

Modelos Celulares para Estudios de Toxicidad y Metabolismo de Xenobióticos



TOXINAS

Intrínsecas

Efecto en todos los individuos expuestos
Efecto dosis-dependiente
Efecto predecible en animales

Idiosincrásicas

Efecto solo en algunos individuos
No dosis-dependiente: **hipersensibilidad**
Dosis-dependiente: **idiosincrasia metabólica**
Polimorfismo genético
Inducción de los CYPs
Efecto No predecible en animales

Clasificación mecánica de las TOXINAS

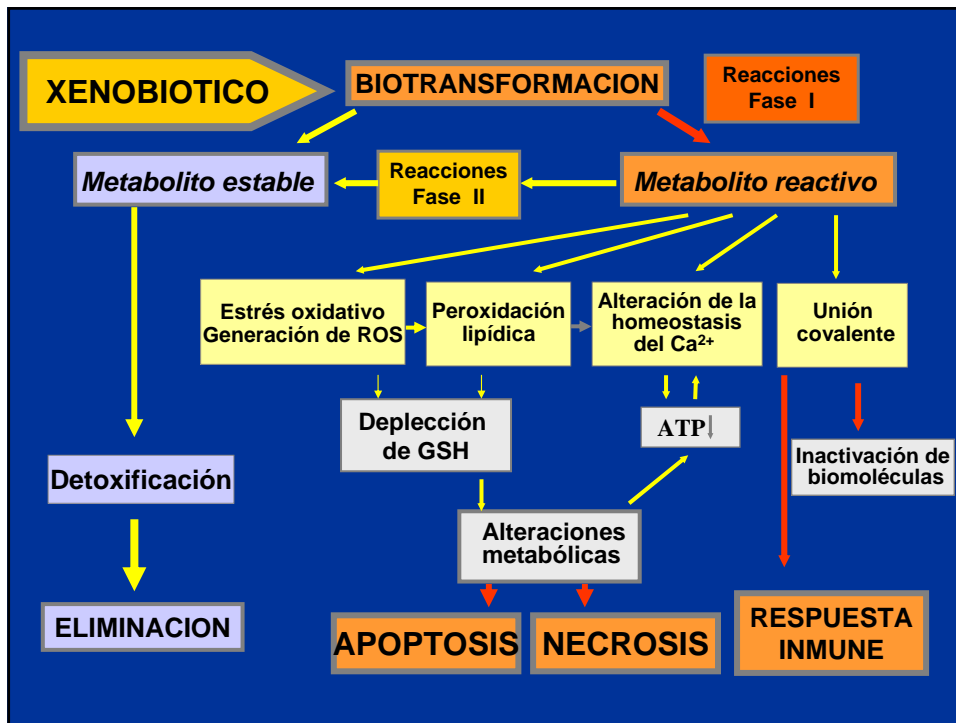
Activas

Son tóxicas *per se* y no requieren ser biotransformadas para ejercer su efecto tóxico.

Efecto dosis-dependiente en los individuos expuestos

Latentes

Requieren ser biotransformadas para ejercer su efecto tóxico.



"... un determinado experimento no se realizará en animales, si existe otro método disponible que sea *razonable, realizable y científicamente satisfactorio* para obtener los mismos resultados y que no requiera el uso de animales..."

"... se utilizará el *mínimo número* de animales y aquel procedimiento que produzca *el mínimo y menos prolongado dolor y sufrimiento*..."

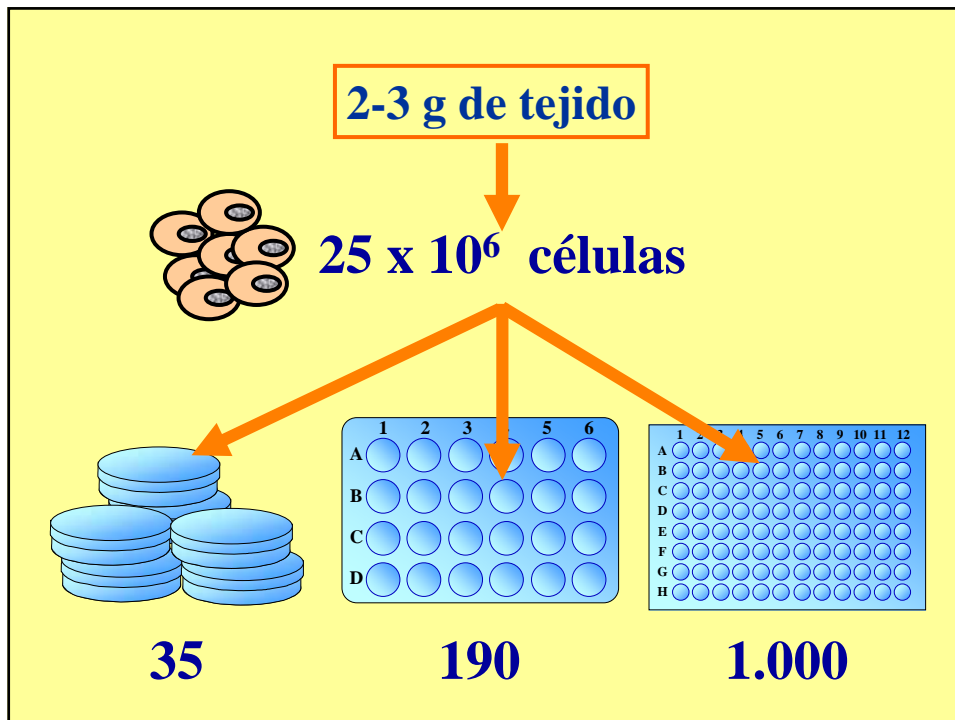
Parlamento Europeo
(Directiva 86/609/CEE)

Ventajas de los Modelo In Vitro

- ↯ Se evitan interferencias de la respuesta del organismo
- ↯ Versatilidad en el diseño experimental
- ↯ Ahorro de tiempo y coste económico
- ↯ Posibilidad de automatización, robotización, miniaturización
- ↯ Necesidad de poca cantidad de producto en estudio
- ↯ Se puede utilizar material biológico humano
- ↯ Reducción del número de animales

Inconvenientes de los Modelo In Vitro

- ↯ Simplicidad: Información a veces parcial
- ↯ Dificultad de interpretación de los resultados
- ↯ Dificultad para extrapolar al hombre
- ↯ No sustituyen del todo los ensayos in vivo
- ↯ No se pueden detectar efectos secundarios
- ↯ Necesidad de validación formal
- ↯ Todavía no están aceptados legalmente, ni incorporados en los protocolos oficiales para el registro de nuevos fármacos

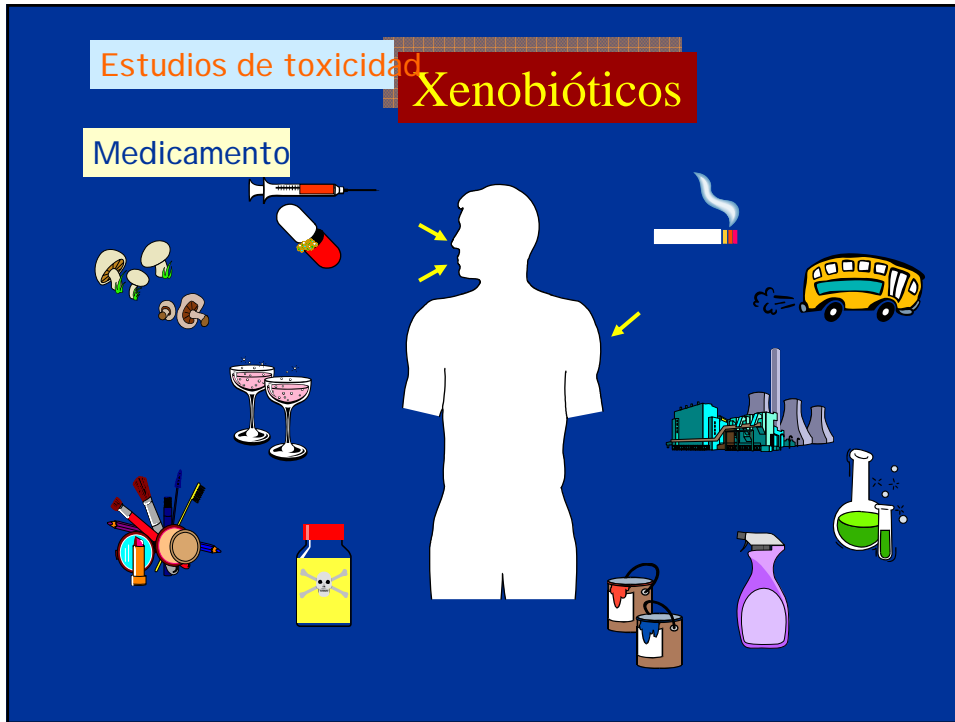


Evaluación del riesgo de toxicidad

→ Productos que se desarrollan para el uso o consumo humano (*aditivos alimentarios, cosméticos, medicamentos, biomateriales, etc.*)

→ Clasificación y etiquetaje de productos químicos (*disolventes, detergentes, etc*)

→ Medioambiente: Ecotoxicología (*plaguicidas, metales pesados, etc*)



**Diseño experimental
para evaluar la toxicidad *in vitro***

Elección de un modelo biológico adecuado

Evaluación de los parámetros adecuados
para estudiar los efectos tóxicos

Correcta interpretación de los resultados:
Valor predictivo del modelo
y extrapolación *in vitro* - *in vivo*

**Diseño experimental
para evaluar la toxicidad *in vitro***

Elección de un modelo biológico adecuado

Complejidad ↑

Organismo entero
Perfusión de órganos
Cultivo de órganos/*slices*
Cultivos primarios
Líneas celulares
Homogenados de tejidos
Fracciones subcelulares
Enzimas purificados

↑ Relevancia

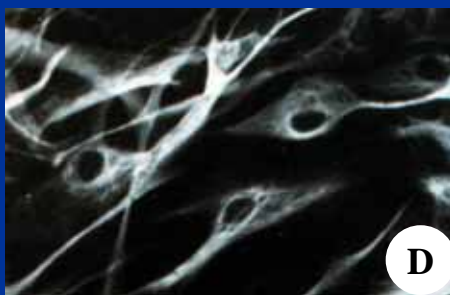
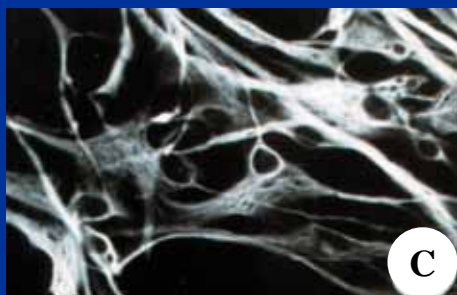
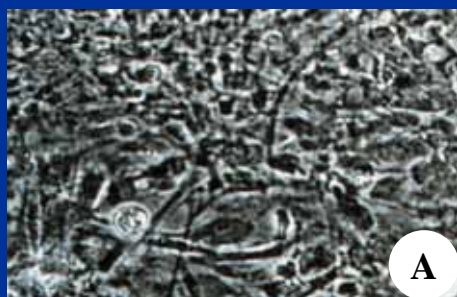
Diseño experimental para evaluar la toxicidad *in vitro*

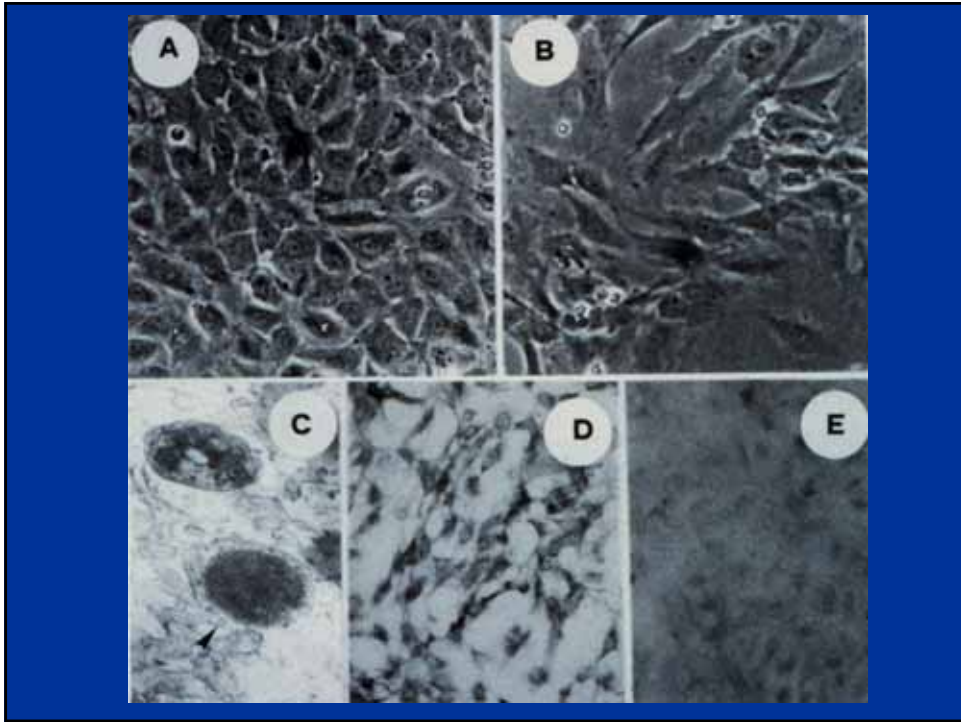
Elección de un modelo biológico: Cultivos celulares

Cultivos Primarios
Líneas celulares
Líneas celulares manipuladas genéticamente
Co-cultivos
Cultivos organotípicos

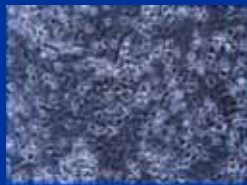
Cultivos Primarios

Aquellos formados por células derivadas directamente del tejido u órgano donante. Pueden ser proliferantes (fibroblastos, etc) o no proliferantes (hepatocitos)

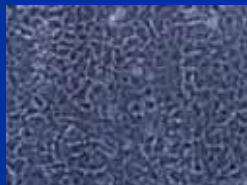




Cultivos de Células de Sistema Nervioso Humano para Estudios de Fármaco-Toxicología



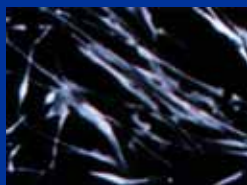
Neuronas



Astrocitos



Oligodendrocitos



Cél. de Schwann



Microglía



Cél. Cromafines

Líneas Celulares Contínuas

Características:

- Células inmortales
- Transformadas mediante virus, etc o de origen tumoral
- Heteroploides
- Estabilidad fenotípica

Ventajas:

- Manejo fácil
- Comercializadas en las colecciones de células (ECACC, ATCC)

Inconvenientes:

- Pérdida de funciones diferenciadas

Células manipuladas genéticamente Expresión de un gen de interés

↙ Integración en el genoma de un gen de interés mediante retrovirus

- Inmortalización de los hepatocitos
- Expresión de isoenzimas del citocromo P450 (CYP)
- Expresión de otros genes de interés

↙ Expresión transitoria de un gen de interés mediante adenovirus

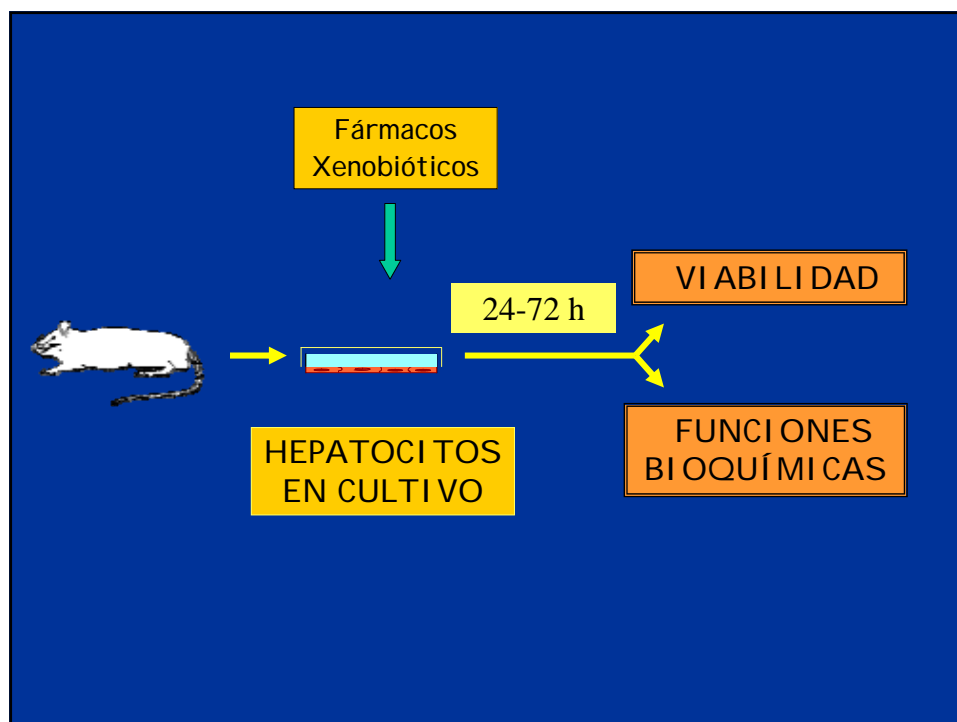
Diseño experimental para evaluar la toxicidad *in vitro*

Evaluación de los parámetros adecuados
para estudiar los efectos tóxicos

Estudios de citotoxicidad general:
Efectos sobre funciones vitales de la células.

Toxicidad órgano-específica: Efectos sobre funciones
diferenciadas de las células del órgano diana.

Mecanismos moleculares de toxicidad



Diseño experimental para evaluar la toxicidad *in vitro*

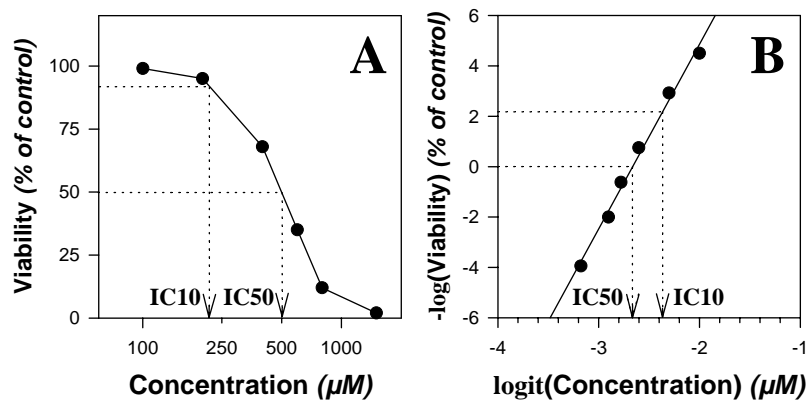
Estudios de citotoxicidad general:

Alteraciones de las funciones vitales de la células.

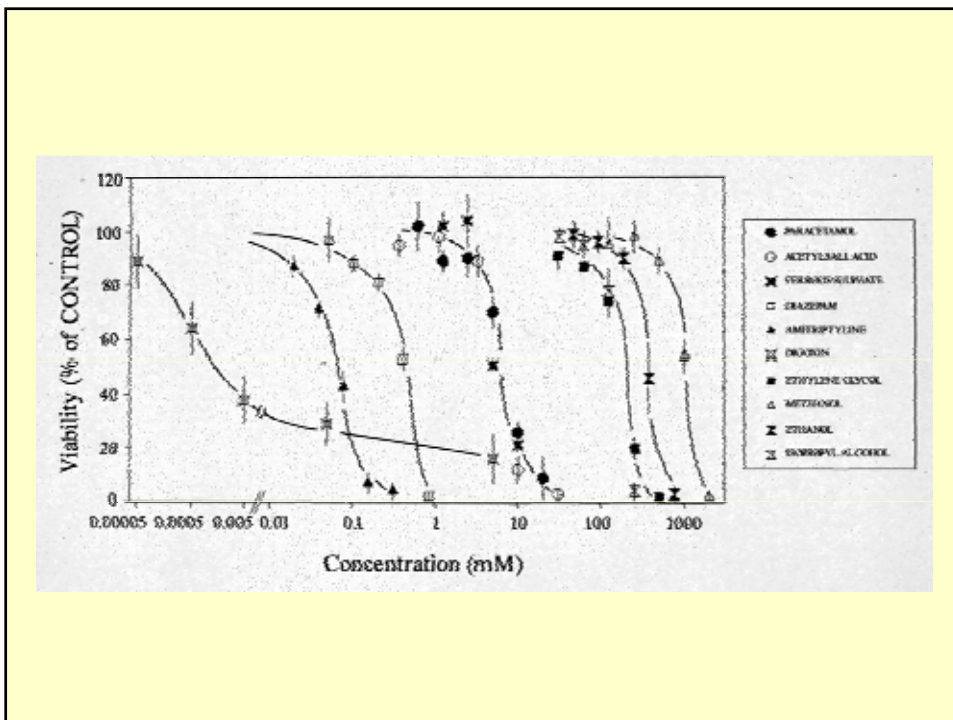
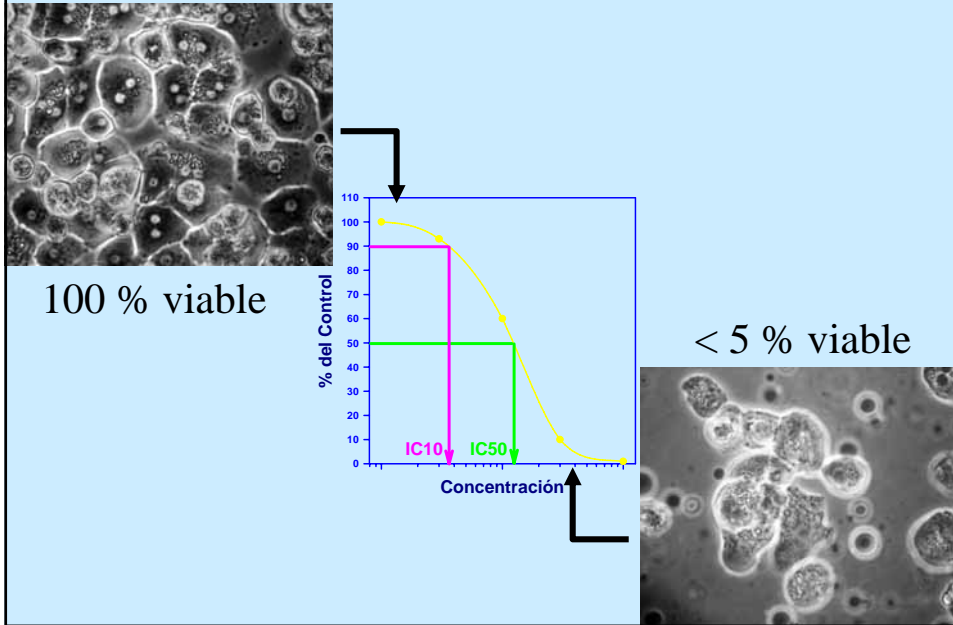
Criterios: Ensayos de viabilidad celular
(MTT, RN, LDH, GOT, GPT, ATP, etc)

Modelos: Líneas celulares y cultivos primarios

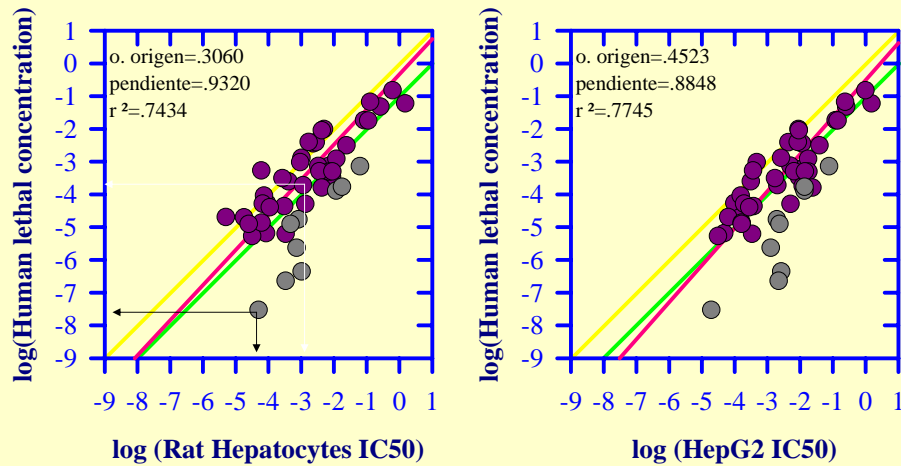
Objetivo: Determinar la máxima concentración no tóxica (MCNT), y las IC_{10} e IC_{50}



Los IC's, parámetros de comparación relativa



Relación entre la toxicidad *in vitro* y la *in vivo*



Diseño experimental

para evaluar la toxicidad *in vitro*

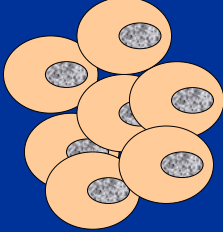
Estudios de toxicidad órgano-específica:

Alteraciones de funciones diferenciadas del órgano diana a concentraciones que no comprometen la viabilidad celular.

Criterios: Evaluación de funciones diferenciadas a concentraciones sub-citotóxicas (\leq MCNT o IC10)

Modelos: Cultivos primarios

Objetivo: Determinar efecto tóxico y mecanismo de toxicidad

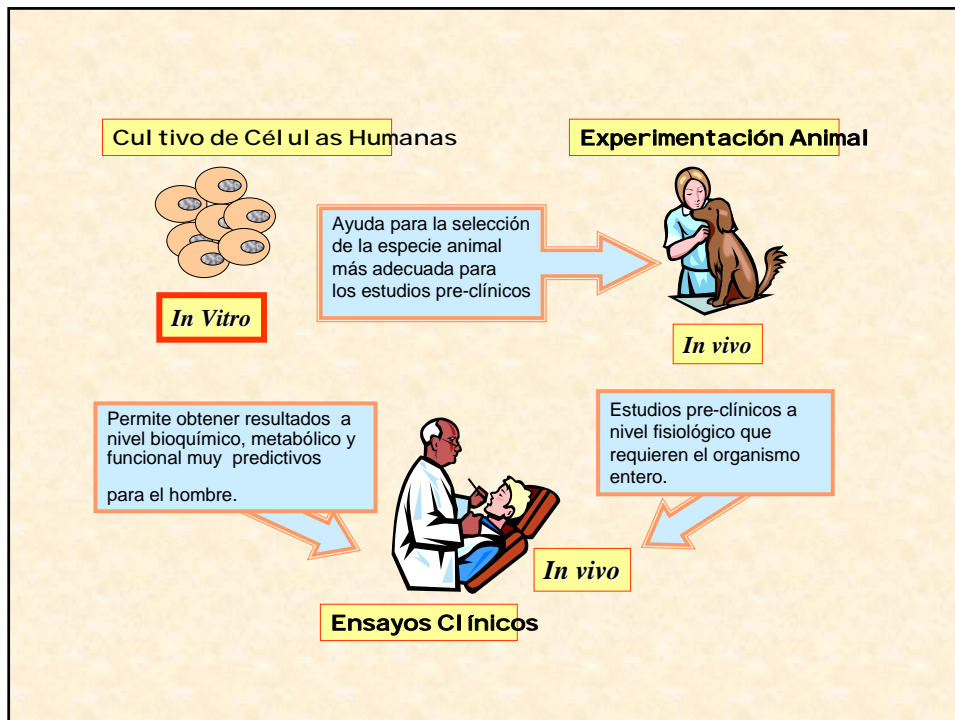


Tipos celulares	Estudios sobre los tejidos/órganos diana
<p>Hígado Sistema nervioso Musculo liso y estriado Células de la piel Riñón Páncreas Pulmón Células oculares Células vasculares Células óseas Células sanguíneas Intestino Otros tejidos</p>	<p>Biotransformación. Efectos beneficiosos o tóxicos a nivel celular o molecular sobre funciones celulares específicas. Biocompatibilidad. Irritación/corrosividad. Acción farmacológica. Carcinogénesis/mutagénesis.</p>

Cultivo de células de diferentes tejidos humanas y de especies animales

**Modelos celulares de origen humano
Estudios In Vitro predictivo para el hombre**

Los modelos celulares de origen humano están llamados a desempeñar un papel puente entre los ensayos preclínicos en animales y los ensayos clínicos en el ser humano



Diseño experimental para evaluar la toxicidad *in vitro*

**Correcta interpretación de los resultados:
Valor predictivo del modelo-Riesgo de toxicidad**

Relevancia del efecto observado

Reversibilidad del efecto tóxico observado

Diferencia de sensibilidad interespecies

Aspectos farmacocinéticos del compuesto

Diferencias en el metabolismo interespecies

RIESGO DE TOXICIDAD

RT = Concentración Plasmática / IC50

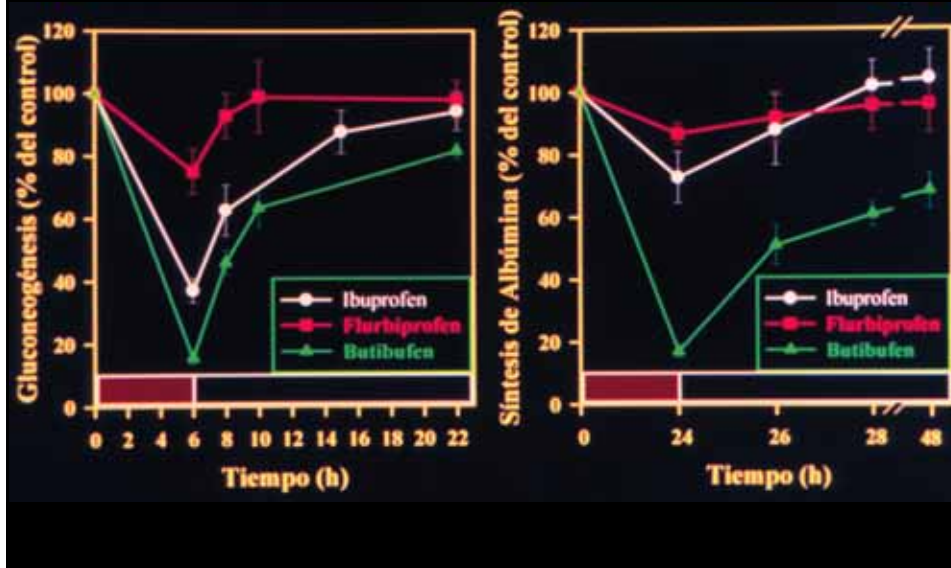
Pico en plasma tras administración terapéutica

RIESGO DE TOXICIDAD

RT = Con. Plasmática / IC50

	Conc. Plasmática (mM)	Viabilidad		Funcionalidad	
		LDH (IC50)	RT	Sínt. Albúmina (IC50)	RT
Buprenorfina	0.7-1.7 x 10 ⁻⁵	0.1	0.7-1.7 x 10 ⁻⁴	2.1 x 10 ⁻²	3.3-8.1 x 10 ⁻³
	---		---		---
Morfina	3 x 10 ⁻⁴ 6 x 10 ⁻²	4.5	6.6 x 10 ⁻⁵ 1.3 x 10 ⁻²	7.7 x 10 ⁻¹	3.9 x 10 ⁻⁴ 7.8 x 10 ⁻²
Heroína	---	3.1	---	9.6 x 10 ⁻¹	---
	3 x 10 ⁻³		9.7 x 10 ⁻⁴		3.1 x 10 ⁻³
Meperidina	2 x 10 ⁻³ 5 x 10 ⁻²	3.9	5.1 x 10 ⁻⁴ 1.3 x 10 ⁻²	3.1 x 10 ⁻¹	6.5 x 10 ⁻³ 1.6 x 10 ⁻¹
Metadona	1 x 10 ⁻⁴ 4 x 10 ⁻³	0.65	1.5 x 10 ⁻⁴ 6.2 x 10 ⁻³	5.6 x 10 ⁻³	1.8 x 10 ⁻² 7.1 x 10 ⁻¹

ESTUDIOS DE REVERSIBILIDAD *IN VITRO*



Estudio de la hepatotoxicidad *in vitro*

3) Extrapolación *In vitro*-*In vivo* / Evaluación del riesgo

- ⇓ Relevancia de la función metabólica alterada
- ⇓ Reversibilidad del efecto
- ⇓ Mecanismos de toxicidad implicados
- ⇓ Interacción con otros fármacos
- ⇓ Identificación de los CYPs implicados en el metabolismo
- ⇓ Inducción/inhibición del CYP
- ⇓ ¿Participan en el metabolismo CYPs con polimorfismo genético?
- ⇓ Evaluación del riesgo de hepatotoxicidad

Aplicaciones de los Modelo In Vitro

- Clasificación y etiquetado de sustancias químicas
- Biocompatibilidad de materiales
- Carcinogénesis y mutagénesis
- Test de irritación ocular y cutánea
- Fototoxicidad
- Toxicología del desarrollo
- Toxicidad órgano-específica
- Toxicidad a nivel sistémico
- Mecanismos moleculares de toxicidad
- Metabolismo y toxicidad de fármacos
- Evaluación de interacciones entre fármacos
- Ecotoxicología