Gross y col., 1990).

La enolasa es por tanto un dímero y cada subunidad necesita un ión Mg^{+2} para mantener su estructura y un ión Mn^{+2} para realizar su actividad catalítica.

La reacción de deshidratación catalizada por la enolasa tiene una consecuencia importante para la glucólisis. La energía libre estándar de la hidrólisis del 2PG es sólo -4.18 Kcal/mol; por otra parte la energía libre estándar de la hidrólisis del PEP es -14.5 Kcal/mol.

Por tanto, la reacción catalizada por la enolasa crea un metabolito rico en energía, el PEP, que en el siguiente paso de la glucólisis dona un grupo fosforilo al ADP (Rawn, 1989).

Los sustratos de la enolasa son el fosfoenolpiruvato y 2-fosfoglicerato. El fosfoenolpiruvato tiene una banda de absorción al ultravioleta muy ancha, con un máximo a 215 nm. El 2-fosfoglicerato es transparente a 220 nm, y esta diferencia en las propiedades espectrales de ambos es la base para el ensayo de la actividad de la enolasa (Wold, 1971).

4.3.- Regulación

La enzima muestra una necesidad absoluta de la presencia de un catión divalente (Mg^{+2} o Mn^{+2}) que forma un complejo con la enzima con anterioridad a la unión del sustrato. La enzima es inhibida fuertemente por el fluoruro, particularmente si se halla presente un fosfato; la especie inhibidora es el ión fosfofluoridato, que forma un complejo con el Mg^{+2} (Lehninger, 1989).

4.4.- Interés toxicológico

Al ser la vía glucolítica tan importante en las neuronas (Cremer, 1981), consideramos interesante medir varias enzimas de esta ruta, situadas a distintos niveles, para localizar el momento a partir del cual se afecta por el tóxico.

La enolasa se encuentra en uno de los últimos pasos de dicha vía, y tiene el interés añadido de ir transformándose de NNE a NSE a medida que la célula neuronal se va diferenciando en el cultivo. Nardone (1983) considera en una batería de ensayos a la NSE como indicador neuronal y a la actividad enolasa total como indicador no neuronal. Así ha sido utilizada como indicador temprano de daño celular *in vitro* en cultivos de tejidos y en líneas celulares de neuroblastoma humano (IMR 32) y de ratón (Neuro-2a) diferenciadas y sin diferenciar (Thomas y col., 1991).

Sin embargo, otros autores indican que ambas enolasas se inhiben tanto por análogos neurotóxicos como no neurotóxicos en nervio ciático *in vivo* (Sakamoto y Hashimoto, 1985b) y en cerebro de ratón *in vitro* (Sakamoto y Hashimoto, 1985a). Howland y col. (1980) no observan ninguna diferencia entre la inhibición producida por la acrilamida *in vitro* en la NSE y en la actividad enolasa total, aunque sí proponen que el daño selectivo observado en neuronas tras la administración crónica de este compuesto sea debida a la inhibición de una única isoenzima de la enolasa, la NSE.

In vitro, algunas enzimas glucolíticas exhiben una sensibilidad variable a los neurotóxicos: a) basándose en la CI_{50} para la 2,5-hexanodiona, el orden de aumento en la sensibilidad de estas enzimas es: enolasa > gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa > fosfofructoquinasa; b) para la acrilamida es: fosfofructoquinasa > enolasa > gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (Howland y col., 1980).

5.- ACTIVIDAD SUCCINATO-DESHIDROGENASA

5.1.- Introducción

La succinato-deshidrogenasa (succinato-oxidoreductasa; EC 1.3.99.1; SDH) es una sulfo-ferro-proteína (también llamada proteína con hierro no hemo). De hecho, esta enzima contiene tres clases diferentes de agrupaciones hierro-azufre en distintas proporciones: 2Fe-2S, 3Fe-4S y 4Fe-4S (Stryer, 1990). Por acción de la succinato deshidrogenasa, el succinato es deshidrogenado a fumarato, utilizando como coenzima el FAD, que es reducido a FADH₂. Por métodos isotópicos se ha demostrado que la enzima cataliza específicamente la formación del fumarato con configuración "trans" (Herrera, 1986).

Es la única enzima del ciclo del ácido cítrico que se localiza en la membrana interna mitocondrial. De hecho, está directamente unida a la cadena de transporte electrónico. El FADH₂ producido por la oxidación del succinato no se disocia de la enzima, a diferencia del NADH producido en otras reacciones de oxidación. En vez de ello, dos electrones del FADH₂

se transfieren directamente a los átomos de FeS de la enzima. El último receptor de estos electrones es el oxígeno molecular (Stryer, 1990).

5.2.- Propiedades catalíticas y estructurales

Posee un peso molecular de alrededor de 100000, y contiene una molécula de FAD, ocho átomos de hierro y ocho átomos de azufre lábiles frente a los ácidos. La enzima muy purificada posee dos subunidades, cuyos pesos moleculares son 30000 y 70000, respectivamente. La subunidad menor de la succinato-deshidrogenasa es una sulfo-ferroproteína que contiene cuatro átomos de hierro y cuatro átomos de azufre ácido-lábiles, y la subunidad mayor contiene además FAD. El FAD está unido covalentemente, pudiendo liberarse por digestión con tripsina de la subunidad mayor. El FAD se halla unido a través del grupo metilo en posición 8 de la riboflavina al nitrógeno en posición 3 del anillo imidazólico de un resto de histidina de la proteína (Lehninger, 1989).

5.3.- Regulación

La succinato-deshidrogenasa posee algunos de los atributos de una enzima alostérica; es activada por succinato, fosfato, ATP y coenzima-Q reducido, y es inhibida por concentraciones muy bajas de oxalacetato. Sin embargo, no es cierto que estos efectos intervengan en el establecimiento de la velocidad global del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ya que la actividad de la succinato-deshidrogenasa mitocondrial es, generalmente, mucho mayor que la actividad de las demás enzimas del ciclo, y mayor también que la actividad de la cadena de transporte electrónico (Lehninger, 1989). Esto supone un mecanismo de regulación del rendimiento energético del ciclo, ya que cuando la succinato-deshidrogenasa actúa a máxima actividad (por ejemplo, por aumento en la disponibilidad de ATP), la entrada de NADH en la cadena respiratoria disminuye por competencia con el FADH_2 como donador de electrones, produciendo el acúmulo del primero e inhibiendo con ello la actividad de las deshidrogenasas que lo forman. Esto supone, a su vez una disminución del rendimiento del ciclo, ya que de la oxidación de una molécula de NADH por la cadena respiratoria se obtiene

energía suficiente para formar 3 ATP, mientras que del succinato se obtienen solamente 2 ATP.

5.4.- Interés toxicológico

La succinato-deshidrogenasa, al formar parte del ciclo del ácido cítrico y de la cadena respiratoria, es un enzima especialmente interesante para determinar el grado de afectación de estos dos procesos, continuación de la vía glucolítica. Además, al encontrarse localizada en la membrana interna mitocondrial, es un indicador del grado de afectación de este orgánulo celular.

Su actividad en células intactas se evalúa mediante la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo, al formazano correspondiente, de color púrpura, cuya aparición se controla espectrofotométricamente. El ensayo del MTT está ampliamente extendido en toxicología *in vitro*, y existen muchos datos publicados sobre este indicador utilizado en distintos cultivos primarios de tejidos y líneas celulares tras aplicar gran variedad de tóxicos. Ha sido modificado por Repetto y col. (1994a) para determinar específicamente la actividad SDH. Por lo tanto su inclusión en nuestra batería de indicadores se hace muy interesante para tener datos *in vitro* con los que poder comparar los nuestros y así tratar de ir estandarizando estos métodos alternativos.

6.- ACTIVIDAD ATPasa

6.1.- ACTIVIDAD ATPasa Na⁺-K⁺

6.1.1- Introducción

La mayoría de las células animales mantienen el K⁺ intracelular a una concentración constante relativamente elevada, comprendida entre 120 y 160 mM, mientras que el nivel de Na⁺ en el interior de la célula es, generalmente, inferior a 10 mM. A través de la membrana existe un gradiente significativo de K⁺ y de Na⁺, puesto que el fluido extracelular de los mamíferos contiene una concentración bastante elevada de Na⁺, y una concentración muy baja de K⁺, generalmente inferior a 4 mM. La alta concentración de K⁺ interior se mantiene constante por la expulsión de Na⁺, con consumo de energía, al exterior celular, y su sustitución por K⁺ (Lehninger, 1989; Herrera, 1986). El transporte activo de Na⁺ y K⁺ tiene una gran significación fisiológica. En realidad, más de un tercio del ATP consumido por un animal en reposo se utiliza para bombear estos iones. El gradiente Na⁺-K⁺ en las células animales controla el volumen celular, permite que las células nerviosas y musculares sean eléctricamente excitables y dirige el transporte activo de los azúcares y aminoácidos (Stryer, 1990).

En Dinamarca, Jens Skou descubrió (1957) una enzima que hidroliza el ATP solamente en presencia de Na⁺ y de K⁺ (además de Mg⁺², el cual es necesario para todas las ATPasas). De aquí que el enzima fuera denominado ATPasa Na⁺-K⁺ (Stryer, 1990; Lehninger, 1989). Skou propuso que la ATPasa Na⁺-K⁺ (ATP fosfohidrolasa; EC 3.6.1.3) es una parte integrante de la bomba de Na⁺-K⁺ y que la ruptura del ATP suministra la energía necesaria para el transporte activo de estos cationes. Distintas evidencias experimentales avalan esta hipótesis:

- 1.- La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ está presente dondequiera que los iones Na^+ y K^+ sean transportados activamente. El nivel de la actividad enzimática está correlacionado cuantitativamente con la intensidad del transporte iónico. Así, por ejemplo, las células nerviosas son ricas tanto en la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ como en la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ mientras que los hematíes poseen niveles bajos de ambas.
- 2.- Tanto la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ como en la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ están estrechamente asociadas a la membrana plasmática.
- 3.- La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ al igual que la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ tienen la misma orientación en la membrana plasmática.
- 4.- Las variaciones en las concentraciones de Na^+ y K^+ tienen un efecto paralelo sobre la actividad de la ATPasa y sobre la velocidad de transporte de estos iones.
- 5.- Tanto la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ como la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ se inhiben específicamente por los esteroides cardiotónicos. La concentración de esteroide que produce una inhibición igual a la mitad de la máxima es la misma para ambos procesos (Stryer, 1990).

6.1.2.- Propiedades catalíticas y estructurales

La bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ es un sistema de antiporte que bombea dos iones K^+ al interior de la célula por cada tres iones Na^+ que expulsa al medio extracelular y por cada molécula de ATP que hidroliza. Cada molécula de ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ hidroliza unas 100 moléculas de ATP por segundo en condiciones óptimas. Así, cerca de una tercera parte del requerimiento energético total de la célula se desvía hacia esta enzima. Es más, en las células excitables, la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ puede llegar a consumir hasta el 70 % de la energía celular (Rawn, 1989; Herrera, 1986).

La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ es una proteína asimétrica que atraviesa íntegramente la bicapa lipídica de la membrana plasmática y que está compuesta por dos tipos de subunidades o cadenas polipeptídicas. La estequiometría de la enzima es $\alpha_2\beta_2$. Las subunidades α (de peso molecular 120000 cada una) llevan a cabo la hidrólisis del ATP y poseen centros de unión para el Na^+ y el ATP en la cara citoplasmática y para el K^+ y la ouabaína en la cara

extracelular; ésta es también la subunidad que se fosforila, en un residuo de ácido aspártico, durante el ciclo catalítico. Las subunidades β (de peso molecular 55000 cada una) son glucoproteínas cuya función es desconocida. Los restos glucídicos de estas glucoproteínas de membrana, están orientados hacia el espacio extracelular (Rawn, 1989; Herrera, 1986; Esmann, 1984).

El ciclo catalítico de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ depende de reacciones de transferencia del grupo fosforilo y de cambios conformacionales de la enzima. Es un mecanismo en dos etapas. Para que el transporte iónico se lleve a cabo, el interior de la célula debe contener ATP y Na^+ , mientras que en el medio extracelular han de existir iones K^+ . Así, tres iones Na^+ se unen a la enzima en el lado citosólico de la membrana plasmática. La transferencia de un grupo fosforilo del ATP presente en el citosol a un residuo de aspartato de la ATPasa genera un enlace acil-fosfato rico en energía. Entonces tiene lugar un cambio conformacional en la ATPasa, de forma que se liberan al medio extracelular tres iones Na^+ . A continuación, dos iones K^+ se unen a la enzima desde el exterior de la célula, se produce un nuevo cambio conformacional tras la hidrólisis del enlace acil-fosfato y los dos iones K^+ son introducidos en el citosol. El ATP y sus productos de hidrólisis, el ADP y el P_i , permanecen en el interior de la célula, lo mismo que el Mg^{+2} . El Mg^{+2} es indispensable sólo porque forma parte del verdadero sustrato, que es el complejo MgATP^{-2} (Rawn, 1989; Lehninger, 1989).

6.1.3.- Regulación

Estudios enzimáticos y de transporte han demostrado que la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ está orientada de la forma siguiente:

- 1.- El ión Na^+ debe estar en el interior, mientras que el K^+ debe estar en el exterior para activar la ATPasa y para ser transportados a través de la membrana.
- 2.- El ATP es un sustrato eficaz para la ATPasa y para la bomba, solamente si esta fuente de energía está en el interior de la célula.

- 3.- Los esteroides cardiotónicos inhiben la bomba y la ATPasa solamente cuando están situados en el exterior de la célula.
- 4.- El vanadato inhibe la bomba y la ATPasa solamente cuando está localizado en el interior de la célula.

Como se ha dicho antes, un aspecto importante de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ es que el ATP no se hidroliza a menos que el Na^+ y el K^+ sean transportados. En otras palabras, el sistema está acoplado de modo que la energía acumulada en el ATP no se disipa. El acoplamiento muy estrecho es una característica general de los conjuntos biológicos que hacen de intermediarios de la conversión de energía, como ocurre también en el transporte electrónico mitocondrial. El acoplamiento de la hidrólisis del ATP y la contracción muscular es otro ejemplo de este principio. La bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ puede invertirse de modo que sintetiza ATP cuando se somete a gradientes iónicos pronunciados (Stryer, 1990; Mummery, 1981; Xie, 1989).

El esteroide vegetal ouabaína, es un inhibidor específico de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, bloqueando desde el medio extracelular la hidrólisis del ATP y la translocación de iones. La inhibición de la enzima por ouabaína altera el equilibrio osmótico de la célula, ya que la entrada de iones Na^+ y Cl^- incrementa la presión osmótica tanto que la célula puede incluso estallar (Rawn, 1989). *In vitro* una concentración 10^{-4} M de ouabaína es suficiente para inhibir completamente la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Montgomery y col., 1982; Stryer, 1990).

6.1.4.- Interés toxicológico

La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ posee un papel regulador de extraordinaria importancia en el control del volumen celular (Rawn, 1989; Abou-Donia, 1988). La inhibición de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ por digitálicos conduce a un mayor nivel de Na^+ en el interior de la célula disminuyendo por tanto el gradiente de Na^+ a través de la membrana. Como consecuencia, disminuye también la salida de Ca^{+2} producida por el transportador que intercambia Na^+ exterior por Ca^{+2} interior (Stryer, 1990).

Los cambios en la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, como principal responsable del potencial electroquímico en células de mamíferos, puede ser un indicador del efecto de una sustancia química sobre la viabilidad de la membrana celular y posiblemente de la célula entera (Invitox, 1991).

6.2.- ACTIVIDAD BASAL DE ATPasa Mg^{+2}

Cuando el Na^+ y el K^+ no se encuentran en la mezcla de reacción, las preparaciones todavía tienen una capacidad residual de hidrolizar ATP; esta actividad basal ATPasa varía significativamente según la fuente del tejido o la técnica de aislamiento y se ha designado como ATPasa estimulada por Mg^{+2} . Su función fisiológica y/o relación con otras ATPasas no se conoce aún totalmente. Puede representar un sistema enzimático distinto o simplemente un estado funcional diferente del complejo estimulado por Na^+ y K^+ . La actividad ATPasa Na^+/K^+ requiere Mg^{+2} , pero no se transporta en condiciones óptimas para el complejo de la ATPasa Na^+/K^+ . La ATPasa Mg^{+2} no se afecta por inhibidores potentes de la ATPasa Na^+/K^+ . Su actividad puede alterarse por agentes no específicos tales como el ácido etacrínico y el p-cloromercuribenzoato, pero las constantes de inhibición son generalmente más altas que para los otros componentes de la ATPasa. Se necesita mayor investigación para determinar la naturaleza de este componente del transporte enzimático (Phillips y Hayes, 1989).

7.- ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA

7.1- Introducción

La acetilcolinesterasa es una de las enzimas más estudiadas, de la cual se han publicado numerosas revisiones en la última década: Brimijoin (1983), Kerkut (1984), Taylor (1991) y Sanz y Repetto (1994).

La primera sugerencia sobre la existencia en el suero sanguíneo de un factor capaz de hidrolizar la acetilcolina fue realizada por Dale en 1914; su implicación en la función nerviosa se debe a Loewi y Navratil (1921). Este factor que hidrolizaba los ésteres de la colina recibió el nombre de colinesterasa por Stedman y col. (1932). La enzima como tal fue definitivamente descrita en 1938 por David Nachmansohn (Stryer, 1990). La acetilcolinesterasa (acetilcolina-acetilhidrolasa; EC 3.1.1.7; AChE) produce la hidrólisis de la acetilcolina en acetato y colina. Dicha hidrólisis es el proceso catabólico más rápido conocido, ya que la escisión de cada molécula en colina y acetato puede producirse en microsegundos (Herrera, 1986).

Tiene una amplia distribución, no solamente limitada al sistema nervioso, lo que garantiza la destrucción inmediata de cualquier molécula de acetilcolina (Herrera, 1986).

Juega un papel clave en los mecanismos colinérgicos de transmisión nerviosa. La inhibición de AChE produce un acúmulo de acetilcolina que parece ser responsable de la despolarización incontrolada de las neuronas colinérgicas en las uniones neuromusculares y consecuentes convulsiones (Park y Eun, 1989).

La AChE se ha definido siempre como una enzima postsináptica, unida a membrana, que actúa principalmente en el receptor postsináptico terminando con la acción de la acetilcolina. Sin embargo, estudios realizados en la última década, muestran que la AChE está también asociada a las terminaciones nerviosas presinápticas en forma soluble y unida a membrana. Además, se ha considerado como un potente neuromodulador en el sitio de su liberación de las dendritas de las células nigro-estriales, donde puede ajustar la sensibilidad de dichas células a los neurotransmisores (Marquis y Fishman, 1985). La inhibición de la AChE favorece la transmisión en todas las sinapsis colinérgicas. Sin embargo, al estar esta enzima en exceso en las sinapsis colinérgicas, es necesario inhibir del 60 % al 90 % de la enzima antes de iniciarse la disfunción colinérgica (Abou-Donia, 1988).

7.2.- Propiedades catalíticas y estructurales

Los estudios de especificidad de sustrato sobre la acetilcolinesterasa han demostrado que aunque el enlace susceptible es el enlace ester entre la colina y el grupo acetilo, la parte de la molécula necesaria para situarlo sobre el centro activo es el grupo amonio cuaternario con carga positiva que se halla unido a un grupo no polar. La presencia de este grupo orientador es también necesaria en la estructura de los inhibidores competitivos de la acetilcolinesterasa (Lehninger, 1989).

Es una glucoproteína (15 % del carbohidrato por peso) cuya unidad es un monómero globular de 80000 daltons. El monómero (G_1) se une en dímeros (G_2) a través de puentes disulfuros intercatenarios. Los dímeros se unen en tetrámeros (G_4), quizás bajo la influencia de fuerzas de Van der Waals (Brimijoin, 1983). Los tetrámeros pueden unirse a tres colas trenzadas (stranded tails). Cada cola se conecta al tetrámero a través de puentes disulfuros, y ayudan a la unión de la enzima a la membrana en las sinapsis y las uniones neuromusculares, aunque estas formas con cola (A_4 , A_8 , A_{12}) también están presentes en el axoplasma. Estas formas solubles o unidas a membranas corresponden, definidas operacionalmente, a las formas solubles en sales y solubles en detergente respectivamente (Andrés, 1990).

En cerebro de mamífero, el 80-90 % de la actividad es típicamente de la forma G_4 , y la mayoría de la actividad remanente es G_1 . Dos áreas de excepción del cerebro de rata son el cerebelo, que contiene cantidades iguales de G_1 y G_4 , y el bulbo, que contiene cantidades significativas de G_2 . Las formas con cola existen en el SNC, pero representan sólo el 0.02 % del total de la actividad AChE. G_1 y G_2 son casi exclusivamente intracelulares, G_4 está principalmente unida a membrana y es generalmente extracelular. La forma A_{12} es siempre extracelular (Brimijoin, 1983).

7.3.- Regulación

Roufogalis y Quist propusieron en 1972 un modelo alostérico de regulación de la AChE para explicar sus datos cinéticos. En el modelo se proponen tres centros aniónicos (α , β y γ): α es el centro aniónico catalítico y β y γ son centros aniónicos periféricos. Ellos clasifican los ligandos colinérgicos basándose en su afinidad relativa por los centros aniónicos catalíticos y periféricos. El Ca^{+2} , a bajas concentraciones (menores de 0.1 nM), ejerce un efecto acelerador sobre la catálisis a través de su unión selectiva al centro aniónico β o centro acelerador, mientras que el tetrametilamonio muestra una especificidad mayor por el centro aniónico α . Se pensó que la galamina se unía al centro aniónico γ , ya que su inhibición no podía ser antagonizada por ligandos que se unen a los centros aniónicos β o α . Por otro lado, los compuestos con dos amonios cuaternarios, tales como el decametonio, parecen unirse a los centros aniónicos β y α , ya que su inhibición puede antagonizarse por tetrametilamonio y Ca^{+2} .

La modificación selectiva de uno o más centros aniónicos periféricos por una carbodiimida soluble, hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), antagoniza el efecto acelerador del Ca^{+2} sin afectar la catálisis del sustrato. Esto confirma la presencia de centros aniónicos periféricos (Sekar y Roufogalis, 1980).

7.4.- Interés toxicológico

El interés en la determinación de la actividad AChE radica en la alta especificidad que sobre ella tienen los compuestos fuertemente neurotóxicos denominados anticolinesterásicos.

Los inhibidores de la AChE pueden dividirse en dos grupos según que la acción sea reversible o irreversible. La inhibición es reversible cuando la actividad enzimática se recupera al eliminar el inhibidor. Se comportan como tales muchos compuestos, entre los que destacan la propia ACh en exceso, fisostigmina, cocaína, morfina, codeína, otros opiáceos como metadona y apomorfina (Sood y Mohanakumar, 1985); metales como el sodio, cinc,

cobre, plomo, mercurio (Repetto y col., 1993), litio (Hughes y Bennet, 1985), talio (Repetto y col., 1994b) y arsénico (Repetto y col., 1994a); toxinas como la botulínica y venenos de serpientes y arañas (Karlsson y col., 1984); anestésicos como la procaína, ketamina, lignocaína y lidocaína; antihistamínicos H₂ (Galli y col., 1984); benzodiazepínicos, barbitúricos y cardiotónicos (Godin y col., 1978); plaguicidas organoclorados como lindano, endosulfán y dieldrin (Zemaitis y col., 1976), y el paraquat. Los carbamatos son el modelo de inhibidores reversibles y pueden usarse preventivamente frente a otros inhibidores.

Se conocen también compuestos capaces de inducir la actividad de la enzima. Entre ellos figuran disolventes orgánicos como etanol, hexano, tricloroetileno, cloruro de metileno, y tolueno (Honma, 1983); metales como aluminio, magnesio, calcio, estaño y vanadio (Hughes y Bennett, 1985); micotoxinas como la ocratoxina A, citrinina y zearalenona (Gupta y col., 1982); agentes físicos como las radiaciones ionizantes y los campos magnéticos de baja frecuencia (Rajeswari y col., 1985); salicilatos (Caralan y col., 1983), hipolipemiantes, antidepresivos, vitamina A, insulina, adrenalina, histamina, prostaglandina, e incluso algunos organofosforados a bajas dosis en cangrejos (Repetto y col., 1988) y en humanos no previamente expuestos (Sanz y col., 1991). Aunque el mecanismo de inducción no está bien establecido, se postula la activación de tipo alostérico en el caso del aluminio (Patocka y Bajgar, 1987), inducción de la síntesis enzimática por agentes de tipo hormonal como la sustancia P (Catalan y col., 1984), o facilitación de la unión enzima-sustrato por fluidificación de la membrana para la AChE (Mazzanti y col., 1986).

La AChE es por tanto un buen indicador de compuestos específicamente neurotóxicos por lo que la hemos incluido en nuestra batería de ensayos.

8.- β -GALACTOSIDASA

8.1.- Introducción

La β -D-galactosidasa, (β -D-galactosil-galactohidrolasa; EC 3.2.1.23; GAL) cataliza la hidrólisis de la parte β -D-galactosil de una gran variedad de sustratos naturales y sintéticos (Chuang, 1990) tales como el gangliósido GM₁ (Singer y Tiemeyer, 1985).

8.2.- Propiedades catalíticas y estructurales

Como sucede con muchas glucosidasas, la especificidad de la enzima está limitada al residuo azucarado y al carácter anomérico del enlace, y no al aglucón. Se ha establecido una serie de requisitos que deben de cumplir los sustratos:

- 1.- El anillo D-piranósido parece esencial. Aunque el o-nitrofenil- β -D-galactofuranósido no es hidrolizado.
- 2.- El grupo hidroxilo en el C-2 parece ser esencial para la hidrólisis enzimática. Este grupo asume un papel específico en el mecanismo catalítico.
- 3.- La inversión de la unión β -glucosídica a la configuración α hace al galactósido resistente a la hidrólisis enzimática.
- 4.- El cambio del oxígeno glucosídico de los β -D-galactósidos por un sulfuro, produce un gran descenso de la velocidad de la hidrólisis enzimática.
- 5.- Además de las uniones C-O y C-S, la enzima puede también hidrolizar sustratos con uniones C-F y C-N sustituyendo al oxígeno glucosídico.
- 6.- La enzima muestra amplia tolerancia respecto a variaciones estructurales del resto no glucosídico, que puede ser otro residuo azucarado, un grupo alquilo o un grupo arilo.

Con el sustrato o-nitrofenil- β -D-galactósido, la β -galactosidasa es activada por iones Na^+ . El Na^+ aumenta la afinidad de la enzima por el o-nitrofenil- β -D-galactósido y la velocidad máxima de hidrólisis (Wallenfels y Weil, 1972).

Basándose en estudios de pH óptimo, pueden considerarse dos grupos distintos de β -galactosidasas: acídica lisosomal y neutra no lisosomal. En hígado humano y cultivos de fibroblastos, la β -galactosidasa acídica lisosomal está presente en forma monomérica de peso molecular 64000 o bien como agregados moleculares (peso molecular 600000-700000). Estudios de biosíntesis de la β -galactosidasa lisosomal en cultivos de fibroblastos han mostrado que la enzima precipita con antisuero anti- β -galactosidasa humana, junto con un polipéptido de peso molecular 32000. Esta β -galactosidasa acídica, que forma complejo con el polipéptido, está formada por un precursor no-lisosomal de peso molecular 54000, el cual se toma del entorno extracelular con pH neutro vía receptores de manosa-6-fosfato. En este polipéptido de peso molecular 32000 se ha descubierto una función protectora contra la degradación proteolítica rápida por polimerización de la β -galactosidasa monomérica (Chuang, 1990).

La estructura tetramérica de la enzima fue demostrada directamente con estudios por microscopía electrónica, que mostraron cuatro subunidades ordenadas en las esquinas de un cuadrado. Las dimensiones de la molécula determinadas por este método oscilan entre 120 y 70 Å, lo cual concuerda con los valores obtenidos de los datos hidrodinámicos (Wallenfels y Weil, 1972).

8.3.- Regulación

Se ha demostrado que una célula de *E. coli* creciendo en lactosa contiene varios miles de moléculas de β -galactosidasa. Por el contrario, el número de moléculas de β -galactosidasa por célula es menor de diez si *E. coli* crece en otras fuentes de carbono, tales como glucosa o glicerol. La lactosa origina o induce un gran incremento en la cantidad de β -galactosidasa en *E. coli* al provocar la síntesis de nuevas moléculas de la enzima en lugar de activar a un

proenzima preexistente. Por tanto, se dedujo que la β -galactosidasa es una enzima inducible (Stryer, 1990).

La β -galactosidasa es además el prototipo de enzima inducible al ser la primera en la que se estableció de forma completa el conjunto de genes que codifica todo el mecanismo regulatorio, denominado operón lactosa (Stryer, 1990).

8.4.- Interés toxicológico

La G_{M1} -gangliosidosis, enfermedad originada por el almacenamiento de gangliósidos (galactoproteínas) en los lisosomas, se debe a un déficit en la actividad β -galactosidasa. Esta deficiencia ha sido estudiada *in vitro* en fibroblastos de pacientes con G_{M1} -gangliosidosis (Van Diggelen y col., 1981).

La β -galactosidasa fue propuesta por Dewar (1983) como un marcador de degeneración del cuerpo neuronal. A pesar de que en 1981 publicó que las actividades β -glucuronidasa y β -galactosidasa aumentaban el daño producido en nervio periférico, en 1983, al considerar por separado ambas actividades, observó el incremento en la β -glucuronidasa y disminución de la β -galactosidasa cerebral paralela a la pérdida de neuronas. Por lo tanto puede ser un buen indicador de neurotoxicidad en cultivos de células neuronales, que nos ayude a diferenciar entre agentes cito y neurotóxicos.

III.- SUSTANCIAS ENSAYADAS

Para la selección de las sustancias a ensayar, se han tenido en cuenta varios criterios.

En primer lugar, se consideró imprescindible contar con productos de toxicidad específica neuronal (neurotóxicos) y otros que produjesen toxicidad general (citotóxicos), para así comprobar si el conjunto de indicadores de toxicidad seleccionado podía diferenciar entre ambos tipos de compuestos.

Un segundo criterio fue el seleccionar productos que afectasen a las células en distintos "puntos", principalmente en aquellos que se consideran importantes en el desarrollo y mantenimiento de las funciones vitales neuronales, tales como la vía glucolítica, la integridad de la membrana neuronal, la viabilidad de las células y la actividad de enzimas consideradas como marcadores neuronales. No siempre se pudo medir de forma directa la acción específica de cada compuesto, puesto que se estableció un conjunto de ensayos que pudieran ser de aplicación general a todos ellos.

Por último se consideraron de forma conjunta varios criterios admitidos por la comunidad científica como críticos en este tipo de estudios. Así se tuvo en cuenta que fueran productos lo más documentados posible, con propiedades fisico-químicas (atendiendo especialmente a la fácil solubilidad en el medio de cultivo) y biológicas establecidas y comercializados por una firma de garantía, de alta pureza, ya que las impurezas pueden originar un desplazamiento de la curva dosis-respuesta y afectar en la interpretación de los resultados. Deben ser sustancias de toxicidad *in vivo* conocida (Veronesi, 1992).

De acuerdo con estos criterios se seleccionaron seis productos, que aunque abarcan sólo unos pocos mecanismos de acción tóxica de los compuestos químicos, sí reflejan algunos de los más interesantes en neuronas.

1.- CLORPROMAZINA

1.1.- Historia. Usos y aplicaciones.

Las fenotiazinas fueron sintetizadas en 1883, aunque hasta 1934 no fueron utilizadas como antihelmínticos, antisépticos urinarios e insecticidas. En 1952 Charpentier sintetizó el producto número 4560 RP, o clorpromazina. Poco después, Laborit y col. (1952) describieron la habilidad de este compuesto para potenciar a los anestésicos y producir hibernación artificial. Observaron que la clorpromazina por sí misma no causaba pérdida de conciencia, producía sólo una tendencia a dormir y una marcada falta de interés en lo que se estuviera haciendo (Jarvik, 1970).

En 1953, Corvoisier y col. describieron un variado número de acciones manifestadas por la clorpromazina. Estas incluían las propiedades gangliolítica, adrenolítica, antifibrilatoria, antiedematosa, antipirética, antishock, anticonvulsiva y antiemética. Además, la clorpromazina aumentaba la actividad de varios fármacos analgésicos y depresores centrales (Jarvik, 1970).

El primer informe sobre el tratamiento de enfermedades mentales con clorpromazina sola fue realizado por Delay y col. (1952). Estaban convencidos de que la clorpromazina lograría algo más que el alivio sintomático de la agitación o la ansiedad y que podría tener un efecto paliativo sobre procesos psicóticos de sintomatología diversa. Pronto se confirmó mediante estudios clínicos, que la acción más importante, al igual que la utilidad más amplia de la clorpromazina, era el tratamiento de estados psicóticos, y desde entonces su uso principal ha sido como neuroléptico (Jarvik, 1970).

Las fenotiazinas, especialmente la clorpromazina, pertenecen al grupo de los fármacos más ampliamente usados en la práctica médica. De 1955 a 1965 al menos 50 millones de pacientes recibieron clorpromazina y poco después había más de 10000 publicaciones que tratan de sus acciones (Jarvik, 1970).

La clorpromazina y otros derivados fenotiazínicos se emplean principalmente en dos situaciones: tratamiento de pacientes psiquiátricos (psicóticos) y como antiemético en el tratamiento de las náuseas y vómitos producidos por diversas enfermedades o los causados por algunos fármacos. Sin embargo, no está indicada en mareos debidos a los medios de locomoción (Reynolds, 1982).

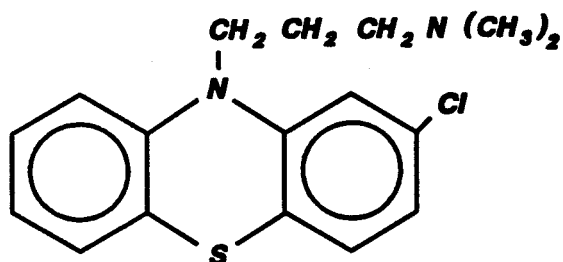
Se usa también para el control de los síntomas de abstinencia al alcohol, aunque el fármaco de elección es el diazepam (Reynolds, 1982).

Como la necesidad de analgésicos se reduce con la clorpromazina, se usa como coadyuvante en el tratamiento de dolores severos, especialmente en enfermedades malignas (como por ejemplo el tétanos) (Reynolds, 1982).

Poco después de la introducción de la clorpromazina, se temió que pudiera tener gran cantidad de efectos tóxicos, incluyendo acciones deletéreas en casi todos los órganos, lo que obligó a un uso más controlado (Jarvik, 1970).

1.2.- Propiedades fisico-químicas

La clorpromazina tiene una estructura de tres anillos en la cual dos bencénicos están unidos por un azufre y un nitrógeno (Budavari, 1989):



El nombre químico de la clorpromazina es 2-cloro-N-N, dimetil-10-H-fenotiazina-10-propanamina. Su fórmula empírica es $C_{17}H_{19}ClN_2S$ y peso molecular 318.86; CAS-50-53-3; RTECS: SN 8925000 (Reynolds, 1982).

Para los ensayos hemos utilizado su clorhidrato de fórmula empírica $C_{17}H_{19}ClN_2SHCl$ y peso molecular 355.32; CAS-69-09-0 (Reynolds, 1982); EINECS 200-701-3 (Lenga y Votoupal, 1993). El clorhidrato de clorpromazina es un polvo cristalino blanco o crema con un sabor picante. Se descompone en contacto con el aire o la luz a color amarillo, rosa y finalmente violeta (Reynolds, 1982). Su punto de fusión es 194-196°C (Lenga y Votoupal, 1993).

Un gramo del clorhidrato se disuelve en 2.5 ml de agua. Es soluble en metanol, etanol y cloroformo y prácticamente insoluble en éter y benceno (Budavari, 1989). Debe almacenarse en contenedores protegidos del aire y de la luz (Reynolds, 1982).

1.3.- Farmaco-toxicocinética

La cinética de las fenotiazinas no se conoce bien debido a las transformaciones químicas tan complicadas que tienen lugar en el organismo. La mayoría de los neurolépticos comparten parámetros farmacocinéticos similares. La clorpromazina es el compuesto tipo.

*** ABSORCION**

En dosis terapéuticas únicas, la biodisponibilidad oral es de aproximadamente un 32 % (oscilando del 10 al 69 %) en relación con la absorción intramuscular. Los picos de concentraciones máximas aparecen normalmente entre 2 y 3 horas tras su ingesta y caen rápidamente entre las 3 y 6 horas. La baja biodisponibilidad oral se debe en gran parte al metabolismo presistémico en el lumen gastrointestinal o pared intestinal. La biodisponibilidad oral de la clorpromazina en terapias crónicas, es incluso menor que por absorción única (un 37 % de ésta (Ellenhorn y Barceloux, 1988)).

*** DISTRIBUCION**

El volumen de distribución de la clorpromazina es de 20 l/kg (márgenes de 10 a 35 l/kg) y la unión a proteínas plasmáticas es alta (90 - 95 %). Además se acumula en tejido adiposo, y los niveles cerebrales pueden alcanzar concentraciones de diez veces los plasmáticos (Ellenhorn y Barceloux, 1988). La acumulación en sistema nervioso ocurre preferentemente en el sistema reticular activante, sistema límbico, hipotálamo y tálamo; mientras que se encuentran cantidades muy pequeñas en cortezas cerebral y cerebelosa.

*** METABOLISMO**

Se metaboliza en el hígado por sulfoxidación y glucuronización. El metabolismo de la clorpromazina es extremadamente complejo, habiéndose aislado sólo 20 de los 168 metabolitos posibles (Ellenhorn y Barceloux, 1988). La biotransformación es inversamente proporcional a la edad: en comparación con los valores de los adultos, en los niños parece estar acelerada (Furlanut y col., 1990).

*** ELIMINACION**

Por la orina se excreta un 23 % del fármaco y sus metabolitos; menos del 1 % se excreta incambiado por el riñón. También puede eliminarse en heces. Muchos de los metabolitos son compuestos activos; por eso la vida media farmacológica de estos productos es difícil de calcular. Tras una dosis oral de 120 mg/m² a voluntarios humanos, la clorpromazina presenta una vida media de eliminación de 18 horas (márgenes de 6 - 119 horas). Los metabolitos polares pueden aparecer en la orina de 2 - 6 semanas tras la administración crónica. La variabilidad en la respuesta terapéutica de las fenotiazinas puede deberse a las diferencias individuales en el metabolismo (Ellenhorn y Barceloux, 1988).

*** TRANSFERENCIA PLACENTARIA**

Se cree que estos fármacos atraviesan la barrera placentaria, ya que en neonatos nacidos de madres esquizofrénicas que recibían fenotiazinas se ha observado depresión respiratoria y reacciones extrapiramidales (Ellenhorn y Barceloux, 1988).

1.4.- Farmaco-toxicodinamia

*** ORGANOS DIANA**

Hígado, sangre, sistema nervioso central y músculo esquelético (Lenga y Votoupal, 1993).

*** ACCIONES**

La clorpromazina es el neuroléptico patrón con el que se suelen comparar los demás. Ejerce un efecto relativamente selectivo sobre las estructuras del sistema nervioso central

(SNC) encargadas de la vigilia y la actividad. La selectividad depende, en parte al menos, de la acumulación preferencial en el sistema reticular activante, sistema límbico, hipotálamo y tálamo.

La clorpromazina tiene acción antagonista de los siguientes fármacos en orden aproximado de potencia:

- 1.- los agonistas de receptores alfa, dopamina, serotonina e histamina (agonista de receptores H_1).
- 2.- los agonistas muscarínicos.
- 3.- la bradicinina, en tejidos periféricos; probablemente también en el SNC.

La afinidad de la clorpromazina por los receptores de neurotransmisores es de 5.3 para el D_2 de la dopamina, 11 y 0.033 para el H_1 y H_2 respectivamente, de la histamina, 38 y 0.13 para α_1 y α_2 adrenérgicos y 1.4 para muscarínicos (Bass y Vargas, 1990).

Se ha sugerido que la acción tranquilizante depende del bloqueo de la transmisión adrenérgica central, pero hay datos que hacen pensar que el bloqueo de la transmisión serotoninérgica y dopaminérgica puede constituir la base de su acción antiesquizofrénica, y el de los receptores de dopamina intervendría en el efecto antiemético y en la producción de efectos secundarios extrapiramidales (Cabrera y col., 1993).

La clorpromazina se une a la AChE y muestra mayor afinidad por el sitio aniónico catalítico que por el sitio aniónico periférico de la enzima (Sekar y Roufogalis, 1980).

La clorpromazina inhibe otras enzimas y sistemas enzimáticos, a veces formando complejos con cofactores, por ejemplo con: FAD, inhibiendo la fosforilación oxidativa; ATP, deprimiendo la actividad celular; con iones metálicos, en particular Mn^{+3} (Cabrera y col., 1993).

En cultivos de células de neuroblastoma (N1E - 115) *in vitro*, Ogata y Narahashi (1990) mostraron dos tipos de canales de calcio, que pueden distinguirse basándose en su dependencia del voltaje y del tiempo, en su selectividad iónica y sus propiedades farmacológicas. El tipo I puede activarse a potenciales muy negativos y se inactiva si la despolarización se mantiene. Sin embargo, el tipo II puede ser activado por grandes despolarizaciones hasta potenciales negativos pequeños, y muestra poca o ninguna inactivación. La clorpromazina causa un bloqueo reversible y dependiente de la concentración casi de igual forma en ambos tipos de canales de calcio.

La clorpromazina antagoniza la calmodulina, siendo un bloqueante más potente de la corriente de sodio que de la de potasio. El lugar de acción probablemente es la superficie intracelular del axolema donde presumiblemente puede formarse un complejo Ca^{+2} - calmodulina.

Roed y Brodal (1981) encontraron en la clorpromazina un gran inhibidor de las ATPasas unidas al sarcolema, en un rango de concentración de 0.15 - 1 mM. La ATPasa Na^+/K^+ fue la más inhibida. Se observó una inhibición más débil en la ATPasa Ca^{+2} (Roed y Brodal, 1981). Se ha observado también en tejido cerebral un efecto inhibitorio de la clorpromazina sobre la ATPasa Na^+/K^+ unida a membrana (Robinson y col., 1968).

Además la clorpromazina posee, tanto *in vitro* como *in vivo*, gran actividad estabilizadora de membrana; para algunos autores este efecto por sí solo es suficiente para explicar la muerte por sobredosis. Proponen por tanto, que el estudio de nuevos fármacos debería incluir la estimación de la actividad estabilizadora de membrana, como una indicación del potencial de dicho fármaco para causar intoxicación mortal por sobredosis (Henry y Cassidy, 1986).

En suspensiones de plaquetas preparadas a partir de sangre humana, Holmsen y Rygh (1990) observaron que la clorpromazina a concentraciones mayores de 50 - 70 μM causa liberación rápida no sólo de mensajeros nucleotídicos, sino también de otros productos

citoplasmáticos, como algunos intermediarios de la glucólisis de bajo peso molecular ($P_m < 2000$). Otro marcador citoplasmático utilizado, la lactato-deshidrogenasa de peso molecular 170000, no se libera al medio a concentraciones de clorpromazina menores de 2 mM. Esto indica que la clorpromazina perfora la membrana plasmática de las plaquetas de tal forma que parece ser permeable a sustancias de bajo peso molecular e impermeable a las de alto peso molecular. A altas concentraciones llegan a liberarse al medio algunas enzimas lisosomales, como la hexosaminidasa.

La clorpromazina a concentraciones no permeabilizadoras ($< 50 \mu\text{M}$) no tiene efecto sobre el recambio (turnover) del ATP. Sin embargo, en este rango de concentraciones, la clorpromazina inhibe la respuesta fisiológica de las plaquetas. Por lo tanto, esta inhibición no se debe a la disminución en la biodisponibilidad del ATP. Cuando se permeabilizan las plaquetas con concentraciones superiores de clorpromazina ($> 50 \mu\text{M}$), el recambio (turnover) del ATP disminuye, lo cual puede contribuir a la inhibición de las respuestas de las plaquetas y a los procesos que acompañan la señal de transducción que utilizan ATP directamente, tales como la fosforilación proteica (Holmsen y Rygh, 1990).

Al basarse la acción neural en la capacidad de excitación de la membrana plasmática, seleccionamos la clorpromazina como producto para nuestros ensayos, por su capacidad estabilizadora de membrana (Henry y Cassidy, 1986).

*** EFECTOS BENEFICIOSOS**

Posee una serie de efectos diversos consecuencia de su mecanismo de acción (Cabrera y col., 1993):

- Por su acción estabilizante de membrana puede manifestar un efecto anestésico local y sobre el corazón ejerce un efecto de tipo quinidínico.
- La clorpromazina posee acciones antiinflamatorias y antipruriginosas que pueden depender del antagonismo de diversas sustancias mediadoras (serotonina, histamina,

bradicinina).

- Las concentraciones elevadas producen irritación local de los tejidos, por lo tanto, la administración parenteral es por inyección intramuscular profunda, y sin repetirla nunca en la misma zona.

*** EFECTOS ADVERSOS**

Los efectos tóxicos colaterales a dosis terapéuticas incluyen somnolencia, sequedad de boca, congestión nasal, hipotensión postural, disminución de la temperatura corporal, taquicardia, arritmias, agitación, insomnio, depresión, miosis y midriasis, convulsiones, fotosensibilidad, erupciones cutáneas e inhibición de la eyaculación (Reynolds, 1982).

El bloqueo de los receptores de dopamina en la vía nigroestriada dentro de los ganglios basales acaba en reacciones extrapiramidales. El bloqueo de las neuronas dopaminérgicas causa pérdida del efecto normal inhibitorio de la dopamina en las neuronas colinérgicas con el consecuente desarrollo de efectos laterales hipocinéticos (parkinsonismo). El desarrollo de reacciones distónicas agudas puede probablemente explicarse por un mecanismo parecido, y contribuir al "síndrome de muerte súbita por fenotiazinas". Este síndrome se caracteriza por disfunción extrapiramidal severa, hipertermia, taquicardia, hipotensión o hipertensión, fluctuaciones del estado mental que puede llevar al coma, elevada CPK y sudor profuso que pueden ocurrir desde después de unas horas a meses tras la terapia con fenotiazinas (Nierenberg y col., 1991). Por otro lado, en el bloqueo crónico de receptores dopaminérgicos, por terapias a largo plazo, puede acabarse en hipersensibilidad por denervación y consecuente aumento en los niveles de dopamina del SNC, produciendo hipercinesia (discinesia tardía) (Bass y Vargas, 1990).

* DOSIS TERAPEUTICAS

La clorpromazina tiene un margen de dosis teórica terapéutica diaria en adultos de 100 - 1000 mg por día (Ellenhorn y Barceloux, 1988). La máxima dosis usada en estados severos es de 2000 mg/día (Ellenhorn y Barceloux, 1988). Las dosis utilizadas generalmente en pediatría son: oral 0.5 mg/Kg (4-6 h; >6 meses); rectal 1.0 mg/Kg (6-8 h; >6 meses); intramuscular e intravenosa 40 mg/D (<5 años; <23 Kg); intramuscular e intravenosa 75 mg/D (5-12 años; 23-45 Kg)

* DOSIS TOXICAS

- Inhalatoria:	Ratón	$CL_{50} = 209 \text{ mg/m}^3/2\text{h}$
	Rata	$CL_{50} = 209 \text{ mg/m}^3/2\text{h}$
- Intramuscular:	Ratón	$DL_m = 300 \text{ mg/Kg}$
- Intraperitoneal:	Cobayo	$DL_{50} = 87 \text{ mg/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 14 \text{ mg/Kg}$
- Intravenosa:	Perro	$DL_{50} = 30 \text{ mg/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 16 \text{ mg/Kg}$
	Rata	$DL_{50} = 23 \text{ mg/Kg}$
	Conejo	$DL_{50} = 16 \text{ mg/Kg}$
- Oral:	Gato	$DL_m = 100 \text{ mg/Kg}$
	Perro	$DL_m = 250 \text{ mg/Kg}$
	Cobayo	$DL_m = 250 \text{ mg/Kg}$
	Humano	$DT_m = 8570 \text{ } \mu\text{g/Kg}/12\text{D-I}$
	Infante	$DT_m = 20 \text{ mg/Kg}$
	Mamífero	$DL_{50} = 500 \text{ mg/Kg}$
	Hombre	$DT_m = 217 \text{ mg/Kg}/19\text{D}$
	Ratón	$DL_{50} = 135 \text{ mg/Kg}$
	Rata	$DL_{50} = 142 \text{ mg/Kg}$
	Mujer	$DT_m = 240 \text{ mg/Kg}/30\text{D}$
Mujer	$DT_m = 200 \text{ } \mu\text{g/Kg}$	

- Subcutánea:	Gato	DL ₅₀ > 10 mg/Kg
	Perro	DL ₅₀ > 20 mg/Kg
	Mono	DL ₅₀ > 5 mg/Kg
	Ratón	DL ₅₀ = 33 mg/Kg
	Rata	DL ₅₀ = 75 mg/Kg

2.- CICLOHEXIMIDA

2.1.- Historia. Usos y aplicaciones

Es una sustancia antimicrobiana producida por *Streptomyces griseus* (Reynolds, 1982).

La cicloheximida es uno de los inhibidores de la síntesis proteica más usado en investigación (Budavari, 1989), aunque se ha observado otra serie de acciones que no parecen estar relacionadas directamente con la inhibición de la síntesis proteica (Huerta-Bahena y col., 1982).

Suele añadirse a medios bacteriológicos para facilitar el aislamiento o contaje de bacterias en presencia de levaduras. Así se ha usado en la detección y aislamiento de *Chlamydia trachomatis* (Reynolds, 1982).

Por sus propiedades antifúngicas se ha empleado en el tratamiento y control de ciertas enfermedades micóticas en plantas (Reynolds, 1982; Budavari, 1989).

En trabajos de experimentación *in vivo* se utiliza para inhibir la inducción de enzimas microsomales hepáticas que metabolizan los fármacos.

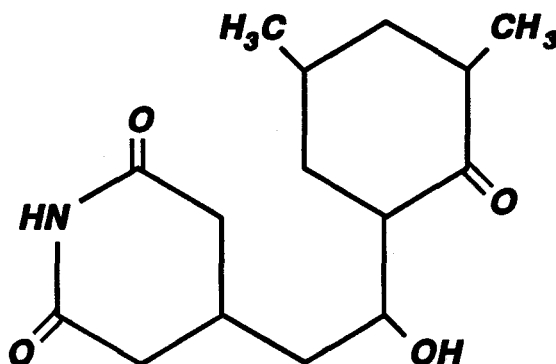
Tiene escasa aplicación terapéutica. Clínicamente se utilizó en el tratamiento de candidiasis diseminada y en meningitis por criptococos en el hombre. Aunque es un potente

irritante de la piel, se usó en el tratamiento de la psoriasis (Reynolds, 1982). Actualmente ha sido sustituido por otros agentes antimicrobianos como la Anfotericina B.

También se ha empleado en combinación con otros agentes en el tratamiento de varios tipos de cáncer a dosis mayores de 15 mg/Kg 2 ó 3 veces a la semana, durante períodos mayores de 48 días.

2.2.- Propiedades fisicoquímicas

Su fórmula química desarrollada es la siguiente:



Su nombre químico es 4-[2(3,5-dimetil-2-oxociclohexil)-2-hidroxietyl-2,6-piperidinediona; también se le conoce como actidiona; su peso molecular es de 281.34, su fórmula empírica es $C_{15}H_{23}NO_4$. CAS-66-81-9 (Budavari, 1989); RTECS: MA 437500; EINECS: 200-636-0 (Lenga y Votoupal, 1993).

Se presenta en forma de cristales incoloros. A 2 °C su solubilidad es del 2.1 % en agua, 7 % en acetato de amilo. También es soluble en cloroformo, éter, acetona, metanol, etanol y otros disolventes orgánicos comunes, excepto hidrocarburos saturados. Es relativamente estable al calor y a los ácidos. Se destruye en agua hirviendo a pH 7 durante 1 hora, pero no muestra pérdida de actividad tras hervir 15 minutos. Se inactiva rápidamente a temperatura ambiente por álcalis diluidos, con la formación de una cetona volátil muy

olorosa, la 2,4-dimetilciclohexanona (Budavari, 1989). Su punto de fusión es de 110-111°C (Lenga y Votoupal, 1993).

2.3.- Farmaco-toxicocinética

El único dato cinético al respecto encontrado en la bibliografía consultada, es que la cicloheximida, fácilmente absorbible por vía oral en ratón, no se absorbe bien a través de la piel intacta (ANON, 1989; Morgan, 1982).

2.4.- Farmaco-toxicodinamia

*** ORGANOS DIANA**

Hígado, riñón, sistema nervioso, tracto gastrointestinal y páncreas (Lenga y Votoupal, 1993).

*** ACCIONES**

Su acción más importante es la de ser un potente inhibidor de la síntesis proteica en mamíferos. Bloquea la reacción de translocación de los ribosomas, inhibiendo la fracción 80s de los mismos. La cicloheximida actúa sólo sobre organismos eucariotas, inhibiendo la síntesis proteica citosólica, pero no la de los orgánulos (Alberts y col., 1989).

Además, estimula la glucogenolisis, gluconeogénesis y la ureogénesis en hepatocitos de rata, efecto mediado a través de los adrenoreceptores α_1 (Huerta-Bahena y col., 1982).

Aumenta los niveles de AMPc y estimula la actividad fosforilasa en hígado de rata. Se propuso que la actividad glucogenolítica de la cicloheximida era consecuencia de un

aumento de los niveles de AMPc, lo cual conllevaría la activación de la fosforilasa. Actualmente se piensa que el pequeño aumento en AMPc es secundario a la activación de receptores β (Huerta-Bahena y col., 1982).

Los lisosomas intervienen en diversos procesos patológicos y en ocasiones son responsables directos del origen de algunas enfermedades. Las células forman vacuolas autofágicas al someterlas a condiciones desfavorables o a sustancias tóxicas como la cicloheximida (Berkaloff y col., 1981).

La cicloheximida se comporta como un agente adrenérgico, y la actividad adrenérgica de este inhibidor de la síntesis de proteínas debe ser considerada en la interpretación de todas sus acciones (Huerta-Bahena y col., 1982).

Inhibe la síntesis de catecolaminas de forma dosis-dependiente (Carr y Wehry, 1980). La cicloheximida causa disminución de la actividad total de la AChE. Estos cambios se concretan principalmente a la forma molecular monomérica G_1 , provocando su desaparición con una vida media aparente de 6 horas (Brimijoin, 1983).

*** EFECTOS BENEFICIOSOS**

La cicloheximida posee acción antibiótica muy activa contra gran número de levaduras, pero no tiene una marcada actividad antibacteriana.

*** EFECTOS ADVERSOS**

Es un potente irritante de la piel. Cuando se ingiere provoca una serie de alteraciones gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarrea y excesiva salivación. Otros signos de intoxicación son excitación transitoria del SNC y temblores.

El mecanismo exacto de toxicidad no está bien definido. Se ha propuesto el daño renal y de la corteza adrenal, además de estimulación del sistema nervioso simpático y parasimpático (Morgan, 1982).

* DOSIS TERAPEUTICAS

Hay insuficiente información en la bibliografía sobre el margen de toxicidad de la cicloheximida en humanos. Personas con enfermedades fúngicas han tolerado más de 180 mg/día de forma intravenosa y 30 mg 4 veces al día de forma intramuscular. Dosis orales regulares de 10 mg causan intensas náuseas en adultos.

* DOSIS TOXICAS

- Intraperitoneal:	Gato	DL ₅₀ = 4 mg/Kg
	Cobayo	DL ₅₀ = 60 mg/Kg
	Hamster	DL _m = 40 mg/Kg
	Ratón	DL ₅₀ = 100 mg/Kg
	Rata	DL ₅₀ = 3700 µg/Kg
- Intravenosa:	Ratón	DL ₅₀ = 150 mg/Kg
	Rata	DL ₅₀ = 2 mg/Kg
	Conejo	DL ₅₀ = 17 mg/Kg
- Oral:	Perro	DL ₅₀ = 65 mg/Kg
	Cobayo	DL ₅₀ = 65 mg/Kg
	Mono	DL ₅₀ = 60 mg/Kg
	Ratón	DL ₅₀ = 133 mg/Kg
	Rata	DL ₅₀ = 2 mg/Kg
- Subcutánea:	Pollo	DL _m = 2 mg/Kg
	Cobayo	DL ₅₀ = 60 mg/Kg
	Ratón	DL ₅₀ = 160 mg/Kg
	Rata	DL ₅₀ = 2500 µg/Kg

3.- DINITROFENOL

3.1.- Historia. Usos y aplicaciones.

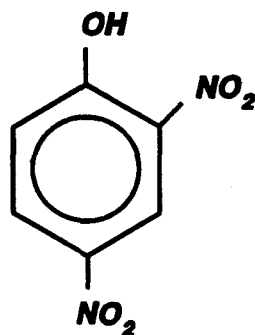
Las acciones farmacológicas del dinitrofenol fueron advertidas por los franceses durante la 1ª Guerra Mundial cuando el compuesto causó envenenamiento en los trabajadores de municiones. Investigaciones posteriores muestran que la acción farmacológica que destaca del dinitrofenol es incrementar la velocidad metabólica. Este aumento en el metabolismo oxidativo disminuye rápidamente los depósitos adiposos, por ello en 1933 se introdujo en medicina clínica como fármaco reductor de peso. Su incorporación en un gran número de panaceas adelgazantes de peso de composición secreta, propició el abuso del dinitrofenol en esa época (Astwood, 1970; Haddad, 1990). Sin embargo, por su alta incidencia de reacciones tóxicas, no ha sido usado más en terapia (Astwood, 1970).

El dinitrofenol y sus productos relacionados son derivados fenólicos usados principalmente como herbicidas y también para el control de ácaros y áfidos (Haddad, 1990).

En laboratorios de análisis químico se emplea como reactivo para la detección de iones potasio y amonio (Budavari, 1989).

3.2.- Propiedades fisicoquímicas

El dinitrofenol (2,4-dinitrofenol) tiene la siguiente fórmula estructural:



Su peso molecular es 184.11 y su fórmula empírica $C_6H_4N_2O_5$ (Budavari, 1989). CAS-51-28-5 (Reynolds, 1992); RTECS: SL 800000; EINECS: 200-087-7 (Lenga y Votoupal, 1993). Se presenta como cristales amarillos ortorrómbicos escasamente solubles en agua fría aunque solubles en agua caliente, alcohol, cloroformo y éter (Reynolds, 1982). Su punto de fusión es 106-108°C (Lenga y Votoupal, 1993).

Forma sales explosivas con los álcalis o el amoníaco. Por tanto, no se deben calentar juntos en recipientes cerrados (Bretherick, 1975).

3.3.- Farmaco-toxicocinética

* ABSORCION

El dinitrofenol se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal, respiratorio o piel intacta (Gosselin y col., 1984; Fikes y col., 1989).

* DISTRIBUCION

La unión a proteínas plasmáticas es alta (Edson, 1955). Al ser un colorante amarillo, da una cierta coloración a los fluidos y tejidos corporales (Astwood, 1970).

* METABOLISMO

El 2,4-dinitrofenol experimenta reducciones en los grupos nitro y conjugaciones en los fenólicos (Morgan, 1989). Es metabolizado en el hombre a 2-amino-4-nitrofenol, 2-nitro-4-aminofenol y 2,4-diaminofenol; y posteriormente sufre conjugación glucurónica (Guerbet y Mayer, 1932; Georgescu, 1932). El hombre destoxica lentamente los dinitrofenoles (Harvey y col., 1951; Smith y col., 1953).

* ELIMINACION

Tras su paso por el hígado es excretado, pero su recirculación enterohepática es tan importante que ésta llega a ser la ruta principal de disponibilidad en el organismo (Morgan, 1989). En el hombre, el producto mayoritario de excreción es el 2-amino-4-nitrofenol (Magne y col., 1932a; Parker, 1952). El dinitrofenol incambiado y sus metabolitos son eliminados por el hombre muy lentamente en la orina (Harvey y col., 1951; Smith y col., 1953).

La vida media en humanos es de 5 a 14 días (Morgan, 1989) y en ratón es de 6 horas (Preache y Gibson, 1975). En un granjero con intoxicación severa, la vida media calculada en suero fue de 13.5 días y en plasma de 39.5 días basándose en los datos siguientes (Leftwich y col., 1982):

DIA	SUERO ($\mu\text{g/ml}$)	PLASMA ($\mu\text{g/ml}$)	ORINA ($\mu\text{g/ml}$)	EXCRECION URINARIA (mg/24 h)
TERCERO			52.7	225
CUARTO	11.5	16.7	37.5	127
OCTAVO	9.2	15.8	49.3	
NOVENO	8.9	15.3	34.4	

3.4.- Farmaco-toxicodinamia

*** ORGANOS DIANA**

Sistema nervioso central, ojos, hígado, riñón, sangre y pulmón.

*** ACCIONES**

El dinitrofenol desacopla la fosforilación oxidativa mitocondrial, ya que actúa como transportador de H^+ hacia el interior mitocondrial, haciendo que no se origine en la membrana mitocondrial el gradiente electroquímico necesario para la activación de la ATPasa, y por tanto impidiendo el paso de ADP a ATP (Alberts, 1989). Como consecuencia se produce una generación y disipación de calor más que la formación de fosfatos ricos en energía (Astwood, 1970).

Este producto aumenta la velocidad del metabolismo en animales intactos y en tejidos aislados. El inicio de la acción es inmediato, y puede observarse dentro del primer minuto tras la inyección intravenosa de 2,4-dinitrofenol. Tras la ingestión por el hombre de 3 a 5 mg/Kg, la velocidad metabólica aumenta en una hora de un 20 a un 30 % y permanece así durante 24 h. Gradualmente vuelve a la velocidad normal en las 48 horas siguientes. Si la dosis anterior se repite diariamente, la velocidad metabólica aumenta en un 50 % y permanece así mientras continúe la administración (Astwood, 1970). La pérdida de peso ocurre porque: a) se inhibe la lipogénesis (Rognstad y Katz, 1969); nosotros pensamos que esta inhibición se debe a la disminución general en la célula de coenzimas reducidos (NADH, FADH, etc), tan necesarios en la lipogénesis, que están siendo captados por el dinitrofenol; b) a causa de la acción del dinitrofenol sobre la velocidad metabólica las reservas adiposas se consumen al ser el carburante mayoritario en condiciones de metabolismo acelerado (Tainter y col., 1935; Shils y Goldwater, 1953).

La succinato-deshidrogenasa se activa por el 2,4-dinitrofenol (Hatefi y Stiggall, 1976).

El 2,4-dinitrofenol, como otros inhibidores mitocondriales, aumenta la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular de la rana. Moffatt y Miyamoto (1988) estudiaron el efecto del bloqueo de canales de sodio y calcio en el aumento de la liberación espontánea de neurotransmisor por el dinitrofenol y concluyeron que parecía deberse principalmente a efectos sobre el uniporte de calcio y no sobre el $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ antiporte.

*** EFECTOS BENEFICIOSOS**

Como herbicida y para control de ácaros y áfidos (Haddad, 1990), pero no como medicamento.

*** EFECTOS ADVERSOS**

La principal vía de intoxicación es a través de piel intacta, llegando a producirse intoxicaciones letales como resultado de contaminación dérmica (Morgan, 1989).

El dinitrofenol es altamente tóxico y puede ocasionar la muerte rápidamente. Los pacientes tienen fiebre, sed, taquicardia y distrés respiratorio, consecuencia del aumento en el metabolismo de las células corporales. Como la función normal cardiorespiratoria no puede mantenerse con la demanda metabólica, se origina rápidamente anoxia y acidosis metabólica. Coma, convulsiones, edema pulmonar e hiperpirexia severa son síntomas preterminales. También produce metahemoglobinemia (Haddad, 1990).

Casi todos estos efectos tóxicos son consecuencia del mecanismo de acción tóxica del dinitrofenol: la exposición al producto aumenta marcadamente el proceso oxidativo celular, estimula el metabolismo en todas las células ocasionando un incremento en el consumo de oxígeno, en la temperatura corporal, y la frecuencia respiratoria y cardíaca; interfiere la

síntesis de ésteres fosfatos ricos en energía. La anoxia y acidosis se desarrolla porque: la circulación y respiración no se aceleran en proporción a la demanda metabólica (Hayes, 1982); se inhibe la oxidación del lactato (Hayes, 1982); y se aumenta la permeabilidad mitocondrial a iones hidrógeno por la interrupción de la conversión de ADP a ATP (EPA, 1985). Por oxidación de la hemoglobina produce metahemoglobina.

* DOSIS TOXICAS

La dosis letal en adultos es de 1 a 3 gramos vía oral. Tres gramos es una cantidad letal aunque se ingiera repartida en varias tomas en un período de 5 días (MacBryde y Taussig, 1935; Dreisbach, 1983).

- Inhalatoria:	Perro	$CL_m = 300 \text{ mg/m}^3/30M$
- Intramuscular:	Pichón	$DL_{50} = 6500 \text{ } \mu\text{g/Kg}$
- Intraperitoneal:	Cobayo	$DL_{50} = 28 \text{ mg/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 26 \text{ mg/Kg}$
	Rata	$DL_{50} = 20 \text{ mg/Kg}$
- Intravenosa:	Perro	$DL_m = 15 \text{ mg/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 56 \text{ mg/Kg}$
	Rata	$DL_{50} = 72 \text{ mg/Kg}$
- Oral:	Pájaro	$DL_{50} = 13 \text{ mg/Kg}$
	Gato	$DL_{50} = 75 \text{ mg/Kg}$
	Perro	$DL_{50} = 30 \text{ mg/Kg}$
	Cobayo	$DL_{50} = 81 \text{ mg/Kg}$
	Humano	$DT_m = 36 \text{ mg/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 45 \text{ mg/Kg}$
	Rata	$DL_{50} = 30 \text{ mg/Kg}$
	Conejo	$DT_{50} = 30 \text{ mg/Kg}$

- Subcutánea:	Perro	$DL_m = 20 \text{ mg/Kg}$
	Cobayo	$DL_m = 25 \text{ mg/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 58 \text{ mg/Kg}$
	Rata	$DL_{50} = 25 \text{ mg/Kg}$
	Conejo	$DL_m = 20 \text{ mg/Kg}$
- Dérmica:	Cobayo	$DL_m = 700 \text{ mg/Kg}$

4.- ACIDO IODOACETICO

4.1.- Historia. Usos y aplicaciones

El ácido iodoacético es muy reactivo con los grupos -SH, pudiendo unirse a los grupos sulfhidrilos de las enzimas, disminuyendo así su actividad (Bloxham y Lardy, 1973).

Se usa como herramienta neuroquímica en investigación.

4.2.- Propiedades fisicoquímicas

El ácido iodoacético o ácido monoiodoacético, tiene un peso molecular de 185.96; CAS-64-69-7; RTECS: AI 3500000; EINECS: 200-590-1 (Lenga y Votoupal, 1993). Su fórmula empírica es $C_2H_3IO_2$ y desarrollada $CH_2I-COOH$. Se prepara tratando con NaI una disolución de ácido cloroacético en acetona. Se presenta en forma de cristales blancos o sin color, solubles en agua y álcalis, y muy poco solubles en éter (Budavari, 1989). Su punto de fusión es de $77-79^\circ\text{C}$ (Lenga y Votoupal, 1993).

4.3.- Farmaco-toxicocinética

No se ha encontrado bibliografía al respecto.

4.4.- Farmaco-toxicodinamia

* ACCIONES

La acción principal del ácido iodoacético es unirse a los grupos -SH de las enzimas, principalmente de la gliceraldehido- 3-P-deshidrogenasa, produciendo así una interrupción de la glucólisis. El efecto de este compuesto sobre otras enzimas glucolíticas es relativamente insignificante, ya que el bloqueo es reversible añadiendo piruvato o lactato (Ochs y Smith, 1971; Brodie y Reed, 1990).

El tejido nervioso es peculiarmente dependiente de glucosa como fuente de ATP. A su vez, el transporte rápido axonal depende del ATP generado en la vía glucolítica. Ochs y Smith, en 1971, demostraron que en nervio ciático de gato *in vitro*, el ácido iodoacético bloquea gradualmente dicho transporte hasta producir el bloqueo completo a las 2 horas. Esto difiere de la rápida interrupción del transporte rápido axonal producida por el efecto del NaCN o del dinitrofenol. Por este motivo algunos autores lo consideran un agente específicamente neurotóxico (Sabri y Spencer, 1981; Ochs y Smith, 1971).

Los tres inhibidores metabólicos citados (CN⁻, iodoacetato y 2,4-dinitrofenol) causan en músculo aislado de ratón *in vitro* (McCall y Duncan, 1989) la liberación de creatinquinasa (CK) y un daño ultraestructural severo. La liberación de CK se activa por un aumento en la concentración intracelular de calcio, que a su vez es el responsable del rápido daño celular que se produce.

El iodoacetato se une además a los grupos -SH de la miosina cambiando la sensibilidad de ésta al Ca⁺² y produciendo un daño rápido de los miofilamentos del músculo esquelético de anfibios (Duncan, 1989).

En hígado de rata, el iodoacetato sódico (2 ml/Kg, ip) produce un aumento del doble

al triple de la concentración de metalotioneina hepática. Administrado conjuntamente con cicloheximida este aumento no se produce, indicando que el aumento observado con el iodoacetato sódico sólo es debido a un incremento de la síntesis de la metalotioneina (Kotsonis y Klaassen, 1979).

En los islotes de Langerhans de sapo *in vitro*, el ácido iodoacético aumenta la permeabilidad a la H³-inulina, que normalmente se encuentra estrictamente en el espacio extracelular. Incubaciones con D-glucosa previas al tratamiento con iodoacetato de los islotes, concretamente el anómero α , tienen efecto protector. Por tanto se piensa que el ácido iodoacético aumenta la permeabilidad de los islotes tras reaccionar con los grupos -SH localizados cerca del sitio de unión de un azúcar en la cara β de la membrana celular (Cooperstein y Watkins, 1978).

*** EFECTOS BENEFICIOSOS**

No se conocen.

*** EFECTOS ADVERSOS**

El KCN y el iodoacetato producen una disminución del contenido en ATP en cultivos de hepatocitos que origina la formación de ampollas en la membrana celular (Nieminen y col., 1988). Otros autores han propuesto que la formación de estas ampollas es debida a un aumento en la concentración intracelular de calcio (Schanne y col., 1979; Bellomo y Orrenius, 1985). De cualquier forma, es importante tener en cuenta que ambos procesos se relacionan, ya que el ATP es necesario para la bomba de Ca⁺² (McCall y Duncan, 1989).

El ácido iodoacético produce ocasionalmente alteraciones en el contenido sanguíneo de colesterol libre o esterificado junto con cambios en otros parámetros lipídicos (Bruin, 1976).

* DOSIS TOXICAS

- Inhalatoria:	Rata	CL _m = 94 mg/m ³ /30M
- Intraperitoneal:	Rata	DL ₅₀ = 75 mg/Kg
- Intravenosa:	Perro	DL ₅₀ = 45 mg/Kg
- Subcutánea:	Rata	DL ₅₀ = 60 mg/Kg
	Conejo	DL _m = 60 mg/Kg

5.- ACIDO KAINICO

5.1.- Historia. Usos y aplicaciones

Hace ya unos 40 años desde que Hayashi (1954) informó de los efectos convulsivantes del ácido L-glutámico, y más de 30 años desde que Curtis y col. (1960) mostraron que el ácido glutámico era capaz de despolarizar neuronas individuales del SNC en mamíferos. Desde entonces se ha realizado una amplia serie de estudios electrofisiológicos, bioquímicos, farmacológicos y anatómicos usando aminoácidos excitadores. Estos estudios y en particular los que han utilizado varios agonistas y antagonistas de la neurotransmisión excitatoria, han indicado que al menos 4 sistemas de receptores pueden mediar la acción de los aminoácidos excitadores. Tres de estos receptores, el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor del quisqualato y el receptor del ácido kaínico, se llamaron así por sus agonistas ácido N-metil-D-aspartico, ácido quisquálico, y ácido α -kaínico respectivamente. El cuarto, el receptor AP4, se nombró así por un potente antagonista de las vías excitadoras específicas del SNC, llamado ácido 2-amino-4-fosfobutanoico (Johnson y Koerner, 1988).

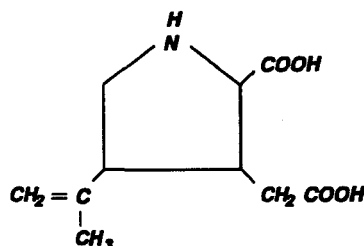
El ácido kaínico es un potente análogo estructural cíclico del glutamato con acción también excitatoria en el SNC (Atterwill, 1987), pero tiene una potencia tóxica 500 veces mayor (Olney, 1981). Fue originalmente aislado del alga de mar *Diginea simplex*.

La cadena lateral insaturada isopropiliden del ácido kaínico parece esencial para su elevada actividad ya que el ácido hidrokaínico tiene menor actividad agonista que el producto considerado el agonista más débil del ácido glutámico (Johnson y Koerner, 1988).

Se usa en veterinaria como antihelmíntico en infecciones por *Ascaris*, en dosis únicas de 5 a 20 mg (Reynolds, 1982). También se ha utilizado para potenciar los efectos de la santonina (Reynolds, 1982), aunque su uso más frecuente es como herramienta neurobiológica (Budavari, 1989).

5.2.- Propiedades fisicoquímicas

El ácido kaínico tiene la fórmula desarrollada siguiente:



Puede recibir también otros nombres como ácido α -kaínico y ácido digénico. Químicamente es el ácido 2-carboxi-4-(1-metileténil)-3-pirrolidinacético. Tiene un peso molecular de 213.2 y de fórmula empírica $C_{10}H_{15}NO_4$ (Budavari, 1989). CAS-487-79-6; RTECS: UX 9665250 (Reynolds, 1982). Su punto de fusión es de 250-252°C (Lenga y Votoupal, 1993).

Se presenta en forma de cristales blancos o polvo cristalino inodoros. Soluble en agua, poco soluble en alcohol y ácido acético glacial. Prácticamente insoluble en cloroformo. Soluble en ácido clorhídrico diluido y en soluciones básicas hidroxídicas. Debe almacenarse en contenedores que impidan el contacto con el aire (Reynolds, 1982).

5.3.- Farmaco-toxicocinética

No se han encontrado en la bibliografía consultada referencias sobre la cinética de este compuesto.

5.4.- Farmaco-toxicodinamia

*** ORGANO DIANA**

Sistema nervioso central.

*** ACCIONES**

Al ser el ácido kaínico un análogo conformacional del glutamato, se considera como una excitotoxina por sus potentes propiedades neuroexcitadoras y neurotóxicas.

Recientemente se ha postulado que el efecto neurotóxico de estos aminoácidos sea la causa de la vulnerabilidad selectiva que sufre el cerebro tras agresiones como isquemia, ataque epiléptico e hipoglucemia. De hecho se ha demostrado que los excitotóxicos, cuando se aplican sobre el sistema nervioso central de mamíferos, causan lesiones selectivas tipo dendrotóxico. El mecanismo molecular preciso de este daño selectivo a las neuronas es incierto (Kobayashi y col., 1990). Sin embargo, varios autores han intentado profundizar al respecto.

Así Leong (1991) estudió los efectos del kainato en dos enzimas del metabolismo de la glucosa en cerebro de rata: la hexoquinasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Como el cerebro es un consumidor obligado de glucosa, por ser la fuente casi exclusiva de energía, estas enzimas son muy estables y no suelen modificar significativamente su actividad cuando

se daña este tejido. Sin embargo, Leong muestra en su estudio cómo una inyección intraventricular de ácido kaínico causa un descenso en la actividad hexoquinasa en la mayoría de las regiones cerebrales, y en particular de la hexoquinasa citosólica soluble, responsable de la glucólisis, aunque la hexoquinasa cerebral está predominantemente unida a mitocondrias. No se observó reducción de la actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Esto sugiere que tras la inyección de ácido kaínico, el uso de glucosa no disminuye drásticamente, ya que la actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa permanece inalterada y la actividad medible de hexoquinasa está reducida, pero dentro de límites fisiológicos.

A pesar de que se ha visto que el ácido kaínico causa degeneración neuronal tanto en el sitio de inyección como en áreas distantes de éste, no es posible medir la pérdida de actividad hexoquinasa debida a este proceso degenerativo.

Kobayashi y col. (1990) estudiaron los cambios agudos del pH tisular y del contenido en ATP en varias regiones del cerebro de rata tratadas con ácido kaínico. La distribución regional de la acidosis está de acuerdo con el aumento del consumo de glucosa en cerebro tras la administración de kaínico. Sin embargo, la administración de kaínico provoca sólo un aumento modesto en los niveles de lactato cerebral. El descenso en ATP tras la acidosis está originado por tres posibles mecanismos: primero, porque el aumento en la actividad neuronal origina un incremento en el consumo de ATP que excede a su biosíntesis; segundo, por una excesiva entrada de calcio a la célula inducida por descargas neuronales tipo epiléptico, y/o perturbación de la actividad respiratoria mitocondrial productora de energía; tercero, porque la acidosis inhibe directamente el proceso metabólico; generalmente se asume que la excesiva acidosis láctica perturba severamente la restauración del metabolismo neuronal y que los valores de pH bajos afectan de forma adversa la actividad de mitocondrias cerebrales aisladas.

Murphy y Miller (1989), investigaron los mecanismos por los cuales el ácido kaínico produce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{++} en neuronas *in vitro*. Demostraron que este aumento podría ser consecuencia de al menos dos procesos. Por una parte, se activaría la entrada de Ca^{++} a través de canales de calcio dependientes de voltaje (VSCC) y por otra parte, el Ca^{++} podría entrar por ionóforos activados por el propio kaínico.

De hecho se ha demostrado que el receptor del kainato incorpora un canal iónico dentro del receptor, que puede poseer centros intracelulares de fosforilación regulados por proteinquinasas y fosfatasas (MacDonald y Nowak, 1990). El cambio en la homeostasis de Ca^{++} puede ser también resultado de una entrada de Na^+ en la célula (Murphy y Miller, 1989).

MacVicar y col. (1988) despolarizaron cultivos de astrocitos *in vitro* con aminoácidos excitatorios y demostraron que la despolarización inducida por el ácido kaínico también causa una salida de iones K^+ .

Bisso y col. (1988) estudiaron los cambios en la distribución de las formas moleculares de la AChE en el cortex frontoparietal de la rata tras producir lesiones en el núcleo basal con ácido kaínico. Concluyeron que la forma tetramérica G_4 se enriquece en las terminales nerviosas presinápticas.

Van der Valk y Vijverberg (1990) examinaron las respuestas electrofisiológicas inducidas por el glutamato en ocho líneas celulares de neuroblastoma con la técnica de pinzamiento de membrana. Sólo las células Neuro-2a diferenciadas responden a la perfusión con glutamato, con una corriente hacia dentro reversible y dependiente de la concentración. La perfusión con los análogos ácido kaínico, ácido quisquálico y ácido N-metil-D-aspartico también evocan corrientes hacia dentro pero de menor amplitud. Por lo tanto las células Neuro-2a son un buen modelo *in vitro* para estudiar las propiedades funcionales de los receptores de glutamato asociados a canales iónicos.

Las observaciones hechas por Murphy y Miller (1989) y Coyle (1983) respecto a los mecanismos que conllevan la neurotoxicidad inducida por el ácido kaínico son muy interesantes. Gran parte de la neurotoxicidad del kaínico observada *in vivo* parece mediada por sus efectos presinápticos. De este modo la activación de los receptores del ácido kaínico en las terminales nerviosas pueden conducir a la liberación de glutamato, activación de los receptores del NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) y si la entrada de Ca^{++} en la célula es

bastante grande, se produce la toxicidad celular.

La toxicidad del ácido kaínico es consecuencia de sus acciones farmacológicas. A altas concentraciones sus efectos son más pronunciados y menos específicos en las células. Así, por ejemplo, en exposiciones prolongadas se produce una marcada reducción de la acetilcolintransferasa (ChAT) y AChE (Atterwill, 1987).

*** EFECTOS BENEFICIOSOS**

El ácido kaínico causa un aumento de las frecuencias neuronales. La acción neuroexcitante del ácido kaínico lleva a la idea de que puede usarse en la detección de circuitos neuronales en los que el ácido glutámico es el neurotransmisor natural (Cremer, 1981).

*** EFECTOS ADVERSOS**

En animales, una inyección de pequeñas cantidades de ácido kaínico en un área específica del cerebro produce en una degeneración selectiva de los cuerpos neuronales de esa zona (Damstra y Bondy, 1982). Tras una inyección intravenosa del ácido (12 mg/Kg) se produce: 1) mirada fija, 2) temblores húmedos, 3) convulsiones, que duran de 12-18 horas antes de disminuir o de hacerse menos violentas, y 4) un último estado en el cual los animales están severamente dañados y la mayoría no come ni bebe (Cremer, 1981).

*** DOSIS TOXICAS**

No se han encontrado en la bibliografía revisada.

6.- OUABAINA

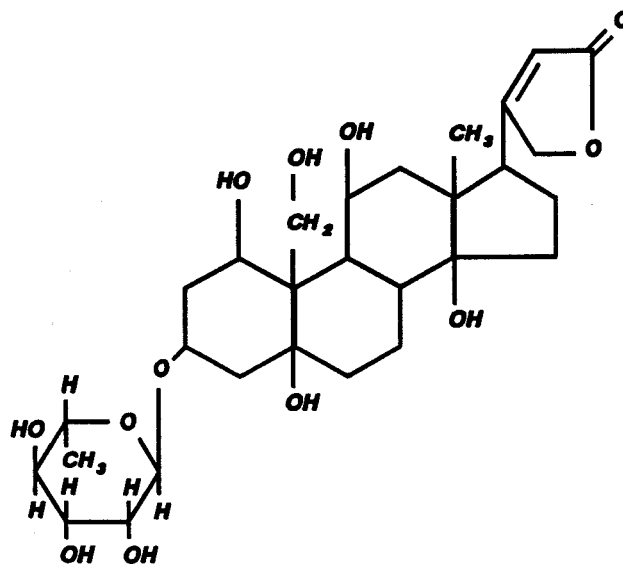
6.1.- Historia. Usos y aplicaciones

La ouabaína es un glucósido cardiotónico que se obtiene de las semillas de *Strofanthus gratus* o de la madera de *Acokanthera schimperi* o de *A. ouabaio*.

Se usa en terapia cardiotónica cuando se requiere un beneficio rápido, especialmente en fallo cardiaco congestivo agudo.

6.2.- Propiedades fisicoquímicas

La fórmula desarrollada de la ouabaína es (Budavari, 1989):



La ouabaína también recibe otros nombres como G-estrofantina y estrofantóxido-G; su denominación química es 3-[(6-deoxi- α -L-manopiranosil)]-1,5,11 α ,14,19-pentahidroxycard-20(22)-enólido. De fórmula empírica $C_{29}H_{44}O_{12}$ y de peso molecular 584.64 . CAS-630-60-4; RTECS: RN 3675000 (Reynolds, 1982).

Se presenta en forma de cristales incoloros e inodoros o como polvo blanco cristalino con sabor amargo (Reynolds, 1982). Un gramo de ouabaína se disuelve en 75 ml de agua lentamente, en 5 ml de agua hirviendo, 100 ml de alcohol y 8 ml de alcohol hirviendo. También es soluble en alcohol isoamílico y dioxano, pero es poco soluble en éter, cloroformo y etilacetato (Budavari, 1989). Su punto de fusión es de 260°C (Lenga y Votoupal, 1993).

Es estable al aire, pero se afecta por la luz (Budavari, 1989).

6.3.- Farmaco-toxicocinética

*** ABSORCION**

La absorción de la ouabaína por el tracto gastrointestinal es impredecible (Reynolds, 1982), lo que reduce su uso a la administración intravenosa.

*** DISTRIBUCION**

En sangre, las concentraciones séricas y plasmáticas de ouabaína son equivalentes (Reynolds, 1982). Sólo se dispone de datos de distribución de la ouabaína en otros tejidos en fetos, donde la concentración de H³-ouabaína encontrada en líquido amniótico es más baja que la correspondiente en plasma fetal o materno. La distribución de la ouabaína en los tejidos fetales es relativamente uniforme, encontrándose las concentraciones más altas en corazón y placenta, y las más bajas en cerebro (Saarikoski, 1980).

*** ELIMINACION**

La vida media plasmática de la ouabaína puede ir desde 5.5 hasta 22 horas, aunque en general se considera que es de 19 a 24 horas. En adultos, tras una sola dosis intravenosa,

el 26 % se elimina en orina en 18 horas y el 47 % en 5 a 6 días. El 23.4 % se elimina en heces en 3 días (márgenes de 13.5 a 31.3 %) y el 32.9 % en 6 días (márgenes de 21.2 a 39.9 %) (Reynolds, 1982).

*** TRANSFERENCIA PLACENTARIA**

Saarikoski (1980) estudió la transferencia placentaria de la H³-ouabaína en ocho mujeres embarazadas a las que se iba a realizar un aborto terapéutico. Tras administrar 5 μ Ci/10 Kg de peso materno, la H³-ouabaína desaparece rápidamente del torrente sanguíneo materno, observándose actividad H³ en la sangre umbilical del feto dos minutos después de la administración de la H³-ouabaína en la sangre materna. Los valores fetales plasmáticos de H³ son más bajos que los maternos en el intervalo de 2 a 120 minutos tras la inyección, igualándose ambas concentraciones plasmáticas de H³ a las cinco horas de la administración.

6.4.- Farmaco-toxicodinamia

*** ORGANO DIANA**

Corazón

*** ACCIONES**

El uso experimental de la ouabaína está muy relacionado con su capacidad de producir hinchazones edematosas de las dendritas neuronales aunque no en el pericarion ni en los axones neuronales. Cuando la ouabaína se inyecta directamente en cerebro, en los astrocitos se produce hinchamiento del cuerpo celular y de los pies vasculares, de forma que las neuronas se rodean de terminaciones nerviosas presinápticas hinchadas. Sin embargo, no se produce hinchamiento en las células de la oligodendroglía. El hinchamiento selectivo de los astrocitos y las terminaciones presinápticas neuronales parece debida a la inhibición de la

adenosina-trifosfatasa de membrana; esta enzima está muy concentrada en las terminaciones nerviosas colinérgicas y astrocitos, los cuales contienen concentraciones de sodio relativamente altas (Powell y col., 1981). Puesto que como ya se ha visto en el apartado 6.3 de "indicadores de toxicidad", el lugar de unión de la ATPasa Na^+/K^+ a la ouabaína están localizados en la superficie extracelular de la membrana, los esteroides cardiotónicos inhiben la bomba y la ATPasa solamente cuando están situados en el exterior de la célula (Stryer, 1990). La inhibición de la enzima por la ouabaína altera el equilibrio osmótico de la célula, ya que la entrada de iones Na^+ y Cl^- incrementa la presión osmótica tanto que la célula puede incluso estallar (Rawn, 1989).

En algunas células, la ATPasa utiliza una gran parte de la energía procedente de la respiración; así por ejemplo, se ha visto que la ouabaína inhibe la respiración de las células renales o cerebrales hasta un 70 % (Lehninger, 1989). Por incubación de rodajas de cerebro cortical con ouabaína a concentraciones de 100 μM , se inhibe casi un 40 % la velocidad respiratoria y la hidrólisis de ATP sin afectación de la fosforilación proteica (Ribeiro y col., 1989).

En resumen, la acción principal de la ouabaína es interferir con los mecanismos de transporte de Na^+ y K^+ que dependen de energía.

Por otra parte, la ouabaína provoca *in vitro* en la fracción cruda de sinaptosomas, un incremento en la liberación de acetilcolina (ACh) a concentraciones bajas (10 μM) que no afectan a los procesos de membrana dependientes de ATP, ni a la respiración celular (Prado y col., 1990; Ribeiro y col., 1989; Ribeiro y Gómez, 1986).

*** EFECTOS BENEFICIOSOS**

La ouabaína es un glucósido cardiotónico con acciones parecidas a las de la digitoxina. Produce su efecto a los 5 - 10 minutos tras una inyección intravenosa y desarrolla su acción completa sobre el corazón tras $\frac{1}{2}$ a 2 horas, persistiendo el efecto de 1 a 3 días.

*** EFECTOS ADVERSOS**

Como ocurre con otros glucósidos cardiotónicos, en sobredosis aguda el daño se ejerce sobre la bomba sodio-potasio, produciéndose una disminución del potasio intracelular y un aumento en el extracelular. El potencial normal de membrana se reduce, y se enlentece la conducción eléctrica, con pérdida completa eventual de la función eléctrica del miocardio. Clínicamente esto resulta en un alto grado de bloqueo cardíaco.

Se ha descrito un caso en el que a un hombre de 57 años con fallo congestivo cardíaco crónico se le administraron 750 μg de ouabaína intravenosamente durante 3 minutos. Tras 23 minutos el paciente rápidamente llegó a estar afásico y se le observó hemiparesis izquierda. La presión arterial alcanzó 255/145 mm de Hg en 1 hora y disminuyó en las 10 horas siguientes. El paciente murió a las 34 horas de la administración (Reynolds, 1982).

La ouabaína, a dosis bajas puede producir pérdidas temporales de la memoria (Reynolds, 1982).

*** DOSIS TERAPEUTICAS**

La ouabaína se administra en inyección intravenosa lenta de 250 - 500 μg ; posteriormente pueden darse inyecciones de 100 μg cada hora, mientras sea necesario, hasta un total de 1 mg en 24 horas. Alternativamente, la digitalización puede continuarse con digoxina por vía oral (Reynolds, 1982).

*** DOSIS TOXICAS**

- | | | |
|------------------|--------|-------------------------------|
| - Intraarterial: | Cobayo | $DL_m = 40 \mu\text{g/Kg}$ |
| - Intracerebral: | Ratón | $DL_{50} = 69 \mu\text{g/Kg}$ |

- Intraduodenal:	Gato	$DL_m = 820 \mu\text{g/Kg}$
	Cobayo	$DL_{95} = 3340 \mu\text{g/Kg}$
- Intramuscular:	Cobayo	$DL_m = 220 \mu\text{g/Kg}$
	Pichón	$DL_m = 330 \mu\text{g/Kg}$
	Conejo	$DL_m = 1 \text{ mg/Kg}$
- Intraperitoneal:	Gato	$DL_{50} = 100 \mu\text{g/Kg}$
	Cobayo	$DL_{50} = 210 \mu\text{g/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 11 \text{ mg/Kg}$
- Intravenosa:	Gato	$DL_{50} = 100 \mu\text{g/Kg}$
	Perro	$DL_m = 54 \mu\text{g/Kg}$
	Rana	$DL_{50} = 250 \mu\text{g/Kg}$
	Cobayo	$DL_{50} = 228 \mu\text{g/Kg}$
	Mono	$DL_m = 102 \mu\text{g/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 2200 \mu\text{g/Kg}$
	Pichón	$DL_m = 183 \mu\text{g/Kg}$
	Rata	$DL_{50} = 14 \text{ mg/Kg}$
	Conejo	$DL_{50} = 252 \mu\text{g/Kg}$
- Oral:	Gato	$DL_m = 5 \text{ mg/Kg}$
	Perro	$DL_m = 1500 \mu\text{g/Kg}$
	Cobayo	$DL_{50} = 8280 \mu\text{g/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 5 \text{ mg/Kg}$
	Pichón	$DL_m = 14 \text{ mg/Kg}$
	Conejo	$DL_m = 7 \text{ mg/Kg}$
- Parenteral:	Rana	$DL_{50} = 370 \mu\text{g/Kg}$
- Subcutánea:	Gato	$DL_m = 150 \mu\text{g/Kg}$
	Perro	$DL_m = 100 \mu\text{g/Kg}$
	Rana	$DL_m = 400 \mu\text{g/Kg}$
	Cobayo	$DL_m = 100 \mu\text{g/Kg}$
	Ratón	$DL_{50} = 5 \text{ mg/Kg}$
	Rata	$DL_m = 50 \text{ mg/Kg}$
	Conejo	$DL_m = 100 \mu\text{g/Kg}$

HIPOTESIS DE TRABAJO

Una vez considerada la situación actual, desarrollada en las bases del conocimiento, y conociendo el gran interés social, ético, científico y económico actual por los métodos alternativos al uso de animales en experimentación toxicológica, nos encontramos en situación de poder plantearnos las siguientes hipótesis:

- 1.- ¿Podríamos diseñar y desarrollar un modelo experimental *in vitro*, con cultivos de células de origen neuronal, capaz de detectar y predecir la capacidad cito y neurotóxica de los compuestos químicos, mediante una batería de indicadores bioquímicos?

- 2.- ¿Permitiría el citado modelo profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción celular responsables de los efectos tóxicos de tales compuestos?

OBJETIVOS

A partir de las hipótesis expuestas nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1.- Desarrollar un sistema biológico alternativo a los ensayos de toxicidad con animales, que sea representativo de la toxicidad real de los compuestos químicos en humanos.
- 2.- Estudiar las posibilidades del modelo para detectar alteraciones neuroespecíficas.
- 3.- Comprobar la capacidad del modelo experimental, para investigar los mecanismos de acción de los compuestos químicos a nivel celular.
- 4.- Contribuir al conocimiento de la acción cito y neurotóxica de los compuestos ensayados.

PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo el estudio desarrollado en la presente memoria, se estableció un plan de trabajo que consta de las siguientes fases:

- 1.- Amplia revisión y estudio bibliográfico para diseñar y desarrollar el modelo experimental a utilizar.
- 2.- Puesta a punto:
 - 2.1.- Del procedimiento de cultivo, realizando la selección de las condiciones de ensayo (período de exposición, densidad celular, concentraciones de las sustancias químicas a ensayar).
 - 2.2.- De los métodos empleados para la determinación de los efectos cito y neurotóxicos. Adaptación de métodos de determinación de actividades enzimáticas al sistema *in vitro* utilizado.
- 3.- Ensayos de comprobación del funcionamiento del modelo.
- 4.- Estudio sistemático con 5 concentraciones [0 (control), 0.1, 1, 10 y 100 mg/l] de cada uno de los compuestos químicos seleccionados.
- 5.- Elaboración de resultados y su valoración estadística para investigar las alteraciones bioquímicas producidas y explicar los mecanismos de acción tóxica de los compuestos.
- 6.- Discusión y conclusiones.

PARTE EXPERIMENTAL

I.- MATERIAL

A continuación se relaciona el material empleado en la realización del presente trabajo de investigación:

1.- LINEA CELULAR ESTABLECIDA

Clon Neuro-2a (ATCC n° CCL 131) suministrado por la firma Flow en el pase n° 183.

2.- MEDIOS DE CULTIVOS Y SUERO

- Medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle, Flow (Irvine, UK).
- Medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle sin rojo fenol, Flow (Irvine, UK).
- Suero bovino fetal con exclusión de la presencia de micoplasma, Flow (Irvine, UK).

3.- PRODUCTOS QUIMICOS Y REACTIVOS

- Acético glacial, ácido, p.a., Merck.
- Adenosina- 5'-difosfato (ADP), Boehringer Mannheim.
- Adenosina- 5'-trifosfato (ATP), Sigma.
- Albúmina sérica bovina, Sigma.

- Aldolasa, Boehringer Mannheim.
- Azida sódica, Merck.
- Azul tripán, p.m., Merck.
- Bicarbonato sódico, p.a., Merck.
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio, Sigma.
- Citrato trisódico, p.a., Merck.
- Clorhídrico, ácido, p.a., Merck.
- Cloruro de colina, Aldrich.
- Cloruro potásico, p.a., Merck.
- Cloruro sódico, p.a., Merck.
- Cicloheximida, p.a., Merck.
- Clorpromacina, p.a., Aldrich.
- Dinitroditiobenzoico, ácido, Merck.
- Dinitrofenol, p.a., Sigma.
- Ditiotreitól, Merck.
- EDTA, p.a., Merck.
- Etanol absoluto, Merck.
- Fosfato dipotásico, p.a., Merck.
- Fosfato disódico, p.a., Merck.
- Fosfato monopotásico, p.a., Merck.
- Fosfoenolpiruvato, sal monosódica, Sigma.
- Fosfoglicerato, sal sódica, Sigma.
- Fructosa- 6-fosfato, Boehringer Mannheim.
- Glicerol- 3-fosfato deshidrogenasa, Triosafosfato isomerasa (GDH-TIM), Boehringer Mannheim.
- Glicina, p.a., Merck.
- Hidróxido sódico, p.a., Merck.

- Imidazol, clorhidrato, Sigma.
- Iodoacético, ácido, p.a., Sigma.
- Isopropanol, p.a., Merck.
- Kaínico, ácido, p.a., Sigma.
- Lactatodeshidrogenasa, Boehringer Mannheim.
- L-Glutamina, Flow.
- Nicotinamida-adenina-dinucleotido reducido (NADH), Sigma.
- p-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido, Boehringer Mannheim.
- Ouabaína, p.a., Sigma.
- Penicilina y estreptomicina, Flow.
- Permanganato de potasio, p.a., Merck.
- Piruvatoquinasa, Sigma.
- Reactivo concentrado de Azul brillante de Coomassie, G-250. Bio-Rad Laboratories, Munchen, Alemania.
- Rojo neutro, p.m., Merck.
- Solución de tripsina 0.05 % - EDTA 0.02 %, Flow.
- Sulfato magnésico, Merck.
- Sulfato magnésico heptahidratado, Merck.
- Trietanolamina, Merck.
- Tris (hidroximetil)-aminometano, p.a., Merck.
- Tritón X-100, Sigma.
- Yoduro de acetiltiocolina, p.a., Merck.

4.- MATERIAL ESPECIFICO

- Frascos de cultivo de 24, 83 y 175 cm² de superficie, Nunc, Roskilde, Dinamarca.
- Placas de cultivo de 96 pocillos, Costar, Roskilde, Dinamarca.

- Placas de 96 pocillos para ELISA, Dynatech.
- Tubos de cultivo, Nunc.
- Cámaras cuentaglóbulos de Neubauer, Brand.
- Micropipetas automáticas, Finnpipette.
- Micropipetas automáticas de 8 canales, Finnpipette.
- Puntas desechables para micropipetas, Daslab.
- Pipeteador automático, Drummond.
- Pipetas graduadas, Brand.
- Papel de aluminio, Albal.

5.- INSTRUMENTOS

- Cabina de flujo laminar vertical, modelo CV-100, Telstar.
- Mechero Bunsen con pulsador, Walter Schumacher.
- Incubador para cultivo de tejidos equipado con procesador de gases, modelo 3192, Forma Scientific.
- Impulsor de aire estéril, FFU-340, Telstar.
- Microscopio óptico Labophot, Nikon.
- Microscopio invertido Diaphot TMD, Nikon.
- Equipo fotomicrográfico, Nikon.
- Fotómetro vertical para placas de 96 pocillos, Titertek Multiskan MCC-340, Flow.
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible, Uvikon 860, Kontron Instruments, equipado con sistema termostatzado y de cubetas múltiples para cinética, y plotter.
- pH-metro HI-8418, Hanna Instruments.
- Centrífuga refrigerada, 4K10, Sigma.
- Balanza analítica, AE-240, Mettler.
- Sistema de purificación y desionización de agua, Milli-RO y Milli-RQ, Millipore.

- Agitador magnético, Selecta.
- Agitador orbital, Atom-85, Atom.
- Agitador de tubos, Reax 2000, Heidolph.
- Baño termostático, Termotronic, Selecta.
- Estufa S-60, Selecta.
- Horno S-80, Selecta.
- Horno microondas, Sanyo.
- Baño de ultrasonidos, Ultrasons.
- Autoclave HA-30D, Hirayama.
- Contenedor de nitrógeno líquido, BT-40, L'air liquide.
- Refrigerador vertical, Vedereca.
- Congelador de -20°C, Ignis.
- Congelador de -80°C, Koxka.

6.- SOPORTE INFORMATICO

- Ordenador personal IBM PS/2 modelo 30/286, equipado con tarjeta de gráficos, monitor en color y coprocesador aritmético.
- Impresora Laseryet-IV, Hewlet Packard.
- Trazador gráfico, plotter SPL 430A, Sekonic.
- Sistema operativo MS DOS.
- Programa Tittersoft, Flow.
- Programa estadístico CSS: Statistica.
- Paquete integrado Symphony, Lotus dev.
- Programa de gráficos Harvard Graffics 2.3. y 3.0.
- Procesador de textos, Word Perfect 5.1.

II.-METODOS

1.- DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL.

El modelo experimental que proponemos, pretende evaluar *in vitro* la acción citotóxica y neurotóxica de compuestos químicos orgánicos. Para ello hemos seleccionado: (a) un sustrato biológico que consideramos adecuado, (b) una serie de compuestos de toxicidad conocida que incluya neurotóxicos y citotóxicos; y (c) unos indicadores de toxicidad general (citotoxicidad) y específica (neurotoxicidad).

1.1.- SUSTRATO BIOLOGICO

1.1.1.- Línea celular.

El clon celular Neuro-2a fue suministrado por una firma de absoluta garantía (FLOW) en cultivo en monocapa en el pase nº 183.

*** CONSERVACION:**

El clon celular se subcultiva y congela alicuotado en criotubos a -196 °C en un contenedor de nitrógeno líquido utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% como agente crioprotector.

La línea celular Neuro-2a se conserva congelada o se mantiene en cultivo hasta obtener un número de células suficiente y en perfectas condiciones de viabilidad para su uso.

*** DESCONGELACION Y CULTIVO:**

Para su uso se procede a la descongelación de dichas alícuotas. En condiciones de esterilidad, se toma un vial, se descongela rápidamente agitando el criotubo en agua a 37 °C y se siembra en un frasco de cultivo con medio completo adecuado a la línea celular (véase el final de este apartado).

Las células se cultivan en oscuridad a 37°C y con un 100% de humedad en un incubador para cultivos celulares, dotado de procesador de gases para mantener una concentración constante de dióxido de carbono del 5% y el 95% de aire estéril.

*** SUBCULTIVO:**

A los 3-4 días desde el cultivo las células empiezan a confluir, disminuye su ritmo de multiplicación y se acumulan detritus, por lo que se hace necesario subcultivarlas.

Las células se liberan de las uniones intercelulares y se despegan de la superficie del frasco con tripsina (0.05 %) y etilendiaminotetraacético (EDTA, 0.02 %) en una disolución tampón de fosfato. Para ello, se trabaja en cabina de flujo laminar: se decanta el medio de cultivo y se lava la monocapa celular con PBS A (fosfato tamponado salino exento de calcio y magnesio), para eliminar los restos de suero que pudieran inactivar la tripsina. Tras despegar las células con tripsina, se suspenden en medio completo hasta obtener una suspensión celular homogénea, lo cual es especialmente difícil en este clon, por tender estas células a formar grumos.

Se toma una alícuota que se mezcla al 50 % con solución de azul tripán. Se espera dos minutos para dar tiempo a las células vivas a excluir el colorante. Después se carga la cámara cuentaglobos de Neubauer y se efectúa el recuento de las células (Bendford y Hubbard, 1987) y la estimación de su viabilidad (Phillips, 1973).

A continuación se diluye la suspensión celular con medio de cultivo para obtener 18×10^5 células viables por frasco de cultivo de 75 cm². Los frascos de cultivo se incuban a 37 °C. El proceso se repetirá cada 3-4 días cuando las células se encuentren al 70-90 % de confluencia.

*** MEDIO DE CULTIVO:**

Medio completo de cultivo, compuesto por:

- Medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle (EMEM) con aminoácidos no esenciales.
- Bicarbonato sódico 24 mM
- Suero bovino fetal 10%, no descomplementado.
- L-Glutamina 2mM
- Penicilina 100 u.i/ml
- Estreptomina 100 µg/ml

Este medio supone trabajar en condiciones de mínima protección microbiológica. Adicionando penicilina y estreptomina, se evita el uso de antibióticos más potentes que pudieran interferir en los ensayos, pero impedimos que una posible contaminación accidental se desarrolle rápidamente y modifique el metabolismo celular (Bendford y Hubbard, 1987).

*** REACTIVOS:**

- PBS A (Fosfato tamponado salino exento de calcio y magnesio)
- Tripsina 0.05 %-EDTA 0.02 %
- Solución de azul tripán 0.4%, cloruro sódico 0.8% y fosfato monopotásico 0.66%, pH 7.2
- Dimetilsulfóxido

1.1.2.- Soporte de ensayo.

*** PLACAS DE CULTIVO:**

Aunque es posible cultivar en suspensión las células Neuro-2a, su crecimiento, adheridas a una superficie formando una monocapa, nos facilita en gran medida su manipulación. Con el fin de obtener el mayor número posible de datos individuales con suficiente número de células y tener así resultados con mayor significación estadística, utilizamos como soporte de ensayo placas de cultivo de poliestireno de 96 pocillos dispuestos en 8 filas (A a H) por 12 columnas (1 a 12). Al tener igual estructura que las empleadas para ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), permiten su lectura en los fotómetros verticales diseñados para éstos, lo que nos faculta realizar determinaciones bioquímicas directamente sobre las células adheridas a las placas. Las placas empleadas tienen 0.32 cm² de superficie de cultivo en cada pocillo y un volumen máximo de 0.300 ml.

*** DISEÑO DE LA PLACA:**

Algunos laboratorios han demostrado que, en los pocillos periféricos de las placas de 96 pocillos, las células no crecen en la misma proporción que en los pocillos interiores. Como resultado, muchos laboratorios usan los pocillos periféricos sólo como blancos, a los que se añade medio de cultivo sin células (Invitox, 1990).

Para decidir qué pocillos deben considerarse como blancos, realizamos distintos tests "t" de Student a los datos procedentes de determinaciones de proteínas totales en placas incubadas tras sembrar todos sus pocillos.

- a) Pocillos exteriores: columnas 1 y 12, y filas A y H. Pocillos interiores: el resto. Aplicando el test "t" de Student vimos que la diferencia entre el valor medio de proteínas de los pocillos interiores y la de los exteriores, es significativa.
- b) Eliminación de columnas 1 y 12. Filas exteriores A y H, interiores el resto. Esta vez la diferencia de las medias de ambas situaciones no fue significativa.

Por lo tanto pudimos concluir que, efectivamente, en los pocillos de las columnas 1 y 12 de la placa, las células no crecen en la misma proporción que en el resto de los pocillos, por lo que son los causantes de la diferencia significativa encontrada en el caso "a". Decidimos no emplear las columnas 1 y 12, usando el resto de la placa para los ensayos, incluido el blanco.

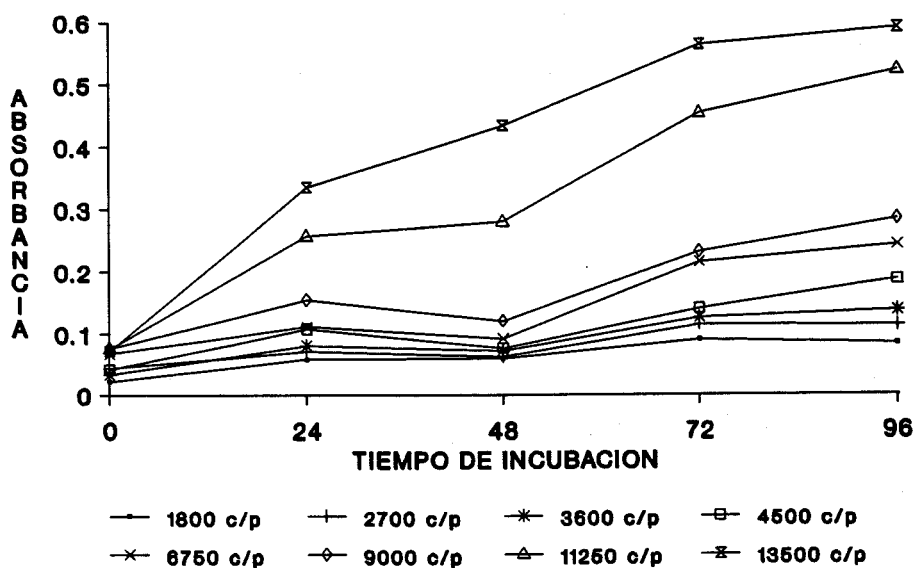
Teniendo en cuenta que el tamaño de la muestra tiene una influencia decisiva sobre la significación estadística de los resultados obtenidos, y siendo conveniente que ésta sea suficientemente grande, procedimos al diseño de la placa. Para ello utilizamos 16 pocillos ($n=16$) por cada concentración de ensayo y determinación, con la excepción de los controles ($n=8$) y blancos ($n=8$).

1.1.3.- Elección de la densidad del cultivo celular.

Las células deben sembrarse a la densidad adecuada en las placas de 96 pocillos y con antelación suficiente al ensayo para permitirles la adhesión a la superficie del pocillo, la adaptación al medio y la recuperación de la acción lesiva de la tripsina.

Se ha comprobado que el grado de afectación tóxica experimentado *in vitro* es dependiente de la densidad del cultivo celular (Bianchi y Fortunati, 1990). Ello se debe a que conforme las células van aumentando su grado de confluencia, disminuye el área celular expuesta al tóxico y con ello los efectos producidos por éste (Borenfreund y Puerner, 1986). Por lo tanto, es muy importante que durante el período de exposición las células no alcancen la confluencia.

Para decidir la densidad óptima según el tiempo de exposición al tóxico, se sembraron cinco placas iguales con distintas densidades celulares por columna en un cantidades de 0 a 14000 cél/pocillo. Se midió el contenido proteico total A 620 nm a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas, expresándose los resultados en la gráfica siguiente.



Seleccionamos las densidades celulares de 12000, 10000 y 8500 células/pocillo como las más adecuadas, según el período de incubación respectivo de 24, 48 y 72 horas de exposición al tóxico con 24 horas de aclimatación de las células.

1.1.4.- Siembra.

Tras subcultivar repetidamente, las células de neuroblastoma se siembran en placas de cultivo de 96 pocillos. Para ello se procesan las células de igual forma que para el subcultivo, pero ajustando la concentración de la suspensión a las células viables por ml adecuada. A continuación se vierten 200 μ l en cada pocillo de la placa de cultivo, obteniendo una densidad celular correspondiente en células/cm², y se incuba durante 17-24 horas como período de aclimatación. Hay que exceptuar la columna 2, a la que no se añade suspensión celular sino sólo medio de cultivo para utilizarla como blanco en las lecturas espectrofotométricas.

1.1.5.- Aclimatación y adhesión.

Si bien hemos comprobado que las células Neuro-2a se adhieren a la superficie de cultivo en un plazo de alrededor de 4 horas en cultivo, extendemos este período hasta 17-24 h. Con ello pretendemos dar más tiempo para la aclimatación a la nueva situación y la recuperación de la agresión química y física producida al pasar las células desde los frascos a las placas de cultivo. Además, con este período se alcanza el 70-90 % de confluencia entre las células, necesaria para la comunicación intercelular.

1.2.- EXPOSICION A LOS TOXICOS

En los ensayos con células cultivadas, la vía lógica de exposición es la disolución del compuesto de ensayo en el medio de cultivo.

Los compuestos ensayados son de toxicidad conocida, y se seleccionaron de modo que cada uno de ellos fuera modelo de lesión celular en distintos puntos de la célula.

1.2.1.- Concentraciones ensayadas.

*** FUNDAMENTO**

Para poder establecer con seguridad la relación existente entre la concentración de un tóxico y los efectos que produce, se aplican varias diluciones del mismo que han de cubrir los máximos márgenes posibles. Por ello, además de los controles, empleamos 4 concentraciones de ensayo, siendo la mayor de 100 mg/l, y separadas unas de otras por un factor de 10. Ello implica, que por cada compuesto y determinación ensayamos las siguientes concentraciones en el medio de cultivo: 0 (control), 0.1, 1, 10 y 100 mg/l.

*** REACTIVOS**

- Serie de 4 diluciones decimales del tóxico, de 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/ml de agua desionizada estéril. En el caso en que fue necesario utilizar un disolvente orgánico para conseguir disolver dicho compuesto, se empleó DMSO a la mínima concentración posible e igualándolo en todas las concentraciones de ensayo incluida la control.

- Serie de 4 disoluciones de ensayo en medio de cultivo, de 0.1, 1, 10 y 100 mg/l, obtenidas por dilución de la serie anterior.

*** PROCEDIMIENTO**

Simplemente aspiramos el medio y añadimos a cada pocillo 200 μ l de las disoluciones de ensayo recién preparadas en el medio habitual, incubando en atmósfera con un 5 % de CO₂ a 37 °C.

1.2.2.- Período de exposición a los tóxicos.

Se seleccionó un período de 24 h de exposición para todas las determinaciones, ampliándose a 48 y 72 h para rojo neutro y contenido proteico total para observar la evolución de las células expuestas a lo largo del tiempo. Las placas se incuban durante dichos períodos a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

1.3.- INDICADORES DE TOXICIDAD

1.3.1.- Puesta a punto. Modificaciones introducidas.

Los métodos analíticos utilizados para determinar cada indicador de toxicidad, fueron puestos a punto adaptando las condiciones de ensayo recogidas de la bibliografía, a determinación directa en la placa de cultivo. Se determinó posteriormente la linealidad de dichos métodos en el espectro de densidad celular seleccionado.

1.3.1.1.- CONTENIDO PROTEICO TOTAL

Tal como se indicó en el apartado 1.2. de los indicadores de toxicidad empleados, se seleccionó el método de Bradford para proteínas.

Aunque el método de Lowry y col. es uno de los más usados para la determinación de proteínas en los laboratorios de investigación, muchas sustancias interfieren en los resultados (Said-Fernández y col., 1990). Otros posibles métodos (Biuret, Kjeldahl, absorbancia a 280 nm, etc) presentan incluso mayores inconvenientes, como ser lentos y complicados sin evitar las posibles interferencias de otras sustancias químicas.

Sin embargo, el ensayo de proteínas basado en el colorante azul brillante de Coomassie G-250 (Bradford, 1976) es muy útil por su simplicidad, sensibilidad, velocidad y resistencia a posibles interferencias de compuestos químicos (Stoscheck, 1990). Está basado en el cambio de color del colorante azul de Coomassie según la concentración de proteína a la que se une mediante interacciones iónicas e hidrofóbicas (Stoscheck, 1990).

Es el ensayo recomendado como sustitutorio del método de Lowry por:

- a) Ser mucho más fácil de usar. Requiere un solo reactivo, comparado con los tres de Lowry.
- b) La absorbancia del complejo colorante-proteína es relativamente estable, no requiere el cronometraje de Lowry.
- c) Está libre de la mayoría de las interferencias por otros compuestos que limitan la aplicación del ensayo de Lowry.

El mayor problema de este ensayo es la variación en respuesta a diferentes proteínas. La adición de NaOH al reactivo de ensayo reduce dicha variación. Además, la sensibilidad del ensayo se aumenta (la sensibilidad es del orden del microgramo). La NaOH puede añadirse en un paso separado para solubilizar células o membranas, o añadirla directamente al reactivo (Stoscheck, 1990).

El efecto de la concentración de NaOH en el desarrollo del color es un factor importante a tener en cuenta. La linealidad del ensayo se ve afectada a altas concentraciones de proteínas, independientemente de la NaOH.

Sin embargo, los mejores valores de absorbancia y de linealidad (r) se tienen a concentraciones entre 0.05-0.1 N, que corresponden a pH 12.55 y 12.8 respectivamente.

El pH óptimo del ensayo es función de la concentración del colorante. El colorante azul G de Coomassie existe en tres estados: un estado azul aniónico que tiene la máxima absorción a 595 nm, un estado verde neutro de máximo a 650 nm, y un estado rojo catiónico que tiene su absorción máxima a 470 nm. El ajustar el pH facilita la conversión del colorante de la forma catiónica a las neutras y aniónicas.

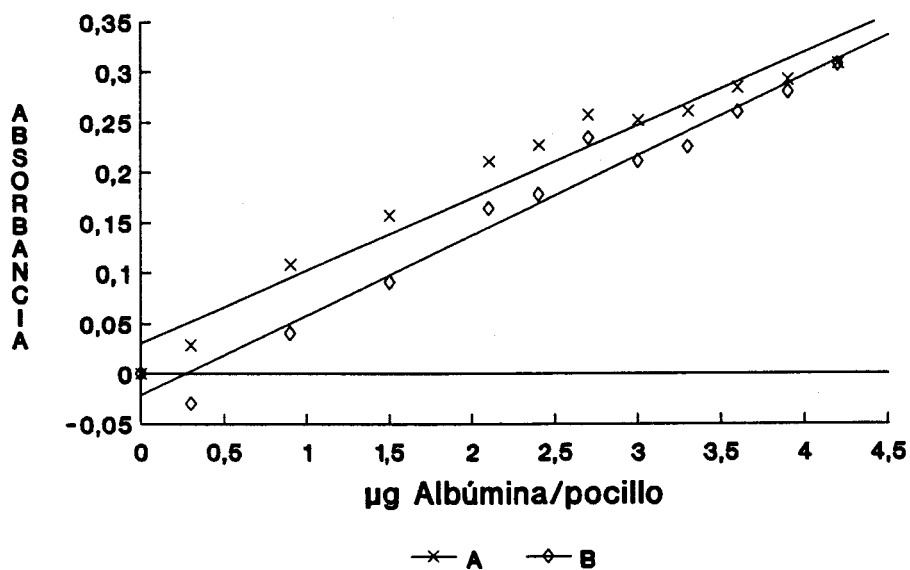
Aunque decidimos utilizar la adaptación de este método para placas de cultivo de 96 pocillos realizada por Knox y col (1986), encontramos discrepancias y modificaciones introducidas tanto en el mismo grupo de investigación (Stark y col, 1986; Babich y Borenfreund, 1987) como por otros (Festing y Eydmann, 1987).

Estudios previos en nuestro laboratorio habían comprobado la incidencia de tales variables (Repetto y Sanz, 1993) que afectaban al rango de patrones, volumen y tiempo de solubilización, concentración del reactivo y longitudes de onda de lectura y referencia; se verificó que para solubilizar el contenido proteico total de las células no era suficiente con añadir 50 μ l de NaOH 0.1 N a cada pocillo, según el método seguido por Shopsis y Eng (1985), por lo que se decidió usar 100 μ l de NaOH 0.1 N (Festing y Eydmann, 1987) e incubar a 37 °C durante dos horas (Babich y Borenfreund, 1987) para facilitar la disolución.

Realizando dicho protocolo, obtuvimos una absorbancia muy alta en la zona de saturación de la curva patrón, probablemente por exceso de contenido proteico total. Por tanto en ensayos posteriores se fueron eliminando del pocillo distintos volúmenes de NaOH 0.1 N con las proteínas disueltas, hasta encontrar que eliminando 70 μ l de NaOH, las proteínas medidas en los 30 μ l de NaOH restantes presentaban una lectura dentro de la curva de calibrado y una desviación estándar menor del 10 % de la media.

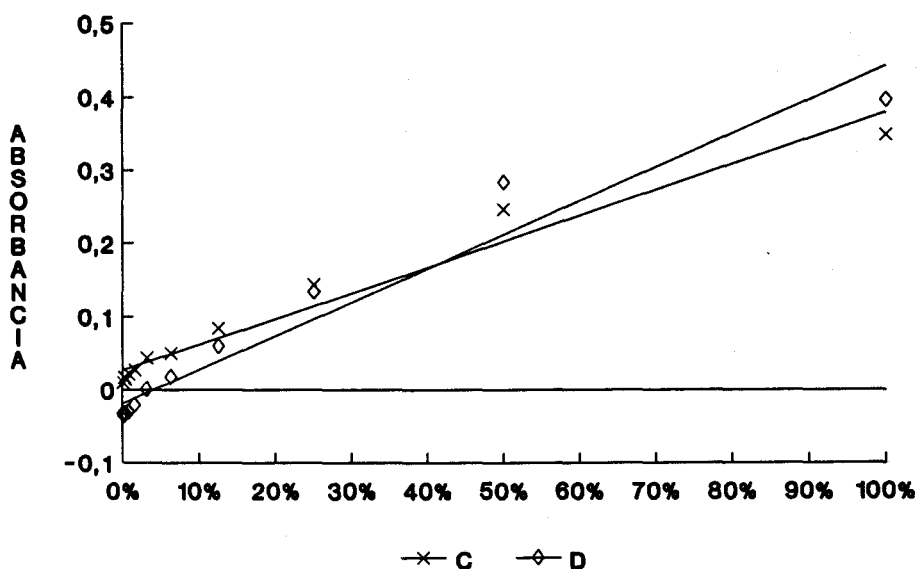
Aunque la determinación de proteínas por este método se realiza generalmente mediante una lectura a 620 nm, algunos autores utilizan 410 nm como filtro de referencia (Frautel, 1991). Para estudiar si este filtro de referencia era necesario, se realizó una curva de calibrado con albúmina a distintas concentraciones (0 - 4.2 μ g albúmina/pocillo)

efectuando la lectura espectrofotométrica al final del ensayo sin (A) y con (B) filtro de referencia. Los resultados se expresan en la gráfica siguiente:



Se obtienen dos rectas con una r de 0.978 y 0.983 sin y con filtro de referencia respectivamente. Teniendo en cuenta que utilizando filtro de referencia los valores de absorbancia del blanco y de las concentraciones de proteínas más bajas eran negativos, decidimos realizar las determinaciones con un solo filtro.

Se confirmaron estos resultados en un ensayo en el que se utilizaron las densidades celulares que previsiblemente se encontrarían en los ensayos con tóxicos. Para ello se sembró una placa a 12000 cél/pocillo con una incubación de 48 h. Tras añadir 100 μ l de NaOH 0.1 N e incubar dos horas, se recogió el extracto de todos los pocillos y se realizaron diluciones seriadas del mismo. El blanco era NaOH 0.1 N sin proteínas. Tras añadir el reactivo y esperar 30 min se procedió a la lectura sin (C) y con (D) filtro de referencia. Los resultados se expresan en la gráfica siguiente:



Se observa que tras restar el blanco a las distintas concentraciones, en la lectura con dos filtros, el blanco y las 5 concentraciones más bajas dan lugar a valores negativos. Sin embargo en la medida con un solo filtro tenemos una recta de $r = 0.982$, confirmando el resultado del ensayo con células.

1.3.1.2.- CAPTACION RELATIVA DE ROJO NEUTRO

El método propuesto por Borenfreund y Babich (1988) utiliza una mezcla de formaldehído 1 % y CaCl_2 1 % para fijar las células a la placa tras la absorción del colorante por aquellas, antes de la extracción del mismo con otra mezcla (Borenfreund y Puerner, 1984). En varios ensayos comparativos, comprobamos que esta etapa no es necesaria, ya que basta con un simple lavado con PBS para retirar el colorante no absorbido. Esta modificación supone un ahorro de tiempo y evita el uso de los citados compuestos.

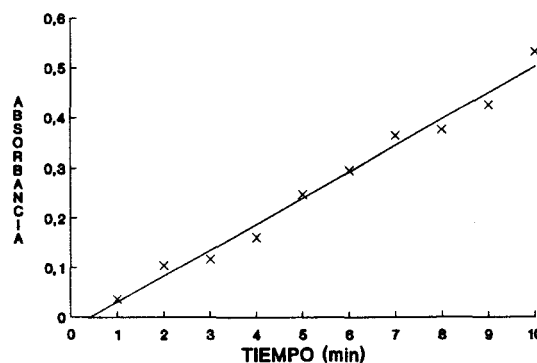
1.3.1.3.- ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA

No encontramos en la bibliografía ningún método de determinación de fosfofructoquinasa en microplacas. De entre todos los métodos publicados, decidimos adaptar el de Ling

y col (1966), que había sido utilizado previamente en nuestro laboratorio para medir la actividad de dicha enzima en la fracción S9 de hígado de rata, como control de la vía glucolítica, demostrando buena sensibilidad y alta reproducibilidad (Sanz y col., 1993; Rodríguez-Vicente, 1990).

Al ser la fosfofructoquinasa una enzima citosólica, para su determinación hemos de romper la membrana plasmática, y para ello utilizamos tritón X-100 al 1 % durante 30 minutos. Estas condiciones se eligieron tras ensayar distintas concentraciones de tritón entre 0.25 % y 1.5 % en períodos de tiempo diferentes, hasta un máximo de 1 h. Además, se compararon nuestros resultados con los citados en la bibliografía (Cull y McHenry, 1990; Jazwinski, 1990; Thomas y McNamee, 1990).

Se adaptaron las concentraciones de los sustratos y enzimas de la reacción acoplada hasta tener una concentración tal que la reacción no se viera condicionada al defecto de éstos. Así se midió el desarrollo de la reacción a 340 nm de minuto en minuto, durante 10 minutos obteniéndose una $r = 0.99$



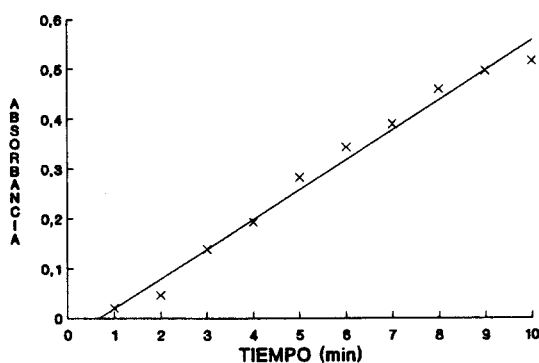
1.3.1.4.- ACTIVIDAD ENOLASA

Según la revisión bibliográfica realizada, no se había utilizado previamente ningún método para la cuantificación directa de enolasa en células adheridas sobre placas de cultivo. Dado el interés neurotoxicológico de su determinación, decidimos evaluar la posibilidad de llevarlo a cabo.

Seleccionamos el método colorimétrico propuesto por Marangos y col (1976) por ser simple, de gran sensibilidad, más adecuado al tipo de muestra y más parecido al resto de los ensayos empleados por nosotros.

El sistema de ensayo lleva una reacción acoplada de tal forma que medimos disminución de NADH a 340 nm, al igual que en los dos ensayos anteriores.

Lo primero a tener en cuenta fue que era preciso lisar las células dado que la enzima se encuentra en el citoplasma. Para ello se utilizó tritón X-100, detergente aniónico que produce la lisis celular y solubiliza las proteínas de membrana (Cull y McHenry, 1990; Jazwinski, 1990; Thomas y McNamee, 1990). Después se realizaron distintos ensayos hasta adaptar los reactivos a tal concentración que la enzima no dejara de actuar por falta de sustrato. Se realizaron medidas cada minuto durante 10 min, observándose una recta de $r = 0.99$. Se decidió que las medidas se realizarían en el minuto 1 (blanco) y en el 5, donde todavía la reacción no está concluida.



1.3.1.5.- ACTIVIDAD SUCCINATO DESHIDROGENASA

El ensayo de la MTT se basa en la reducción de la sal de tetrazolio MTT, que es soluble y amarilla, a su formazano, azul e insoluble, por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (Borenfreund y col, 1988).

La puesta a punto se realizó siguiendo las modificaciones introducidas por Borenfreund y col (1988), al método de Mosmann (1983) con el fin de eliminar las interferencias producidas por el colorante rojo fenol en la lectura espectrofotométrica. Este colorante es un indicador de pH que se adiciona habitualmente a los medios de cultivo de células y tejidos para controlar el correcto funcionamiento del sistema de tamponamiento bicarbonato-CO₂. Por ello, una vez realizada la exposición de las células a los tóxicos disueltos en el medio habitual que contiene suero y rojo fenol, se decantan las placas y se añade un medio que contiene MTT, un 1 % de suero (en lugar del 5 % habitual porque el suero también interfiere) pero no rojo fenol. Tras la incubación de 3 a 3 ½ h, el medio fue decantado a diferencia del método de Mosmann.

De acuerdo con Repetto y col. (1994), se añadió al medio de incubación KCN y antimicina A para inhibir otras deshidrogenasas.

Durante todo el ensayo se mantuvo la placa en la máxima oscuridad posible, evitando sobre todo la luz directa.

1.3.1.6.- ACTIVIDAD ATPasa

El centro activo de la ATPasa Na⁺/K⁺ está en el lado citoplasmático de la membrana plasmática, y los sitios activados por Na⁺ y K⁺ están en los lados citoplasmático y extracelular, respectivamente. Para poder determinar la actividad de ATPasa total, es necesario tener ambos lados de la membrana libremente accesibles a los substratos e iones añadidos. El uso de detergentes para formar vesículas pequeñas, sirve para desenmascarar la actividad latente de la enzima (Xie y col, 1989), aún cuando es inevitable una ligera alteración de las propiedades de la enzima debido a la ocupación por el detergente de los centros reguladores (Huang y col, 1985).

Al no encontrar, en la bibliografía revisada, ningún método que determine la actividad ATPasa en microplacas, se pensó en adaptar el método de Davis (1970) midiendo el fosfato

liberado por Ohnishi (1975), que había sido utilizado ya en nuestro laboratorio. Se hicieron varios ensayos para la puesta a punto del método, encontrando grandes dificultades en la determinación del fósforo inorgánico por formar éste un complejo que producía gran turbidez en el pocillo, que no se puede eliminar e impide la obtención de una solución transparente en la que se pudiera determinar la actividad del enzima colorimetricamente en un lector de Elisa. La mezcla H₂O:molibdato:reductor usada para formar el complejo se modificó repetidamente tanto en proporciones como en su tiempo de reacción, teniendo siempre como resultado una respuesta no reproducible, con turbidez variable de un pocillo a otro. Por todo ello rechazamos dicho método.

Pusimos a punto el método de Yeagle (1983), el cual utiliza Tritón X-100 como detergente aniónico que produce la lisis de la membrana plasmática, y que es el detergente que con este fin veníamos utilizando en otras determinaciones.

Es un método sencillo que acopla una reacción de la vía glucolítica al ensayo, de tal forma que la actividad de la enzima se mide indirectamente por disminución de NADH a 340 nm. Mide la actividad total de ATPasa (que incluye la ATPasa Na⁺/K⁺ y la ATPasa Mg⁺⁺) y la ATPasa Mg⁺⁺, calculando la ATPasa Na⁺/K⁺ por diferencia entre ambas. Todos los métodos colorimétricos encontrados en la bibliografía, determinan la ATPasa Na⁺/K⁺ por diferencia entre la total y la magnésica.

Una innovación al protocolo de trabajo fue el lavar las placas con una disolución de colina, en vez de con PBS, para no añadir iones que pudiesen interferir en la determinación. Este lavado se hace siempre para eliminar los restos de medio y suero de la placa antes de cualquier determinación.

En los primeros ensayos de la ATPasa Na⁺/K⁺ observamos que las diferencias entre actividad total y magnésica eran muy pequeñas. La técnica utilizada se basa en una reacción acoplada de la vía glucolítica, que requiere ADP aportado por la hidrólisis de ATP gracias a la ATPasa. En la glucolisis, el Mg⁺⁺ es un cofactor muy frecuente, por lo tanto, en el

cuerpo de las células neuronales, donde la vía glucolítica tiene gran importancia, la actividad ATPasa predominante es la ATPasa Mg^{++} , mientras que en las prolongaciones neuronales predomina la ATPasa Na^+/K^+ . Al ser células de neuroblastoma neuronas indiferenciadas, la ATPasa Mg^{++} debe estar también especialmente activa, y por tanto quedaría justificada la escasa diferencia entre ambas actividades, por ser la ATPasa Na^+/K^+ minoritaria.

De todas formas decidimos determinar la ATPasa total de la células como indicador de la actividad energética celular ya que permite valorar consumo de ATP, y como indicador del mantenimiento del gradiente electroquímico celular.

1.3.1.7.- ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA

Se utilizó el método de Ellman y col (1961), que había sido adaptado previamente en nuestro laboratorio a microplacas (Repetto y col, 1993).

En la adaptación de dicho método lo primero a tener en cuenta fue que no era preciso lisar las células dado que la enzima se encuentra firmemente adherida a la cara externa de la membrana citoplasmática (Niday y col, 1977). En segundo lugar se calculó la composición de la mezcla de reacción para adaptarla a la densidad celular, a su actividad y al reducido volumen en que puede desarrollarse la reacción, ya que en un pocillo no deben sobrepasarse los 0.250 ml.

Al utilizar nosotros este método, extremamos las medidas de oscuridad durante el desarrollo de la determinación enzimática, porque el compuesto coloreado que se forma es inestable con la luz.

1.3.1.8.- ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

El método elegido para su determinación fue el propuesto por Kresse y col (1982) que

ha sido adaptado a microplacas por nosotros, incluyendo algunas modificaciones.

Se añadió un tratamiento con tritón 1 % de 35 min, que permite una mejor penetrabilidad del sustrato dentro de los lisosomas para que así pueda actuar la enzima. Para evitar la saturación de la reacción, se aumentó la concentración de sustrato de tal forma que entre los márgenes de densidad celular que nos interesa, permanezca siempre en exceso.

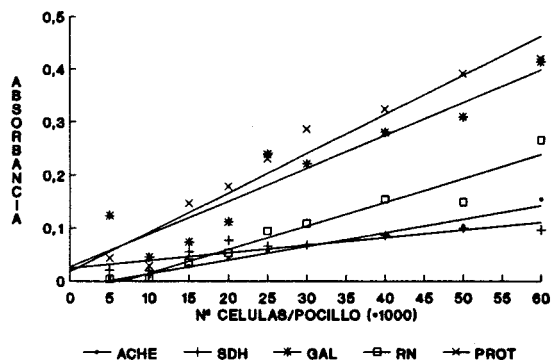
Tras ensayos comparativos, el período de incubación de la enzima con el sustrato se aumentó a 90 min, de tal forma que dejando actuar a la enzima más tiempo, el valor de absorbancia mejora considerablemente. El tampón glicina se añade al final de la incubación para detener la reacción y permitir el desarrollo de color. Se comprobó que el tiempo que transcurría entre la adición de este último tampón y el momento de la lectura no modificaba los valores de los resultados. Sin embargo, se decidió fijar este tiempo a 4 min, tratando así de estandarizar todos los pasos del protocolo.

1.3.2.- Linealidad de los indicadores.

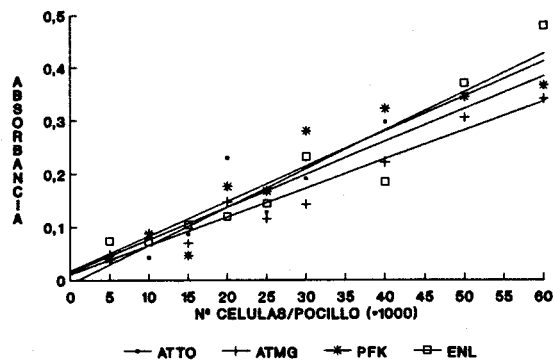
Estudiamos la linealidad de la respuesta de todos estos métodos indicadores de toxicidad, respecto a la concentración celular. Consideramos 11 concentraciones diferentes de células, sin incubación. Esta comprobación es necesaria debido a la lógica variabilidad en el número de células/pocillo en las experiencias con incubación y sobre todo con exposición a un tóxico.

Los resultados se recogen en las gráficas siguientes:

A)



B)



El estudio de la correlación lineal entre los resultados de los diversos indicadores para diferentes densidades celulares, se recoge en la tabla siguiente:

INDICADOR	ECUACION DE REGRESION LINEAL	r
PR	$y = 0.000007 x + 0.018198$	0.969974
RN	$y = 0.000004 x - 0.029720$	0.971797
PFK	$y = 0.000006 x + 0.016429$	0.945943
ENL	$y = 0.000007 x - 0.007090$	0.948250
SDH	$y = 0.000001 x + 0.024263$	0.894216
ATTO	$y = 0.000006 x + 0.014077$	0.932638
ACHÉ	$y = 0.000002 x - 0.012000$	0.985586
GAL	$y = 0.000006 x + 0.026218$	0.938287

Confirmamos por tanto la linealidad de los indicadores en las concentraciones de células que nos interesa.

1.3.3.- Procedimientos normalizados (SOPs) para la determinación de los indicadores de toxicidad.

1.3.3.1.- DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN PLACAS DE CULTIVO

METODO

Bradford (1976) adaptado por Shopsis y Eng (1985); Babich y Borenfreund (1987), Repetto y Sanz (1993), modificado.

FUNDAMENTO

Este método aplica el procedimiento de Bradford de determinación de proteínas a la cuantificación de éstas células cultivadas en placas de 96 pocillos y con lectura en un lector de placas. Se basa en el incremento de absorbancia que experimenta el colorante azul brillante de Coomassie al unirse a las proteínas.

En células no estáticas, se considera un índice ideal de proliferación celular, al poderse relacionar con el número de células.

MATERIAL

- NaOH 0.1 N (valorada) en H₂O.
- Reactivo concentrado de Azul brillante de Coomassie G-250.
- Reactivo de Azul de Coomassie diluido al 22.2% con agua desionizada y filtrado con papel de filtro. Estabilidad: 2 semanas a T.A.
- Solución patrón de albúmina sérica bovina de 1 mg/ml en agua.

PREPARACION DE LAS PLACAS

- 1.- Lavar con PBS (al menos 3 veces).
- 2.- Lavar con agua desionizada y escurrir bien.
- 3.- Las placas pueden mantenerse congeladas a -20 °C indefinidamente. De esta forma se determina el mayor número posible de placas con el mismo reactivo, consiguiendo una mayor estandarización del ensayo.

CURVA DE CALIBRADO

Se realiza durante el período de incubación con NaOH. Se prepara en una placa de Elisa añadiendo 30 µl/pocillo, de cada uno de los patrones de albúmina en NaOH 0.1 N. Incubar la placa a 37 °C y seguir el proceso

a partir del apartado 4 siguiente.

DETERMINACION: PROTEINAS

- 1.- Si las placas se mantuvieron congeladas, mantener a T.A. al menos 30 min
- 2.- Añadir 100 μ l de NaOH 0.1 N a cada pocillo de la placa de cultivo para disolver las proteínas.
- 3.- Incubar al menos unas 2 horas a 37° C en cámara húmeda.
- 4.- Eliminar 70 μ l de cada pocillo.
- 5.- Añadir 180 μ l del reactivo diluido al 22.2% a cada pocillo de todas las placas.
- 6.- Incubar 30 min: a temperatura ambiente.
- 7.- Leer en el lector de microplacas a 620 nm, restando el valor del blanco a todos los pocillos. Estabilidad entre 30 - 60 min.

CALCULOS

- 1.- Hallar las medias de las absorbancias obtenidas para cada grupo.
- 2.- Representar la curva patrón.
- 3.- Hallar la cantidad de proteínas/pocillo, que corresponde al 30% de las proteínas totales que realmente teníamos en el pocillo.
- 4.- Calcular la CE-50: concentración del tóxico que produce un 50 % de disminución en absorbancia (concentración) con respecto al control.

1.3.3.2.- ENSAYO DE CAPTACION RELATIVA DE ROJO NEUTRO

METODO

Borenfreund y Puerner (1984) modificado por Babich y Borenfreund (1987) y Repetto y Sanz (1993).

FUNDAMENTO

La cuantificación de la captación y acumulación lisosomal de este colorante por las células vivas, se realiza espectrofotométricamente tras extraer el colorante en medio ácido.

MATERIAL

- Medio de cultivo completo (EMEN rojo fenol)
- Solución madre de rojo neutro 1 % (P/V) en PBS A (0.1 g en 10 ml). Estabilidad indefinida a 4 °C.
- (E) Solución de trabajo de rojo neutro de 50 µg/ml preparada en medio de cultivo a partir de la solución madre (125 µl solución madre de rojo neutro en 25 ml de medio completo), incubada durante la noche a 37° C y centrifugada antes de usar (1000 rpm 10 min).
- (E) Mezcla 1:49:50 de acético glacial, etanol absoluto y agua. Preparar 25 ml/placa (0.25 ml acético glacial + 25 ml de etanol del 50 %)
- PBS A
- Rojo neutro: Hidrocloruro de 3-amino-7-dimetilamino-2-metil- fenacina.

DETERMINACION (RN)

- 1.- Decantar el medio (condiciones no estériles)
- 2.- Lavar una vez con PBS
- 3.- Añadir 200 µl de la solución de trabajo de rojo neutro.
- 4.- Incubar 3 h a 37 °C
- 5.- Decantar el colorante invirtiendo la placa
- 6.- Lavar dos veces la placa con PBS y decantar.
- 7.- Añadir 200 µl de la mezcla ácido-acético etanol
- 8.- Dejar 10 minutos a temperatura ambiente para extracción del colorante, agitando a 100 r.p.m.
- 9.- Leer en un lector de microplacas a 540 nm, restando el blanco al resto de los pocillos.

CALCULOS (RN)

- 1.- Captación de rojo neutro: Informa de la viabilidad y la proliferación. Se halla el % de modificación de cada grupo respecto al control.
- 2.- Captación relativa de rojo neutro: Informa de la viabilidad celular, es decir, de la integridad de membrana y de los mecanismos de transporte. Se obtiene dividiendo la captación celular (global) del pocillo entre el contenido proteico total que le corresponda.

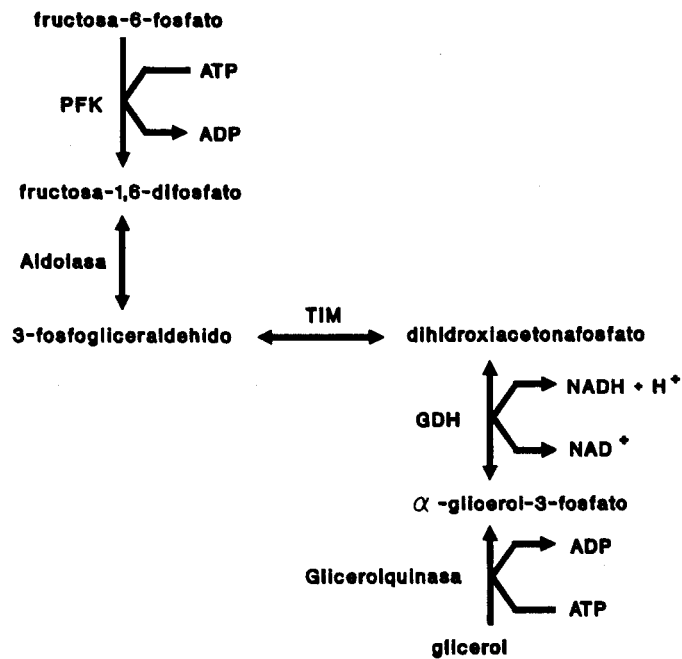
1.3.3.3.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA

METODO

Adaptación del método de LING y col, 1966.

FUNDAMENTO

Para la determinación espectrofotométrica de la fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.11) en placas de cultivo, se utiliza una reacción acoplada de la vía del glicerol, pudiendo medirse así la disminución de NADH a 340 nm.



MATERIAL

- ATP (Adenosina-5'-trifosfato), sal disódica. Boehringer Mannheim
- Fructosa-6-fosfato, sal disódica. Boehringer Mannheim
- NADH. Boehringer Mannheim
- GDH-TIM (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; triosafosfato isomerasa). Boehringer Mannheim
- Aldolasa. Boehringer Mannheim
- Tritón 1 % (1 ml tritón X-100 ---> 100 ml H₂O)
- Solución de Tris HCl 0.01 M pH=8 (0.12 g tris/100 ml)
- Solución de Tris HCl 0.2 M pH=8 (2.423 g tris/100 ml)
- Solución de SO₄Mg 0.2 M (5 g SO₄Mg/100 ml)

- Solución de ClK 0.23 M (1.7 g ClK/100 ml)
- (E) Solución de ATP 0.02 M pH=7 (0.11 g ATP/10 ml)
- (E) Solución de F-6-P 0.02 M (0.06 g F-6-P/10 ml)
- (E) Solución de NADH 2.4 mM (0.017 g NADH/10 ml)
- (E) Solución de Ditiotreitól 0.1 M (0.575 g DTT/5 ml)
- (E) Mezcla de enzimas:
 - 4 mg Albúmina en 1.88 ml tris ClH 0.01 M pH=8
 - 20 μ l GDH-TIM
 - 100 μ l Aldolasa

- (E) Reactivo de ensayo (1 placa)

TrisHCl 0.2 M pH=8	3.33 ml
ATP 0.02 M pH=7	2.00 ml
SO ₄ Mg 0.2 M	0.50 ml
F6K 0.02 M	2.00 ml
NADH 2.4 mM	1.30 ml
ClK 0.23 M	4.40 ml
Ditiotreitól 0.1 M	0.20 ml
Mezcla de enzimas	1.30 ml

DETERMINACION

- 1.- Decantar la placa
- 2.- Lavar con PBS
- 3.- Añadir 50 μ l/pocillo de tritón 1%
- 4.- Dejar a T.A. durante 30 min
- 5.- Preparar el reactivo de ensayo
- 6.- Añadir 150 μ l/pocillo del reactivo de ensayo
- 7.- Medir a 340 nm a los 1 y 10 min, restándole los valores de los blancos

CALCULOS

- 1.- Actividad absoluta de PFK: Valor absoluto de la variación de absorbancia entre tiempo 1 y 10 min. Informa de alteraciones en la enzima conjuntamente con la proliferación. Se halla el % de modificación, por cada concentración del tóxico, respecto al grupo control.
- 2.- Actividad relativa de PFK: Informa exclusivamente de las modificaciones inducidas en la actividad de la enzima, eliminando las interferencias de la alteración de la proliferación. Se obtiene dividiendo la modificación de absorbancias por el contenido proteico total que le corresponda.

1.3.3.4.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENOLASA

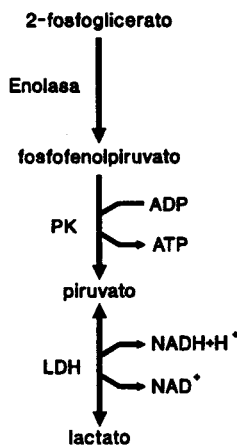
METODO

Adaptación del método de Marangos y col, 1976.

FUNDAMENTO

La enolasa (EC 4.2.1.11) es la enzima encargada de catalizar el paso de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Esta es la segunda reacción de la glucólisis, en la cual se forma un enlace fosfato rico en energía.

La determinación espectrofotométrica se basa en una medida indirecta de la enolasa a través de una reacción acoplada:



Medimos la disminución de NADH a 340 nm.

MATERIAL

- ADP (Adenosina-5'-difosfato). Boehringer Mannheim
- NADH. Boehringer Mannheim
- Acido 2-fosfoglicérico. Sigma
- Piruvato-quinasa. Sigma
- LDH (Lactato-deshidrogenasa). Boehringer Mannheim
- Imidazol, hidrocloreuro. Sigma
- Solución de Tritón X-100 al 1% en H₂O
- Solución concentrada de Enolasa 2x pH=7.5

KCl (70 mM) 5.220 g

MgSO₄ · 7 H₂O (7 mM) 1.725 g

EDTA · Na ₂ · 2H ₂ O (3 mM)	1.117 g
Imidazol (50 mM)	5.225 g
Agua destilada c.s.p.	500 ml
- (E) Solución de ensayo (1 placa)	
Solución Enolasa 2x	13.4 ml
Agua destilada	6.6 ml
ADP	0.0264 g
NADH	0.004 g
Acido 2-fosfoglicérico	0.006 g
Piruvato-quinasa (10 mg/ml)	10.0 μl
LDH (10 mg/2 ml)	53.3 μl

PREPARACION Y CONSERVACION

- 1.- Decantar la placa.
- 2.- Lavar la placa con PBS y escurrir bien.
- 3.- Si se desea, las placas pueden almacenarse a -20°C.

DETERMINACION

- 1.- Añadir 50 μl tritón x-100 al 1 % /pocillo.
- 2.- Dejar a T.A. durante 30 min
- 3.- Añadir 150 μl/pocillo de la solución de ensayo (E)
- 7.- Lectura a los 1 y 5 min a 340 nm, restando los blancos

CALCULOS

- 1.- Actividad absoluta de enolasa: Valor absoluto de la variación de absorbancia entre tiempo 1 y 5 min. Informa de alteraciones en la enzima conjuntamente con la proliferación. Se halla el % de modificación, por cada concentración del tóxico, respecto al grupo control.
- 2.- Actividad relativa de enolasa: Informa exclusivamente de las modificaciones inducidas en la actividad de la enzima, eliminando las interferencias de la alteración de la proliferación. Se obtiene dividiendo la modificación de absorbancia por el contenido proteico total que le corresponda.

1.3.3.5.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD SUCCINATO-DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL

METODO

Mosmann (1983) modificado por Borenfreund y col. (1988) y Repetto y col. (1994a).

FUNDAMENTO

La enzima succinato deshidrogenasa o succinato oxidoreductasa (SDH), EC 1.3.99.1, se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial y participa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos oxidando el succinato a fumarato.

Su actividad en células intactas se evalúa mediante la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo, a su formazano correspondiente de color púrpura, cuya aparición controlamos espectrofotométricamente.

SDH

MTT (amarillo) ----- > Formazano de MTT (púrpura)

MATERIAL

- MTT = Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difenil tetrazolio. SIGMA: M-2128 500 mg
- Medio de cultivo sin rojo fenol (EMEM)
- CIH 1 N (104 ml de CIH 35% ----- > 1000 ml)
- Solución de KCN 100 mM (0.325 g KCN en 5 ml H₂O con 2 gotas de NaOH)
- Solución de antimicina A 250 μ M (120 μ g antimicina A/ml etanol absoluto, a -20 °C)
- (E) Solución de trabajo de MTT de 0.5 mg/ml (1 placa):
0.0075 g de MTT se disuelven en 15 ml de EMEM sin rojo fenol, con PEGA y un 1 % de suero, 0.150 ml de KCN 100 mM y 0.150 ml de antinomicina A 250 μ M. Prepararla protegida de la luz con papel de aluminio.
- (E) Solución de isopropanol-ácido (HCl 0.04 N en isopropanol). Es una mezcla 1:24 de HCl 1 N en isopropanol. (V/V) 25 ml ----- > 2 placas.

DETERMINACION

- 1.- Decantar el medio (condiciones no estériles).
- 2.- Lavar las placas con PBS
- 3.- Añadir 100 μ l de la solución de trabajo de MTT a cada pocillo. Procurando tener la mayor oscuridad posible.
- 4.- Cubrir con papel de aluminio e incubar 3 h a 37 °C
- 5.- Decantar el colorante invirtiendo la placa (NO LAVAR)

- 6.- Añadir 100 μ l de la solución extemporánea de isopropanol-ácido a cada pocillo.
- 7.- Dejar de 15 minutos a una hora a temperatura ambiente protegida de la luz con papel de aluminio.
- 8.- Agitar 1 min. en un agitador de placas a 1000 r.p.m.
- 9.- Leer en un lector de microplacas a una longitud de onda de 540 nm y usando una longitud de onda de referencia de 690 nm.

CALCULOS (MTT)

- 1.- Restar a cada pocillo el valor del blanco, y hacer las medias por grupos.
- 2.- Actividad absoluta de SDH. (Ensayo de la MTT): Informa de alteraciones en la SDH conjuntamente con la proliferación. Se halla el % de modificación, por cada concentración del tóxico, respecto al grupo control.
- 3.- Actividad relativa de SDH: Informa exclusivamente de las modificaciones inducidas en la enzima, eliminando las interferencias de la alteración de la proliferación. Se obtiene dividiendo el contenido celular en SDH del pocillo entre el contenido proteico total que le corresponda.

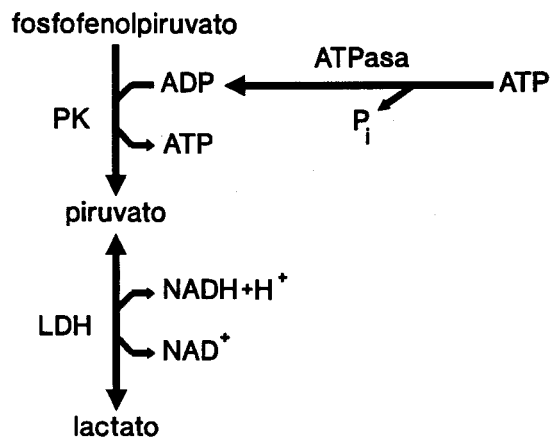
1.3.3.6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ATPasa

METODO

Adaptación del método de YEAGLE, (1983).

FUNDAMENTO

Para su determinación espectrofotométrica en placas de cultivo, se utiliza una reacción acoplada de la vía glucolítica, pudiendo medirse así la disminución de NADH a 340 nm.



MATERIAL

1.- Reactivos:

- Trietanolamina. Merck
- Colina, cloruro. Aldrich
- Fosfoenol piruvato (PEP), sal monosódica. Sigma
- ATP (Adenosina-5'-trifosfato), sal tris. Sigma
- NADH, sal tris. Sigma
- PK (Piruvato quinasa). Sigma
- LDH (Lactato deshidrogenasa). Boehringer Mannheim
- Ouabaína. Sigma

2.- Soluciones:

- Solución de colina 200 mM (55 g --> 2 l)
- Solución de colina 3 M (21 g --> 50 ml)
- Tritón 1% (1 ml tritón X-100 --> 100 ml H₂O)
- Solución de MgSO₄ 1 M (24.65 g --> 100 ml)
- Solución de NaCl 20 M (58.44 g --> 5 ml)
- Solución de KCl 1 M (3.73 g --> 50 ml)
- (E) Solución de PEP 5 mM (0.005 g --> 5 ml)
- (E) Solución de ATP 0.2 M (0.51 g --> 5 ml)
- (E) Solución de NADH 7 mM (0.025 g --> 5 ml)
- (E) Ouabaína 2.5 mM (0.009 g --> 5 ml)
- (E) Solución de ensayo de ATPasa concentrada:

Trietanolamina	0.71 ml
MgSO ₄ 1 M	2.70 ml
Fosfoenolpiruvato 5 mM	1.60 ml
ATP 0.2 M	1.35 ml
NADH 7 mM	1.55 ml
PK 2000 U/ml	0.27 ml
LDH 2750 U/ml	0.40 ml
Agua destilada	21.42 ml

- (E) Solución de ensayo ATPasa total (1 placa):

Sol. ATPasa concentrada	15 ml
NaCl 20 M	1 ml
KCl 1 M	0.7 ml
Agua destilada	3.3 ml

- (E) Solución de ensayo ATPasa Mg⁺⁺ (1 placa):

Sol. ATPasa concentrada	15 ml
Colina 3 M	1 ml
Ouabaína 2.5 mM	1.1 ml
Agua destilada	2.9 ml

DETERMINACION

- 1.- Decantar la placa
- 2.- Lavar con solución de Colina 200 mM. (T.A.)
- 3.- Añadir 50 μ l/pocillo de tritón 1%
- 4.- Dejar a T.A. durante 30 min
- 5.- Preparar el reactivo de ensayo justo antes de su uso.
- 6.- Añadir 150 μ l/pocillo del reactivo correspondiente de ensayo a cada placa.
- 7.- Medir a 340 nm a los 1 y 10 min

CALCULOS

1.- Actividad absoluta de ATPasa: Valor absoluto de la variación de absorbancia entre tiempo 1 y 10 min. Informa de alteraciones en la enzima conjuntamente con la proliferación. Se halla el % de modificación, por cada concentración del tóxico, respecto al grupo control.

2.- Actividad relativa de ATPasa: Informa exclusivamente de las modificaciones inducidas en la actividad de la enzima, eliminando las interferencias de la alteración de la proliferación. Se obtiene dividiendo la modificación de absorbancia por el contenido proteico total que le corresponda.

1.3.3.7.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA EN PLACAS DE CULTIVO

METODO

Método de Ellman y col (1961), adaptado por Repetto y col (1993).

FUNDAMENTO

Su determinación espectrofotométrica se basa en:

acetiltiocolina |———— AChE ———> tiocolina + acético

tiocolina + ditiobisnitrobenzoato |————> ácido tionitrobenzoico (amarillo)

MATERIAL

- Solución de yoduro de acetiltiocolina (Merck) 0.075 M.
0.02167 g/ml de H₂O. Estable 10-15 días a 4°C.
Alicuotar y congelar a -20°C.
- Solución de ácido 2,2'dinitro-5,5'ditiobenzoico 0.01 M, compuesto por:
 - a) 0.0396 g de DTNB (Merck)
 - b) 10 ml de tampón fosfato 0.1 M pH 7.0; disolver y añadir
 - c) 0.015 g de CO₃HNaAlicuotar y congelar a -20°C.
- Tampón fosfato 0.1 M pH 8.0
- Tampón fosfato 0.1 M pH 7.0

PREPARACION Y CONSERVACION

- 1.- Lavar la placa con PBS y escurrir bien.
- 2.- Si se desea las placas pueden almacenarse a -20 °C.

DETERMINACION

- 1.- Si las placas se conservaron congeladas, colocarlas durante una media hora a temperatura ambiente.
- 2.- Preparación del reactivo de ensayo por placa (Mezclar inmediatamente antes de usar):
 - * Tampón fosfato 0.1 M pH= 8 24.00 ml

* DTNB 0.80 ml

* Yoduro de acetilcolina 0.16 ml

3.- Añadir inmediatamente 200 μ l a cada pocillo.

4.- Incubar a temperatura ambiente exactamente durante 10-15 min en oscuridad.

5.- Leer en el lector de microplacas a 414 nm.

CALCULOS

1.- Restar el blanco a cada pocillo, y hallar las medias por grupos.

2.- Actividad absoluta de AChE: Informa de alteraciones en la enzima conjuntamente con la proliferación. Se halla el % de modificación, por cada concentración del tóxico, respecto al grupo control.

3.- Actividad relativa de AChE: Informa exclusivamente de las modificaciones inducidas en la enzima, eliminando las interferencias de la alteración de la proliferación. Se obtiene dividiendo el contenido celular en AChE del pocillo entre el contenido proteico total que le corresponda.

1.3.3.8.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

METODO

Adaptación del método de Kressey y col, 1982.

FUNDAMENTO

Para la determinación espectrofotométrica de la β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) se utiliza un método colorimétrico basado en la aparición de color amarillo tras actuar el enzima sobre el p-nitrofenil beta-D-galactopiranosido.

MATERIAL

- p-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido. Boehringer Mannheim

- Tampón Citrato pH=4

NaCl (0.1 M)..... 0.5844 g

NaN₃ (6 mM)..... 0.039 g

Albúmina de suero bovino... 0.2 g

Citrato trisódico..... 2.941 g

- Agua destilada c.s.p..... 100 ml
- Tampón glicina pH=10.4
 - Glicina (0.4 M)..... 3.003 g
 - Agua destilada c.s.p..... 100 ml
- Tritón-Citrato al 1%
 - Tritón X-100 1 ml
 - Tampón Citrato c.s.p..... 100 ml
- (E) Reactivo de ensayo
 - p-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido.... 0.0675 g
 - Tampón citrato c.s.p..... 15 ml

DETERMINACION

- 1.- Decantar la placa.
- 2.- Lavar la placa con PBS y escurrir bien.
- 3.- Añadir 50 μ l/pocillo de tritón-citrato 1 %
- 4.- Dejar a T.A. durante 30 min
- 5.- Preparar el reactivo de ensayo (E)
- 6.- Añadir 100 μ l/pocillo del reactivo de ensayo (E)
- 7.- Incubar 90 min a 37°C
- 8.- Añadir 100 μ l/pocillo de tampón glicina -NaOH
- 9.- Lectura a los 4 min a 405 nm

CALCULOS

- 1.- Actividad absoluta β -galactosidasa: Informa de alteraciones en la enzima conjuntamente con la proliferación. Se halla el % de modificación, por cada concentración del tóxico, respecto al grupo control.
- 2.- Actividad relativa β -galactosidasa: Informa exclusivamente de las modificaciones inducidas en la actividad de la enzima, eliminando las interferencias de la alteración de la proliferación. Se obtiene dividiendo el contenido celular en beta-galactosidasa del pocillo entre el contenido proteico total que le corresponda.

Todas las actividades se han expresado en valores de absorbancias (tanto absolutas, como relativas a proteínas) ya que, como se verá más adelante (apartado 2.2.), todo el estudio estadístico se ha realizado con los porcentajes de actividad respecto al control.

2.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS. ESTUDIO ESTADISTICO

2.1.- ESTUDIO ESTADISTICO PRELIMINAR

Los datos obtenidos para cada uno de los parámetros en las diferentes concentraciones de exposición a cada tóxico se sometieron a un estudio estadístico preliminar. Para conocer si la distribución de una determinada variable seguía la ley Normal, se ha utilizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov, que se basa en comparar la distribución acumulada de los valores de la muestra con la distribución acumulada que se obtendría en el supuesto que siguiera exactamente una ley Normal de media μ y varianza σ^2 .

Ambas distribuciones se comparan, realizando la prueba con la máxima diferencia encontrada ($D_{\text{máx}}$). Si dicho test es estadísticamente significativo, se rechaza la hipótesis de que nuestros datos siguen la distribución normal.

Comprobada la normalidad de nuestras poblaciones, se rechazaron aquellos datos que no se encontraban en el intervalo $\mu \pm 2\sigma$ ("outliers"), tras lo cual se recalcularon todos los parámetros estadísticos (media, desviación estándar, error estándar de la media, número de individuos/grupo,...).

Por último se aplicó la prueba de Cochran de homogeneidad de varianzas, como condición previa al ANOVA. Dicha prueba permite verificar el supuesto de igualdad de varianzas ($H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$) a partir de las varianzas $S_1^2, S_2^2, \dots, S_k^2$ observadas en k muestras. Se considera un valor de "significación estadística" a partir de $p < 0.05$

2.2.- TRANSFORMACION DE VARIABLES

Para posibilitar la comparación entre resultados de diferentes experimentos y tóxicos aplicados, se diseñó una estrategia aplicable para cada indicador y compuesto; así, los valores

obtenidos en cada pocillo (individuo) fueron referidos como porcentaje del valor medio de los controles de ese experimento, que se tomó como referencia (100); tendríamos entonces el % de actividad absoluta de cada indicador.

El siguiente paso fue transformar estos datos en % de actividades relativas a contenido proteico total de las células (mg de proteínas), evitando así la influencia de las alteraciones de la proliferación celular en el resultado de la actividad enzimática absoluta.

2.3.- SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS

Para conocer la significación estadística de los resultados, aplicamos el análisis de la varianza (ANOVA/MANOVA).

Las condiciones de aplicación del ANOVA/MANOVA son que las poblaciones sean normales y con igualdad de varianza. Ambas condiciones se confirmaron en el apartado de estadística preliminar.

El propósito del análisis de la varianza (ANOVA) es estudiar si las diferencias entre medias son significativas. Partimos de la hipótesis nula $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ en poblaciones normales donde $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$. Se considera un valor de "significación estadística" a partir de $p < 0.05$

2.4.- RELACION CONCENTRACION-EFECTO

Se establece representando gráficamente para cada indicador de citotoxicidad la curva que relaciona las concentraciones ensayadas de cada compuesto frente a los efectos observados.

2.5.- ESTIMACION DE LA CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA (CE-50)

La realizamos por interpolación gráfica a partir de la curva anterior para cada producto y determinación. La CE-50 corresponde a la concentración del tóxico que produce una modificación determinada en el indicador del 50% con respecto al control.

2.6.- ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCION

Utilizando las curvas obtenidas con los diferentes indicadores de toxicidad y los valores de las CE-50, comprobamos cuales han sido los procesos fisiológicos más afectados y el sentido de estos cambios. A partir de dichos datos se valoran los mecanismos tóxicos responsables de tales modificaciones.

3.- OBSERVANCIA DE LAS BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO (BLP)

3.1.- FUNDAMENTO

Al pretender comparar los resultados obtenidos *in vitro* con los de estudios de toxicidad realizados con animales es evidente que deben adoptarse en ambos las medidas más estrictas posibles que aseguren la veracidad, reproducibilidad y repetibilidad de los ensayos. Todo ello trata de conseguirse mediante la aplicación de los Principios de Buena Práctica de Laboratorio (BPL), (OECD, 1981; EEC, 1987; RD 822/93) que garantizan la calidad de la experimentación toxicológica.

3.2.- PROCEDIMIENTO

Dado que no es posible reflejar aquí todos los aspectos relacionados con las BLP (Repetto, 1988), enumeramos, a modo de ejemplo, algunos de los observados durante la realización del presente trabajo de investigación:

- Las instalaciones experimentales permitieron la adecuada separación entre las diferentes zonas de trabajo: laboratorio de cultivos celulares dotado de aire filtrado y en sobrepresión, y con área estéril anexa para almacenamiento de material; laboratorio de analítica bioquímica; laboratorio de microscopía óptica; laboratorio de espectrofotometría y fotometría vertical; laboratorio de esterilización; almacén de productos y reactivos de ensayo; archivos; sistema de evacuación de residuos, etc.
- Los sistemas experimentales (células) son de absoluta garantía manteniendo registro de llegada, período de cuarentena, y controles periódicos de salud y microbiológicos, incluyendo la exclusión de micoplasma.
- Los instrumentos fueron revisados, mantenidos y calibrados periódicamente de acuerdo con Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT/SOP).
- Todas las fases del estudio dispusieron de Procedimientos Normalizados de Trabajo escritos y validados.
- Cada estudio posee un protocolo previamente escrito y aprobado realizado tras la puesta a punto.
- Los resultados y demás anotaciones se recogieron fechadas y firmadas en hojas estandarizadas de recogida de datos.

III.- RESULTADOS

Con el fin de establecer la relación existente entre la concentración de un tóxico y los efectos que produce, se aplicaron varias diluciones del mismo cubriendo un amplio espectro. Por ello, tal como se indicó en el apartado 1.2.1 de Métodos, además de los controles, empleamos 4 concentraciones de ensayo, siendo la mayor de 100 mg/l, y separadas unas de otras por un factor de 10. Ello implica, que por cada compuesto y determinación ensayamos las siguientes concentraciones en el medio de cultivo: 0 (control), 0.1, 1, 10 y 100 mg/l. Se utilizaron tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h para las determinaciones de contenido proteico total y captación de rojo neutro para así observar la evolución de las células expuestas a lo largo del tiempo. Posteriormente se seleccionó una exposición de 24 h para el resto de las determinaciones.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos para cada uno de los 6 productos químicos ensayados, se presentan en 7 **gráficas concentración-efecto** (Figuras 1 a 42), que contienen las actividades absolutas o las actividades relativas de los distintos indicadores de toxicidad. Al objeto de sistematizar su estudio, la primera gráfica de cada producto muestra la afectación de la proliferación celular (según el contenido proteico total) para los tres períodos de exposición ensayados; la segunda y la tercera representan, respectivamente, los resultados de la captación de rojo neutro (RN) y la captación relativa de RN (CRRN) a los tres mismos períodos. Después se presentan los resultados de la afectación de la vía de metabolismo de la glucosa: glucolisis (PFK y ENL) y del ciclo de Krebs (SDH), en actividades absolutas y relativas. Finalmente las dos últimas gráficas de cada producto corresponden a la actividad ATPasa total y a los indicadores empleados como marcadores neuronales (AChE y GAL). La escala en ordenadas de cada gráfica se adaptó en cada caso de forma que mostrara una información global del efecto de cada producto.

En la tabla 2 se recogen los valores de la **concentración efectiva media** (CE-50) determinada por interpolación gráfica de los resultados de proliferación, captación de rojo neutro, captación relativa de rojo neutro para cada período de incubación y producto, y de las actividades absolutas y relativas del resto de los indicadores para cada producto ensayado.

El estudio estadístico de los resultados, se estructura como sigue:

- 1.- *Estudio estadístico descriptivo*. Se recoge en 7 tablas por producto (Tablas 3 a 44), ordenadas de forma paralela a las gráficas, en las que se presentan los datos estadísticos descriptivos (media, desviación estándar y error estándar de la media para las actividades absolutas y relativas de cada indicador y período de incubación).
- 2.- *Inferencia estadística*. Para conocer la significación estadística de los resultados, aplicamos el análisis de la varianza (ANOVA). Sus resultados se presentan en una tabla por producto (Tablas 45 a 50). Se considera un valor con "significación estadística" a partir de $p < 0.05$, apareciendo estos datos en negrilla en las tablas. Los valores que aparecen en la tabla como $p = 0.0000$ equivalen a un grado de significación < 0.00005

CLORPROMAZINA

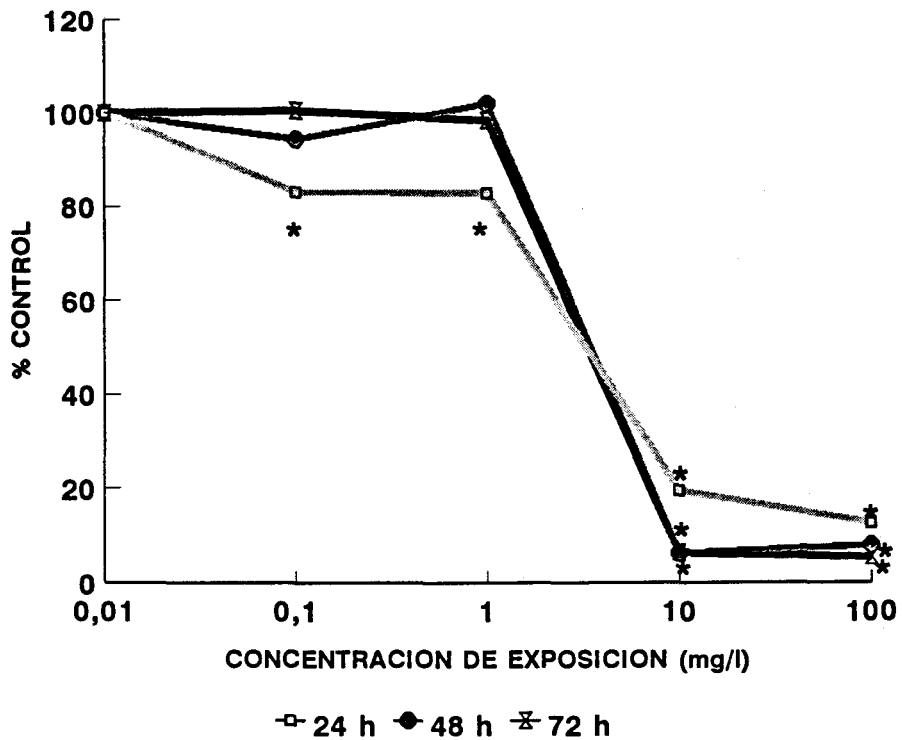


Fig. 1.- Efecto de la clorpromazina sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

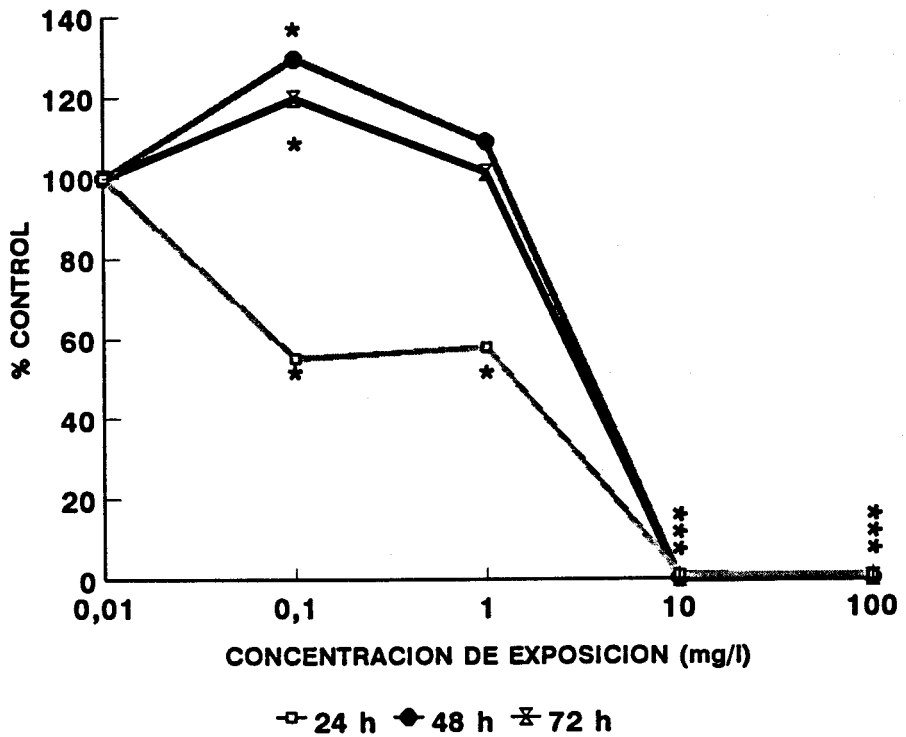


Fig. 2.- Efecto de la clorpromazina sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

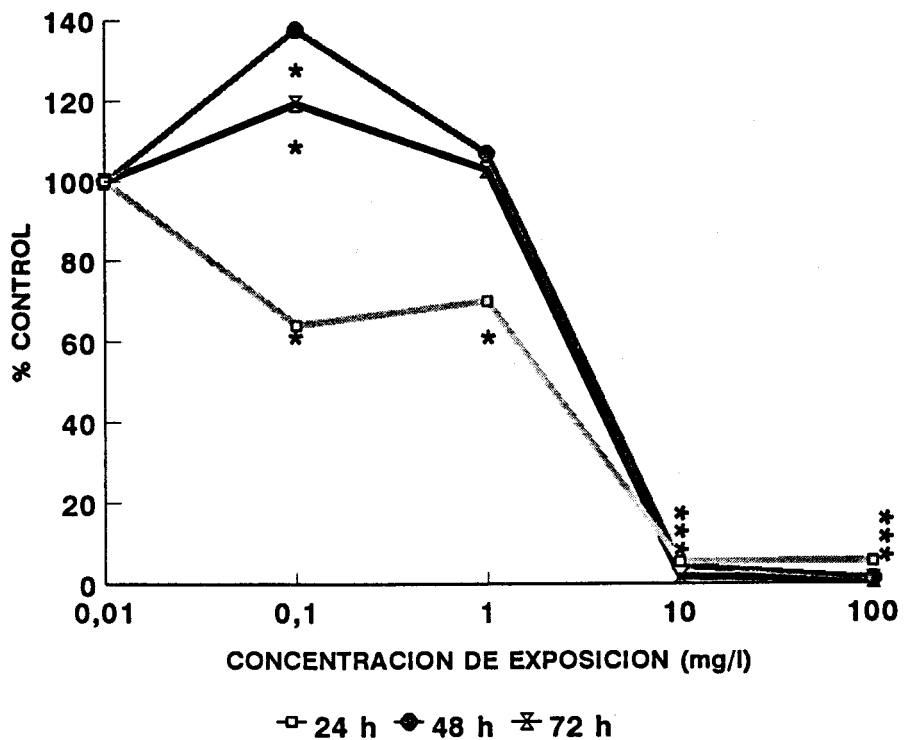


Fig.3.- Efecto de la clorpromazina sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

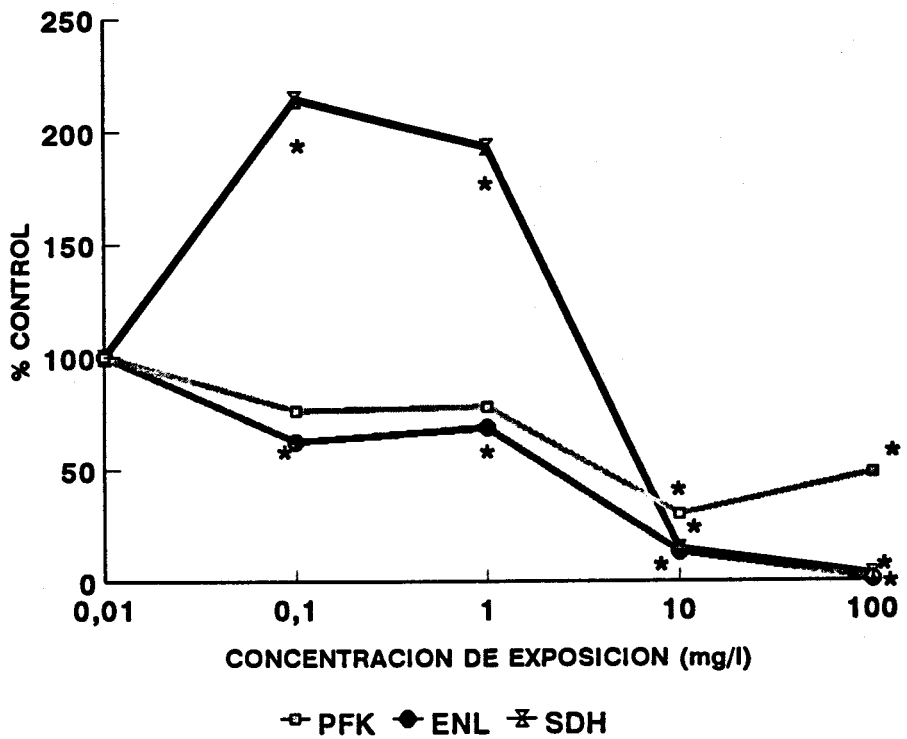


Fig. 4.- Efecto de la clorpromazina sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

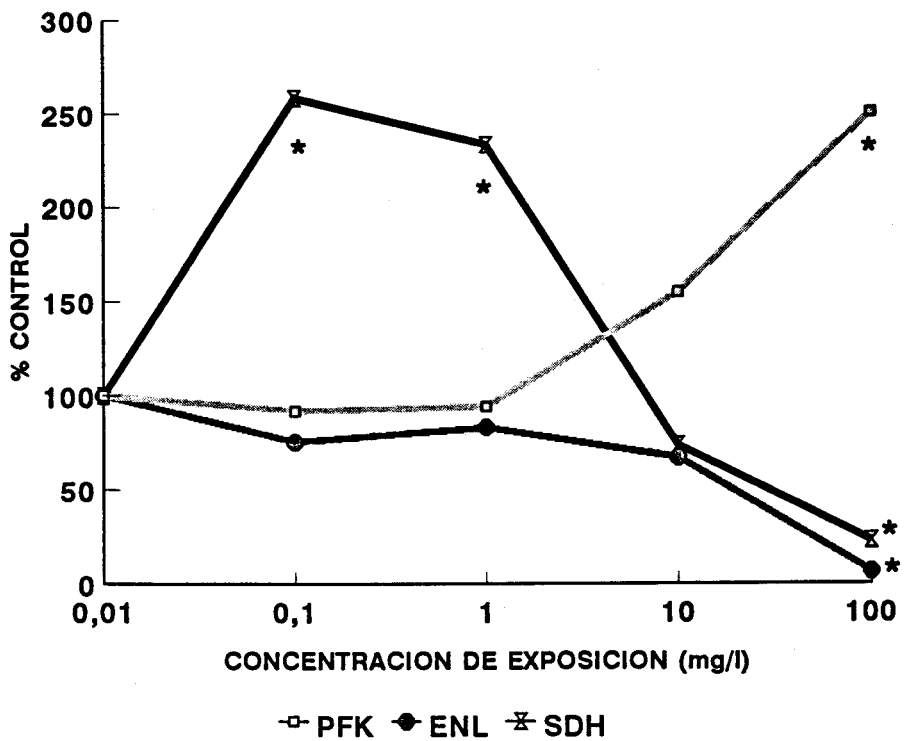


Fig. 5.- Efecto de la clorpromazina sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

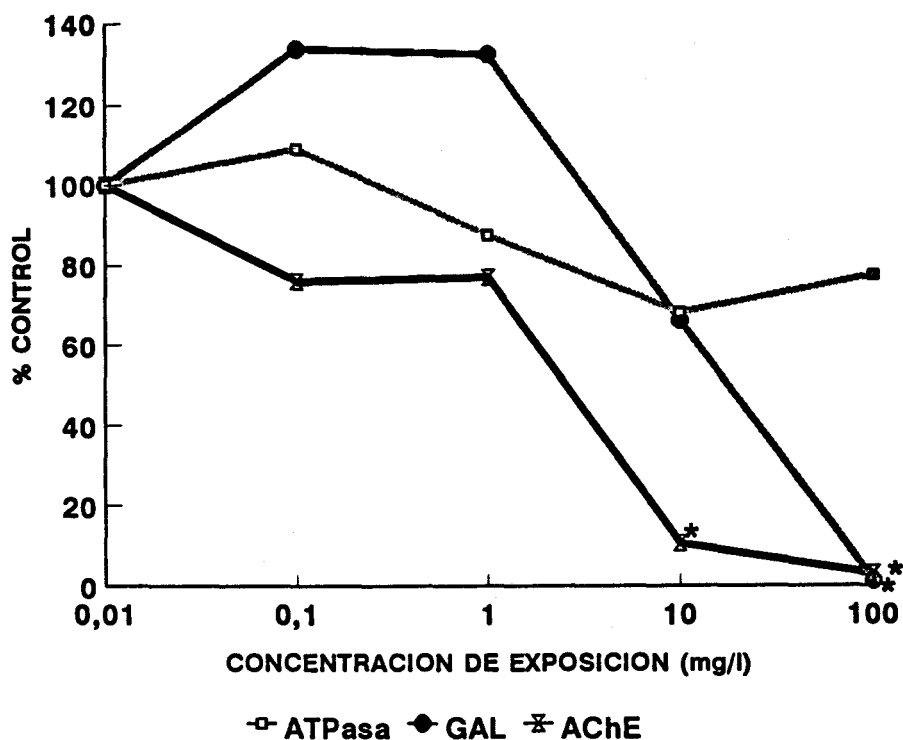


Fig. 6.- Efecto de la clorpromazina sobre las actividades absolutas de ATPase, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

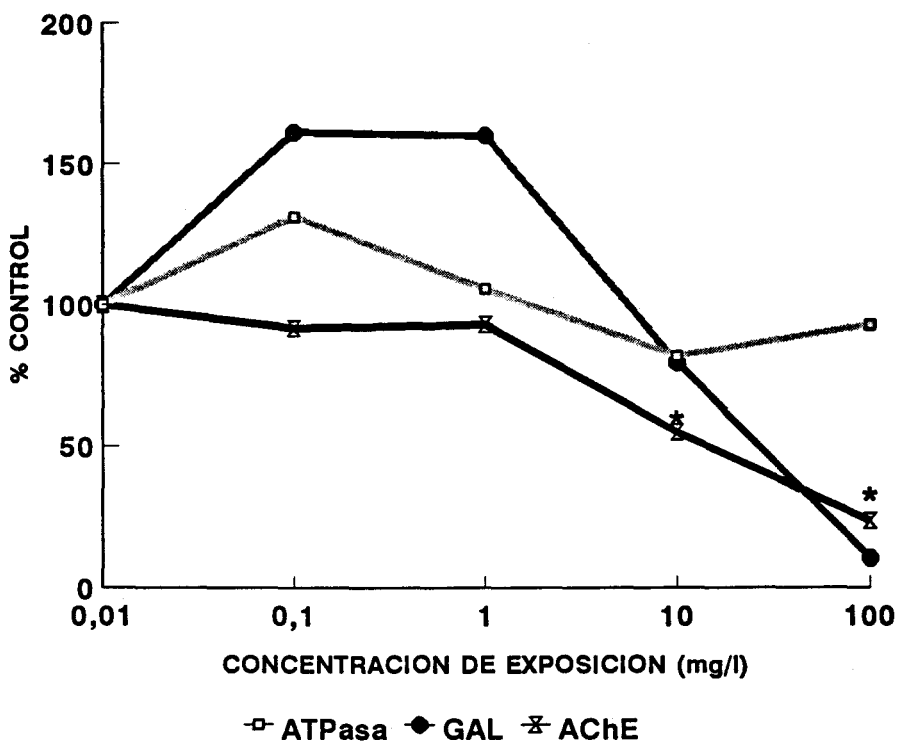


Fig. 7.- Efecto de la clorpromazina sobre las actividades relativas de ATPase, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

CICLOHEXIMIDA

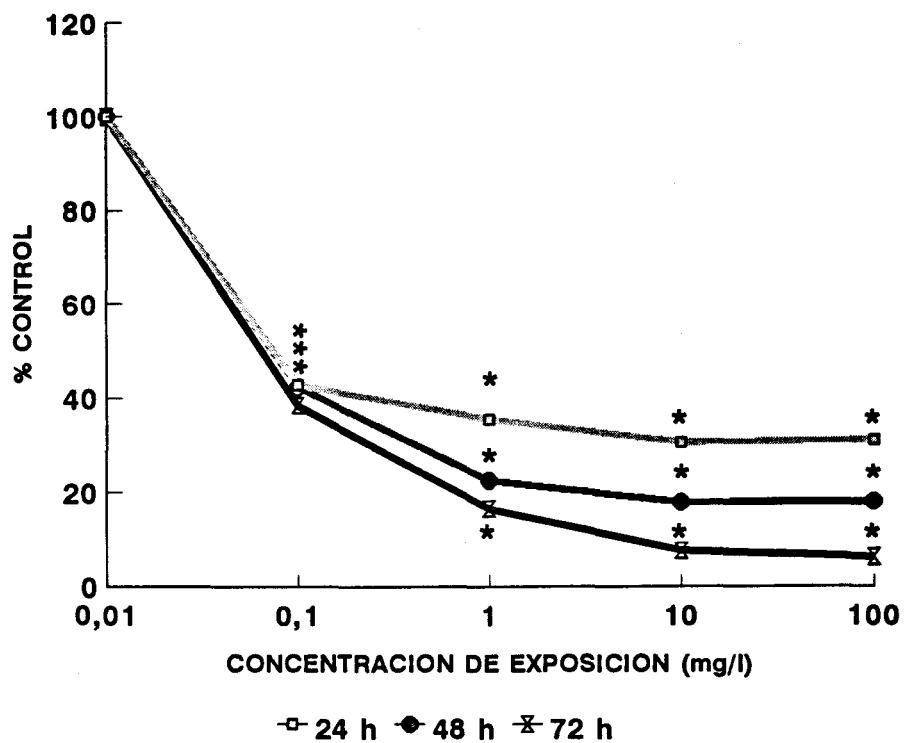


Fig. 8.- Efecto de la cicloheximida sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

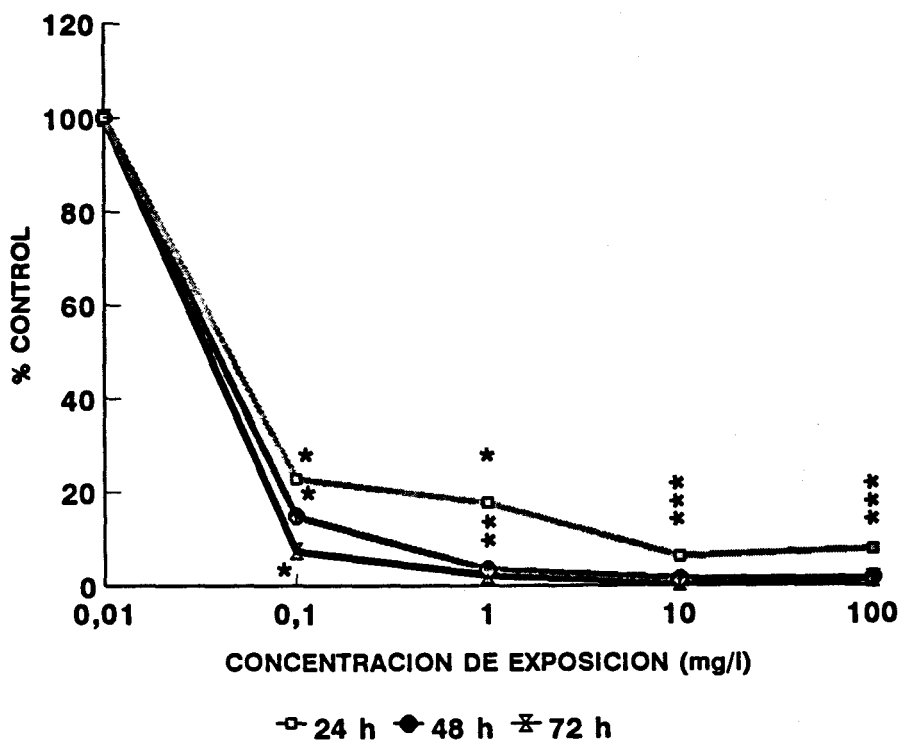


Fig. 9.- Efecto de la cicloheximida sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

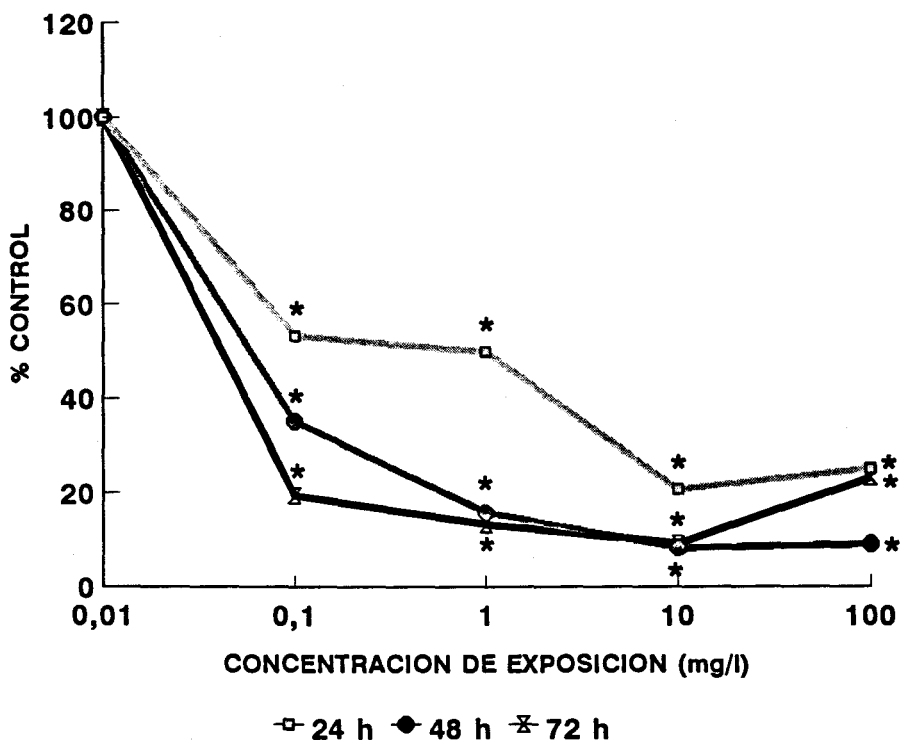


Fig. 10.- Efecto de la cicloheximida sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

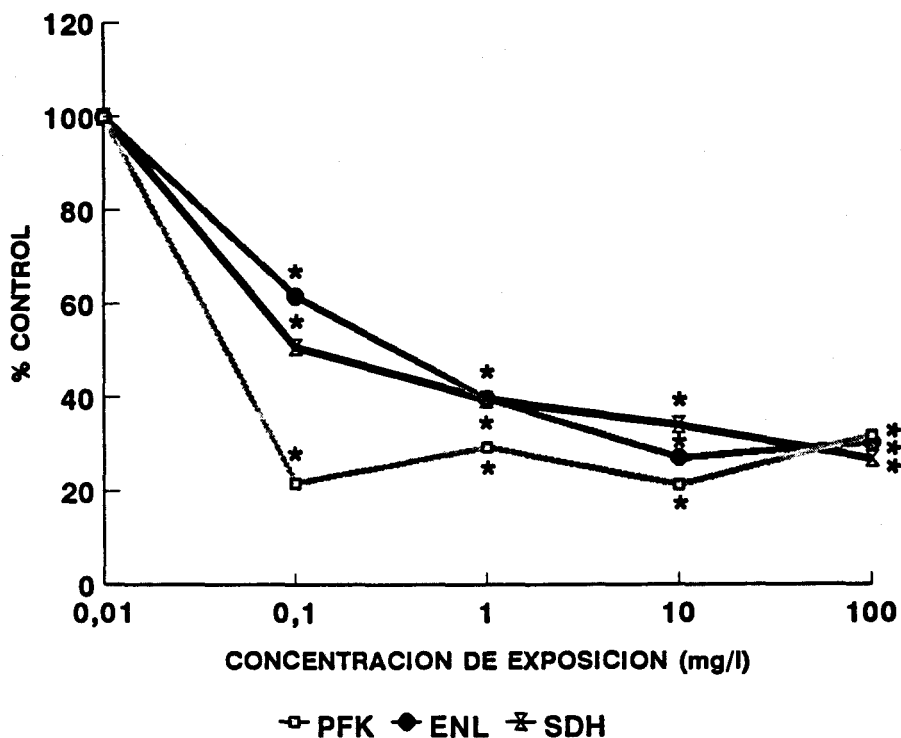


Fig. 11.- Efecto de la cicloheximida sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

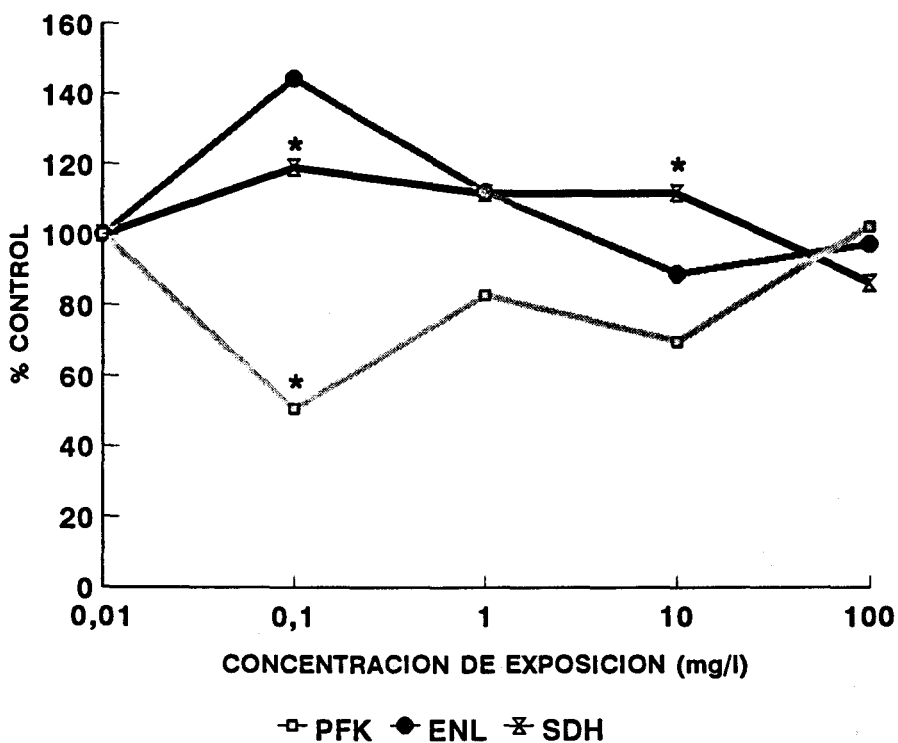


Fig. 12.- Efecto de la cicloheximida sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma tras 24 h de exposición.

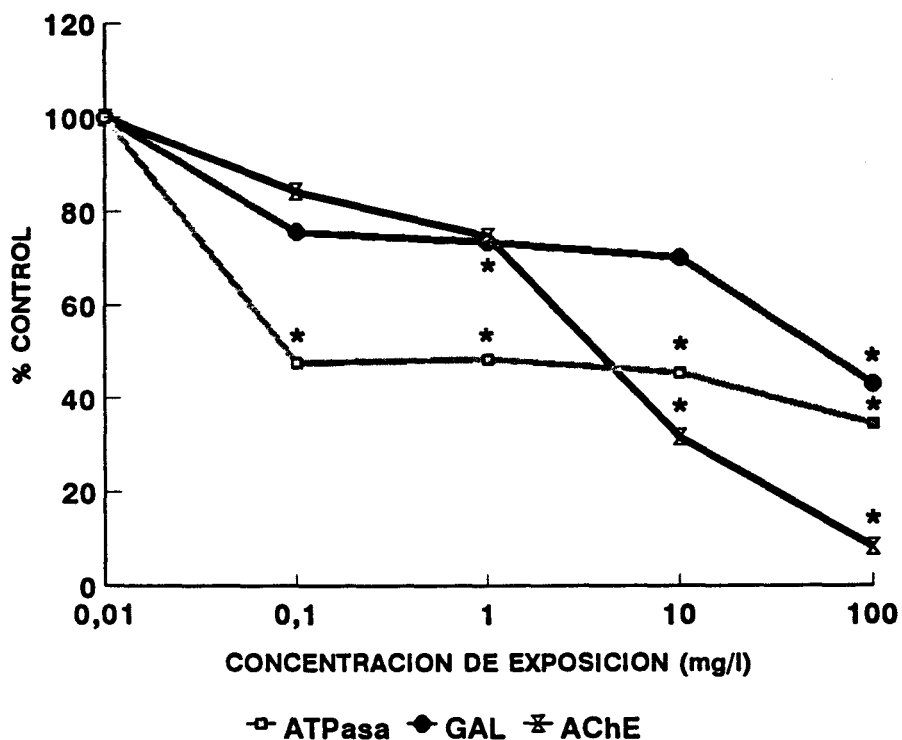


Fig. 13.- Efecto de la cicloheximida sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

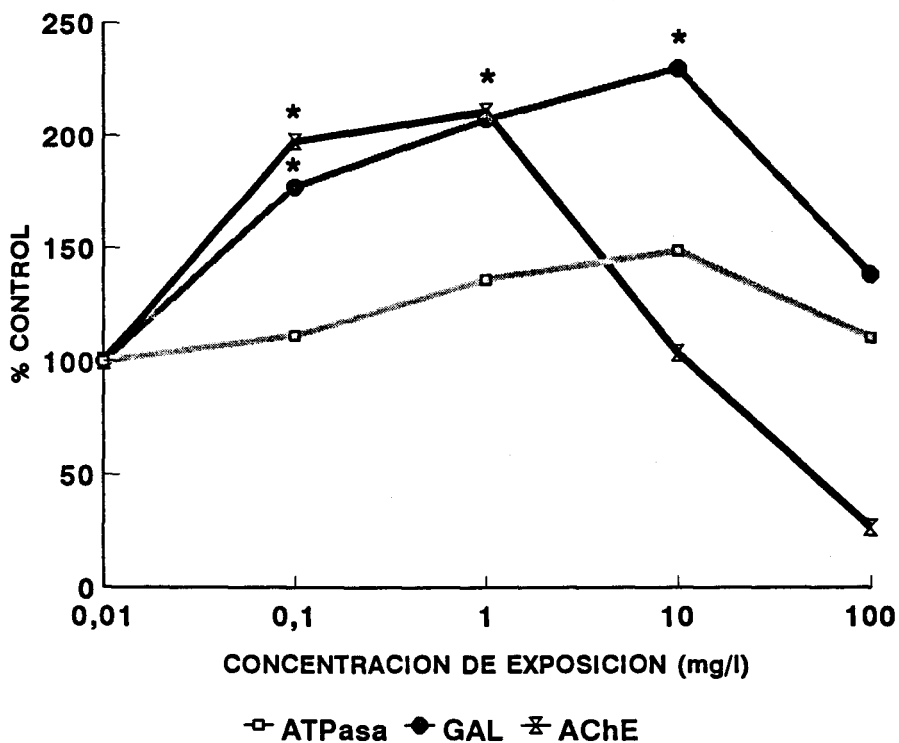


Fig. 14.- Efecto de la cicloheximida sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

DINITROFENOL

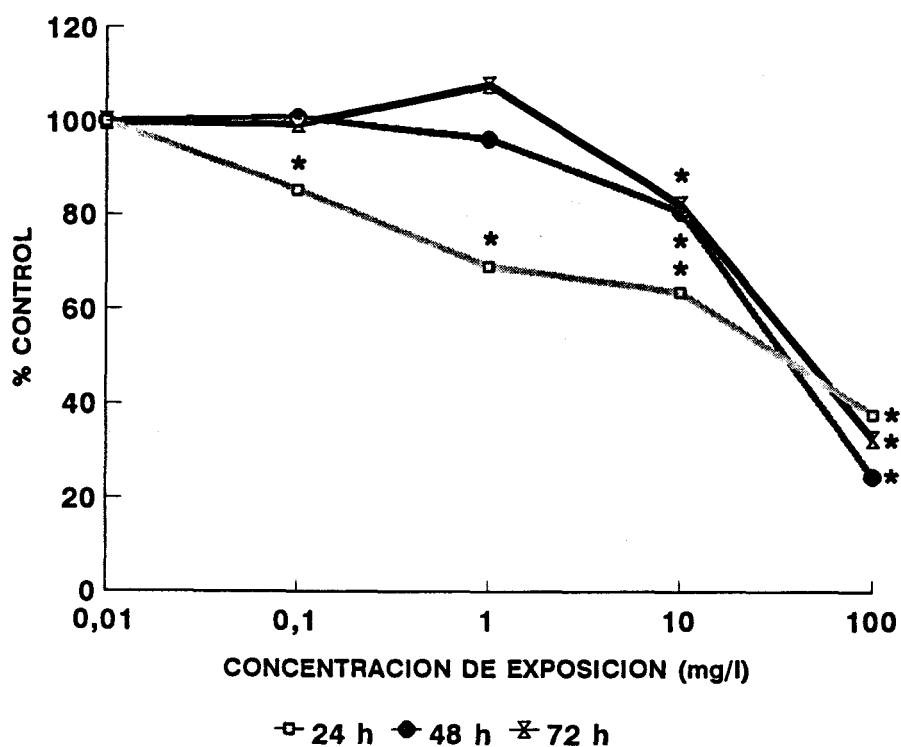


Fig. 15.- Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

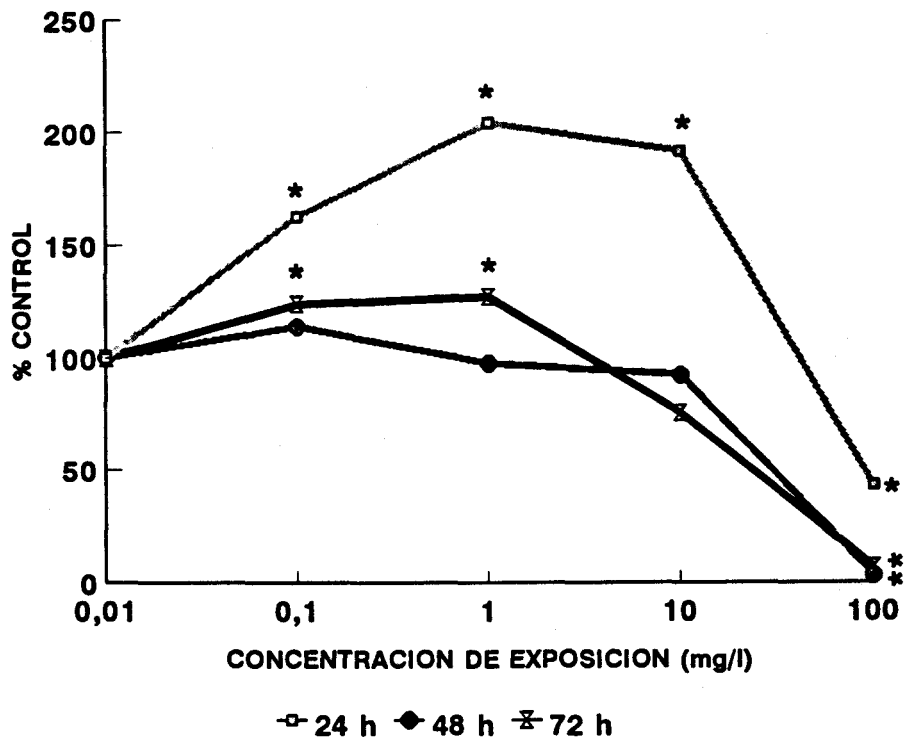


Fig. 16.- Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

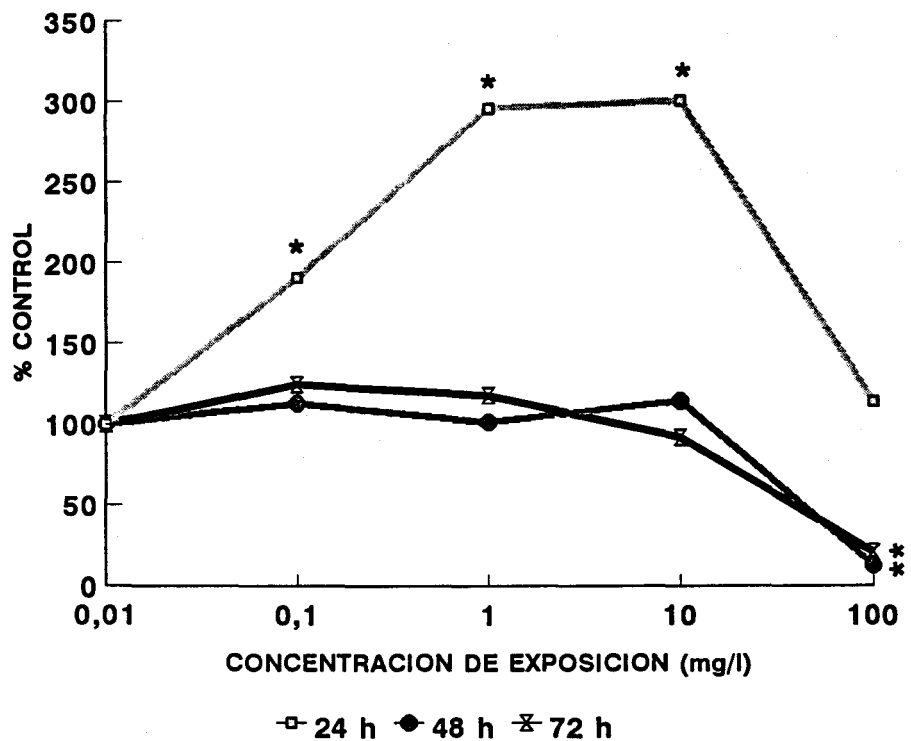


Fig. 17.- Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

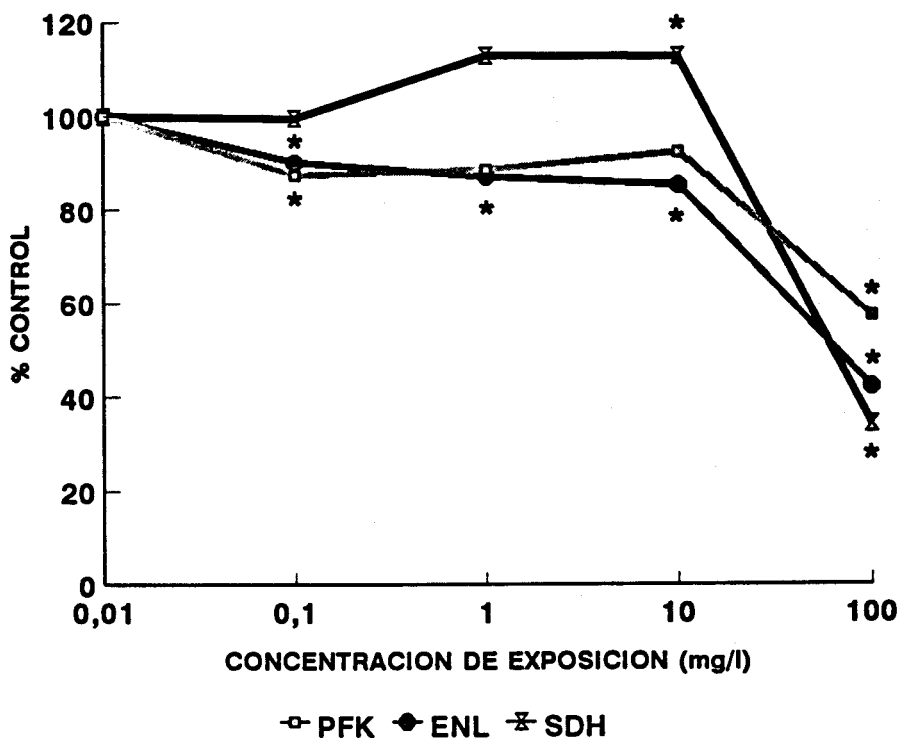


Fig. 18.- Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

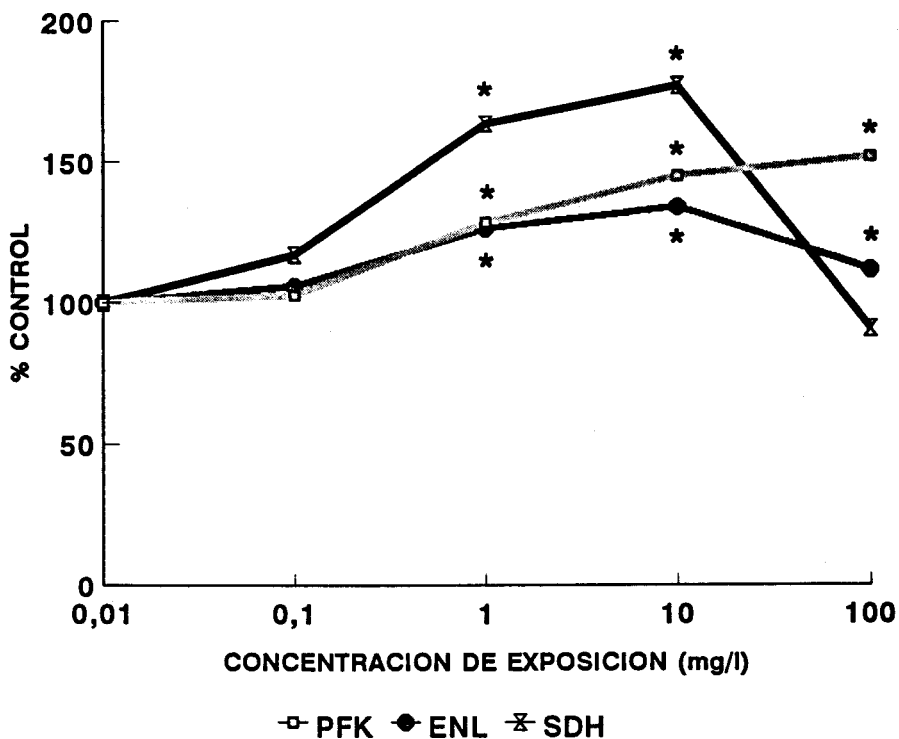


Fig. 19.- Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

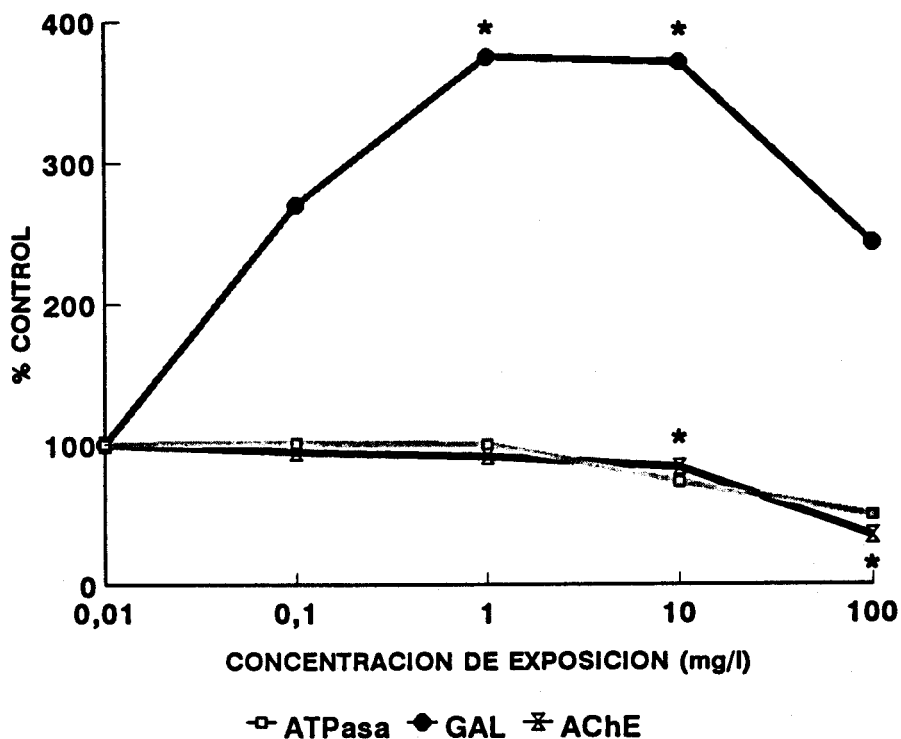


Fig. 20.- Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

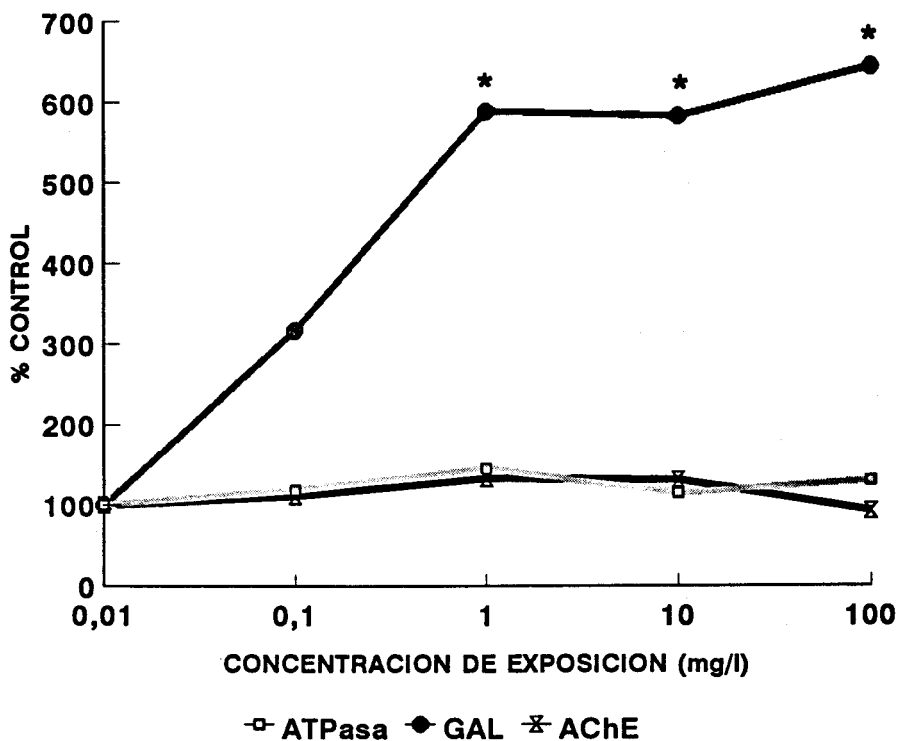


Fig. 21.- Efecto del 2,4-dinitrofenol sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

ACIDO IODOACETICO

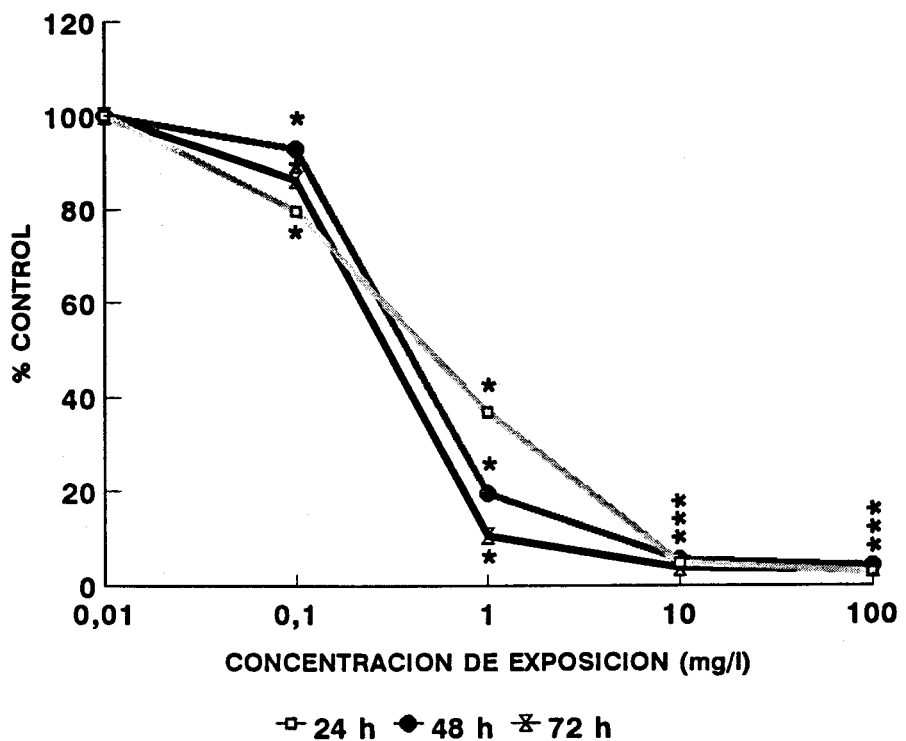


Fig. 22.- Efecto del ácido iodoacético sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

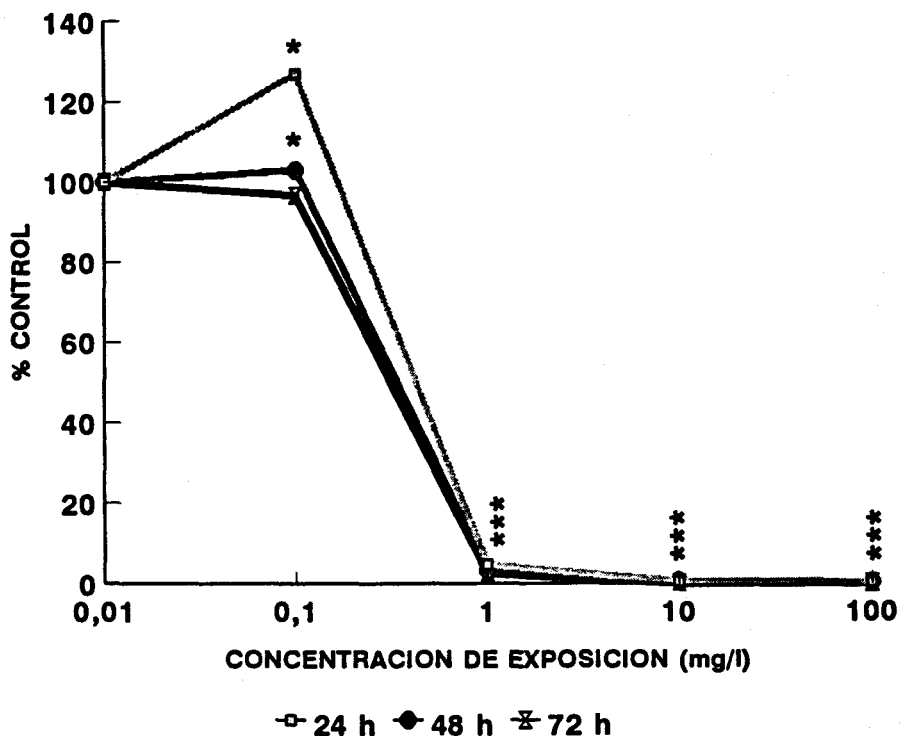


Fig. 23.- Efecto del ácido iodoacético sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

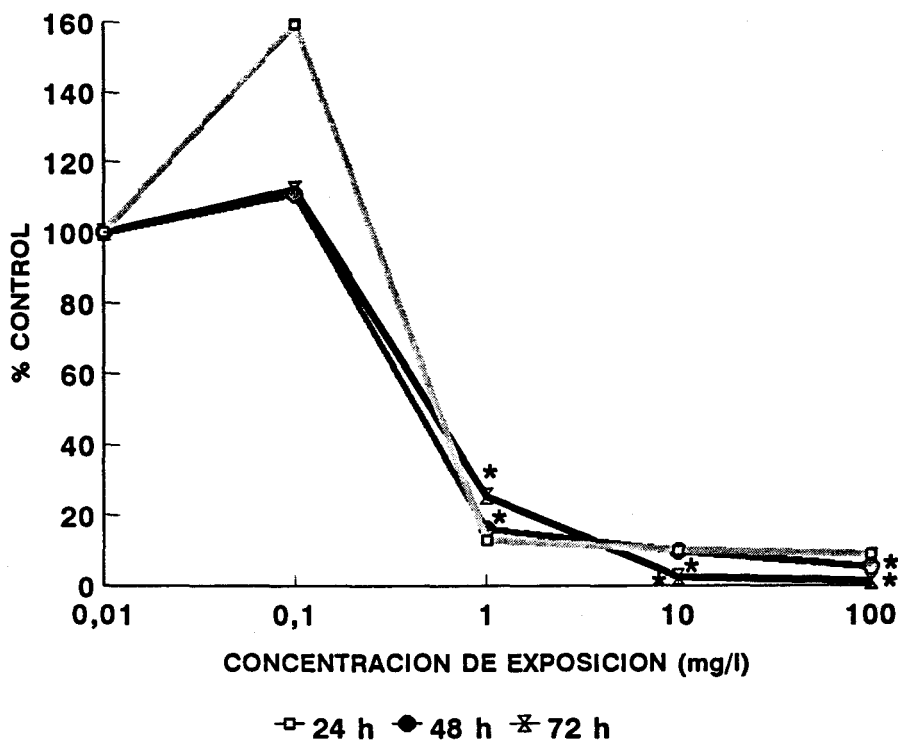


Fig. 24.- Efecto del ácido iodoacético sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

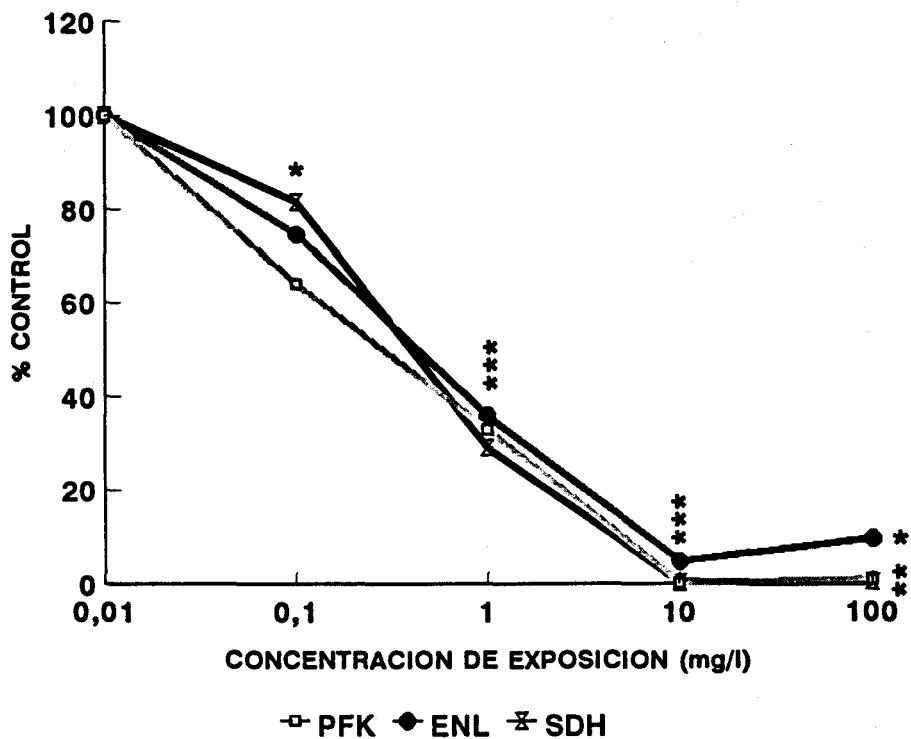


Fig. 25.- Efecto del ácido iodoacético sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

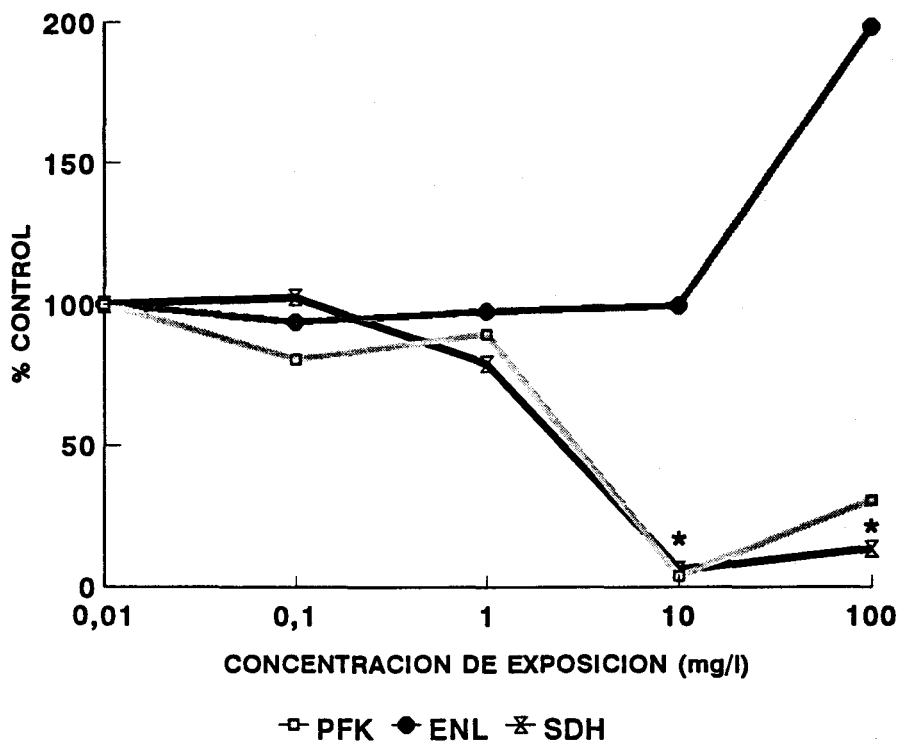


Fig. 26.- Efecto del ácido iodoacético sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

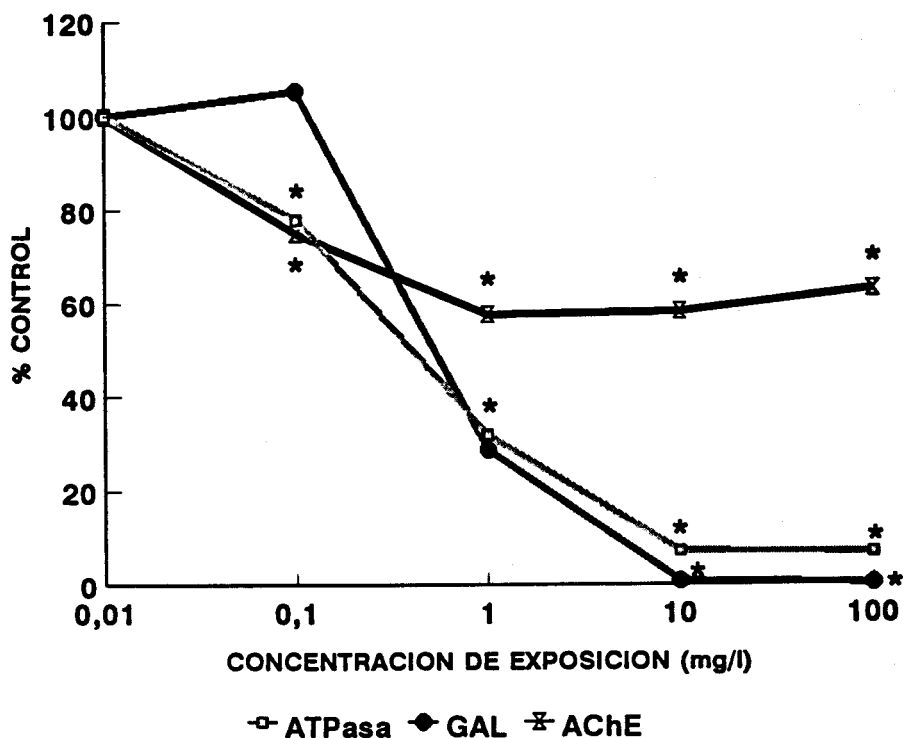


Fig. 27.- Efecto del ácido iodoacético sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

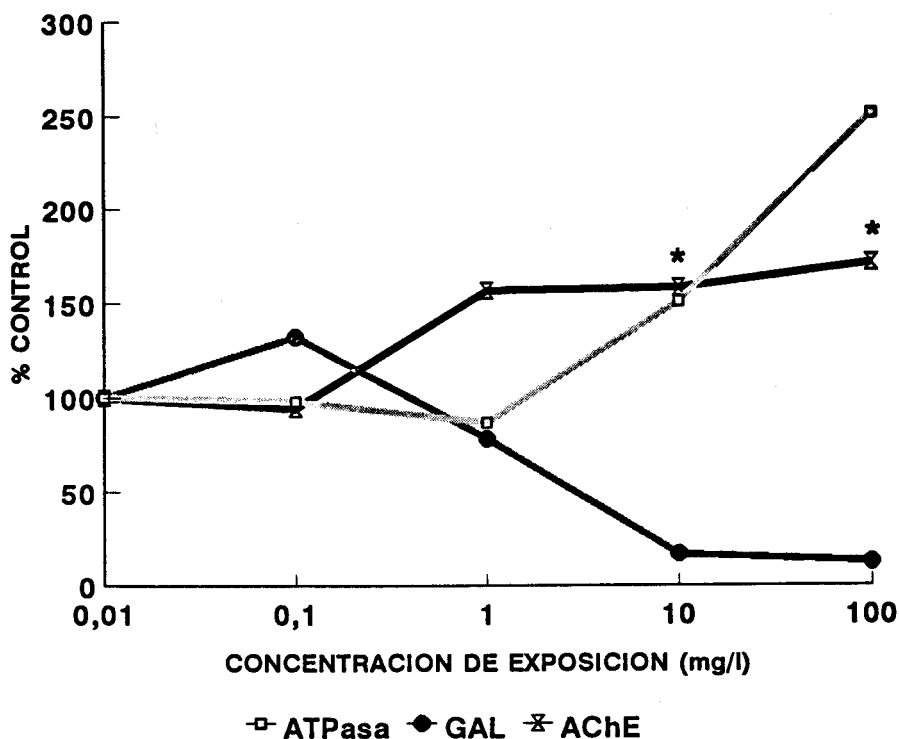


Fig. 28.- Efecto del ácido iodoacético sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

ACIDO KAINICO

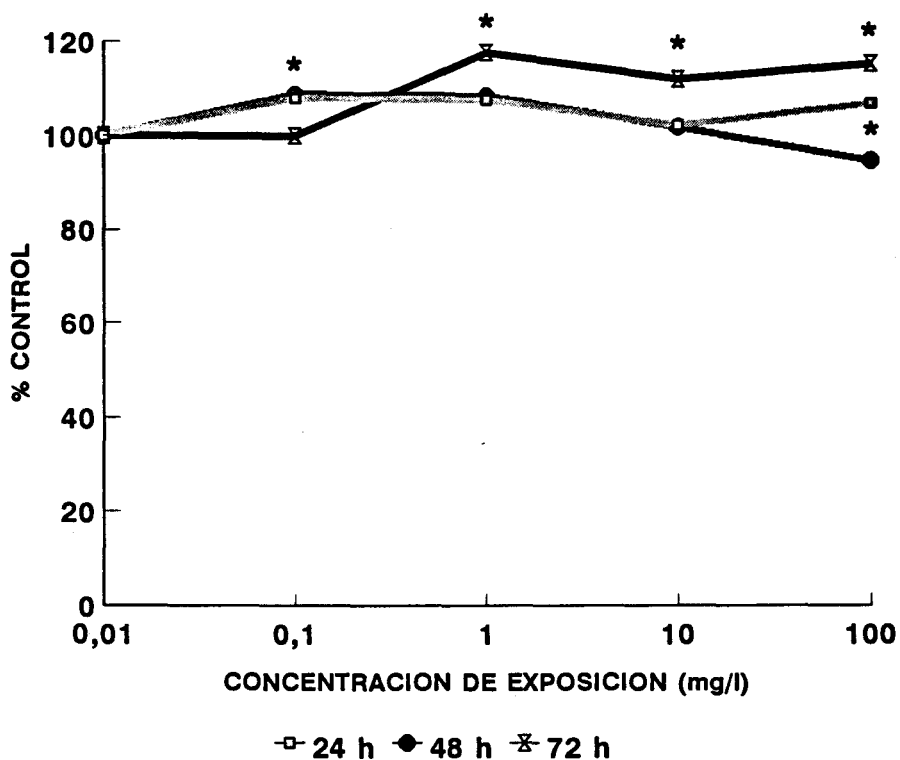


Fig. 29.- Efecto del ácido kaínico sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

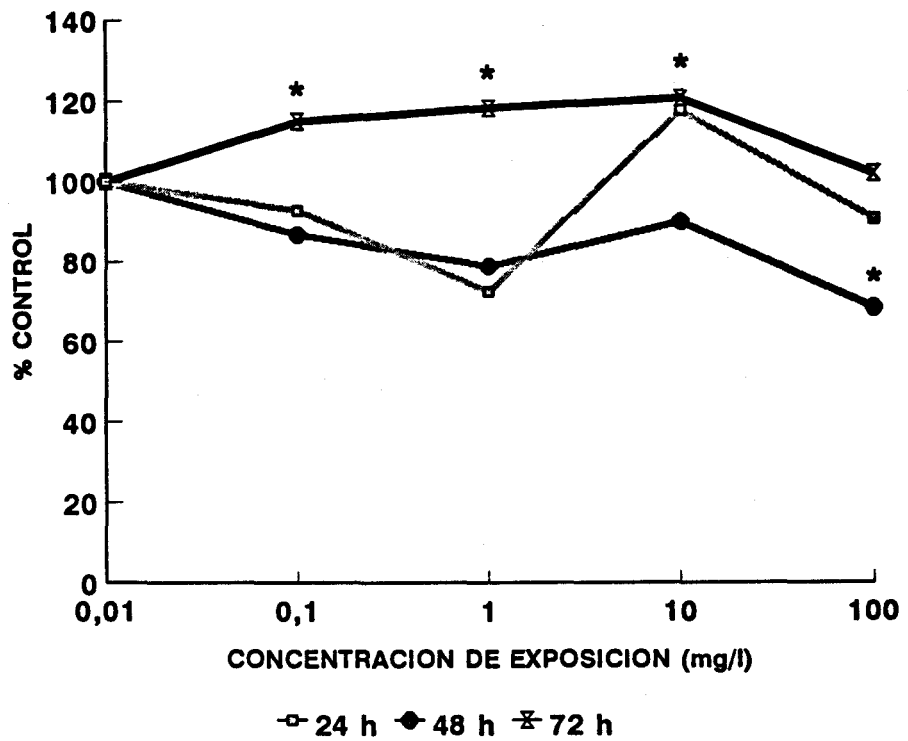


Fig. 30.- Efecto del ácido kaínico sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

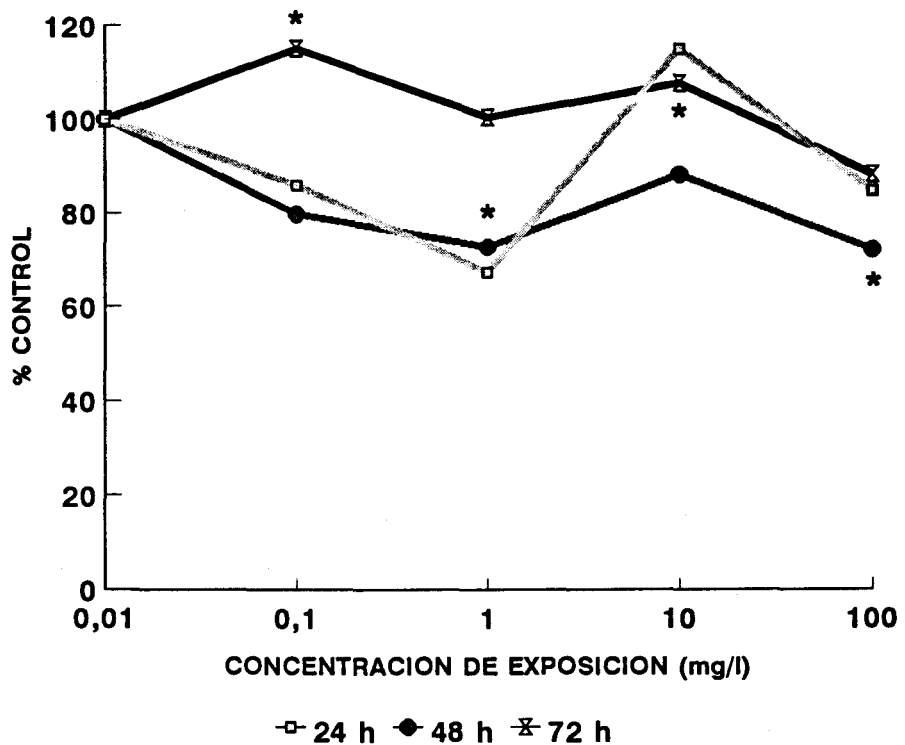


Fig. 31.- Efecto del ácido kaínico sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

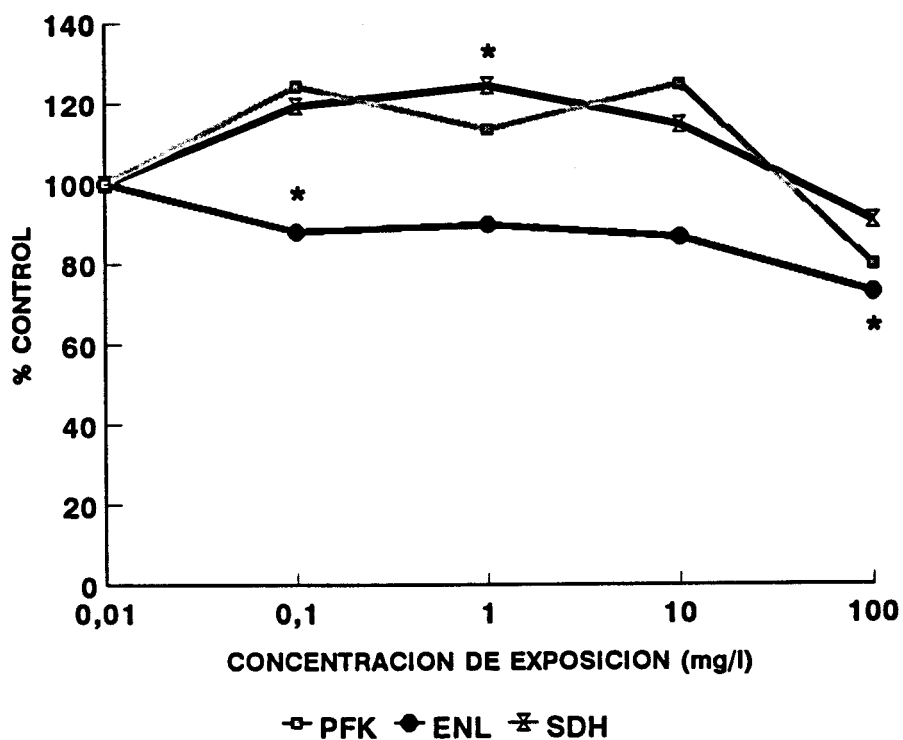


Fig. 32.- Efecto del ácido kaínico sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

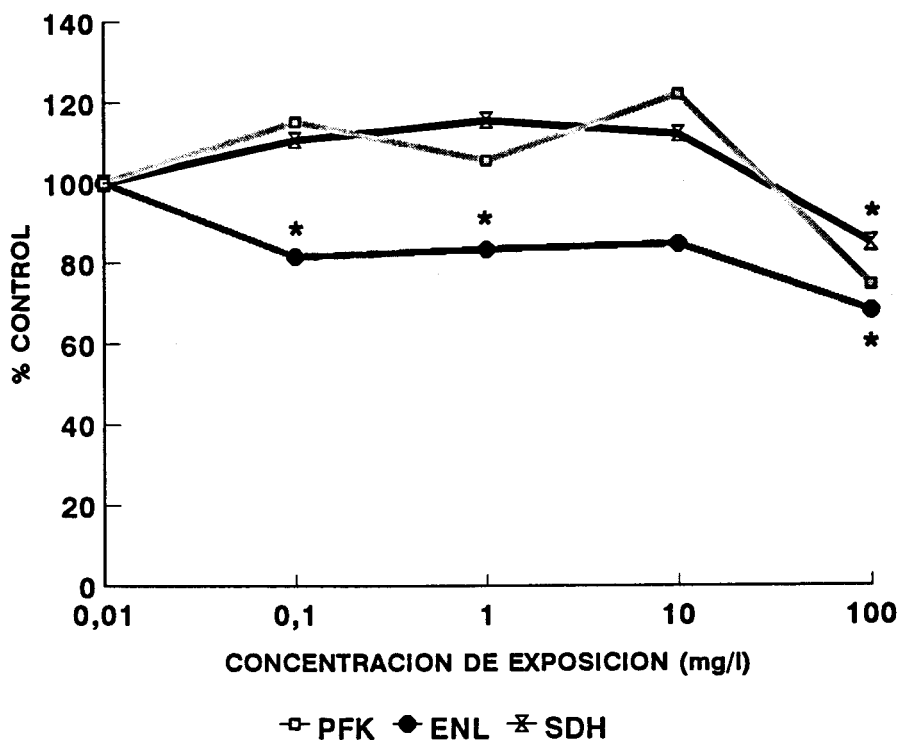


Fig. 33.- Efecto del ácido kaínico sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

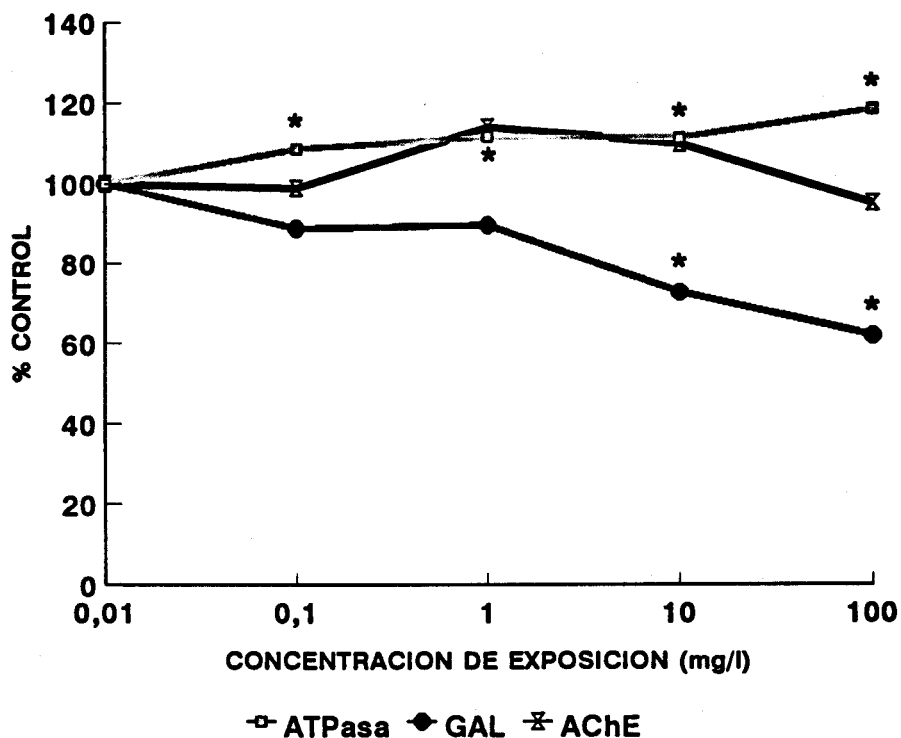


Fig. 34.- Efecto del ácido kaínico sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

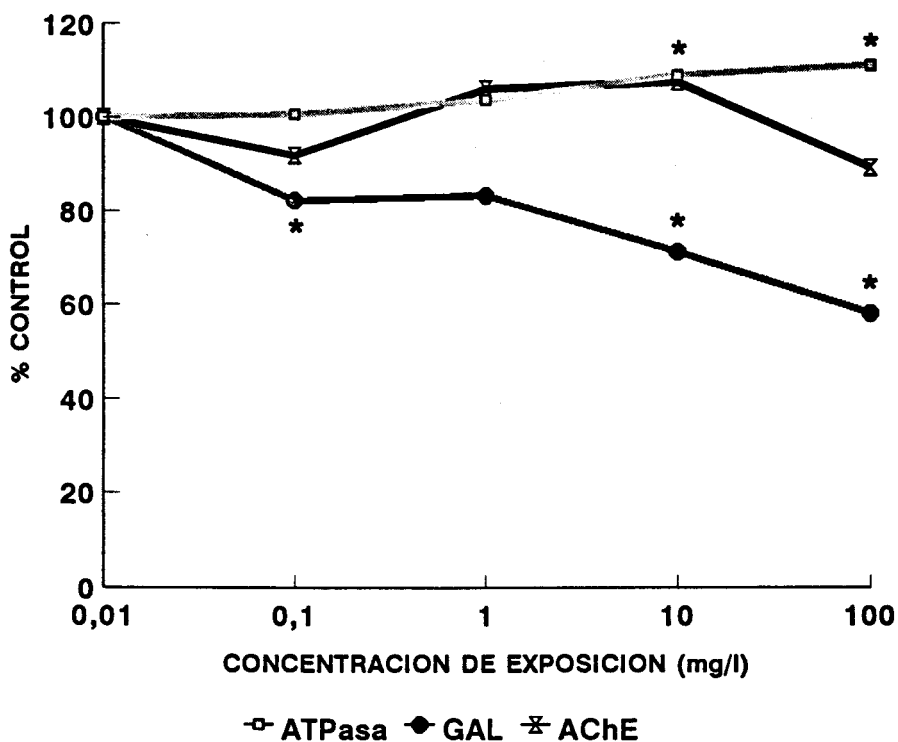


Fig. 35.- Efecto del ácido kaínico sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

OUABAINA

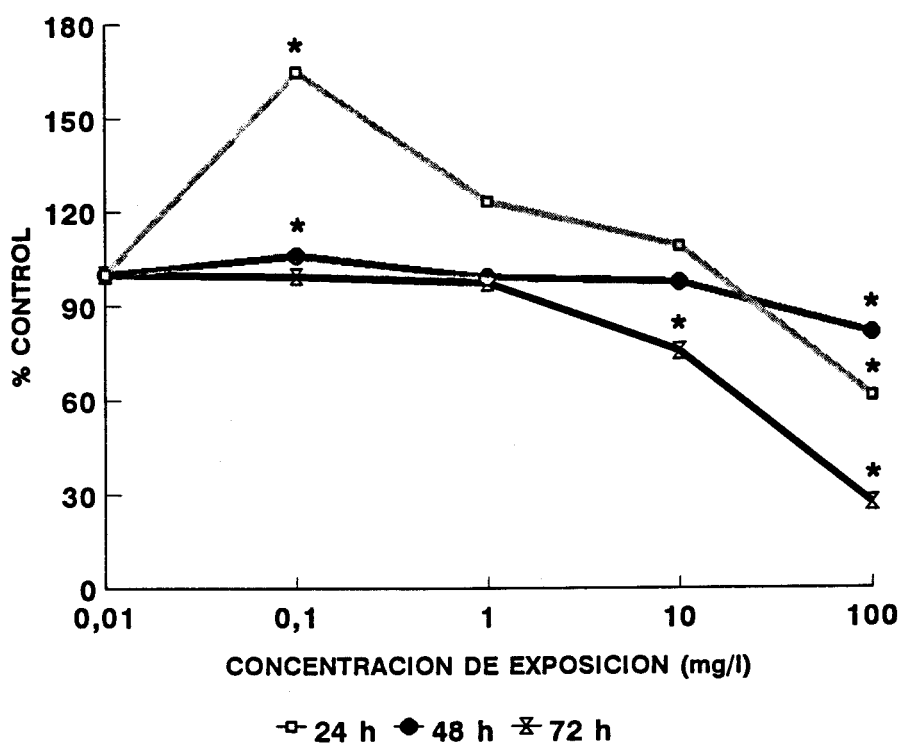


Fig. 36.- Efecto de la ouabaína sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

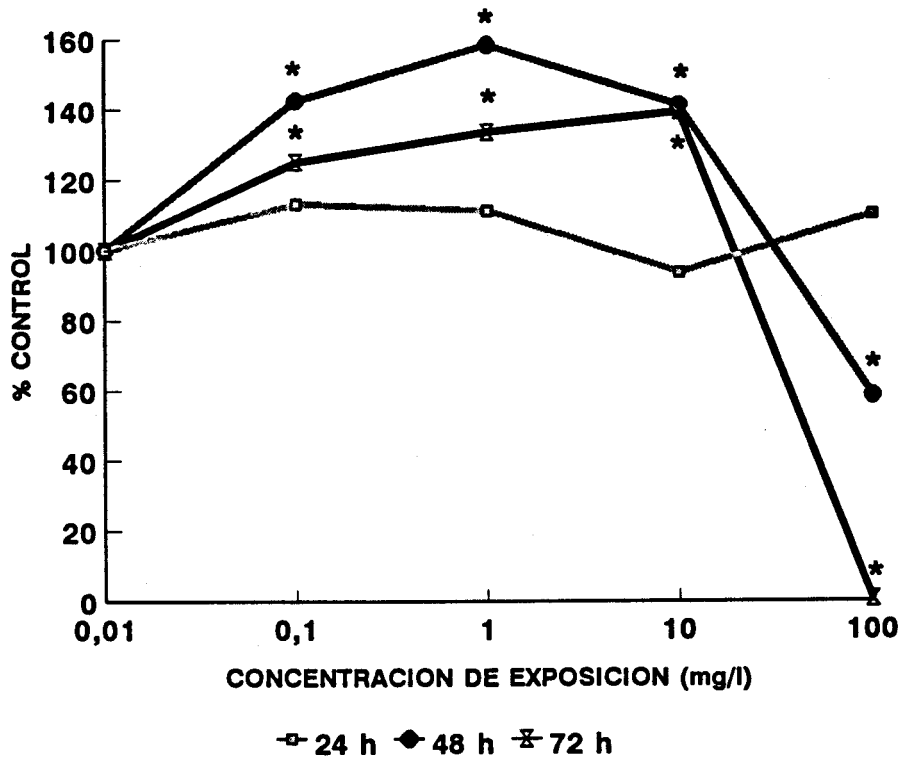


Fig. 37.- Efecto de la ouabaína sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

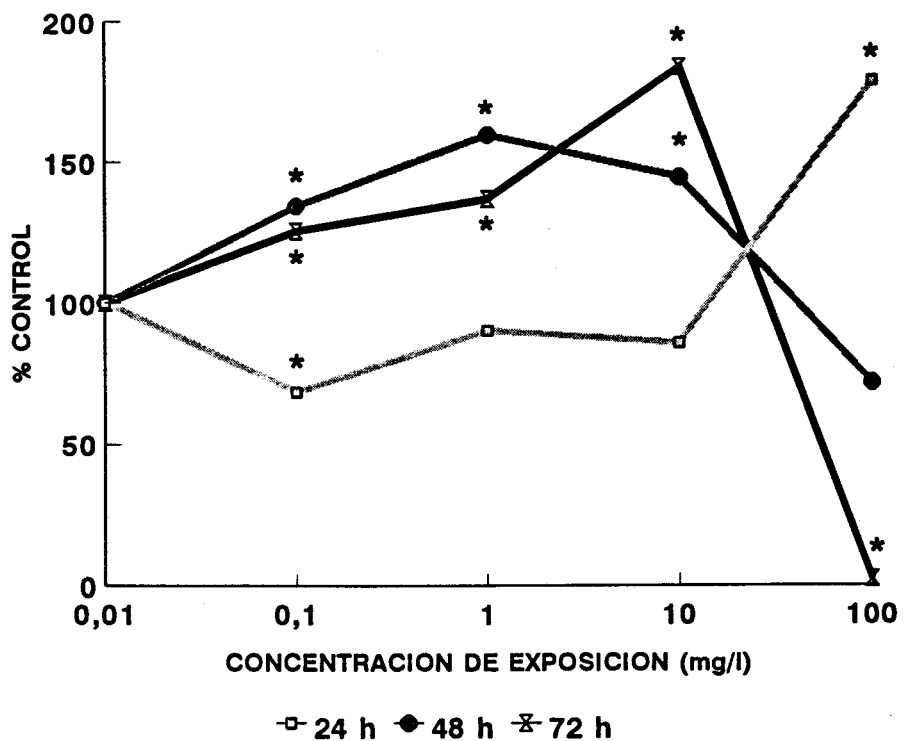


Fig. 38.- Efecto de la ouabaína sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

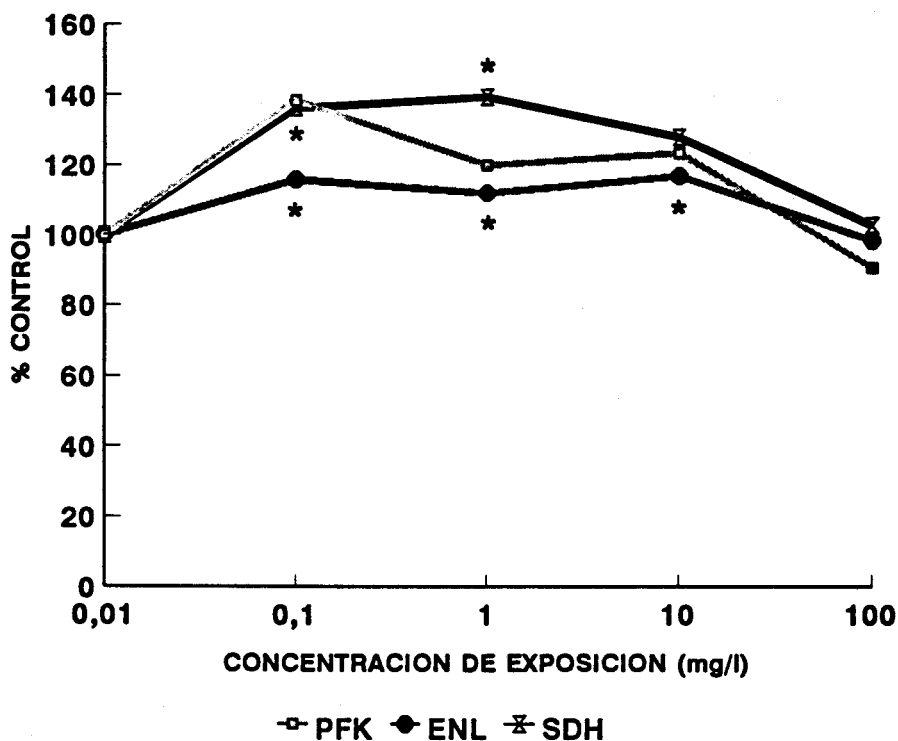


Fig. 39.- Efecto de la ouabaína sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

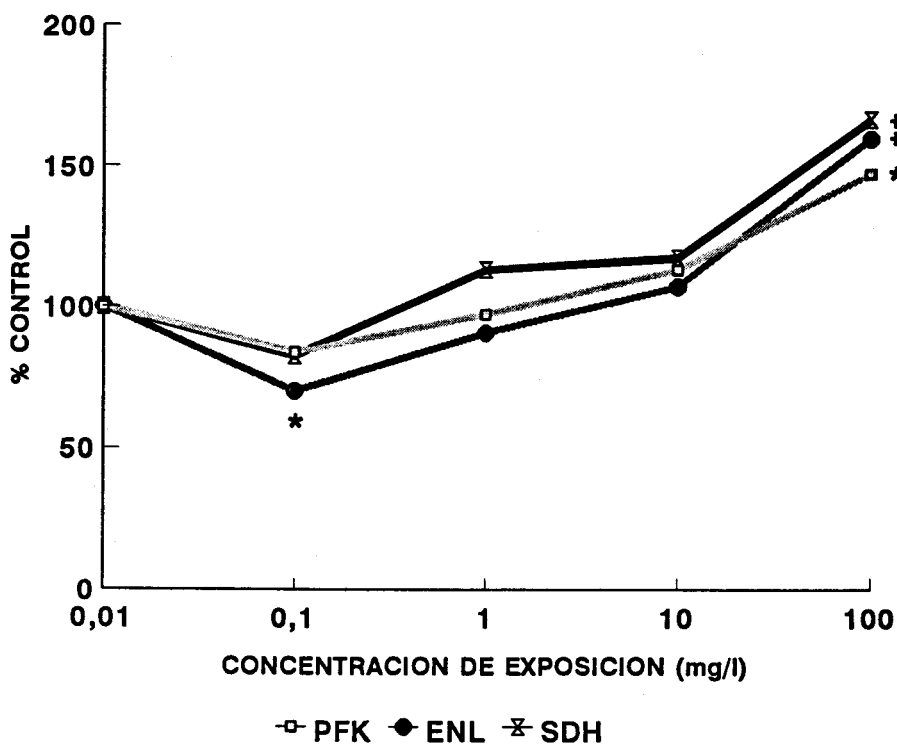


Fig. 40.- Efecto de la ouabaína sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

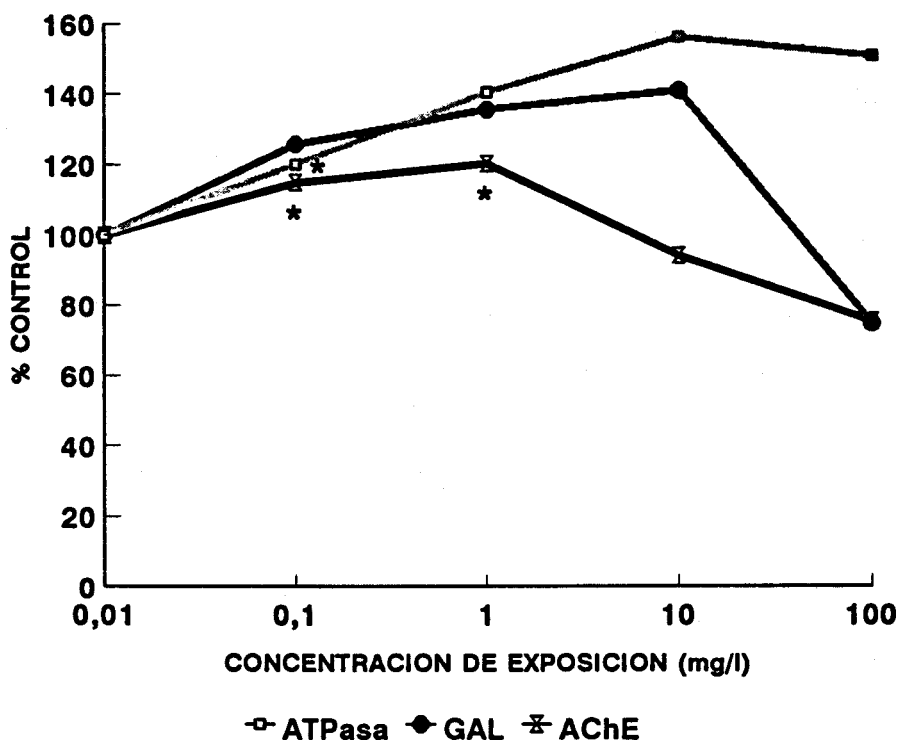


Fig. 41.- Efecto de la ouabaína sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

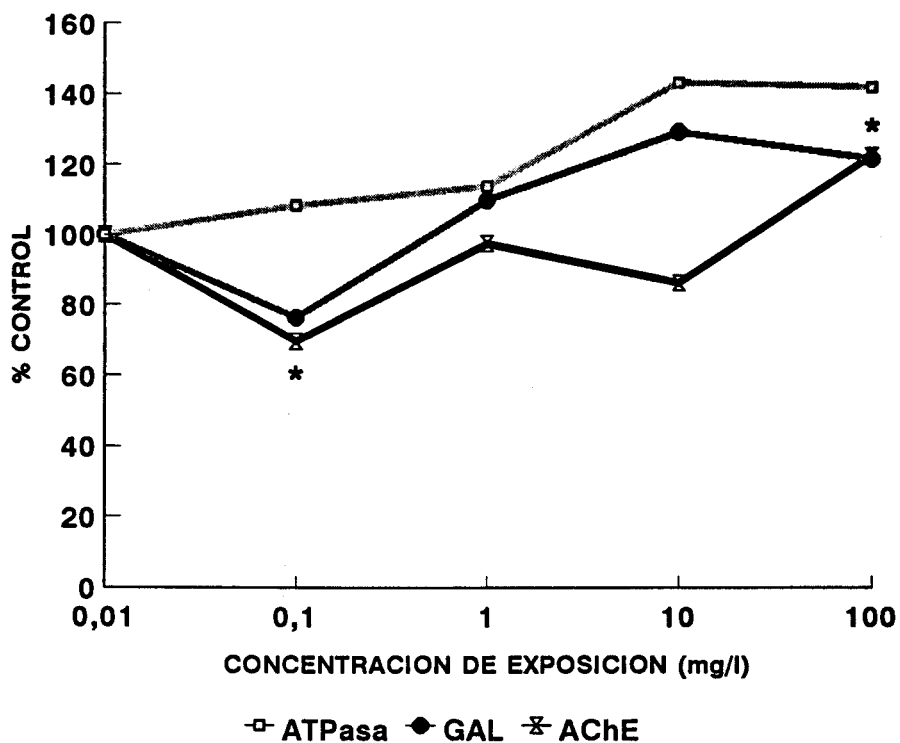


Fig. 42.- Efecto de la ouabaína sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición.

Tabla 2: Concentraciones Efectivas Medias (CE-50) obtenidas *in vitro* para los diferentes indicadores de toxicidad (mg/l)

	Clorpro- mazina	Ciclohe- ximida	Dinitro- fenol	Ac Iodo- acético	Ac Kaí- nico	Ouabaí- na
PR24	3.3	0.08	30	0.5	> 100	> 100
PR48	3.3	0.08	31	0.4	> 100	> 100
PR72	3.3	0.07	40	0.3	> 100	31
RN24	1.5	0.045	90	0.41	> 100	> 100
RN48	3.5	0.04	30	0.31	> 100	> 100
RN72	3.2	0.035	21	0.3	> 100	43
CRRN24	2	1	> 100	0.54	> 100	> 100
CRRN48	3.1	0.06	42	0.42	> 100	> 100
CRRN72	3.5	0.041	40	0.5	> 100	53
PFK	3.2	0.042	> 100	0.28	> 100	> 100
ENL	2	0.35	70	0.31	> 100	> 100
SDH	6	0.13	68	0.39	> 100	> 100
PFK/PR	> 100	> 100	> 100	2.5	> 100	> 100
ENL/PR	35	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
SDH/PR	57	> 100	> 100	2.2	> 100	> 100
ATTO	> 100	0.08	50	0.43	> 100	> 100
GAL	18	53	> 100	0.51	> 100	> 100
AChE	2.6	3.8	50	> 100	> 100	> 100
ATTO/PR	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
GAL/PR	71	> 100	> 100	5	> 100	> 100
AChE/PR	12	50	> 100	> 100	> 100	> 100

CLORPROMAZINA

Tabla 3: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la clorpromazina sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	PR24			PR48			PR72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	4.42	1.67	100.00	10.49	3.71	100.00	2.28	0.86
0.1	83.03	10.92	2.82	94.23	14.77	3.81	100.45	3.06	0.79
1	82.81	11.38	2.94	101.90	10.47	2.70	98.38	4.08	1.05
10	19.45	6.16	1.54	6.22	1.52	0.38	6.39	2.23	0.56
100	12.54	4.78	1.19	7.88	1.78	0.44	5.43	1.39	0.35

Tabla 4: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la clorpromazina sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	RN24			RN48			RN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	25.63	9.06	100.00	22.94	8.11	100.00	15.85	5.60
0.1	53.11	13.64	3.52	129.63	54.79	13.69	119.78	16.11	4.15
1	57.88	26.43	6.82	108.90	47.41	11.85	101.18	10.28	2.65
10	1.05	0.71	0.17	0.26	1.08	0.26	0.11	0.40	0.10
100	0.69	1.82	0.45	0.09	0.69	0.17	0.05	0.36	0.09

Tabla 5: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la clorpromazina sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	CRRN24			CRRN48			CRRN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	25.63	9.06	100.00	22.94	8.11	100.00	15.85	5.60
0.1	63.99	16.44	4.24	137.58	58.15	14.54	119.25	16.03	4.14
1	69.92	31.93	8.24	106.86	46.52	11.63	102.85	10.45	2.70
10	5.45	3.67	0.91	4.30	17.63	4.40	1.82	6.41	1.60
100	5.58	14.66	3.66	1.23	8.89	2.22	0.98	6.81	1.70

Tabla 6: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la clorpromazina sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK			ENL			SDH		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	14.45	5.46	100.00	28.43	10.05	100.00	13.81	4.88
0.1	76.12	15.25	3.93	62.49	7.91	2.04	214.46	29.43	7.35
1	77.81	29.67	7.41	68.81	6.79	1.81	193.13	41.13	10.28
10	29.95	33.97	8.49	12.95	5.55	1.38	14.26	5.52	1.38
100	48.43	11.17	2.98	0.80	5.32	1.37	2.86	1.36	0.34

Tabla 7: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la clorpromazina sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK/PR			ENL/PR			SDH/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	14.45	5.46	100.00	28.42	10.05	100.00	13.81	4.88
0.1	91.70	18.37	4.74	75.28	9.53	2.46	258.38	35.45	8.86
1	94.00	35.84	8.96	83.12	8.20	2.19	233.29	49.67	12.42
10	155.01	43.97	10.09	67.02	28.75	7.19	73.81	28.57	7.14
100	250.38	90.02	24.05	6.49	42.90	11.07	23.09	10.96	2.74

Tabla 8: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la clorpromazina sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO			GAL			AChE		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	23.88	9.05	100.00	90.41	31.96	100.00	8.38	2.96
0.1	108.97	41.92	10.82	133.79	76.51	19.13	75.99	14.58	3.64
1	87.45	31.96	8.25	132.46	92.03	23.01	76.91	8.41	2.10
10	68.11	67.44	16.86	66.09	94.36	23.59	10.60	4.57	1.18
100	77.32	70.84	17.71	1.27	80.27	20.06	2.91	2.95	0.73

Tabla 9: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la clorpromazina sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO/PR			GAL/PR			AChE/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	43.88	11.05	100.00	40.40	13.90	100.00	8.38	2.96
0.1	131.29	50.51	13.04	161.19	92.17	23.04	91.55	17.56	4.39
1	105.63	38.61	9.96	160.00	90.17	22.7	92.90	10.16	2.54
10	81.73	348.93	87.23	79.31	488.2	122.0	54.85	23.65	6.10
100	92.78	570.72	142.68	10.28	646.65	161.66	23.46	23.83	5.95

CICLOHEXIMIDA

Tabla 10: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la cicloheximida sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	PR24			PR48			PR72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	13.17	4.97	100.00	8.43	2.98	100.00	10.79	4.08
0.1	42.78	5.20	1.34	42.30	5.94	1.53	38.44	9.30	2.32
1	35.54	5.01	1.33	22.51	4.92	1.27	16.52	9.23	2.38
10	30.64	7.88	2.03	17.84	4.69	1.25	7.52	2.73	0.70
100	31.17	8.25	2.06	18.01	4.53	1.17	6.18	3.98	1.06

Tabla 11: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la cicloheximida sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	RN24			RN48			RN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	28.53	10.16	100.00	16.08	5.68	100.00	25.94	9.17
0.1	22.71	6.44	1.66	14.79	6.74	1.74	7.44	6.14	1.53
1	17.64	7.97	1.99	3.51	1.81	0.45	2.17	1.23	0.31
10	6.31	3.12	0.78	1.46	0.92	0.23	0.68	1.46	0.36
100	7.74	4.45	1.11	1.61	1.06	0.26	1.40	2.84	0.73

Tabla 12: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la cicloheximida sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	CRRN24			CRRN48			CRRN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	28.53	11.16	100.00	16.08	5.68	100.00	25.94	9.17
0.1	53.21	15.11	3.90	35.04	15.97	4.12	19.39	16.00	4.00
1	49.81	22.51	5.62	15.69	8.11	2.03	13.24	7.53	1.88
10	20.69	10.24	2.55	8.27	5.22	1.30	9.18	19.71	4.92
100	24.95	14.34	3.58	8.99	5.91	1.47	23.07	46.78	12.07

Tabla 13: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la cicloheximida sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK			ENL			SDH		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	29.89	11.64	100.00	20.02	7.56	100.00	11.64	4.39
0.1	21.63	21.19	5.47	61.56	33.87	8.46	50.75	9.45	2.36
1	29.31	16.34	4.08	39.65	13.87	3.70	39.52	6.22	1.55
10	21.27	16.65	4.30	27.06	9.62	2.40	34.05	6.26	1.56
100	31.65	11.14	2.87	30.13	11.60	3.10	26.73	7.12	1.78

Tabla 14: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la cicloheximida sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK/PR			ENL/PR			SDH/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	29.87	11.64	100.00	20.02	7.56	100.00	11.64	4.39
0.1	50.70	49.65	12.82	144.26	79.37	19.84	118.95	22.16	5.54
1	82.77	46.13	11.53	111.97	39.17	10.47	111.61	17.56	4.39
10	69.73	54.58	14.09	88.68	31.54	7.88	111.59	20.51	5.13
100	101.97	35.90	9.26	97.08	37.37	9.98	86.13	22.95	5.73

Tabla 15: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la cicloheximida sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO			GAL			AChE		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	33.56	11.86	100.00	23.48	8.30	100.00	10.02	3.54
0.1	47.55	19.25	4.97	75.63	25.65	6.41	84.22	18.01	4.50
1	48.26	17.18	4.59	73.43	24.08	6.21	74.69	21.42	5.53
10	45.37	23.39	6.04	70.07	19.96	5.15	31.62	22.19	5.73
100	34.30	18.12	4.68	42.92	29.40	7.35	8.25	22.03	5.51

Tabla 16: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la cicloheximida sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO/PR			GAL/PR			AChE/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	33.56	11.86	100.00	23.48	8.30	100.00	10.02	3.54
0.1	111.43	45.12	11.65	177.25	60.12	15.03	197.37	42.21	10.55
1	136.27	48.52	12.96	207.34	68.01	17.56	210.89	60.48	15.61
10	148.68	76.65	19.79	229.62	65.43	16.89	103.64	72.72	18.77
100	110.51	58.39	15.07	138.26	94.72	23.68	26.58	70.99	17.74

DINITROFENOL

Tabla 17: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	PR24			PR48			PR72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	6.30	2.23	100.00	2.67	1.01	100.00	7.63	2.88
0.1	85.22	2.65	10.62	100.86	13.19	3.40	99.45	11.68	2.92
1	68.98	13.02	3.36	96.23	7.31	1.88	107.80	16.01	4.00
10	63.63	11.06	2.76	80.62	5.71	1.47	82.18	5.40	1.35
100	37.76	10.30	2.66	24.64	7.00	1.80	32.67	5.55	1.43

Tabla 18: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	RN24			RN48			RN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	18.43	6.96	100.00	37.30	13.18	100.00	19.69	6.96
0.1	162.59	38.92	10.04	113.85	24.04	6.20	123.81	36.64	9.46
1	203.99	50.27	12.98	97.47	19.88	5.13	127.02	35.08	8.77
10	191.19	35.58	9.51	92.25	19.42	5.01	75.47	24.54	6.13
100	42.92	16.89	4.36	3.05	1.23	0.30	6.76	9.91	2.47

Tabla 19: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	CRRN24			CRRN48			CRRN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	18.43	6.96	100.00	37.30	13.18	100.00	19.69	6.96
0.1	190.83	45.67	11.79	112.87	23.83	6.15	124.49	36.84	9.51
1	295.93	72.93	18.83	101.29	20.66	5.33	117.81	32.54	8.13
10	300.75	55.97	14.95	114.46	24.10	6.22	91.86	29.87	7.46
100	113.98	44.84	11.58	12.47	5.01	1.25	20.74	30.42	7.60

Tabla 20: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del 2,4-dinitrofenol sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK			ENL			SDH		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	8.74	3.30	100.00	3.79	1.34	100.00	10.17	3.84
0.1	87.31	13.78	3.55	90.05	6.14	1.53	99.52	13.34	3.44
1	88.45	11.60	2.99	86.91	4.03	1.04	112.79	12.37	3.30
10	92.10	8.26	2.06	85.08	5.76	1.44	112.57	15.23	3.93
100	57.12	11.07	2.76	42.00	3.93	0.98	34.14	6.41	1.65

Tabla 21: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del 2,4-dinitrofenol sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK/PR			ENL/PR			SDH/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	8.74	3.30	100.00	3.79	1.34	100.00	10.17	3.84
0.1	102.47	16.17	4.17	105.69	7.20	1.80	116.81	15.66	4.04
1	128.31	16.83	4.34	126.08	5.84	1.51	163.63	17.95	4.79
10	144.88	12.99	3.24	133.84	9.07	2.26	177.08	23.95	6.18
100	151.67	29.41	7.35	111.53	10.43	2.60	90.67	17.02	4.39

Tabla 22: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del 2,4-dinitrofenol sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO			GAL			AChE		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	12.10	4.27	100.00	29.93	7.79	100.00	15.91	6.01
0.1	100.95	21.18	5.46	269.94	60.56	15.07	94.64	14.73	3.80
1	99.98	13.20	3.41	375.00	261.5	67.53	91.59	17.29	4.46
10	72.94	41.51	10.71	370.48	257.13	64.28	83.41	18.84	5.22
100	49.26	62.44	15.61	242.48	215.49	55.64	34.73	20.80	5.37

Tabla 23: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del 2,4-dinitrofenol sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO/PR			GAL/PR			AChE/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	12.10	4.27	100.00	89.94	31.79	100.00	15.91	6.01
0.1	118.48	24.86	6.41	316.82	294.43	76.02	111.07	17.29	4.46
1	145.05	19.15	4.94	588.75	379.47	97.97	132.82	25.08	6.47
10	114.75	65.30	16.86	582.78	404.49	101.12	131.21	29.64	8.22
100	130.80	165.81	41.45	643.87	572.19	147.73	92.24	55.23	14.26

ACIDO IODOACETICO

Tabla 24: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido iodoacético sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	PR24			PR48			PR72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	5.20	1.83	100.00	10.22	3.61	100.00	3.42	1.21
0.1	79.61	8.30	2.07	92.73	8.71	2.17	86.19	3.91	0.97
1	36.85	10.05	2.51	19.51	6.33	1.58	10.57	4.91	1.22
10	4.86	1.98	0.49	5.52	2.00	0.50	3.78	0.98	0.24
100	2.90	1.97	0.49	4.23	1.53	0.38	3.45	1.48	0.37

Tabla 25: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido iodoacético sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	RN24			RN48			RN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	30.93	10.93	100.00	26.37	9.96	100.00	13.43	4.74
0.1	126.93	32.38	8.65	102.88	44.75	11.55	96.68	14.31	3.82
1	4.71	4.08	1.05	3.12	1.13	0.28	2.67	1.83	0.45
10	0.47	5.45	1.36	0.53	1.72	0.43	0.09	0.93	0.23
100	0.24	5.08	1.27	0.22	1.93	0.48	0.04	1.06	0.26

Tabla 26: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido iodoacético sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	CRRN24			CRRN48			CRRN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	30.93	10.93	100.00	26.37	9.96	100.00	13.43	4.74
0.1	159.50	40.69	10.87	110.95	48.26	12.46	112.18	16.60	4.43
1	12.81	11.11	2.87	16.10	5.86	1.46	25.46	17.43	4.35
10	10.04	44.9	10.70	9.79	31.90	7.97	2.27	25.11	6.27
100	8.89	83.11	25.77	5.38	46.94	11.73	1.38	31.58	7.89

Tabla 27: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido iodoacético sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK			ENL			SDH		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.0	5.55	1.96	100.00	2.23	0.84	100.00	17.15	6.06
0.1	63.98	7.27	1.81	74.60	9.08	2.42	81.53	19.80	4.95
1	32.86	10.78	2.69	35.86	25.11	6.27	28.99	5.62	1.50
10	0.18	4.32	1.08	4.72	22.42	5.79	0.28	0.44	0.11
100	0.84	64.48	16.12	9.44	25.54	6.38	0.36	0.44	0.11

Tabla 28: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido iodoacético sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK/PR			ENL/PR			SDH/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	5.55	1.96	100.00	2.23	0.84	100.00	17.15	6.06
0.1	80.39	9.13	2.28	93.74	11.41	3.04	102.45	24.88	6.22
1	89.37	29.31	7.32	97.52	68.29	17.07	78.84	15.28	4.08
10	3.80	91.33	22.83	99.60	72.82	18.08	6.02	9.37	2.34
100	30.32	93.96	23.24	198.34	99.18	24.79	13.23	15.99	3.99

Tabla 29: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido iodoacético sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO			GAL			AChE		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	1.88	0.71	100.00	54.20	19.61	100.00	4.64	1.75
0.1	77.90	8.75	2.26	105.28	45.40	11.72	74.94	8.79	2.27
1	31.90	9.79	2.52	28.75	67.24	16.81	57.58	6.93	1.79
10	7.16	5.29	1.32	0.80	55.61	14.36	58.22	12.62	3.25
100	6.98	6.09	1.52	0.35	54.78	14.14	62.93	22.05	5.51

Tabla 30: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido iodoacético sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO/PR			GAL/PR			AChE/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	1.88	0.71	100.00	54.21	19.16	100.00	4.64	1.75
0.1	97.89	11.05	2.84	132.29	57.04	14.73	94.17	11.05	2.85
1	86.75	26.63	6.87	78.20	182.86	45.71	156.60	18.86	4.86
10	151.08	111.66	27.91	16.95	72.51	18.74	158.36	266.05	68.69
100	251.21	99.47	12.86	12.61	71.83	18.12	171.17	793.55	198.38

ACIDO KAINICO

Tabla 31: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido kaínico sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	PR24			PR48			PR72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	3.91	1.48	100.00	7.22	2.55	100.00	11.97	4.23
0.1	107.86	12.60	3.25	108.62	7.21	1.86	99.88	10.04	2.51
1	107.53	11.28	2.91	108.29	5.05	1.30	117.60	8.11	2.02
10	102.09	3.71	0.95	101.71	9.27	2.39	111.89	12.24	3.06
100	106.60	8.59	2.14	94.51	5.89	1.52	115.12	11.99	3.20

Tabla 32: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido kaínico sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	RN24			RN48			RN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	32.65	9.15	100.00	24.88	8.79	100.00	10.82	3.82
0.1	92.65	37.30	9.63	86.64	23.50	5.87	114.96	10.15	2.53
1	72.30	41.58	10.73	78.68	20.04	5.01	118.11	12.81	3.20
10	117.37	66.18	17.08	89.73	15.47	3.86	120.41	10.07	2.51
100	90.32	56.95	14.23	68.16	9.52	2.46	101.57	31.22	8.34

Tabla 33: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido kaínico sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	CRRN24			CRRN48			CRRN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	62.65	22.15	100.00	24.88	8.79	100.00	10.82	3.82
0.1	85.89	34.58	8.92	79.75	21.63	5.41	115.09	10.16	2.54
1	67.22	38.66	9.98	72.64	18.50	4.62	100.41	10.89	2.72
10	114.96	64.82	16.73	88.22	15.21	3.80	107.59	8.99	2.24
100	84.71	53.42	13.35	72.12	10.08	2.60	88.21	27.11	7.24

Tabla 34: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido kaínico sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK			ENL			SDH		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	16.46	6.22	100.00	27.18	9.61	100.00	22.05	7.79
0.1	124.23	67.99	16.99	87.94	29.44	7.36	119.31	22.81	5.70
1	113.34	62.75	15.68	89.65	26.37	6.59	124.32	18.36	4.74
10	124.53	78.32	19.58	86.45	16.66	4.30	114.38	23.35	5.83
100	79.53	42.31	10.92	72.66	10.72	2.86	90.47	20.15	5.20

Tabla 35: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido kaínico sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK/PR			ENL/PR			SDH/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	16.46	6.22	100.00	27.18	9.61	100.00	22.05	7.79
0.1	115.16	63.03	15.75	81.52	27.29	6.82	110.60	21.14	5.28
1	105.39	58.35	14.58	83.36	24.52	6.13	115.59	17.07	4.40
10	121.97	76.71	19.17	84.67	16.31	4.21	112.02	22.87	5.71
100	74.59	39.68	10.24	68.15	10.06	2.68	84.85	18.90	4.88

Tabla 36: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido kaínico sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO			GAL			AChE		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	9.83	3.47	100.00	31.94	11.29	100.00	17.47	6.17
0.1	108.47	10.25	2.64	88.62	26.41	6.82	98.88	14.96	3.86
1	111.38	7.33	1.89	89.45	20.42	5.10	113.86	13.99	3.61
10	111.04	6.47	1.67	72.61	24.84	6.41	109.60	14.51	3.88
100	118.16	6.22	1.60	61.81	23.01	5.75	94.80	9.35	2.50

Tabla 37: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto del ácido kaínico sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO/PR			GAL/PR			AChE/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	9.83	3.47	100.00	31.94	11.29	100.00	17.47	6.17
0.1	100.55	9.50	2.45	82.15	24.48	6.32	91.65	13.87	3.58
1	103.56	6.82	1.76	83.17	18.99	4.74	105.87	13.01	3.36
10	108.76	6.34	1.63	71.11	24.33	6.28	107.34	14.22	3.80
100	110.83	5.84	1.50	57.97	21.58	5.39	88.91	8.77	2.34

OUABAINA

Tabla 38: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la ouabaína sobre la proliferación celular en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	PR24			PR48			PR72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	20.47	7.23	100.00	9.53	3.36	100.00	6.03	2.13
0.1	164.84	29.45	7.36	105.87	5.52	1.42	99.45	7.66	1.97
1	123.18	36.50	9.12	99.15	8.39	2.09	97.41	10.09	2.60
10	108.96	53.03	13.69	97.61	8.36	2.15	75.71	43.25	10.81
100	61.51	18.86	4.87	81.54	5.90	1.57	27.38	9.76	2.61

Tabla 39: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la ouabaína sobre la captación de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	RN24			RN48			RN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	8.44	2.98	100.00	14.76	5.22	100.00	6.69	2.52
0.1	113.05	18.94	4.89	142.46	19.41	5.01	124.95	8.11	2.09
1	111.01	16.16	4.17	158.32	20.18	5.39	133.35	11.34	2.83
10	93.43	26.34	6.80	140.94	18.23	4.70	138.97	15.55	4.31
100	109.78	27.81	7.18	58.45	21.93	5.66	0.65	1.03	0.25

Tabla 40: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la ouabaína sobre la captación relativa de rojo neutro en las células de neuroblastoma Neuro-2a, a los períodos de exposición de 24, 48 y 72 h.

Conc	CRRN24			CRRN48			CRRN72		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	8.44	2.98	100.00	14.76	5.22	100.00	6.69	2.53
0.1	68.51	11.47	2.96	134.55	18.34	4.73	125.64	8.15	2.10
1	90.07	13.11	3.38	159.67	20.35	5.43	136.91	11.64	2.91
10	85.73	24.17	6.24	144.39	18.67	4.82	183.61	20.54	5.69
100	178.76	45.28	11.69	71.70	26.90	6.94	2.40	3.78	0.94

Tabla 41: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la ouabaína sobre las actividades absolutas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK			ENL			SDH		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	35.79	13.53	100.00	14.12	4.99	100.00	33.17	11.72
0.1	138.41	58.52	14.63	115.78	15.36	3.96	136.27	22.95	5.92
1	119.83	31.89	7.97	111.85	20.66	5.33	139.25	34.26	8.56
10	123.20	21.60	5.57	116.66	18.75	4.84	127.71	27.67	6.92
100	90.43	19.91	5.32	98.18	9.85	2.54	102.44	23.14	5.97

Tabla 42: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la ouabaína sobre las actividades relativas de PFK, ENL y SDH en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	PFK/PR			ENL/PR			SDH/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	35.79	13.53	100.00	14.12	4.99	100.00	33.17	11.72
0.1	83.88	35.46	8.86	70.16	9.30	2.40	82.58	13.91	3.59
1	97.23	25.88	6.47	90.76	16.76	4.33	112.99	27.80	6.95
10	113.04	19.82	5.11	107.05	17.21	4.44	117.18	25.39	6.34
100	147.24	32.42	8.66	159.87	16.04	4.14	166.81	37.68	9.73

Tabla 43: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la ouabaína sobre las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO			GAL			AChE		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	38.68	14.62	100.00	35.11	12.41	100.00	19.82	7.01
0.1	120.00	249.40	62.35	125.71	48.46	12.11	114.87	14.84	3.71
1	140.32	70.72	18.90	135.39	43.28	10.82	120.10	21.50	5.37
10	155.93	135.87	36.31	140.72	60.43	15.10	93.93	18.17	4.54
100	150.31	131.54	33.96	74.59	63.74	15.93	75.17	10.67	2.85

Tabla 44: Estudio estadístico descriptivo (media, desviación estándar y error estándar) del efecto de la ouabaína sobre las actividades relativas de ATPasa, GAL y AChE en las células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h exposición.

Conc	ATTO/PR			GAL/PR			AChE/PR		
	Media	DE	EE	Media	DE	EE	Media	DE	EE
0	100.00	38.68	14.62	100.00	35.11	12.41	100.00	19.82	7.01
0.1	108.34	151.14	37.78	76.18	29.37	7.34	69.61	8.99	2.24
1	113.86	57.38	15.33	109.86	35.12	8.77	97.45	17.45	4.36
10	143.07	124.67	33.32	129.12	55.45	13.86	86.18	16.67	4.16
100	141.75	214.19	55.30	121.45	98.79	24.94	122.41	17.38	4.64

Tabla 45: CLORPROMAZINA; estudio de la significación estadística de los resultados mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

	Grado de significación estadística "p"			
	0.1 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l
PR24	0.0039	0.0061	0.0000	0.0000
PR48	0.5973	0.3346	0.0000	0.0000
PR72	0.6575	0.0516	0.0000	0.0000
RN24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
RN48	0.0400	0.8465	0.0000	0.0000
RN72	0.0001	0.9748	0.0000	0.0000
CRRN24	0.0224	0.0300	0.0000	0.0000
CRRN48	0.0411	0.9225	0.0001	0.0000
CRRN72	0.0009	0.7513	0.0000	0.0000
PFK	0.2100	0.1906	0.0000	0.0451
ENL	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
SDH	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PFK/PR	0.9963	0.9875	0.4396	0.0000
ENL/PR	0.1814	0.3915	0.0741	0.0000
SDH/PR	0.0000	0.0000	0.1759	0.0000
ATTO	0.4834	0.8717	0.9802	0.8952
GAL	0.8990	0.5377	0.2411	0.0078
AChE	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
ATTO/PR	0.8321	0.9130	0.0909	0.0035
GAL/PR	0.9010	0.8080	0.3852	0.3933
AChE/PR	0.7633	0.3988	0.0002	0.0000

Tabla 46: CICLOHEXIMIDA; estudio de la significación estadística de los resultados mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

	Grado de significación estadística "p"			
	0.1 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l
PR24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PR48	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PR72	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
RN24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
RN48	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
RN72	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
CRRN24	0.0002	0.0006	0.0000	0.0000
CRRN48	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
CRRN72	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PFK	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
ENL	0.0036	0.0000	0.0000	0.0000
SDH	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PFK/PR	0.0291	0.4611	0.5984	0.8235
ENL/PR	0.1099	0.8413	0.4932	0.8230
SDH/PR	0.0194	0.1186	0.0490	0.2167
ATTO	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000
GAL	0.2209	0.0289	0.0677	0.0004
AChE	0.2111	0.0507	0.0000	0.0000
ATTO/PR	0.7161	0.5254	0.0907	0.7252
GAL/PR	0.0235	0.0644	0.0012	0.3612
AChE/PR	0.0012	0.0009	0.9171	0.1040

Tabla 47: DINITROFENOL; estudio de la significación estadística de los resultados mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

	Grado de significación estadística "p"			
	0.1 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l
PR24	0.0063	0.0000	0.0000	0.0000
PR48	0.8410	0.2589	0.0002	0.0000
PR72	0.8509	0.0712	0.0019	0.0000
RN24	0.0014	0.0000	0.0000	0.0007
RN48	0.0823	0.3622	0.9940	0.0000
RN72	0.0339	0.0061	0.2217	0.0000
CRRN24	0.0019	0.0000	0.0000	0.4764
CRRN48	0.1231	0.2311	0.0582	0.0000
CRRN72	0.0849	0.1064	0.8788	0.0000
PFK	0.0266	0.0634	0.1741	0.0000
ENL	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000
SDH	0.9528	0.1535	0.0106	0.0000
PFK/PR	0.7650	0.0033	0.0000	0.0000
ENL/PR	0.1169	0.0000	0.0000	0.0005
SDH/PR	0.0528	0.0000	0.0000	0.1260
ATTO	0.8860	0.9840	0.3327	0.0701
GAL	0.1005	0.0001	0.0159	0.2375
AChE	0.4105	0.1373	0.0287	0.0000
ATTO/PR	0.6788	0.3676	0.6800	0.2835
GAL/PR	0.2505	0.0010	0.0192	0.0159
AChE/PR	0.6846	0.2092	0.2490	0.7707

Tabla 48: ACIDO IODOACETICO; estudio de la significación estadística de los resultados mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

Grado de significación estadística "p"

	0.1 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l
PR24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PR48	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PR72	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
RN24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
RN48	0.0447	0.0000	0.0000	0.0000
RN72	0.7000	0.0000	0.0000	0.0000
CRRN24	0.2785	0.3281	0.4213	0.1995
CRRN48	0.1526	0.0004	0.0001	0.0000
CRRN72	0.3576	0.0000	0.0000	0.0000
PFK	0.0687	0.0016	0.0000	0.0000
ENL	0.0797	0.0000	0.0000	0.0000
SDH	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
PFK/PR	0.9738	0.9833	0.8864	0.7584
ENL/PR	0.9894	0.9679	0.8420	0.2601
SDH/PR	0.9408	0.0537	0.0000	0.0000
ATTO	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
GAL	0.6509	0.0694	0.0021	0.0030
AChE	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000
ATTO/PR	0.9270	0.8686	0.3684	0.0771
GAL/PR	0.9523	0.9925	0.7668	0.9004
AChE/PR	0.9661	0.8254	0.0600	0.0580

Tabla 49: ACIDO KAINICO; estudio de la significación estadística de los resultados mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

	Grado de significación estadística "p"			
	0.1 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l
PR24	0.1179	0.1224	0.8467	0.7544
PR48	0.0299	0.0692	0.8782	0.0288
PR72	0.4293	0.0003	0.0140	0.0011
RN24	0.5082	0.2028	0.8518	0.3987
RN48	0.5376	0.0521	0.7386	0.0051
RN72	0.0008	0.0001	0.0001	0.2617
CRRN24	0.3424	0.1258	0.9170	0.2838
CRRN48	0.1558	0.0083	0.6036	0.0098
CRRN72	0.0002	0.3077	0.0319	0.2334
PFK	0.2046	0.6774	0.1241	0.4076
ENL	0.0162	0.1388	0.2072	0.0125
SDH	0.0746	0.0433	0.2769	0.1095
PFK/PR	0.3156	0.8655	0.1270	0.3100
ENL/PR	0.0029	0.0354	0.1365	0.0030
SDH/PR	0.3899	0.2582	0.3827	0.0239
ATTO	0.0275	0.0016	0.0045	0.0000
GAL	0.0985	0.2225	0.0119	0.0015
AChE	0.5841	0.0796	0.3164	0.8985
ATTO/PR	0.6483	0.1248	0.0123	0.0060
GAL/PR	0.0292	0.0777	0.0064	0.0004
AChE/PR	0.1002	0.5435	0.4798	0.3028

Tabla 50: OUABAINA; estudio de la significación estadística de los resultados mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

	Grado de significación estadística "p"			
	0.1 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l
PR24	0.0027	0.5553	0.9836	0.0451
PR48	0.0441	0.8241	0.5710	0.0003
PR72	0.8069	0.9972	0.0003	0.0000
RN24	0.7930	0.5458	0.4025	0.2931
RN48	0.0008	0.0000	0.0018	0.0018
RN72	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
CRRN24	0.0102	0.3438	0.2185	0.0000
CRRN48	0.0098	0.0000	0.0015	0.0580
CRRN72	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PFK	0.1013	0.7521	0.1019	0.8986
ENL	0.0085	0.0476	0.0154	0.4359
SDH	0.0452	0.0473	0.7015	0.3528
PFK/PR	0.2114	0.3713	0.1889	0.0012
ENL/PR	0.0022	0.5345	0.1002	0.0000
SDH/PR	0.0956	0.8148	0.8139	0.0052
ATTO	0.0003	0.7271	0.5509	0.5023
GAL	0.9841	0.8660	0.1811	0.2917
AChE	0.0112	0.0007	0.7633	0.3319
ATTO/PR	0.0556	0.9644	0.6389	0.0607
GAL/PR	0.0897	0.4811	0.3902	0.3519
AChE/PR	0.0256	0.1879	0.6083	0.0000

Del conjunto de los resultados obtenidos se deducen para cada producto los siguientes efectos:

1.- CLORPROMAZINA

*** TOXICIDAD BASAL**

- Proliferación celular

En los tres períodos de exposición, la proliferación celular permaneció por encima del 80 % respecto al control con concentraciones ≤ 1 mg/l. El efecto máximo se observó a las 24 h. A partir de los 10 mg/l la proliferación celular se redujo al 20 % respecto al control en los tres períodos de exposición ensayados (Fig. 1, Tabla 3).

CE-50 = 3.3 mg/l a las 24, 48 y 72 h.

- Captación de rojo neutro

Con el período de exposición más corto, de 24 h, se observó una disminución en la captación del colorante rojo neutro hasta práctica anulación a partir de 10 mg/l de clorpromazina. Con los tiempos más largos de exposición, 48 y 72 h, apareció un aumento de la captación del colorante con 0.1 mg/l. Sin embargo, la captación disminuyó a partir de 1 mg/l, llegando a desaparecer con 10 mg/l (Fig. 2, Tabla 4).

CE-50 = 1.5 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 3.5 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 3.2 mg/l a las 72 h.

En la CRRN la disminución en la captación del colorante a las 24 h fue ligeramente menor a la anterior, sin embargo los resultados para las 48 y 72 h de exposición fueron muy parecidos a sus respectivos valores absolutos (Fig. 3, Tabla 5).

CE-50 = 2.0 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 3.1 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 3.5 mg/l a las 72 h.

*** METABOLISMO ENERGETICO**

Las actividades absolutas de las enzimas glucolíticas medidas, PFK y ENL, disminuyeron ligeramente al aumentar la concentración de exposición. Por el contrario, la actividad absoluta de SDH, enzima del ciclo de Krebs, se incrementó considerablemente con las dos concentraciones más bajas (0.1 y 1 mg/l) hasta valores de 214.4 % respecto al control, pasando a ser menor a la del control a concentraciones superiores a 4 mg/l (Fig. 4, Tabla 6).

Las actividades relativas al contenido proteico de la PFK y ENL no sufrieron diferencias significativas respecto al control. La actividad relativa de SDH aumenta hasta el 258.4 % a 0.1 mg/l de clorpromazina, disminuyendo de forma concentración dependiente a partir de 1 mg/l (Fig. 5, Tabla 7).

*** OTRAS ENZIMAS**

Las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE no variaron significativamente respecto al control hasta 10 mg/l de producto. La ATPasa es la que permanece más invariable, la GAL sufre un ligero aumento a las concentraciones más bajas y la AChE tiene tendencia a inhibirse, pero no de forma significativa (Fig. 6, Tabla 8). Las actividades

relativas de estas enzimas permanecen sin diferencias significativas respecto al control a 0.1 y 1 mg/l (Fig. 7, Tabla 9).

2.- CICLOHEXIMIDA

*** TOXICIDAD BASAL**

- Proliferación celular

Destaca una gran inhibición de la proliferación celular, incluso a la concentración más baja ensayada (0.1 mg/l). El efecto tóxico, que a esta concentración sólo es ligeramente mayor al aumentar el período de exposición, se hace cada vez más patente al incrementar la concentración del compuesto (Fig. 8, Tabla 10).

CE-50 = 0.08 mg/l a las 24 y 48 h.

CE-50 = 0.07 mg/l a las 72 h.

- Captación de rojo neutro

En los tres períodos de exposición, la captación de rojo neutro se redujo drásticamente hasta aproximadamente el 20 % del control desde la concentración de 0.1 mg/l, obteniéndose unos valores de CE-50 de la mitad de los de proliferación celular (Fig. 9, Tabla 11).

CE-50 = 0.045 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 0.040 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 0.035 mg/l a las 72 h.

En la captación relativa de rojo neutro, la viabilidad celular a las 24 h no se afecta por debajo del 50 % respecto al control hasta concentraciones mayores de 1 mg/l. Los valores de CE-50 para las 48 y 72 h están entre 0 y 0.1 mg/l, al igual que en los otros dos ensayos anteriores (Fig. 10, Tabla 12).

CE-50 = 1.00 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 0.06 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 0.04 mg/l a las 72 h.

*** METABOLISMO ENERGETICO**

La actividad absoluta de PFK muestra una fuerte reducción desde la concentración más baja, que se mantiene con concentraciones superiores. La actividad de la ENL y la SDH disminuyen de forma gradual a medida que aumenta la concentración del producto (Fig. 11, Tabla 13). En las actividades relativas, sólo se observa disminución en la PFK (50.70 %) a la concentración más baja (Fig. 12, Tabla 14).

*** OTRAS ENZIMAS**

Se observa una disminución de las actividades absolutas de ATPasa, GAL y AChE más acusada en la ATPasa (Fig. 13, Tabla 15), mientras que existe un aumento en las actividades relativas correspondientes, siendo más patentes para la GAL y AChE ya a la concentración de 0.1 mg/l (Fig. 14, Tabla 16).

*** ESTUDIO MORFOLOGICO**

Para confirmar que el incremento de AChE era debido a la diferenciación de las células Neuro-2a, se realizó un estudio microscópico de los cultivos.

Como criterios morfológicos de diferenciación celular hemos establecido, en primer lugar, la secuencia de los siguientes pasos:

I.- Células en mitosis, morfológicamente de forma esférica y algunas unidas entre sí por microtúbulos procedentes del huso mitótico.

II.- Aparición de numerosas parejas celulares, que se mantienen unidas por aposición de membranas citoplasmáticas, constituyendo imágenes de células dobles, simétricas, que se caracterizan por la adquisición de forma elongada con núcleo grande y

vesiculoso y dos extremos citoplasmáticos, de base ancha, localizados en cada uno de los polos del núcleo. Dichas parejas celulares han sido denominados células postmitóticas.

III.- Aparición de placas de células de estirpe neuronal que recuerdan, por su morfología, a las células gigantopiramidales de la corteza cerebral. Dichas células aparecen morfológicamente constituidas por un núcleo vesiculoso, que contiene uno o dos nucleolos, y un citoplasma que posee prolongaciones anchas y cortas que salen de las células formando ángulos de 120° aproximadamente.

IV.- Emisión de prolongaciones largas y finas: a) con aparición de células monopolares con cuerpo celular en forma de pera y larga prolongación neurítica; b) en el estadio morfológico final de la diferenciación aparecen células con largas prolongaciones neuríticas (bi y multipolares) algunas de las cuales establecen contactos sinápticos; c) además, como fenómeno morfológico no descrito como criterio de diferenciación, hemos considerado la aparición de rosetas constituidas por una gran célula multinucleada central rodeada por neuroblastos envolventes que originan imágenes que recuerdan a la formación de células ganglionares y de células satélites (sateliteblastos). A este fenómeno lo hemos denominado "satelitosis".

Cuando se comparan las células tratadas con 0.1 mg/l de cicloheximida (fotomicrografía 5) con su respectivo control (fotomicrografía 2) se observa que la cicloheximida indujo la formación de placas celulares constituidas por células bipolares, multipolares, y por la aparición de rosetas.

A la concentración de 1 mg/l se indujo la diferenciación celular y además, fenómenos de lesión celular expresados por la aparición de vacuolización citoplasmática fina (probablemente correspondientes a un intenso edema mitocondrial). Estas vacuolas llegan a ser confluentes en algunas células (fotomicrografía 6). A esta concentración aparecen en los cultivos mayor número de células multipolares, algunas de las cuales presentan largas prolongaciones neuríticas y rosetas (fotomicrografía 7).

A la concentración de 10 mg/l predominan en el cultivo los fenómenos tóxico-lesivos celulares que incluyen:

- a) Alteraciones de la membrana citoplasmática por lesión del citoesqueleto celular (aparición de filopodios y de protusiones membranosas).
- b) Alteraciones del citoplasma (vacuolización citoplasmática fina (células perforadas)
- c) Lesión nuclear (picnosis y/o cariorexis) (fotomicrografía 8).

A la concentración de 100 mg/l en el cultivo existen pocas células, la mayoría de las cuales se encuentran muertas (células pequeñas con núcleos picnóticos) o presentan lesiones nucleares irreversibles (reticulación de la cromatina nuclear) o citoplasmáticas graves (vacuolización fina y aparición de grandes vacuolas autofágicas procedentes de la desintegración de orgánulos citoplasmáticos (fotomicrografías 9 y 10).

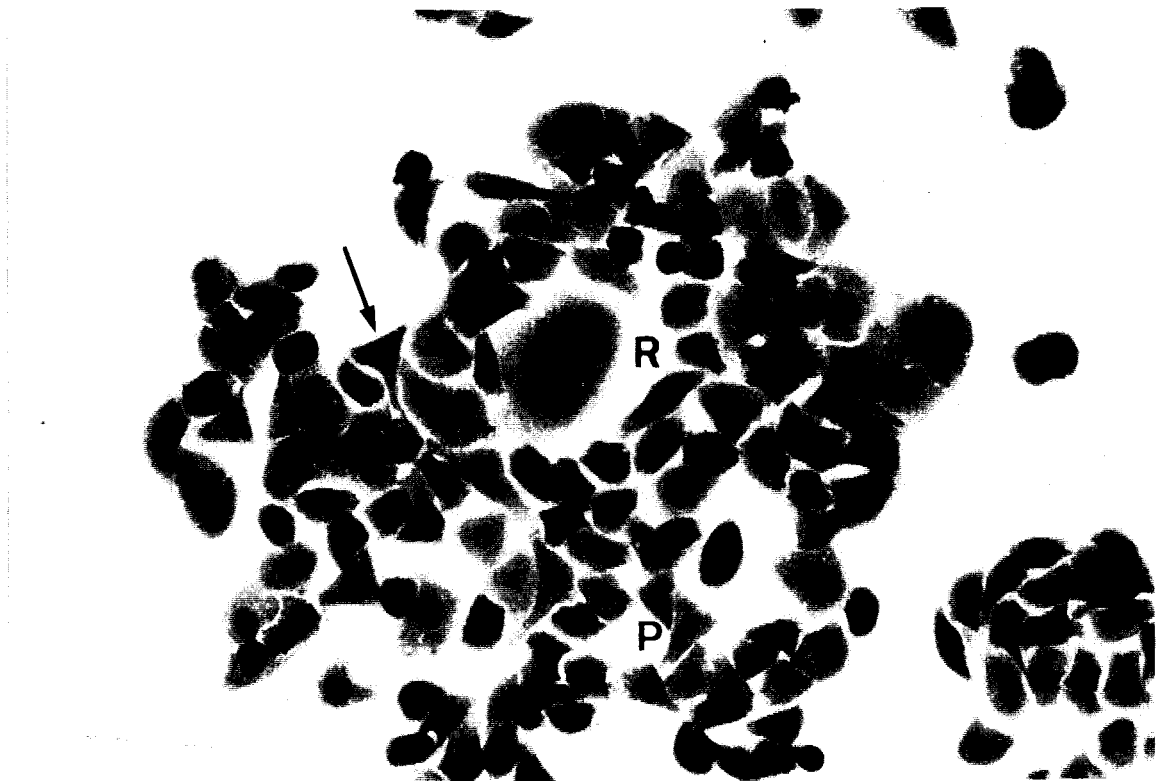
Teniendo en cuenta los cuatro estadios considerados previamente en los criterios de diferenciación celular (estadios I a IV. Estadio I: proliferativo; estadio IV: diferenciado) se demuestra, morfológicamente, que la cicloheximida induce la aparición de una desviación de los cultivos hacia estadios de diferenciación más avanzados respecto a su control coetáneo.



Fotomicrografía 5.- Cultivo de células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición a 0.1 mg/l de cicloheximida. Aparición de células multinucleadas con formación de rosetas (R), numerosas células poligonales (P) y bipolares (B) diferenciadas. Giemsa. 200x.



Fotomicrografía 6.- Cultivo de células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición a 1 mg/l de cicloheximida. Aparición de vacuolas citoplasmáticas confluentes (→). Giemsa. 200x.



Fotomicrografía 7.- Cultivo de células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición a 1 mg/l de cicloheximida. Formación de rosetas (R), numerosas células poligonales (P) y multipolares (→). Giemsa. 200x.



Fotomicrografía 8.- Cultivo de células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición a 10 mg/l de cicloheximida. Numerosos neuroblastos presentan muerte celular con núcleos picnóticos (→) y/o cariorrexis (⇨). Vacuolización citoplasmática difusa (V) y aparición de numerosas prolongaciones citoplasmáticas filopódicas (F) expresivas de alteraciones del citoesqueleto celular. Giemsa. 200x.



Fotomicrografía 9.- Cultivo de células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición a 100 mg/l de cicloheximida. Abundantes neuroblastos presentan vacuolización citoplasmática fina (V). Picnosis y muerte de numerosas células (→). Giemsa. 200x.



Fotomicrografía 10.- Cultivos de células de neuroblastoma Neuro-2a tras 24 h de exposición a 100 mg/l de cicloheximida. Detalle de neuroblasto con vacuolización citoplasmática fina y vacuola autofágica (→). Reticulación de la cromatina nuclear (R). Giemsa. 400x.

3.- DINITROFENOL

*** TOXICIDAD BASAL**

- Proliferación celular

A las 24 h de exposición, la proliferación celular disminuye de forma dependiente de la concentración de exposición. Sin embargo a las 48 y 72 h esta disminución no se hace significativa hasta la concentración de 10 mg/l (Fig. 15, Tabla 17).

CE-50 = 30 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 31 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 40 mg/l a las 72 h.

- Captación de rojo neutro

Se produce un aumento significativo en la captación de rojo neutro por los lisosomas a las 24 h de exposición incluso a la concentración más baja ensayada (0.1 mg/l). Este aumento se hace menos patente a las 48 y 72 h (Fig. 16, Tabla 18).

CE-50 = 90 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 30 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 21 mg/l a las 72 h.

El aumento significativo de la captación de rojo neutro a las 24 h se hace aún más notorio cuando se observa la captación relativa de rojo neutro. Sin embargo a las 24 y 48 h no se produce diferencia significativa respecto al control hasta la concentración más alta ensayada de 100 mg/l (Fig. 17, Tabla 19).

CE-50 > 100 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 42 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 40 mg/l a las 72 h.

*** METABOLISMO ENERGETICO**

Las actividades absolutas de las enzimas de la glucólisis, PFK y ENL, disminuyen casi un 20 % respecto al control a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/l de 2,4-dinitrofenol. La actividad SDH no sufre diferencias significativas respecto al control hasta 10 mg/l del compuesto ensayado (Fig. 18, Tabla 20). En la figura 19, gráfica que representa las actividades relativas de las enzimas de la vía glucolítica y ciclo de Krebs (PFK, ENL y SDH), se observa un aumento de éstas que se hace significativo respecto al control a la concentración de 1 mg/l. Este aumento es mayor para la SDH (Fig. 19, Tabla 21).

*** OTRAS ENZIMAS**

La actividad absoluta de la ATPasa permanece sin diferencias significativas respecto al control a lo largo del espectro de concentraciones utilizado. La actividad absoluta de la GAL aumenta bastante respecto al control, produciéndose un pico de 375.0 % a la concentración de 1 mg/l del tóxico. La actividad absoluta de la AChE disminuye ligeramente al aumentar la concentración, permaneciendo por encima del 80 % hasta los 10 mg/l (Fig. 20, Tabla 22). Las actividades relativas de la ATPasa y AChE no se afectan de forma significativa a ninguna de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, la actividad relativa de GAL aumenta considerablemente respecto al control llegando a ser de 643.87 % con 100 mg/l (Fig. 21, Tabla 23).

4.- ACIDO IODOACETICO

*** TOXICIDAD BASAL**

- Proliferación celular

La acción del ácido iodoacético sobre la proliferación celular se hizo patente a partir de la concentración más baja ensayada (0.1 mg/l). Esta inhibición de la proliferación celular está relacionada con la concentración de tóxico utilizado hasta la concentración de 10 mg/l, en que la lesión es casi total. El mayor efecto inhibitor ocurre entre 0.1 y 10 mg/l de ácido

iodoacético a las 24 h de exposición, y entre 0.1 y 1 mg/l para tiempos más largos; a concentraciones superiores se mantiene la inhibición. El contenido celular baja de un 80 - 90 % a un 10 - 40 % dependiendo del tiempo de exposición (Fig. 22, Tabla 24).

CE-50 = 0.5 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 0.4 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 0.3 mg/l a las 72 h.

- Captación de rojo neutro

En el ensayo de captación de rojo neutro, se observa un aumento significativo respecto al control a las 24 y 48 h a la concentración de 0.1 mg/l. Sin embargo a partir de 1 mg/l inclusive, los valores de captación del colorante rojo neutro son casi del 0 % respecto al control en los tres períodos de exposición ensayados (Fig. 23, Tabla 25).

CE-50 = 0.41 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 0.31 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 0.30 mg/l a las 72 h.

A la concentración de 0.1 mg/l de ácido iodoacético no se observan diferencias significativas respecto al control en ninguno de los tres períodos de exposición. A partir de 1 mg/l inclusive, los valores de captación relativa permanecen siempre por debajo del 30 % respecto al control (Fig. 24, Tabla 26).

CE-50 = 0.54 mg/l a las 24 h.

CE-50 = 0.42 mg/l a las 48 h.

CE-50 = 0.50 mg/l a las 72 h.

* METABOLISMO ENERGETICO

Se observa una gran disminución estadísticamente significativa de las actividades absolutas de las enzimas PFK, ENL y SDH por el ácido iodoacético por encima de 1 mg/l,

a partir de la cual se encuentran las CE-50 de estas tres enzimas. A la concentración menor, 0.1 mg/l, sólo la actividad absoluta de SDH es significativamente distinta al control (Fig. 25, Tabla 27).

Sin embargo, en las actividades relativas observamos que: ni la PFK, ni la ENL presentan diferencias significativas respecto al control a ninguna de las concentraciones ensayadas y la SDH es significativamente distinta del control desde una concentración de ácido iodoacético de 10 mg/l (Fig. 26, Tabla 28).

*** OTRAS ENZIMAS**

La actividad absoluta de ATPasa disminuye de forma dependiente a la concentración del tóxico ensayada, llegando incluso a valores del 6.98 % respecto al control con la concentración de 100 mg/l. La actividad absoluta de la GAL no es estadísticamente significativa respecto al control hasta los 10 mg/l de concentración del ácido iodoacético, con 0.80 % respecto al control. La actividad absoluta de AChE sufre una disminución progresiva al ir aumentando la concentración del tóxico hasta 1 mg/l, a partir de la cual la actividad absoluta permanece siempre por encima del 50 % respecto al control (Fig. 27, Tabla 29).

Las actividades relativas de ATPasa, β -galactosidasa y AChE, permanecen no significativamente distintas del control a las concentraciones del tóxico ensayadas (Fig. 28, Tabla 30).

5.- ACIDO KAINICO

*** TOXICIDAD BASAL**

- Proliferación celular

El ácido kaínico no afecta a la proliferación celular en los períodos de exposición de 24 y 48 h. Sin embargo a las 72 h se produce un ligero aumento en la proliferación celular a partir de 1 mg/l de concentración (Fig. 29, Tabla 31).

CE-50 > 100 mg/l a las 24, 48 y 72 h.

- Captación de rojo neutro

No se observan diferencias significativas en la captación de rojo neutro respecto al control en los períodos de exposición de 24 y 48 h en el espectro de concentraciones ensayado. Sin embargo existe un ligero aumento en la captación del colorante en el período de exposición de 72 h (Fig. 30, Tabla 32).

CE-50 > 100 mg/l a las 24, 48 y 72 h.

Sin embargo, en la CRRN, el ácido kaínico sólo afecta de forma estadísticamente significativa respecto al control en los períodos de exposición de 48 y 72 h y en concentraciones distintas que hacen que no se observe una continuidad en la respuesta de las células a la acción del tóxico a distintas concentraciones. Es destacable que a 48 h se produce una disminución de la CRRN respecto al control de casi el 30 % a 1 y 100 mg/l, y a 72 h se produce un aumento del 15 % a 0.1 mg/l (Fig. 31, Tabla 33).

CE-50 > 100 mg/l a las 24, 48 y 72 h.

*** METABOLISMO ENERGETICO**

Las actividades absolutas de las enzimas glucolíticas medidas (PFK y ENL) y del ciclo de Krebs (SDH), apenas sufren una variación del 20 % respecto al control que tan sólo es significativa en el caso de la ENL a 0.1 y 100 mg/l de concentración y la SDH a 1 mg/l (Fig. 32, Tabla 34).

Las actividades relativas de PFK y SDH no se modificaron significativamente respecto al control en ninguna de las concentraciones de tóxico ensayadas, excepto para la SDH a 100 mg/l. Sin embargo la actividad relativa de la ENL está disminuida significativamente en aproximadamente un 20 % respecto al control (Fig. 33, Tabla 35).

*** OTRAS ENZIMAS**

La actividad absoluta de ATPasa sufre un ligero aumento siempre menor del 20 % respecto al control, que es significativo en todas las concentraciones del compuesto ensayadas. La actividad absoluta de GAL disminuye de forma concentración-dependiente hasta el 61.81 % a los 100 mg/l. Sin embargo no se observan diferencias significativas para los valores de AChE, que permanecen siempre alrededor de 100 % (Fig. 34, Tabla 36).

Las actividades relativas de ATPasa y β -galactosidasa no son significativamente distintas del control hasta concentraciones mayores o iguales a 10 mg/l. Sin embargo mientras que la ATPasa sufre un ligero aumento, la GAL disminuye, permaneciendo siempre por encima del 50 % respecto al control. No existen diferencias significativas respecto al control de la actividad relativa de AChE (Fig. 35, Tabla 37).

6.- OUABAINA

*** TOXICIDAD BASAL**

- Proliferación celular

A concentraciones bajas (0.1 mg/l) y 24 h de exposición, encontramos un aumento en contenido proteico total del 64.8 % respecto al control. Con las concentraciones superiores no existen variaciones significativas respecto al control, excepto en la concentración mayor ensayada, 100 mg/l. En los otros dos períodos de exposición, la variación respecto al control es más suave. En la única concentración que se ve efecto tóxico en todos los períodos de exposición es a 100 mg/l (24 h = 65.51 %; 48 h = 81.54 %; 72 h = 27.38 %) (Fig. 36, Tabla 38).

CE-50 > 100 mg/l a las 24 y 48 h.

CE-50 = 31 mg/l a las 72 h.

- Captación de rojo neutro

La captación de rojo neutro a las 24 h de exposición no sufre diferencias significativas respecto al control. Existe un aumento de la captación menor del 60 % a las 48 y 72 h en concentraciones menores de 10 mg/l, a partir de la cual sufren un brusco descenso (Fig. 37, Tabla 39).

CE-50 > 100 mg/l a las 24 y 48 h.

CE-50 = 43 mg/l a las 72 h.

La captación relativa de rojo neutro a las 24 h de exposición sufre una disminución respecto al control, que en ningún caso es mayor al 50 %, siendo significativamente distinto al control el valor a 0.1 mg/l (68.51 %). Existe un aumento de la captación relativa a las 48 y 72 h en concentraciones menores de 10 mg/l, a partir de la cual sufren un brusco descenso (Fig. 38, Tabla 40).

CE-50 > 100 mg/l a las 24 y 48 h.

CE-50 = 53 mg/l a las 72 h.

*** METABOLISMO ENERGETICO**

La actividad absoluta de la PFK no sufre diferencias significativas respecto al control. La actividad absoluta de la ENL sufre un aumento significativo respecto al control menor del 20 % a las concentraciones de 0.1 a 10 mg/l. El aumento de la actividad absoluta de la SDH es significativo para 0.1 y 1 mg/l de concentración de ouabaína (Fig. 39, Tabla 41).

Las tres actividades de PFK, ENL y SDH siguen un comportamiento prácticamente paralelo, con aumento significativo de las tres a la concentración más alta ensayada, que alcanza el 50 % (Fig. 40, Tabla 42).

* OTRAS ENZIMAS

No se observan variaciones en la actividad absoluta de ATPasa respecto al control a ninguna de las concentraciones ensayadas. La actividad absoluta de la β -galactosidasa no se vio significativamente afectada por la acción de la ouabaína. La actividad absoluta de AChE aumenta hasta un 20 % respecto al control con 1 mg/l del compuesto ensayado (Fig. 41, Tabla 43).

La actividad relativa de ATPasa aumentó respecto al control, sin embargo ninguno de estos valores son significativamente distintos del control. La actividad relativa de la GAL no se afecta de forma estadísticamente significativa por la acción del compuesto ensayado. La actividad relativa de AChE disminuye hasta un valor del 69.61 % respecto al control con 0.1 mg/l del compuesto ensayado, aumentando a la vez que la concentración del tóxico hasta un máximo de 122.4 % con 100 mg/l de ouabaína (Fig. 42, Tabla 44).

DISCUSSION

En el trabajo recogido en la presente memoria se ha desarrollado un modelo *in vitro* con la finalidad de valorar diferentes aspectos toxicodinámicos de sustancias químicas de reconocida toxicidad *in vivo*. Además se evaluó la capacidad del modelo para reproducir aspectos conocidos de los mecanismos de acción y se intentó conocer las posibilidades de aplicarlo a una selección previa entre compuestos citotóxicos y neurotóxicos.

Para ello se han analizado, en cultivos en microplacas de la línea celular establecida de ratón Neuro-2a, diferentes parámetros celulares y bioquímicos, tanto de toxicidad general como específicas neuronales, que nos permitan evaluar los efectos celulares de cada uno de los tóxicos ensayados y profundizar en el conocimiento de su mecanismo de acción.

De la consideración general del modelo experimental propuesto, cabe destacar en primer lugar que las modificaciones introducidas en las determinaciones de indicadores habituales en los estudios *in vitro*, contenido proteico total, captación de rojo neutro y MTT, para medir la actividad SDH, han sido de utilidad. Se ha mejorado sensiblemente la linealidad de la determinación de proteínas. En el ensayo de la MTT y de AChE, al incrementar las exigencias de oscuridad ha mejorado la estabilidad de la reacción coloreada (formación de formazano, púrpura, y de ácido tionitrobenzoico, amarillo, respectivamente). Por otra parte, se han adaptado por primera vez a cultivos en microplacas, cuatro determinaciones de actividades enzimáticas PFK, ENL, ATPasa y GAL hasta ahora generalmente estudiadas *in vivo* y en homogeneizados tisulares, lo que contribuye al enriquecimiento de las posibilidades de la metodología *in vitro* para estudios de toxicidad con fines mecanicistas.

Como período de exposición para los estudios de citotoxicidad mediante ensayos de proliferación celular y captación de rojo neutro, Ridell y col. (1986) proponen el uso de 72 h, en vez de las 24 h utilizadas generalmente. Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio sugieren el período de exposición de 48 h en vez de 72 h, ya que no se obtuvieron diferencias significativas de citotoxicidad entre 48 y 72 h de exposición para ninguno de los compuestos e indicadores utilizados; sí aparecen diferencias significativas entre los períodos de 24 y 48 h, probablemente porque determinados efectos citotóxicos precisen de al menos 48 h para expresarse (Andrés y col., 1993). Sin embargo, para las determinaciones bioquímicas, después de 24 horas es difícil observar daños específicos en los que no se solapen efectos citotóxicos generales.

En consecuencia, para ver la evolución del efecto tóxico, el estudio de la proliferación celular y la viabilidad se ha llevado a cabo con distintos tiempos de exposición (24, 48 y 72 h). De acuerdo con Walum (1990), para la consideración mecanicista de los efectos observados sólo se consideran los producidos por concentraciones inferiores a la CE-50 de proliferación celular para asegurar que las alteraciones bioquímicas se están estudiando en un cultivo en el que las células no se encuentran dañados por un efecto tóxico generalizado. Por ello, y tras 24 horas de exposición, sólo se tendrán en cuenta las actividades relativas de los indicadores bioquímicos de toxicidad, por ser las que poseen significación bioquímica en forma independiente de la afectación de la proliferación del cultivo.

En primer lugar se expondrán e interpretarán por separado los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos estudiados. Posteriormente, de la consideración global de todos los resultados, se evaluará la capacidad de la batería propuesta como ensayo previo de criba de nuevos productos, alternativa a la experimentación *in vivo*.

1.- CLORPROMAZINA

En conjunto, la clorpromazina mostró baja toxicidad en concentraciones menores o iguales a 1 mg/l, por encima de la cual se encuentran los valores de CE-50 (entre 1 y 10 mg/l) en los tres ensayos de viabilidad/letalidad (contenido proteico total, captación de rojo neutro y captación relativa de rojo neutro). La captación relativa de rojo neutro a las 24 h fue la más afectada por la clorpromazina incluso a bajas concentraciones, con una CE-50 de 2 mg/l, inferior a la de proliferación celular, indicando una reducción de su viabilidad.

El hecho de que no exista paralelismo entre la modificación de los valores de captación de rojo neutro y de proliferación celular a las 24 h, se considera por algunos autores como un índice de daño lisosomal (Forsby, 1991). En la clorpromazina esta discordancia es acusada a las 24 horas, la CE-50 es de 3.3 en proliferación celular y sólo de 1.5 mg/l en la captación de rojo neutro. Por tanto puede deducirse que este producto afecta a la función lisosomal.

A las 48 y 72 horas también se aprecia en la captación de rojo neutro una modificación significativa respecto al control que no se refleja en la proliferación celular; pero es de sentido inverso al efecto observado a las 24 h puesto que aparece un incremento en la captación del colorante de hasta un 37 % respecto del valor control (100 %). Esto indicaría no sólo reversibilidad del daño manifestado a las 24 h tanto en los lisosomas como en la proliferación de las células, sino la posible puesta en marcha de mecanismos defensivos de respuesta ante la exposición a concentraciones bajas del compuesto, menores o iguales a 1 mg/l.

La comparación entre los resultados de los ensayos de captación de rojo neutro y de la correspondiente captación relativa, es de utilidad para el estudio de las alteraciones tóxicas específicas lisosomales (Repetto y Sanz, 1993). La clorpromazina presenta unas curvas concentración-respuesta paralelas para ambos indicadores, en cada uno de los tres tiempos de exposición considerados. Este paralelismo indica que la alteración lisosomal precede a la de la proliferación celular. Pero además, a las 24 horas tiene lugar una disminución gradual de ambos indicadores prácticamente en forma concentración-dependiente, lo que concuerda con

la capacidad estabilizante de membrana citada por Henry y Cassidy (1986), que en el lisosoma impediría la entrada del colorante. A las 48 y 72 horas se observa, con las concentraciones más bajas, un incremento en ambos indicadores y disminución con las más altas. Este tipo de curva podría corresponder a permeabilización de la membrana lisosomal permitiendo una mayor incorporación del colorante.

Ni en las actividades de PFK ni la ENL, enzimas claves de la glucolisis, se detectan modificaciones significativas, por tanto no parece afectarse esta vía de utilización de la glucosa. Tampoco en la bibliografía revisada aparece reflejada ninguna referencia al respecto.

Sin embargo, aunque la primera etapa de la respiración celular (glucolisis) no se modifica, se ha detectado una duplicación en la actividad SDH (258.38 y 233.29 % con 0.1 y 1 mg/l respectivamente). Este significativo aumento es tanto más llamativo dado que esta enzima suele encontrarse muy por encima de los requisitos celulares (Lehninger, 1989) y por tanto los incrementos de actividad suelen ser difíciles de detectar. De hecho se sabe que este producto inhibe la fosforilación oxidativa por su capacidad de formar complejos con cofactores como el FAD (Cabrera y col., 1993). La oxidación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, catalizada por la SDH, es dependiente de FAD que se reduce e incorpora a la cadena respiratoria. Su bloqueo justifica pues, que se desencadene una respuesta de activación de este paso metabólico. Por tanto nuestro resultado es compatible y complementario a las observaciones referidas por estos autores y puede inferirse un efecto específico de la clorpromazina en la regulación alostérica de esta enzima no inducible.

Aunque algunos autores indican que la clorpromazina inhibe muchos sistemas de transporte de membrana, especialmente las ATPasas unidas a sarcolema (Robinson y col., 1968; Cabrera y col., 1993), nosotros no hemos detectado ninguna modificación en la ATPasa total. No obstante las células de neuroblastoma utilizadas en este trabajo han resultado poseer una actividad ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ muy pobre (véase el apartado 1.3.1.6 de métodos) por lo que en la actividad detectada contribuirá mayoritariamente la ATPasa Mg^{+2} , de significación fisiológica mal definida (Phillips y Hayes, 1989).

La medida de la actividad de la GAL ha mostrado en todos los casos una gran variabilidad tanto en los cultivos control como en general con los expuestos a los distintos productos ensayados. Debido a esto, el estudio estadístico no pone de manifiesto diferencias respecto al control en las modificaciones observadas en las gráficas. Al ser ésta una enzima inducible, la variabilidad observada entre pocillos de una misma placa de cultivo podría explicarse por una interferencia no controlada en los mecanismos de la inducción, lo que sería necesario confirmar en el futuro, con utilización de cultivos sincronizados.

En el caso de la clorpromazina aunque, como hemos indicado, sin significación estadística, se aprecia una clara tendencia al incremento de actividad de la GAL, de alrededor del 60 % tanto con 0.1 como con 1 mg/l. Por tanto no se puede descartar un daño sobre esta enzima lisosomal. Este resultado sería además concordante con la afectación señalada anteriormente sobre los lisosomas, detectada por la no correlación entre la proliferación celular y la captación relativa del rojo neutro. Así mismo se ha descrito que la clorpromazina libera al medio otras enzimas lisosomales, como la hexosaminidasa (Holmsen y Rygh, 1990). Además la GAL se induce cuando hay afectación de estructuras neuronales ricas en glucolípidos degradados por la GAL. El aumento de la actividad de la GAL es, según Dewar (1983), un índice de degeneración neuronal por lo que, pese a que el tratamiento estadístico de los datos no permite extraer conclusiones definitivas, no puede despreciarse un efecto neurotóxico, compatible con el uso terapéutico como neuroléptico de la clorpromazina. Además, las concentraciones utilizadas en los ensayos son comparables con las detectadas en el suero de pacientes con intoxicación por ingesta aguda, que se encuentran entre 0.5 y 1.5 mg/l (Bailey y Guba, 1979).

La actividad AChE ha mostrado una cierta tendencia a la inhibición, aunque no de forma estadísticamente significativa. En estudios de regulación enzimática de la AChE, Sekar y Roufogalis (1980) demostraron que la clorpromazina es capaz de unirse a esta enzima, mostrando una afinidad específica por el sitio aniónico catalítico α .

En conclusión, la clorpromazina ha demostrado toxicidad no muy elevada, con efecto citotóxico preferente sobre los lisosomas. Parece incrementar de forma específica a la SDH y por tanto al ciclo de Krebs. Se vislumbra un efecto neurotóxico sobre el que sería necesario

profundizar, tanto más cuanto esta sustancia se considera como prototipo de neuroléptico fenotiazínico.

2.- CICLOHEXIMIDA

La acción más conocida de la cicloheximida es la de ser un potente inhibidor de la síntesis proteica por bloqueo de la reacción de translocación en los ribosomas citosólicos de las células eucariotas (Alberts y col., 1989), siendo el compuesto más utilizado en investigación como prototipo de este tipo de acción (Budavari, 1989). Por ello, en el modelo celular propuesto, la proliferación celular, medida como contenido proteico total, se redujo ya a un 42.78 % a la concentración más baja (0.1 mg/l). Este efecto se agudiza al aumentar la concentración del tóxico y el tiempo de exposición.

La captación de rojo neutro fue incluso más sensible a la cicloheximida que la proliferación celular, aumentando el efecto tóxico con el tiempo de exposición. Los valores de CE-50 son la mitad de los de proliferación celular, dentro del mismo rango menor de 0.1 mg/l, que coincide para ambos parámetros. Esto es concordante con los resultados de Nordin y col. (1991) que concluyeron que los ensayos de RN y MTT (SDH) eran más sensibles que los ensayos de proliferación celular debido a que miden interferencias con funciones celulares específicas de forma más directa.

La reducción en la captación relativa de rojo neutro es aparentemente menor que la de la captación absoluta del colorante por el cultivo, debido a la gran inhibición ejercida por la cicloheximida en la proliferación celular. Según Berkaloff y col. (1981), la cicloheximida induce la formación de vacuolas autofágicas y éstas se forman a expensas de los lisosomas cuando se acumulan *detritus* intracelulares por daño celular generalizado.

De estos tres ensayos se puede concluir que la cicloheximida es un producto muy citotóxico, por lo que para la interpretación mecanicista de las actividades enzimáticas nos referiremos solamente a los valores correspondientes a la menor concentración ensayada (0.1 mg/l).

De acuerdo con la reducción de las actividades absolutas PFK, ENL y SDH pudiera pensarse que la cicloheximida deprimiría la vía glucolítica y el ciclo de Krebs. Pero, dado su potente citotoxicidad, esta reducción es consecuencia de la disminución de la proliferación celular en el cultivo. Cuando estas actividades se refieren al contenido proteico (actividades relativas), sólo se observaron modificaciones significativas con la concentración más baja, una reducción de la PFK y un ligero incremento de la SDH, que desapareció al aumentar la concentración. Por tanto podría tratarse de modificaciones transitorias que habría que comprobar con tiempos de exposición más largos a esa misma concentración. En resumen, parece que la cicloheximida no altera los marcadores estudiados del metabolismo de la glucosa ni en la glucolisis ni en el ciclo de Krebs. Tampoco en la bibliografía revisada se ha encontrado mención de un posible efecto específico sobre este proceso metabólico.

No se observaron modificaciones significativas en la actividad ATPasa respecto al control en ninguna de las concentraciones ensayadas. En la bibliografía revisada no se ha encontrado ninguna referencia de la toxicidad de la cicloheximida sobre esta enzima *in vivo*.

La duplicación observada en la actividad GAL puede interpretarse, de acuerdo con Dewar (1983) como un índice de degeneración del cuerpo neuronal. Este aumento sería una consecuencia de la actividad autofágica, citada anteriormente, que están sufriendo las células, puesto que esta enzima lisosomal inducible es la encargada de la degradación de glucolípidos especialmente abundantes en la célula nerviosa.

Por último también se ha observado el aumento de la actividad relativa de AChE. Sin embargo, según lo descrito por Brimijoin en una extensa revisión sobre esta enzima (1983), la cicloheximida causa disminución de la actividad total de la AChE en diafragma de rata. Estos cambios son mínimos y tempranos ya que los animales sobrevivían sólo 8 horas, debido a la inhibición de la síntesis proteica. Además esta alteración sólo era apreciable en la forma monomérica G_1 , agotando las reservas necesarias para la renovación, por ensamblaje, de la forma tetramérica G_4 , a medida que esta se libera en la transmisión nerviosa (Brimijoin, 1983). Pero, en sistema nervioso central, del 80 al 90 % de la AChE se encuentra en forma G_4 y el resto como remanente G_1 (Brimijoin, 1983). Por tanto, con la concentración más baja considerada, mientras la síntesis proteica no está aún tan dañada como para comprometer la

viabilidad celular, puede no sólo mantenerse intacta la actividad AChE, sino incrementarse ligeramente a expensas de las reservas ya sintetizadas de G₁. Aunque aparentemente los datos indican una duplicación de la AChE, la reducción en casi un 60 % del contenido proteico total sugiere que este incremento no se produzca por inducción ni por activación enzimática y sólo ocurra un mantenimiento de la actividad debido a las características peculiares de la enzima. De hecho, Clement (1993) observa *in vivo* que, a pesar de utilizar un pretratamiento con cicloheximida, se produce un aumento en la AChE tras el tratamiento con soman, potente anticolinesterásico, por el citado mecanismo de unión de precursores (G₁ previamente sintetizados en la célula).

Por otro lado, el incremento en AChE es concordante con la diferenciación morfológica que hemos observado tras el tratamiento con cicloheximida, ya que el aumento en AChE es considerado un marcador bioquímico de diferenciación en el clon Neuro-2a (Blume y col., 1970).

Como consecuencia de todo lo anteriormente expuesto, en el modelo utilizado se ha comprobado el mecanismo de acción primario de la cicloheximida como inhibidor de la proliferación celular, al inhibir la síntesis proteica, y secundariamente, al utilizar una célula de origen neuronal, destaca la activación de una actividad degradativa específica.

3.- DINITROFENOL

La afectación de la proliferación celular por el dinitrofenol, varió según el período de exposición. Mientras que a las 48 y 72 h la diferencia respecto al control no fue significativa hasta los 10 mg/l (80.62 y 82.18 % respectivamente), a las 24 horas de exposición, el resultado es significativo desde la concentración más baja ensayada (0.1 mg/l; 85.22 %) aunque el efecto no es muy llamativo y progresa lentamente con el aumento de concentración.

Al comparar los resultados de proliferación celular, que como hemos visto disminuye, y los de captación de rojo neutro, que se incrementa a las 24 h de exposición, se pone de manifiesto un posible daño lisosomal producido por el dinitrofenol en este período de exposición. Además, sólo a las 24 h la captación relativa de rojo neutro presenta desde la

concentración más baja, diferencias significativas respecto al control y alcanza valores de hasta el 300 % de éste. Esta importante estimulación de la captación relativa de rojo neutro, refleja una activación de la función lisosomal. El mecanismo podría ser similar al del metilmercurio (Repetto y col., 1993), con el que se ha observado que los primeros cambios ultraestructurales producidos en neuronas *in vivo* consisten en un incremento en el número de lisosomas (Chang, 1980).

Se sabe que el dinitrofenol origina *in vivo* un aumento general de la velocidad metabólica celular en animales intactos y tejidos aislados (Astwood, 1970). Hatefi y Stiggall (1976) han descrito la activación de la SDH por el 2,4-dinitrofenol. En el modelo celular propuesto, se realiza un seguimiento de las vías metabólicas principales en neuronas, glucolisis y ciclo de Krebs, a través de la medida de las enzimas PFK y ENL y de la SDH respectivamente. De acuerdo con lo esperado, en las tres enzimas se observó un aumento significativo respecto al control a partir de 1 mg/l, siendo este aumento aún más patente para la SDH. Pese a la normal dificultad de la SDH a manifestar activación, debido a su capacidad catalítica superior a los requisitos celulares, el claro incremento provocado por el dinitrofenol puede justificarse por ser el mecanismo de acción primario de este compuesto el desacople de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Alberts, 1989). Otros compuestos desacoplantes, como el arseniato sódico, también incrementan la actividad SDH en cultivos de células de neuroblastoma (Repetto y col., 1994a). La SDH es una de las enzimas claves del ciclo de Krebs en la generación de poder reductor como $FADH_2$ que se incorpora a la cadena respiratoria; la activación de SDH sería una forma de compensar el bloqueo de ésta, mientras el daño celular general no sea irreversible, como ocurre con la concentración mayor (100 mg/l).

No se detectó modificación de la actividad ATPasa total respecto al control a ninguna de las concentraciones de tóxico ensayadas, a pesar de que cabría esperar una inhibición de su actividad por la falta del sustrato, ATP, citada por otros autores (Astwood, 1970).

El aumento significativo de la β -galactosidasa respecto al control a partir de 1 mg/l, puede deberse, en el caso del dinitrofenol, a su acción general de aumentar la velocidad metabólica, más que a un efecto neuronal específico señalado por Dewar (1983), ya que no

deben interpretarse aislados del conjunto cada uno de los indicadores de la batería.

La posible ausencia de neurotoxicidad de este compuesto se refuerza por el hecho de no haberse detectado, ni con la concentración más alta, ninguna alteración de la AChE.

4.- ACIDO IODOACETICO

De acuerdo con los resultados obtenidos puede definirse al ácido iodoacético como un potente agente citotóxico, ya que inhibió la proliferación celular de forma significativa desde la concentración más baja ensayada, de forma concentración-dependiente hasta 1 mg/l y ya a 10 mg/l los cultivos están totalmente agostados. Al actuar el ácido iodoacético uniéndose a los grupos -SH de las enzimas y otras proteínas (Sabri y Spencer, 1981; Ochs y Smith, 1971), produciría inhibición de actividad e incluso, a las concentraciones más altas, la desnaturalización estructural de éstas, por bloqueo de los residuos de cisteína principales responsables del mantenimiento de su estructura terciaria, y finalmente muerte celular.

Cuando se une a las proteínas de membrana, puede actuar modificándola afectando su permeabilidad. Está descrito que el ácido iodoacético aumenta la permeabilidad a la H^3 -inulina en los islotes de Langerhans de sapo *in vitro* (Cooperstein y Watkins, 1978), lo que está de acuerdo con el incremento observado de captación de rojo neutro a las 24 y 48 h a la concentración más baja. Sin embargo ya a la concentración siguiente, las células dejan de captar el colorante debido a desestructuración como consecuencia de su elevada citotoxicidad.

Este hecho se hace aún más patente en la CRRN. A la concentración más baja, el ácido iodoacético permeabiliza la membrana lisosomal, sobre todo a las 24 h, aunque el efecto no es significativo respecto al control, posteriormente y de forma muy rápida cabe suponer destrucción lisosomal y celular.

Respecto al metabolismo de la glucosa, observamos que ni la PFK, ni la ENL, ni la SDH sufren diferencias significativas respecto al control hasta los 10 mg/l. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la bibliografía, ya que el ácido iodoacético aunque se une a los grupos -SH de las enzimas, parece presentar, dentro del metabolismo glucídico, una

cierta especificidad hacia la gliceraldehido-3P-deshidrogenasa. Su efecto sobre otras enzimas glucolíticas podría ser relativamente insignificante a las concentraciones más bajas, cuando aún no hay efecto citotóxico, pues su bloqueo es fácilmente reversible en presencia de piruvato o lactato (Sabri y Spencer, 1981; Ochs y Smith, 1971). Además, *in vitro*, algunas enzimas glucolíticas exhiben una sensibilidad variable a los agentes neurotóxicos (Howland y col., 1980). Al igual que para la acrilamida, para el ácido iodoacético la sensibilidad de la PFK es mayor que la de la ENL, lo que se observa a las concentraciones más bajas, aunque como ya se ha indicado, cuando el daño celular es muy grande y el número de células se ha reducido mucho en el cultivo, los resultados observados son a menudo artefactos.

Pero la actividad ATPasa total tampoco sufre modificaciones significativas respecto al control, a pesar de haberse descrito que produce una disminución del contenido de ATP en cultivos de hepatocitos (Nieminen y col., 1988).

Así mismo ni la GAL, ni la AChE se afectan a las concentraciones menos citotóxicas. Cabe suponer, por tanto, que las células de neuroblastoma utilizadas sean especialmente sensibles al efecto citotóxico de este compuesto, de forma que no llegan a detectarse modificaciones específicas, al menos en los marcadores utilizados. Respecto a éstas, actuaría de forma "todo o nada": o no se afecta la actividad celular, o se destruye totalmente la propia célula.

Este comportamiento peculiar del cultivo de Neuro-2a, incluso contradictorio con lo que se sabe del mecanismo de acción tóxica *in vivo* en otros tipos celulares puede ser una consecuencia de la neurotoxicidad del compuesto propuesta por Sabri y Spencer (1981) y Ochs y Smith (1971).

5.- ACIDO KAINICO

Salvo ligeras fluctuaciones, el ácido kaínico no parece afectar a la proliferación de las células de neuroblastoma Neuro-2a, sino que incluso a las 72 h, estimula significativamente su crecimiento alrededor de un 20 % a partir de 1 mg/l, e independientemente de la concentración. Prácticamente lo mismo ocurre con la captación del rojo neutro y su captación

relativa, ya que las fluctuaciones que se observan a las 24 horas no tienen significación estadística.

El ácido kaínico, resultó ser por tanto, un producto muy poco citotóxico que además no produce ningún tipo de daño específico lisosomal, con una CE-50 por encima de la concentración más alta ensayada, lo que nos puede permitir valorar de forma fiable los efectos metabólicos observados como alteraciones específicas en el mecanismo de acción.

A pesar del aumento conocido del consumo de la glucosa en cerebro producido por el ácido kaínico *in vivo*, responsable de una acidosis regional, sólo se ha demostrado un modesto aumento del lactato cerebral (Kobayashi y col., 1990) y, dentro de márgenes fisiológicos en distintas enzimas glucolíticas y de la vía de las pentosas fosfato tras su inyección intraventricular (Leong, 1991). *In vitro*, en la línea celular Neuro-2a, se observó que la primera fase de la glucolisis cuya enzima clave es la PFK usada como indicador, no se vio afectada por la acción de este análogo del glutamato, no teniendo diferencias significativas respecto al control, a ninguna de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, la ENL (indicador de la segunda fase glucolítica), se encuentra disminuida un 20 % desde la concentración de tóxico más baja ensayada, 0.1 mg/l. Aunque de forma leve y no dependiente de la concentración, el ácido kaínico parece inhibir de forma específica a la actividad de la enolasa. También se ha descrito ligera disminución, no fisiopatológica, de la hexoquinasa cerebral *in vivo* (Leong, 1991).

Howland y col. (1980) indicaron que la sensibilidad de algunas enzimas glucolíticas *in vitro* es variable según el neurotóxico empleado en el ensayo. Así, el ácido kaínico sigue al modelo de la 2,5-hexanodiona, siendo la sensibilidad de la enolasa mayor que la de la fosfofructoquinasa.

El ciclo de Krebs, para el que se ha utilizado como indicador a la SDH, no parece afectarse significativamente respecto al control, a pesar de la inhibición del 20 % de la ENL, y por tanto, la reducción de piruvato en la célula, sustrato inicial del ciclo de Krebs. Pero como la SDH trabaja por debajo de sus posibilidades (Lehninger, 1989), leves cambios en su actividad son muy difíciles de detectar.

A pesar del descenso en ATP que se produce en la célula tras la acidosis provocada por el ácido kaínico (Murphy y Miller, 1989), la actividad ATPasa total, no se afecta de forma significativa respecto al control hasta la concentración ensayada de 10 mg/l, a partir de la cual la actividad aumenta ligeramente un 10.83 % . Está descrito en la bibliografía, que la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ puede invertirse de modo que sintetiza ATP cuando se somete a gradientes iónicos pronunciados (Stryer, 1991; Xie, 1989; Mummery, 1981). Se sabe que el ácido kaínico produce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{+2} en neuronas *in vitro* (Murphy y Miller, 1989) y que la despolarización que provoca en astrocitos *in vitro* también causa salida de iones K^+ (Mac Vicar y col., 1988). Todas estas modificaciones podrían revertir la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ hacia la síntesis de ATP.

La enzima β -galactosidasa tiene una actividad relativa significativamente distinta del control, inhibiéndose de forma concentración-dependiente, aunque la CE-50 sea mayor de 100 mg/l. Esto podría deberse a que el ácido kaínico produce acidosis, que inhibe directamente el proceso metabólico, perturbando severamente la restauración del metabolismo neuronal (Kobayashi, 1990).

A pesar de que Bisso y col. (1988) concluyeran que en el cortex frontoparietal de la rata, la forma G_4 de la AChE se enriquece en las terminales nerviosas presinápticas tras producir lesiones con ácido kaínico en el núcleo basal, o que, por el contrario, Atterwill (1987) indicara que a altas concentraciones y en exposiciones prolongadas se produce una marcada reducción de la AChE, no hemos encontrado diferencias significativas de esta actividad respecto al control.

En conclusión, el ácido kaínico ha resultado ser muy poco citotóxico, incluso ligeramente estimulante a las 72 horas de exposición en el modelo utilizado, con una leve acción inhibidora sobre la enolasa. A las concentraciones ensayadas, que han resultado ser subtóxicas, el efecto más llamativo de este producto sería la inhibición de la GAL, lo que está de acuerdo con la acción estimulante detectada sobre este tipo celular. La falta de neurotoxicidad puede ser debida a la ausencia de receptores del glutamato en las células de neuroblastoma Neuro-2a no diferenciadas (Van der Valk y Vijverberg, 1990).

6.- OUABAINA

La ouabaína no penetra en las células, sino que se une a un lugar de la ATPasa Na^+/K^+ específico para ella, localizado en la superficie extracelular (Montgomery y col., 1982). Por tanto, a concentraciones bajas y 24 h, el aumento observado en el contenido proteico, podría deberse a un efecto rebote de la célula para adaptarse a la nueva situación, y a concentraciones superiores ya no hubo variación respecto al control. En la única concentración a la que se vio efecto tóxico en todos los períodos de exposición fue a 100 mg/l (61.51 % a 24 h; 81.54 % a 48 h y 27.38 % a 72 h). Por tanto, sólo se pudo obtener un valor de la CE-50 para el tiempo de exposición más prolongado (CE-50 = 31 mg/l a las 72 h).

Mientras que a las 24 horas se observó a concentraciones bajas estimulación de la proliferación celular sin modificación de la captación del rojo neutro, conforme transcurre el tiempo y las células estabilizan su ritmo de crecimiento, tiene lugar un ligero incremento en la permeabilidad lisosomal. Con la concentración más alta, única que puede considerarse tóxica, se observa a las 48 y 72 horas un bloqueo lisosomal más llamativo que el de la proliferación.

Las fluctuaciones que se observan a las 24 horas en la captación relativa del rojo neutro, a pesar de ser significativamente diferentes respecto al control, deben considerarse como reflejo de las correspondientes alteraciones del contenido proteico total, sin que deba deducirse ningún tipo de alteración lisosomal. Sin embargo con 48 y 72 horas de exposición tendría lugar un ligero aumento de la permeabilidad lisosomal con ruptura a la concentración más alta ensayada.

Consecuentemente, la ouabaína resultó ser un producto poco citotóxico en el modelo experimental propuesto, con CE-50 mayores de 100 mg/l a las 24 y 48 h para los tres ensayos comentados, con solo ligera afectación lisosomal.

En la bibliografía revisada no se describe afectación de la vía glucolítica por la ouabaína. En las células Neuro-2a utilizadas, tampoco se han apreciado modificaciones

significativas en las enzimas glucolíticas PFK y ENL, ni en la SDH del ciclo de Krebs, salvo un ligero incremento con 100 mg/l que no supera en ninguna de ellas un 50 % respecto al control.

A pesar de que cabría pensar que la ouabaína, potente inhibidor de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, afectara sensiblemente a la actividad ATPasa total de la célula, no se observaron diferencias significativas respecto al control. Pero, por una parte, se sabe que en nervio ciático de ratón, la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ sólo representa un 10 % de la total (Hermenegildo y col., 1992) y posiblemente en las células indiferenciadas de neuroblastoma de ratón todavía puede ser menor esta proporción. No existen datos bibliográficos al respecto, aunque ensayos previos que no figuran en esta memoria, tienden a confirmar esta suposición. En consecuencia, con el modelo de ensayo utilizado pudiéramos no detectar oscilaciones muy pequeñas de esta enzima. Además, la ATPasa Mg^{+2} , que prácticamente coincidiría con la total en estas células, no es sensible a la acción de la ouabaína (Phillips y Hayes, 1989). Por otra parte, como ya hemos indicado, se ha utilizado un mismo espectro de concentraciones en todos los ensayos, útil para establecer baremos de toxicidad general, y en este margen la ouabaína ha resultado encontrarse por debajo de concentraciones tóxicas. De hecho, de acuerdo con Mummery y col. (1981) son necesarias concentraciones entre 0.2 mM y 5 mM para inhibir la ATPasa. Por tanto, la mínima concentración de ouabaína utilizada para inhibir la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en estudios cinéticos se encuentra incluso por encima de la máxima usada en nuestro modelo (100 mg/l equivale a 0.17 mM).

Como ya se ha indicado la ouabaína no penetra en el interior celular y actúa por unión a lugares extracelulares de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de membrana. Aunque esta enzima ha resultado ser muy poco abundante en las células de Neuro-2a, es posible que haya sido suficiente para retener las concentraciones utilizadas de ouabaína, sin llegar a inhibirse ni desencadenarse otras alteraciones bioquímicas secundarias al deterioro de mecanismos de transporte.

Se sabe que en cerebro, la ATPasa utiliza un 70 % de la energía respiratoria (Lehninger, 1989). Por tanto, si se inhibe, la respiración celular lo hace otro tanto. Los resultados encontrados en nuestro modelo para metabolismo respiratorio y ATPasa, sin

alteración en ninguna de las dos, siguen siendo concordantes entre sí.

Tampoco la β -galactosidasa sufrió diferencias significativas respecto al control a ninguna de las concentraciones ensayadas, ni existen en la bibliografía revisada referencias al respecto.

Aunque según la representación gráfica la AChE y la GAL se comportan de forma paralela, al ser más homogénea la respuesta entre pocillos de la primera, las fluctuaciones observadas resultan ser estadísticamente significativas. Así se observa inhibición a concentraciones bajas (al 69.61 % del valor control) e incremento a concentraciones altas (al 122.41 %). Algunos autores han descrito *in vitro*, en la fracción cruda de sinaptosomas especialmente ricas en transmisores enzimáticos, un incremento en la liberación de acetilcolina (sustrato de la AChE) a concentraciones bajas (10 μ M que equivale a 5.8 mg/l) que no afectan a los procesos de membrana dependientes de ATP, ni a la respiración celular (Prado y col., 1990; Ribeiro y col., 1989; Ribeiro y Gómez, 1986). A esa misma concentración ya se está recuperando en el modelo propuesto, la inhibición inicial de la actividad y tampoco se obtuvieron modificaciones en la ATPasa ni en la respiración celular.

En conclusión la ouabaína ha sido poco citotóxica a las concentraciones ensayadas, observándose tan sólo alteraciones leves de la actividad AChE.

CONSIDERACIONES DE CARACTER GENERAL

Como resumen de lo expuesto en la Discusión, cabe decir que, en líneas generales, desde un punto de vista cualitativo, se han encontrado resultados concordantes entre los efectos celulares observados *in vitro* y los conocimientos que se tienen sobre el mecanismo molecular de acción de los compuestos ensayados, obtenidos con otros modelos experimentales, la mayoría *in vivo*.

Por otra parte, los indicadores ensayados han manifestado un amplio abanico de respuestas, lo que les confiere la suficiente versatilidad para suministrar información sobre los mecanismos de acción de una variada gama de compuestos. Es más, ofrecen garantías de éxito en la ampliación de la batería con nuevos marcadores enzimáticos de otras vías metabólicas. Con ello se consolidan las posibilidades de la utilización de los modelos *in vitro* con fines mecanicistas.

La batería ensayada ha permitido investigar los mecanismos de neurotoxicidad, que será necesario, en un futuro, profundizar con nuevos indicadores específicamente neuronales, tales como los relacionados con receptores o neurotransmisores, que requieren en general técnicas más especializadas, sofisticadas y costosas, que no es prudente introducir antes de comprobar la eficacia de un modelo más sencillo.

Una vez comprobado el funcionamiento del modelo para reproducir el mecanismo de toxicidad *in vivo*, se podrá ampliar mediante estudios ciegos de una gama de productos y establecer correlaciones cuantitativas, con valor estadístico, entre los parámetros de toxicidad *in vivo* e *in vitro*. Debe tenerse presente que los resultados obtenidos sobre un determinado sustrato biológico (en nuestro caso células de neuroblastoma) pueden no ser totalmente extrapolables a cualquier tipo de células, con diferentes características morfológicas y

funcionales.

Ateniéndonos exclusivamente a los resultados obtenidos en la medida de la proliferación celular podemos establecer la siguiente gradación creciente de toxicidad general: ácido kaínico < ouabaína < dinitrofenol < clorpromazina < ácido iodoacético < cicloheximida. Esta misma secuencia se obtiene si consideramos la CE-50 de viabilidad (CRRN). Por tanto, ambos parámetros son cualitativamente equiparables, y de acuerdo con lo previsto por otros autores (Nordin y col., 1991) la captación de rojo neutro puede ser un parámetro más sensible de citotoxicidad que la proliferación celular. Este hecho es particularmente llamativo en la cicloheximida, a pesar de ser un compuesto cuyo principal efecto tóxico es la inhibición específica de la síntesis proteica.

Sobre los marcadores específicos neuronales introducidos, GAL y AChE, los compuestos no neurotóxicos no han mostrado una especial acción, lo que no puede interpretarse independientemente de otros efectos bioquímicos. Sin embargo, los neurotóxicos sí han producido efectos claramente indicativos de daño neuronal, como la clorpromazina, o bien una marcada acción general en este tipo de células como en el caso del ácido iodoacético. Para los compuestos que actúen sobre los receptores del glutámico habría que utilizar células diferenciadas (Van der Valk y Vijverberg, 1990), lo cual se consigue tratando a las células con mitomicina C y 5-bromo-2-desoxiuridina (Thomas y col., 1991; Johnston y col., 1991).

El modelo propuesto ha resultado satisfactorio para investigar efectos citotóxicos de los compuestos orgánicos. Además, ofrece adecuadas perspectivas de, ampliando el número de marcadores neuronales, poderlo utilizar como ensayo de criba para diferenciar sustancias cito y neurotóxicas, y someterlo a un programa de validación.

Por tanto, y de acuerdo con las tendencias actuales de la toxicología *in vitro*, el trabajo recogido en esta memoria demuestra la utilidad de este tipo de ensayos en los estudios mecanicistas como alternativos y/o complementarios a los ensayos *in vivo*.

CONCLUSIONES

- 1^a.- Se han adaptado como métodos de aplicación *in vitro* a cultivos de células de neuroblastoma (Neuro-2a), las determinaciones bioquímicas de la actividad fosfofructoquinasa, enolasa, β -galactosidasa y ATPasa, además se ha utilizado la determinación del contenido proteico total, la captación relativa de rojo neutro, la actividad succinato-deshidrogenasa y acetilcolinesterasa, que permiten valorar las actividades basales, del metabolismo energético y de implicación neuronal.
- 2^a.- Como aportación al conocimiento de la toxicidad celular de los distintos compuestos, se ha comprobado que:
- 2^a.1.- La clorpromazina presenta una toxicidad no muy elevada sobre las células Neuro-2a, con efecto tóxico preferentemente sobre los lisosomas, y ejerce una acción estimulante sobre el ciclo de Krebs.
- 2^a.2.- La citotoxicidad de la cicloheximida es muy elevada con gran afectación de la función lisosomal. Induce la diferenciación celular con aumento específico de actividad acetilcolinesterásica.
- 2^a.3.- Las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo energético se incrementan significativamente por el 2,4-dinitrofenol, cuya citotoxicidad no ha sido muy elevada.
- 2^a.4.- El ácido iodoacético se ha manifestado como un potente agente citotóxico sobre este tipo de células, no detectándose modificaciones específicas en los marcadores estudiados.

- 2^a.5.- El ácido kaínico ha sido muy poco citotóxico sobre las células Neuro-2a, provocando incluso una ligera estimulación de la proliferación celular con exposición prolongada.
- 2^a.6.- La ouabaína ha mostrado poca citotoxicidad a las concentraciones ensayadas, observándose tan sólo modificaciones acetilcolinesterásicas.
- 3^a.- El orden de toxicidad obtenido *in vitro* para los compuestos ensayados fue, en forma creciente: ácido kaínico < ouabaína < dinitrofenol < clorpromazina < ácido iodoacético < cicloheximida.
- 4^a.- La batería de ensayos propuesta ha proporcionado resultados concordantes entre los efectos celulares observados *in vitro* y los conocimientos previos sobre el mecanismo molecular de acción de los compuestos ensayados, obtenidos con otros modelos experimentales, la mayoría de ellos *in vivo*.
- 5^a.- Los indicadores ensayados han manifestado un amplio abanico de respuestas, lo que les confiere una gran versatilidad para suministrar información sobre los mecanismos de acción celular de una variada gama de compuestos.
- 6^a.- La batería propuesta permite detectar diferentes mecanismos de neurotoxicidad, y posibilita su ampliación con nuevos indicadores neuronales, tales como los relacionados con los receptores o neurotransmisores, o por estimulación de actividades específicas tras la inducción de su diferenciación.
- y 7^a.- Por último, y de conformidad con lo anteriormente expuesto, el modelo experimental propuesto, a pesar de las limitaciones propias de los métodos *in vitro*, es útil para detectar efectos citotóxicos. Además, ofrece la posibilidad de ser utilizado como ensayo de criba para la detección y evaluación de la capacidad cito y neurotóxica de las sustancias químicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abou-Donia MB, Lapadula DM, Carrington CD (1988) Biochemical Methods for Assessment of Neurotoxicity. En: Ballantine B (ed) Perspectives in brain and applied toxicology. Butterworth y Co. LTD, Salisbury, pp. 1-30

Alberts B, Bray D, Lewis L, Raff M, Roberts K, Watson JD (1989) Molecular Biology of The Cell. 2ª Ed, Garland Publishing, Nueva York

Amano T, Richelson E, Nirenberg M (1972) Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. Proc Natl Acad Sci USA 69: 258-263

Andres C, El Mourabit M, Stutz C, Mark J, Waksman A (1990) Are soluble and membrane-bound rat brain acetylcholinesterase different?. Neurochem Res 15(11): 1065-1072

Andrés MI, Sanz P, Repetto G, Repetto M (1993) Comparación de los ensayos de citotoxicidad del contenido proteico y de la captación relativa de rojo neutro, según el período de exposición. Rev Toxicología 10(2): 92

ANON. Cycloheximide. Enero/febrero 1989.

Astwood EB (1970) Thyroid and antithyroid drugs. En: Goodman LS, Gilman A (eds) The Pharmacological Basis of Therapeutics. MacMillan, New York, pp. 1466-1511

Atterwill CK (1990) Neurotoxicity *in vitro*: model systems and practical applications. Comparative studies with the cholinergic neurotoxin in primary brain cultures and in rabbit retina *in vivo*. Toxic in Vitro 4 (4/5): 346-355

Atterwill CK (1987) Brain reaggreagate cultures in neurotoxicological investigations. En: Atterwill CK, Steele CE (eds) *In Vitro Methods in Toxicology*. Cambridge University Press, Cambridge

Atterwill CK, Hillier G, Johnston H, Thomas SM (1992) A Tiered System for *In Vitro* Neurotoxicity Testing: a Place for Neural Cell Line and Organotypic Cultures?. En: Zbinden G (ed) *The Brain in Bits and Pieces*. MTC Verlag, Zollikon, pp. 81-113

Atterwill CK, Simpson MG, Evans RJ, Allen SL, Ray D (1991) Alternative Methods and their application in Neurotoxicity Testing. En: Balls M, Bridges J, Southee J (eds) *Animals and Alternatives in Toxicology*. MacMillan Pres, London, pp. 121-150

Augusti-Tocco G, Sato G (1969) Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 311-315

Babich H, Borenfreund E (1987) Structure-activity relationship (SAR) models established in vitro with the neutral red cytotoxicity assay. *Toxic in Vitro* 1(1): 3-9

Bailey DN, Guba JJ (1979) Gas-chromatographic analysis for chlorpromazine and some of its metabolites in human serum, with use of a nitrogen detector. *Clin Chem* 25: 1211-1215

Balls M, Blaauboer B, Brusick D, Frazier J, Lamb D (1990) Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA* 18: 313-337

Balls M, Bridges JW (1985) Acute toxicity testing: alternative aproaches. En: Goldberg AM (ed) *Alternative methods in toxicology*. Vol. 2. Liebert MA, New York, pp. 61-79

Balls M, Blaauboer BJ, Bruner L, Combes R, Ekwall B, Fielder R, Guillouzo A, Lewis D, Lowel D, Reinhardt C, Repetto G, Sladowski D, Spielman H, Zucco F (1994) Report and practical recommendations of an ECVAM workshop on the validation of toxicity testing procedures. *ATLA* 22, en prensa

Bass RR, Vargas J (1990) The Antipsychotic Drugs. En: Haddad MD, Winchester, J (eds) Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose. 2^a Ed. Saunders, Philadelphia, pp. 780-784

Bellomo G, Orrenius S (1985) Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 5: 876-882.

Bendford DJ (1987) Biological Models as Alternatives to Animal Experimentation. *ATLA* 14: 318-328

Bendford DJ, Hubbard SA (1987) Preparation and culture of mammalian cells. En: Snell K, Mullock B (eds) *Biochemical toxicology. A practical approach*. IRL Press, Oxford, pp. 57-82

Berkaloff A, Bourguet J, Favard P, Lacroix JC (1981) Lisosomas. En: *Biología y fisiología celular II*. OMEGA, Barcelona

Bernson V, Clausen J, Ekwall B, Hensten-Pettersen A, Holme J, Högberg J, Niemi M, Walum E (1986) Trends in Scandinavian cell toxicology. *ATLA* 13(3): 162-179

Bianchi V, Fortunati E (1990) Cellular effects of an anionic surfactant detected in V79 fibroblasts by different cytotoxicity tests. *Toxicol in Vitro* 4(1): 9-16

Bisso GM, Diana G, Fortuna S, Meneguz A, Michalek H (1988) Change in the distribution of acetylcholinesterase molecular forms in frontoparietal cortex of the rat following nucleus basalis lesions with kainic acid. *Brain Research* 449: 391-394.

Bloxham DP, Lardy HA (1973) Phosphofructokinase. En: Boyer, PD (ed) *The Enzymes* vol VIII, 3^a Ed. Academic Press, New York, pp. 239-278

Blume A, Gilbert S, Wilson J, Farber R, Rosenberg R, Nirenberg MW (1970) Regulation of acetylcholinesterase in neuroblastoma cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 67: 786-792

Boonstra J, Mummery CL, Tertoolen LGJ, Van der Saag PT, De Laat SW (1981) Characterization of $^{42}\text{K}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ transport and electrical membrane properties in exponentially growing neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 643: 89-100

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N (1988) Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays. The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol in Vitro* 2(1): 1-6

Borenfreund E, Puerner JA (1986) Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicology* 39: 121-134

Borenfreund E, Puerner JA (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth* 9: 7-9

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 246

Bradlaw J (1986) Evaluation of drug and chemical toxicity with cell culture systems. *Fundamental and Applied Systems* 6: 589-606

Bretherick L (1975) *Handbook of Reactive Chemical Hazards*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL

Bridges JW, Garattini S (1990) Methods to detect toxic effects in specific mammalian organs and physiological systems. En: Bourdeau P, Somers E, Richardson GM, Hickman JR (eds) *Short-term Toxicity Test For Non-genotoxic Effects*. John Wiley and Sons, New York, pp. 11-45

Brimijoin S (1983) Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: Nature, localization and dynamics. *Progress in Neurobiology* 21: 291-322

Brodie AE, Reed DJ (1990) Cellular recovery of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and thiol status after exposure to hydroperoxides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 276(1): 212-218

Bruin A (1976) *Biochemical Toxicology of Environmental Agents*. Elsevier, Amsterdam

Budavari S (1989) *The Merck Index*, 11th ed. Merck and Co, Inc, Rahway, New Jersey

Cabrera R, Mencías E, Cabrera J (1993) Neurolépticos. En: *Toxicología de los psicofármacos*. Línea S.N.C. Beecham, Madrid, pp. 132-136

Carr LA, Wehry SM (1980) Effect of cycloheximide and *d*-amphetamine on brain catecholamines in two mouse strains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 13: 193-197

Carrington CD, Carrington MN, Abou-Donia MB (1985) Neurotoxic esterase in cultured cells; An *in vitro* alternative for the study of organophosphorous compound-induced delayed neurotoxicity. En: *In vitro toxicology*. Vol. 3. Alternative methods in Toxicology. Liebert, ME, New York, pp. 454-465

Castell JV, Gómez Lechón MJ (1992) *In vitro* alternatives to animal Pharmacotoxicology. Farmaindustria, Madrid

Chang LW (1980) Mercury. En: Spencer PS, Shaumburg HH (eds) *Experimental and clinical neurotoxicology*. Williams and Wilkins Co, Baltimore, pp 508-526

Chuang N (1990) A neutral β -galactosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus Monodon* (Crustacea: Decapoda): Dimeric and sialylated. *Comp Biochem Physiol* 96b(4): 747-751

Clement JG (1993) Recovery from soman-induced hypothermia is due to an increase in acetylcholinesterase activity but not new protein synthesis. *Neurotoxicology* 14(4): 411-416

Clementi F, Cabrini D, Gotti C, Fornasari D (1987) A human neuroblastoma cell line for neurotoxicity testing *in vitro*: effects of heavy metals. En: Shahar A, Goldberg AM (eds) *In models systems in neurotoxicology alternatives approaches to animal testing*. Progress in clinical and biological research vol. 253. Liss, AR, New York, pp. 137-149

Cooperstein SJ, Watkins D (1978) Effect of sulfhydryl-binding reagents on islet tissue permeability: protection and reversal by D-glucose and phlorizin. *J Pharmacol Exp Ther* 204: 230-239

Coyle JT (1983) Neurotoxic Action of Kainic Acid. *J Neurochem* 41(1): 1-11

Cremer JE (1981) Specific toxic effects on the nervous system. En: Brow SS, Davies DS (eds) *Organ directed-toxicity*. Pergamon, Exeter

Cull M, McHenry CS (1990) Preparation of Extracts from Prokaryotes. *Methods in Enzymology* 182: 147-154

Dale HH (1914) The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J Pharmacol and Exp Ther* 6: 147-190

Damstra T, Bondy SC (1982) Neurochemical Approaches to the Detection of Neurotoxicity. En: Mitchell CL (ed) *Nervous System Toxicology*. Raven Press, New York, pp. 349-373

Davenport CJ, Morgan KT (1988/89) *In vitro* Neurotoxicology: Industrial Applications. *In vitro Toxicol* 2(3): 207-218

Davis PW (1970) Inhibition of renal Na⁺/K⁺-Activated adenosine triphosphatase activity by ethacrynic acid. *Biochemical Pharmacology* 19: 1983-1989

Dewar AJ (1983) Neurotoxicity. En: Balls M, Riddell RJ, Worden AN (eds) *Animals and Alternatives in Toxicity Testing*. London: Academic, London, pp. 229-284

Dewar AJ (1981) Neurotoxicity testing with particular reference to biochemical methods. En: Gorrod JW (ed) *Testing for toxicity*. Taylor and Francis, London, pp. 199-217

Dreisbach RH (1983) *Handbook of Poisoning*, 11th ed. Lange Medical Publications, Los Altos, California

Duncan CJ (1989) Mechanisms that produce rapid damage to myofilaments of amphibian skeletal muscle. *Muscle and Nerve* 12: 210-218

Edson EF (1955) Emergencies in general practice. Agricultural poisons. *Br Med J* 1: 841-844.

EEC (1987) Council Directive 87/18/EEC on the harmonization of the laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the Principles of Good Laboratory Practice and the verification of their application for tests on chemical substances. *OJEC* 15, 17.1.1 87, Brussels.

Ekwall B (1992) Validation of *in vitro* cytotoxicity tests. En: Castell JV, Gómez-Lechón MJ (eds) *In vitro* alternatives to animal pharmaco-toxicology. Farmaindustria, Madrid, pp. 361-396

Ellenhorn MJ, Barceloux DG (1988) Neuroleptic drugs. En: *Medical Toxicology*. Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 477-490

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmac* 7: 88-95

EPA (1985) EPA Chemical profile on Environmental Protection Agency Washington, DC.

Erkell LJ (1980) Differentiation of mouse neuroblastoma cells under increased oxygen tension. *Expl Cell Biol* 48: 374

Esmann M (1984) The distribution of C₁₂E₈-solubilized oligomers of the (Na⁺ +K⁺)-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 787: 81-89

Fautrel A, Chesné C, Guillouzo A, De Sousa G, Placidi M, Rahmana R, Braut F, Pichon J, Hoellinger H, Vintézou P, Diarte I, Melcion C, Cordier A, Lorenzon G, Benicourt M, Vannier B, Fournex R, Peloux AF, Bichet N, Gouy D, Cano JP, Lounes R (1991) A multicentre study of acute *in vitro* cytotoxicity in rat liver cells. *Toxic in Vitro* 5(5/6): 543-547

Fedalei A, Nardone RM (1983) An *in vitro* alternative for testing the effect of organophosphates on neurotoxic esterase activity. En: Products safety evaluation. Vol. 1, Alternative methods in toxicology. Liebert MA, New York, pp. 22-269

Festing MFW, Eydmann T (1987) Genetic variation in the response of mice to xenobiotics *in vitro*. I. General methodology and response to some model compounds. *Toxicol in Vitro* 1(3): 115-125

Fikes JD, Lovell RA, Metzler M (1989) Dinoseb toxicosis in two dogs. *J Am Vet Med Assoc* 194: 543-544

Frazier JM (1992) General Perspectives on *in Vitro* Toxicity Testing. En: Frazier JM (ed) *In Vitro Toxicity Testing*. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 1-11

Furlanut M, Benetello P, Baraldo M, Zara G, Montanari G, Donzelli F (1990) Chlorpromazine disposition in relation to age in children. *Clin Pharmacokinet* 18: 329-331

Gad SC (1992) Industrial Applications for *in vitro* Toxicity Evaluation: A Tier Testing Strategy for Product Safety Assessment. En: Frazier JM (ed) *In Vitro Toxicity Testing*. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 253-279

Gad SC (1989) Acute and chronic systemic chromium toxicity. *Sci Total Environ* 86(1-2): 144-157

Garattini S (1990) Short-Term Test for Neurotoxicity. En: Bourdeau P, Somers E, Richardson GM, Hickman JR (eds) *Short-term Toxicity Test For Non-genotoxic Effects*. John Wiley and Sons, New York, pp. 193-220

Georgescu J (1932) Studies on the action of 1,2,4-dinitrophenol (Thermol) VI. Glucuronate content of the urine after injections of 1,2,4-dinitrophenol. *Ann Physiol Physicochim Biol* 8: 122-126

Goldberg AM, Frazier JM (1989) Alternatives to animals in toxicity testing. *Scientific American* 261: 16-22

- Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC (1984) *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 5th ed, Williams and Wilkins, Baltimore
- Grisham JW, Smith GJ (1984) Predictive and Mechanistic Evaluation of Toxic Responses in Mammalian Cell Culture Systems. *Pharmacol Reviews* 36(2): 151S-171S
- Gross J, Zinsmeyer J, Lessing A, Wenzel J, Prenzlau P, Halle H, Grauel EL (1990) Development of enolase isoenzymes in various regions of the human brain. *Biomed Biochim Acta* 49(7): 533-538
- Guerbet M, Mayer A (1932) Studies on the action of 1,2,4-dinitrophenol (Thermol) V. Presence of 1,2,4-dinitrophenol and its derivatives in the organs and body fluids during poisoning. Urinary excretion. *Ann Physiol Physicochim Biol* 8: 117-121
- Haddad LM (1990) Phenol and Related Agents. En: Haddad MD, Winchester J (eds) *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. 2^a Ed, Saunders Company, Philadelphia. pp. 1290-1292
- Hafke SC, Seeds NW (1975) Neuroblastoma: The *E. Coli* of neurobiology?. *Life Sciences* 16: 1649-1658
- Harvey DG, Bidstrup PL, Payne JAL (1951) Poisoning by di-nitro-ortho-cresol. Some observations on the effects of di-nitro-ortho-cresol administered by mouth to human volunteers. *Br Med J* 2: 13-16
- Hatefi Y, Stiggall D (1976) Metal-Containing flavoprotein dehydrogenases. En: Boyer PD (ed) *The Enzymes* Vol. XIII 3^a Ed. Academic Press, New York, pp. 222-257
- Hayes WJ (1982) Nitro compounds and phenolic pesticides. En: *Pesticides Studied in Man*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 471-472
- Henry JA, Cassidy SL (1986) Membrane stabilising activity: a major cause of fatal poisoning. *The Lancet*: 1414-1417

Hermenegildo C, Felipo V, Miñana MD, Grisolia S (1992) Inhibition of protein kinase C restores Na^+, K^+ -ATPase activity in sciatic nerve of diabetic mice. *J Neurochem* 58: 1246-1249

Herrera E (1986) *Bioquímica*. Interamericana, Madrid

Herschman HR, Lerner MP (1973) Production of a nerves system specific protein (14-3-2) by human neuroblastoma cells in culture. *Nature New Biol* 241: 242-244

Holmsen H, Rygh T (1990) Chlorpromazine makes the platelet plasma membrane permeable for low-molecular weight substances and reduces ATP production. *Biochem Pharmacol* 40(2): 373-376

Howland RD, Vyas IL, Lowndes HE, Argentieri TM (1980) The etiology of peripheral neuropathies: in vitro effects of acrylamide and 2,5-hexanedione on brain enolase and other glycolytic enzymes. *Brain Research* 202: 131-142

Huang WH, Kakar SS, Askari A (1985) Mechanism of detergent effects on membrane-bound (Na^+/K^+)-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 260(12): 7356-7361

Huerta-Bahena J, Villalobos-Molina R, García-Sáinz JA (1982) Cycloheximide: an adrenergic agent. *Life Sciences* 30: 1757-1762

Hughes RJ, Bennet J (1985) Effects of metal ions on the activity of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7.). *Biochem Soc Trans* 13(1): 219-20

Invitox Protocol, N° 35 (1991) Chinese hamster ovary Na^+/K^+ -ATPase. ERGATT/FRAME, Nottingham

Invitox Protocol, N° 46 (1990) BALB/C 3T3 cytotoxicity test. ERGATT/FRAME, Nottingham

- Ishakawa E, Ougushi S, Ishikawa T, Uyeda K (1990) Activation of mammalian phosphofructokinase by ribose 1,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 265(31): 18875-18878
- Jarvik ME (1970) Drugs used in the treatment of psychiatric disorders. En: Goodman LS, Gilman A (eds) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. MacMillan, New York, pp. 155-169
- Jazwinski SB (1990) Preparation of Extracts from Yeast. *Methods in Enzymology* 182: 154-174
- Johnson RL, Koerner JF (1988) Excitatory Amino Acid Neurotransmission. *Journal of Medicinal Chemistry* 31: 2057-2066
- Johnston HB, Thomas SM, Atterwill CK (1991) Aluminium chloride induced neurotoxicity and metabolic changes in neuroblastoma cell lines and primary neural cultures. *Toxicol in Vitro* 7(3): 229-233
- Jover R, Ponsoda X, Castell JV (1992) *In Vitro* Investigation of The Molecular Mechanisms of Toxicity. En: Castell JV, Gómez-Lechón MJ (eds) *In vitro alternatives to animal pharmaco-toxicology*. Farmaindustria, Madrid, pp. 293-327
- Kaplan BB, Gioio AG, Bernstein SL, Batter DK, Capano-Perrone (1982) Analysis of gene expression in brain: comparative and developmental studies. En: Giuffrida Stella AM, Gombos G, Benzi G, Bachelard HS (eds) *Basic and clinical aspects of molecular neurobiology*. Fond. Int. Menarini, Milan, pp. 87-97
- Klaassen CD (1986) Principles of toxicology. En: Klaassen CD, Amdur MO, Doull J (eds) *Cassaret and Doull's Toxicology. The science of poisons*. 3^a Ed. McMillan PB, New York
- Klebe RJ, Ruddle FH (1969) Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J Cell Biol* 43: 69A

Knox P, Uphill PF, Fry JR, Benford J (1986) The FRAME multicentre project on in vitro cytotoxicology. *Fd Chem Toxicol* 24(6/7): 457-463

Kobayashi S, Kikuchi H, Ishikawa M, Hashimoto K (1990) Regional changes of tissue pH and ATP content in rat brain following systemic administration of Kainic acid. *Brain Research* 514: 352-354

Kotsonis FN, Klaassen CD (1979) Increase in Hepatic Metallothionein in Rats Treated with Alkylating Agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 51: 19-27

Kresse H, Figura KV, Klein V, Glössl J, Parchke E, Pohlmann R (1982) Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide Storage Disorders. *Methods in Enzymology* 83: 565-566

Leftwich RB, Floro JF, Neal RA (1982) Dinitrophenol poisoning: a diagnosis to consider in undiagnosed fever. *South Med J* 75: 182-184

Lehninger AL (1971) *BIOCHEMISTRY*. 5^a Ed. Worth Publishers Inc, New York, p. 325

Lehninger AL (1989) *Bioquímica las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. 2^a Ed. Omega, Barcelona

Lenga RE, Votoupal KL (1993) *The Sigma-Aldrich library of Regulatory and Safety Data*. Sigma Chemical Company and Aldrich Chemical Company. United States of America

Leong SF (1991) Effects of kainate on glucose metabolising enzymes in the brain. *Life Sciences* 48: 561-567

Leslie GB, Johnson P (1987) Introduction. En: Atterwill CK, Steele CE (eds) *In Vitro methods in Toxicology*. Cambridge University Press, Cambridge

Ling KH, Paetkau V, Marcus F, Lardy HA (1966) Phosphofructokinase. (I. Skeletal Muscle). *Methods in Enzymology* IX: 425-426

Loewi O, Navratil E (1921) *Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. XI. Über den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostygin und Ergotamin.* Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere 214: 689-696

MacBryde CM, Taussig BL (1935) *Functional changes in liver, heart and muscles, and loss of dextrose tolerance.* JAMA 105: 13-17

MacDonald JF, Nowak LM (1990) *Mechanisms of blockade of excitatory amino acid receptor channels.* Trends Pharmacol Sci 11(4): 167-172

MacVicar BA, Baker K, Crichton SA (1988) *Kainic acid evokes a potassium efflux from astrocytes.* Neuroscience 25(2): 721-725

Magne H, Mayer A, Plantefol L (1932) *Pharmacodynamic action of nitro-phenols. An agent stimulating cellular oxidation, 1,2,4-dinitro-phenol (Thermol). I. General character of 1,2,4-dinitro-phenol poisoning.* Ann Physiol Physicochim Biol 8: 1-50

Manuel D (1987) *Marshall Hall (1770-1857): vivisection and the development of experimental physiology.* In: Rupke NA (ed) *Vivisection in historical perspective.* Croom Helm, London, pp. 87-104

Marangos PJ, Goodwin FD, Parma AM, Lanter C, Trams E (1978) *Neuron specific protein (NSP) in neuroblastoma cells: relation to differentiation.* Brain Res 195: 49-58

Marangos PJ, Zomzely-Neurath C, York C (1976) *Determination and characterization of neuron specific protein (NSP) associated enolase activity.* Biochem and Biophys Res Com 68(4): 1309-1316

Marquis JK, Fishman EB (1985) *Presynaptic acetylcholinesterase.* Trends in Pharmacological Sciences: 387-388

Mazzanti L, Cester N, Meme E, Valesise H, Romanini C, Ferrara P, Marinelli F, Biagini G, Bertoli E (1988) *Effect of general anesthesia on syncytio-trophoblast plasma membranes from human placenta.* Biochem Int 16(6): 1095-1101

- Mc Call KE, Duncan CJ (1989) Independent pathways causing cellular damage in mouse soleus muscle under hypoxia. *Comp Biochem Physiol* 94A(4): 799-804
- McGee R, Simpson P, Christian C, Mata M, Nelson P, Niernberg M (1978) Regulation of acetylcholine release from neuroblastoma glioma hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1314-1318
- Moffatt EJ, Miyamoto MD (1988) Effect of Sodium and Calcium Channel Blockage on the Increase in Spontaneous Transmitter Release Produced by the Mitochondrial Inhibitor, Dinitrophenol. *J Pharmacol Experimental Therapeutics* 244(2): 613-618
- Montgomery R, Dryer RL, Conway TW, Spector AA (1982) *Bioquímica Médica*. Salvat, Barcelona
- Moolenaar WH, Boonstra J, Van der Saag PT, De Laat SW (1981) Sodium/proton exchange in mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 256: 12883-12887
- Morgan DP (1989) *Recognition and Management of Pesticide Poisonings* 4^a Ed. US Environmental Protection Agency, EPA-540/9-89-001, US Government Printing Office, Washington DC
- Morgan DP (1982) *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*. 3^a Ed. US Government Printing Office, Washington DC, pp. 78-79
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J of Immunological Methods* 65: 55-63
- Mummery CL, Boonstra J, Van der Saag PT, De Laat SW (1982) Modulations of Na⁺ Transport During The Cell Cycle of Neuroblastoma Cells. *J Cell Physiol* 112: 27-34
- Mummery CL, Boonstra J, Van der Saag PT, De Laat SW (1981) Modulation of functional and optimal (Na⁺ -K⁺) ATPase activity during the cell cycle of neuroblastoma cells. *Journal of cellular physiology* 107: 1-9

Murphy SN, Miller RJ (1989) Regulation of Ca⁺⁺ influx into striatal neurons by kainic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 249(1): 184-193

Nardone RM (1983) Neurotoxicity testing: an *in vitro* strategy. *Annal New York Acad Sci (USA)* 407: 458-459

Niday E, Wang CS, Alanpovic P (1977) Studies on the characterization of human erythrocyte acetylcholinesterase and its interaction with antibodies. *Biochim Biophys Acta* 469: 180-193

Nieminen AL, Gores GJ, Wray BE, Tanaka Y, Herman B, Lemasters JJ (1988) Calcium dependence of bleb formation and cell death in hepatocytes. *Cell Calcium* 9: 237-246

Nierenberg D, Disch M, Manheimer E (1991) Facilitating prompt diagnosis and treatment of the neuroleptic malignant syndrome. *Clin Pharmacol Ther* 50: 580-586

Nissen C, Ciesielski-Treska J, Hertz L, Mandel P (1973) Regulation of oxygen consumption in neuroblastoma cells: effects of differentiation and of potassium. *J Neurochem* 20: 1029-1035

Nyberg E, Walum E (1984) On the application of cultured neuronal cells in neurotoxicological studies: Implications of acrylamide induced neurite desintegration. *ATLA* 11: 194-203

Ochs S, Smith CB (1971) Fast axoplasmic transport in mammalian nerve *in vitro* after block of glycolysis with iodoacetic acid. *Journal of Neurochemistry* 18: 833-843

OECD (1981) Decision of the Council concerning the mutual acceptance of data in the assesment of chemicals. Annex 2. OECD Principles of good laboratory practice. c(81), 30 (Final)

Ogata N, Narahashi T (1990) Potent blocking action of chlorpromazine on two types of calcium channels in cultured neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 252(3): 1142-1149

Ohnishi T, Gall RS, Mayer ML (1975) An improved assay of inorganic phosphate in the presence of extralabile phosphate compounds: Application to the ATPase Assay in the Presence of Phosphocreatine. *Analytical Biochemistry* 69: 261-267

Olney JW (1981) Excitotoxic mechanisms of neurotoxicity. En: Spencer PS, Schaumburg HH (eds) *Experimental and clinical neurotoxicology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 272-294

Oortgiesen M, Vijverberg HPM (1989) Properties of neuronal type acetylcholine receptors in voltage clamped mouse neuroblastoma cells. *Neurosci* 31: 169-179

Ougushi S, Lawson JWR, Dobson GP, Veech RL, Uyeda K (1990) A New Transient Activator of Phosphofructokinase during Initiation of Rapid Glycolysis in Brain. *The Journal of Biological Chemistry* 265(19): 10943-10949

Parish CR, Mullbacher A (1983) Automated Colorimetric Assay for T Cell Cytotoxicity. *J of Immunol Methods* 58: 225-237

Park EH, Eun C (1989) Effect of papaverine on acetylcholinesterase in rat brain. *Arch Pharmacol Res* 12: 34-38

Parker VH (1952) Enzymic reduction of 2,4-dinitrophenol by rat tissue homogenates. *Biochem J* 51: 363-370

Patocka J, Bajgar J (1987) Aluminium activation and inhibition of human brain acetylcholinesterase in vitro. *Inorg Chim Acta* 135(2): 161-163

Peterson A, Walum E (1983) Growth and morphology of neuronal cell lines in perfusion. *In vitro* 19(12): 875-880

Phillips HJ (1973) Dye exclusion test for cell viability. En: Kruse PF (ed) *Tissue culture methods and technique*. Academic Press, New York, pp. 406-408

Phillips TD, Hayes AW (1989) Techniques in Membrane Toxicology. En: Hayes AW (ed) Principles and Methods of Toxicology. 2nd Ed. Raven Press, New York, pp. 761-776

Pockedly C (1977) Neuroblastoma. Arnold, London

Powell HC, Myers RR, Lampert PW (1981) Edema in neurotoxic injury. En: Spencer PS, Schaumburg HH (eds) Experimental and clinical neurotoxicology. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 118-138

Prado MAM, Santos TM, Gómez MV (1990) The effect of 2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol (AH-5183), tityustoxin and ouabain of the release of acetylcholine and its mobilization from cytoplasmic and vesicular pools of rat brain cortical slices. Neurosci Lett 111(1-2): 195-200

Prasad KN (1980) Regulation of differentiation in mammalian nerve cells. Plenum Press, New York, p. 245

Preache MM, Gibson JE (1975) Effects in mice of high and low environmental temperature on the maternal and fetal toxicity of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb) and on disposition of ¹⁴C-dinoseb. Teratology 12: 147-156

Purchase IFH (1990) An international reference chemical data-human bank would accelerate the development, validation and regulatory acceptance of alternative toxicology test. ATLA 18: 345-348

Rawn JD (1989) Bioquímica. Editorial Interamericana. McGraw-Hill, Madrid

Ray R, Boucher LJ, Broomfield CA, Lenz DE (1988) Specific soman-hydrolyzing enzyme activity in a clonal neuronal cell culture. Biochim Biophys Acta Ser Gen Subj 967(3): 373-381

Repetto G (1992) Evaluación de la neurotoxicidad de elementos químicos mediante un modelo experimental *in vitro* con células de neuroblastoma. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla

- Repetto G (1988) Las prácticas correctas de laboratorio y problemas en su implantación. *Rev Toxicol* 5: 117-125
- Repetto G, Repetto M (1994) Métodos alternativos: estudios toxicológicos *in vitro*. En: Repetto M (ed) *Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos, Madrid
- Repetto G, Sanz P, Repetto M (1988) *In vivo* and *in vitro* effect of trichlorfon on esterases of the red crayfish *procambarus clarkii*. *Bull Environ Contam Toxicol* 41: 597-603
- Repetto G, Sanz P (1993) Neutral Red Uptake, Cellular Growth and Lysosomal Function: *In vitro* Effects of 24 Metals. *ATLA* 21: 501-507
- Repetto G, Sanz P, Repetto M (1993) *In vitro* effects of mercuric chloride and methylmercury chloride on neuroblastoma cells. *Toxicol in vitro* 7(4): 353-357
- Repetto G, Sanz P, Repetto M (1994a) Comparative *In Vitro* Effects of Sodium Arsenite and Sodium Arsenate on Neuroblastoma Cells. *Toxicology*: en prensa
- Repetto G, Sanz P, Repetto M (1994b) *In Vitro* effects of thallium on mouse neuroblastoma cells. *Toxic in vitro* 8(3/4): en prensa
- Repetto M (1981) *Toxicología fundamental*. 1ª Ed. Científico-médica, Barcelona, pp 154-155
- Repetto M (1988) *Toxicología fundamental*. 2ª Ed. Científico-médica, Barcelona, p 408
- Repetto M (1989) *Ética en la experimentación animal*. *Rev Toxicol* 6(2): 185-193
- Reynolds JEF (1982) *Martindale: The extra pharmacopoeia*. 28ª Ed. The pharmaceutical press, London
- Ribeiro AM, Gómez MV (1986) The effect of calmodulin inhibitors on the release of acetylcholine and protein phosphorylation induced by tityustoxin, K⁺ and ouabain. *Brain Research Bulletin* 16: 673-680

Ribeiro AM, Resende SRO, Gómez MV (1989) Effect of tityustoxin and ouabain on protein phosphorylation in a crude synaptosome fraction. *Brazilian J Med Biol Res* 22: 547-554

Richelson E (1978) Tricyclic antidepressants block histamine H1 receptors of mouse neuroblastoma cells. *Nature* 274: 176-177

Riddell RJ, Panacer DS, Wilde SM, Clothier RH, Balls M (1986) The importance of exposure period and cell type in *In Vitro* cytotoxicity tests. *ATLA* 14: 86-92

Roberfroid MB, Goethals F (1990) *In vitro* toxicology: A challenge for the 21st century. *ATLA* 18: 19-22

Roberfroid MB, Goethals F (1992) *In vitro* toxico-pharmacology: past, present and future. En: Castell JV, Gómez Lechón MJ (eds) *In vitro* alternatives to animal pharmaco-toxicology. Farmaindustria, Madrid, pp 17-41

Robins E, Hirsch HE, Emmons SS (1968) Glycosidases in the Nervous System. I. Assay, some properties and distribution of beta-galactosidase, beta-glucuronidase, and beta-glucosidase. *J Biol Chem* 243 (16): 4246-4252

Robinson JD, Lowinger J, Bettinger (1968) Chlorpromazine: differential effects on membrane-bound enzymes from rat brain. *Biochem Pharmacol* 17:1113-1116

Rodríguez-Vicente MC (1990) Mecanismo de acción del cannabis sobre el metabolismo hepático de la glucosa en rata. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla

Roed A, Brodal B (1981) Inhibition of Sarcolemma ATPases by some Membrane-stabilizing Drugs. *Acta pharmacol et toxicol* 48: 65-68

Rönback L, Hansson E (1987) A Model for Cellular Neurotoxicology. *ATLA* 14(3): 173-178

Rognstad R, Katz J (1969) The Effect of 2,4-dinitrophenol on adipose tissue metabolism. *Biochem J* 114: 431-444

Rowan A, Andrutis KA (1990) Alternatives: A socio-political commentary from the USA. ATLA 18: 3-10

Rowan AN (1990) Non-Specialized Mammalian Cell Cultures for Toxicity Testing. En: Bourdeau P, Somers E, Richardson GM, Hickman JR (eds) Short-term Toxicity Test For Non-genotoxic Effects. John Wiley and Sons, New York, pp. 7-9

Russell WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. Methuen, London

Saarikoski S (1980) Placental Transmision and Foetal Distribution of ³H-Ouabain. Acta Pharmacol et Toxicol 46: 278-282

Sabri MI, Spencer PS (1981) Toxic distal axonopathy: biochemical studies and hypothetical mechanisms. En: Spencer PS, Schaumburg HH (eds) Experimental and clinical neurotoxicology. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 206-219

Said-Fernández S, González-Garza MT, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L (1990) A Multiporose Solid-Phase Method for Protein Determination With Coomassie Brilliant Blue G-250. Analytical Biochemistry 191: 119-126

Sakamoto J, Hashimoto K (1985a) Effect of acrylamide and related compounds on glycolytic enzymes in mouse brain in vitro. Arch Toxicol 57: 276-281

Sakamoto J, Hashimoto K (1985b) Effect of acrylamide and related compounds on glycolytic enzymes in rat sciatic nerve in vivo. Arch Toxicol 57: 282-284

Sanz P, Repetto M (1994) Implicaciones toxicológicas de las enzimas colinesterasas. En: Repetto M (ed) Toxicología Avanzada. Díaz de Santos, Madrid

Sanz P, Rodríguez-Vicente MC, Repetto M (1993) Comparación del efecto producido en el metabolismo hepático de la glucosa en ratas tratadas con dosis diferentes de tetrahidrocannabinol puro. Rev Toxicología 10: 142-145

Sanz P, Rodríguez-Vicente MC, Díaz D, Repetto J, Repetto M (1991) Red Blood Cell and Total Blood Acetylcholinesterase and Plasma Pseudocholinesterase in Humans: Observed Variances. *Clinical Toxicology* 29(1): 81-90

Schanne FAX, Kane AB, Young EE, Farber JL (1979) Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206: 700-702

Seeds NW, Gilman AG, Amano T, Nirenberg M (1970) Regulation of axon formation by clonal lines of a neuronal tumor. *Proc Ed Nat Acad Sci USA* 66: 160-167

Sekar MC, Roufogalis BD (1980) Allosteric Regulation of Acetylcholinesterase. *The Pharmstudent* XX: 1-7

Shils ME, Goldwater LJ (1953) Effect of diet on the susceptibility of the rat to poisoning by 2,4-dinitrotoluene. *Arch Environ Health* 8: 262-267

Shimizu A, Fujiko S, Kato K (1983) Characterization of $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$ and $\alpha\gamma$ human enolase isoenzymes, and preparation of hybrid enolases ($\alpha\gamma$ $\beta\gamma$ and $\alpha\beta$) from homodimeric forms. *Biochemica et Biophysica Acta* 748: 8278-8284

Shopsis C, Eng B (1985) Rapid cytotoxicity testing using semi-automated protein determination on cultured cells. *Toxicol Lett* 26: 1-8

Singer JS, Tiemeyer M (1985) The establishment of in vitro systems to evaluate neuronal toxicity. En: Singer JS, Tiemeyer M (eds) *Alternative methods in toxicology. In vitro Toxicology. Vol. 3.* Liebert MA, New York, pp. 267-291

Smith JN, Smithies RH, Williams RT (1953) Studies in detoxication. 48. Urinary metabolites of 4,6-dinitro-o-cresol in the rabbit. *Biochem J* 54: 225-230

Sokoloff L (1981) Circulation and energy metabolism of the brain. En: Siegel GJ, Alberts RW, Agranoff BW, Katzman R (eds) *Basic Neurochemistry. 3^a Ed.* Little Brow and Company, Boston, pp. 471-495

Sood PD, Mohanakumar KP (1985) Acetylcholinesterase fluctuations in the brain of mice during morphine dependence development, withdrawal and naloxone-induced withdrawal. *Cell Mol Biol* 31(6): 475-488

Sprigge TLS (1987) Ethical consideration on animal experimentation. *ATLA* 14: 307-311

Stark DM, Shopsis C, Borenfreund E, Babich H (1986) Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. *Fd Chem Toxicol* 24(6/7): 449-455

Stark DM, Shopsis C, Borenfreund E, Babich H (1985) A Comparison of Several Alternative Assays for Measuring Potential Toxicants. En: Singer JS, Tiemeyer M (eds) *Alternative methods in toxicology. In vitro Toxicology. Vol. 3.* Liebert MA, New York

Stedman E, Stedman E, Easson LH (1932) Cholinesterase. An enzyme present in the blood serum of the horse. *Biochem J* 26: 2056-2066

Stoscheck CM (1990) Increased Uniformity in the Response of the Coomassie Blue G Protein Assay to Different Proteins. *Analytical Biochemistry* 184: 111-116

Stryer L (1990) *Bioquímica. 3ª Ed.* Reverté, Barcelona

Sue K, Nakagawara A, Okuzono S, Fukushige T, Ikeda K (1988) Different effects of vitamin E on the growth and morphological differentiation of 4 murine neuroblastoma cell lines in vitro. *Kinderchir* 43: 398-401

Tainter ML, Cutting WC, Hines E (1935) Effects of moderate doses of dinitrophenol on the energy exchange and nitrogen metabolism of patients under conditions of restricted dietary. *J Pharmacol Exp Ther* 55: 326-353

Taylor P (1991) The Cholinesterases. *The Journal of Biological Chemistry* 266(7): 4025-4028

Thomas SM, Hartley CL, Mason HJ (1991) Effects of neurotoxins on neurone-specific enolase and lactate dehydrogenase activity and leakage in neuroblastoma cells. *Toxic in Vitro* 5(5/6): 439-442

Thomas SM, Johnston HB, Hartley CL, Atterwill CK (1991) Increases of mitochondrial and lysosomal activities as early indicators of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 12(4): 799

Thomas TC, McNamee MG (1990) Purification of membrane proteins. *Methods in Enzymology* 182: 499-520

Tyson CA (1992) *In Vitro* Technology, Trends and Issues. En: Frazier JM (ed) *In Vitro Toxicity Testing*. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 13-43

Van der Valk JBF, Vijverberg HPM (1990) Glutamate-induced inward current in a clonal neuroblastoma cell line. *Eur J Pharmacol* 185(1): 99-102

Van Diggelen OP, Schram AW, Sinnott ML, Smith PJ, Robinson D, Galjaard H (1981) Turnover of β -galactosidase in fibroblasts from patients with genetically different types of β -galactosidase deficiency. *Biochem J* 200: 143-151

Veronesi B (1992) *In Vitro* Screening Batteries for Neurotoxicants. *Neurotoxicology* 13(1): 185-196

Wallenfels K, Weil R (1972) β -Galactosidase. En: Boyer PD (ed) *The Enzymes*, Vol VII. 3^a Ed. Academic Press, New York, pp. 617-663

Walum E (1990) En: Walum E, Stenberg K, Jenssen D (eds) *Understanding cell toxicology. Principles and practice*. Ellis Horwood, Chichester

Walum E, Edstrom A (1976) Kinetics of 2-deoxy-D-glucose transport into cultured mouse neuroblastoma cells. *Exper Cell Res* 97: 15-22

Walum E, Petersson A (1984a). Effects of subacute concentrations of acrylamide on the morphology of cultured mouse neuroblastoma N1E115 cells: a time-laps cinematographic study. *ATLA* 12: 33-41

Walum E, Peterson A (1984b) On the application fo cultured neuroblastoma cells in chemical toxicity screening. *J Toxicol Environ Health* 13: 511-520

Wold F (1971) Enolase. En: Boyer PD (ed) The Enzymes, Vol. V. 3^a Ed. Academic Press, New York

Xie Z, Wang Y, Ganjeizadeh M, McGee R, Askari A (1989) Determination of total (Na⁺/K⁺)-ATPase activity of isolated or cultured cells. Analytical Biochemistry 183: 215-219

Yeagle P (1983) Cholesterol Modulation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase. ATP Hydrolysing Activity in the Human Erythrocyte. Bioch Bioph Acta 727: 39-44

Zbinden G (1987) The predictive value of animal studies in toxicology. ATLA 15: 41-42