

Nuevos modelos celulares humanos para entender cómo los contaminantes ambientales afectan al desarrollo del cerebro

Novos modelos de células humanas para compreender como os poluentes ambientais afetam o desenvolvimento cerebral

New human cell models to understand how environmental pollutants affect brain development

Briz Herrezuelo V, Peña López A, Ramos JJ

Centro Nacional de Sanidad Ambiental (CNSA), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

INTRODUCCIÓN

El Centro Nacional de Sanidad Ambiental (CNSA) ha incorporado recientemente una nueva línea de investigación en el Área de Toxicología Ambiental que lleva por nombre *"Interacciones genético-ambientales en los trastornos del neurodesarrollo"*, cuyo objetivo es estudiar determinados factores genéticos y medioambientales, como las proteínas Ras y los contaminantes ambientales neurotóxicos, como posibles factores de riesgo en los trastornos del neurodesarrollo.

LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y LOS TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO

Los trastornos del neurodesarrollo constituyen uno de los principales retos actuales en salud pública infantil. Su origen es complejo y combina factores genéticos y ambientales. Las proteínas Ras son enzimas de pequeño tamaño que actúan como interruptores moleculares regulando numerosos procesos fisiológicos esenciales, como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Tanto es así, que mutaciones en Ras y otros genes de la ruta de señalización celular MAPK (del inglés, mitogen-activated protein kinases) dan lugar a un grupo enfermedades raras, conocidas como RASopatías, con graves patologías asociadas. En conjunto, las RASopatías suponen el grupo de trastornos genéticos del neurodesarrollo más frecuente en la población, afectando a 1 de cada 1 000 nacimientos¹. Todas ellas comparten una sintomatología común que incluye anomalías craneofaciales, alteraciones en la piel, baja estatura, cardiopatías congénitas y una mayor incidencia de cáncer y de trastornos del neurodesarrollo como el espectro autista (TEA) o el déficit de atención e hiperactividad (TDAH)^{2,3}. Además, según los genes

afectados y ciertas características particulares, se clasifican en diversos síndromes, siendo los más comunes el síndrome de Noonan y la neurofibromatosis de tipo I (NF1). Otros síndromes menos frecuentes, como el cardiofaciocutáneo (CFC) y el de Costello, suelen además cursar con discapacidad intelectual⁴. Nuestras investigaciones recientes indican que las variantes de la proteína Ras, como H-Ras y K-Ras, tienen funciones diferenciadas en el cerebro y regulan procesos tan importantes como la plasticidad sináptica⁵, el mecanismo fisiológico responsable de funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje.

La exposición continua a contaminantes ambientales neurotóxicos representa un problema creciente para la salud pública, en un entorno con cada vez mayor presencia de compuestos sintéticos industriales en multitud de productos domésticos de gran consumo. Esta cuestión es más preocupante, si cabe, para determinadas poblaciones vulnerables como son los pacientes de enfermedades genéticas que afectan al desarrollo, quienes en su gran mayoría son menores. Durante el embarazo y la lactancia, muchos de estos contaminantes se transfieren de la madre al feto a través de la placenta y de la leche materna, respectivamente. El cerebro en desarrollo es extremadamente sensible a los contaminantes ambientales neurotóxicos, incluso a niveles de exposición supuestamente seguros para los adultos. De esta manera, estos tóxicos pueden interferir con los procesos fisiológicos en el cerebro y aumentar así el riesgo de sufrir trastornos del neurodesarrollo, como el TEA, el TDAH y la discapacidad intelectual^{6,7}. Entre los principales contaminantes ambientales neurotóxicos para el desarrollo se encuentran los siguientes:

- Metales pesados, como el metilmercurio, el plomo y el manganeso.

- Contaminantes orgánicos persistentes, como los plaguicidas organoclorados y organofosforados, los bifenilos policlorados (PCB), los retardantes de llama bromados (PBDE) y los compuestos perfluorados (PFAS).
- Disruptores endocrinos empleados como aditivos en plásticos, como los ftalatos y los bisfenoles.

Investigaciones previas del grupo del Dr. Briz en modelos animales *in vitro* e *in vivo* indican que la exposición durante el desarrollo a diferentes clases de plaguicidas causa alteraciones moleculares y conductuales similares a las observadas en los trastornos del neurodesarrollo⁶. En ciertos casos, estos efectos neurotóxicos están producidos por la sobreactivación crónica de la vía de señalización Ras/MAPK en el hipocampo, un área del cerebro importante para la memoria y el aprendizaje. Curiosamente, estas mismas alteraciones neurológicas se han observado en modelos animales de RASopatías^{8,9}. Por tanto, la hipótesis principal de esta nueva línea de investigación, puesta en marcha en el CNSA, es que individuos con mutaciones genéticas asociadas a las RASopatías podrían tener una mayor susceptibilidad a la exposición a contaminantes ambientales neurotóxicos. Para abordar esta importante cuestión científica, se combinarán diferentes aproximaciones metodológicas, entre las que se incluyen herramientas básicas de biología molecular y celular, nuevas tecnologías ómicas, electrofisiología, histología y el estudio de la conducta animal, muchas de las cuales ya se están implementando en el Área de Toxicología Ambiental. Además, por un lado, contamos con modelos animales transgénicos de ratón de RASopatías con mutaciones en HRAS o KRAS^{8,9}, cedidos gracias a la colaboración del grupo del Dr. Mariano Barbacid (CNIO), célebre investigador que aisló el primer oncogén humano, H-Ras¹⁰. Por otro lado, en la Unidad del Cultivos, del CNSA, hemos generado nuevos modelos celulares humanos, tales como cultivos neuronales y organoides cerebrales, derivados de células madre pluripotenciales (iPSC) procedentes de pacientes con NF1, obtenidas del Biobanco Nacional de Líneas Celulares (ISCIII).

ORGANOIDES CEREBRALES Y OTROS MODELOS CELULARES HUMANOS: HERRAMIENTAS CLAVE EN NEUROTOXICOLOGÍA

Los modelos animales, y especialmente los modelos transgénicos de ratón, han sido la herramienta de referencia para el estudio de las enfermedades genéticas humanas, incluidas aquellas que afectan al neurodesarrollo. En la actualidad, dichos modelos son indispensables para el estudio de procesos neurológicos como la plasticidad sináptica o la formación de circuitos neuronales, y de funciones cognitivas como el aprendizaje o la conducta social¹¹. Sin embargo, estos

modelos presentan ciertas limitaciones entre las que se incluyen su baja reproducibilidad técnica y su limitada capacidad para predecir respuestas clínicas humanas¹². A estas, se le suman las limitaciones al uso de animales de experimentación debido a cuestiones bioéticas, impulsadas desde el ámbito regulatorio (Directiva 2010/63/UE). Por esta misma razón, en los estudios de neurotoxicología, los modelos animales han sido progresivamente sustituidos por distintos modelos *in vitro*, tales como líneas celulares humanas inmortalizadas, cultivos primarios neuronales¹³ o cultivos organotípicos, estos dos últimos de origen animal (habitualmente rata o ratón)⁶. Sin embargo, estos modelos *in vitro* tienen una limitada capacidad traslacional al no reflejar de manera completa el desarrollo y la fisiología del cerebro humano.

En este contexto, a lo largo de los últimos años, los modelos celulares derivados de células madre pluripotenciales (iPSC) humanas han cobrado un gran protagonismo tanto en el estudio de las enfermedades humanas como en el campo de la toxicología^{14,15}. Entre los motivos principales encontramos, por un lado, su sencilla obtención a partir de células somáticas (no reproductoras) de pacientes, como los fibroblastos de la piel o las células nucleadas de la sangre. Por otro, su capacidad para diferenciarse a cualquier tipo celular, incluidas las neuronas y las células gliales del cerebro. Además, ofrecen la posibilidad de llevar a cabo todo tipo de estudios biológicos en el contexto genético del paciente, con un grandísimo potencial para la medicina personalizada.

Mención especial merecen los organoides cerebrales, estructuras celulares esféricas originadas a partir de iPSC que, a diferencia de los cultivos neuronales en 2D, pueden llegar a mantenerse en cultivo durante meses, lo que permite realizar estudios toxicológicos crónicos a muy largo plazo. Asimismo, los protocolos para generar y mantener a los organoides cerebrales se han ido optimizando cada vez más, llegando en la actualidad a obtenerse organoides de una elevada complejidad y especificidad que reproducen con gran fidelidad la arquitectura y microambiente de regiones específicas del cerebro como el mesencéfalo, la corteza cerebral o el cerebelo. Estos modelos tridimensionales permiten estudiar procesos como la migración celular, la formación de las distintas capas corticales y la conectividad neuronal, que no pueden llevarse a cabo en otros modelos más sencillos. Sus aplicaciones son amplias y abarcan desde el estudio de las bases patológicas de las enfermedades genéticas a la identificación de dianas terapéuticas, el cribado y validación de fármacos y el estudio de la neurotoxicidad de los contaminantes ambientales en el desarrollo cerebral y su impacto en la salud pública^{14,15}. En conjunto, los organoides cerebrales y otros modelos derivados de iPSC humanas representan una herramienta sin precedentes para entender cómo interactúan

genética y medio ambiente durante el desarrollo del cerebro humano. En el CNSA, estamos empleando estos nuevos modelos celulares para investigar los efectos combinados de la exposición a contaminantes ambientales neurotóxicos y de las mutaciones ligadas a las RASopatías y su impacto en el neurodesarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rauen KA. The RASopathies. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2013; 14:355–69.
2. Geoffroy MM et al. Autism Spectrum Disorder Symptom Profile Across the RASopathies. *Front. Psychiatry.* 2021; 11:585700.
3. Naylor PE et al. Neuropsychiatric phenotypes in children with Noonan syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* 2023; 65:1520–9.
4. Wingbermhühle E et al. Cognitive Phenotype and Psychopathology in Noonan Syndrome Spectrum Disorders through Various Ras/MAPK Pathway Associated Gene Variants. *J. Clin. Med.* 2022; 11:1–15.
5. López-Merino E. et al. Different Ras isoforms regulate synaptic plasticity in opposite directions. *EMBO J.* 2025; 1–28
6. López-Merino E, Cuartero MI, Esteban JA, Briz V. Perinatal exposure to pesticides alters synaptic plasticity signaling and induces behavioral deficits associated with neurodevelopmental disorders. *Cell Biol. Toxicol.* 2022.
7. Landrigan PJ. What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Curr. Opin. Pediatr.* 2010; 22:219–25.
8. Hernández-Porras I et al. K-RasV14I recapitulates noonan syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014; 111:16395–400.
9. Schreiber J et al. Mechanisms underlying cognitive deficits in a mouse model for Costello Syndrome are distinct from other RASopathy mouse models. *Sci. Rep.* 2017; 7:1256.
10. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature.* 1982; 300:149–52.
11. Briz V et al. The non-coding RNA BC1 regulates experience-dependent structural plasticity and learning. *Nat. Commun.* 2017; 8:1–15.
12. Zhao X, Bhattacharyya A. Human Models Are Needed for Studying Human Neurodevelopmental Disorders. *The American Journal of Human Genetics.* 2018; 103:829–57.
13. Briz V et al. Differential estrogenic effects of the persistent organochlorine pesticides dieldrin, endosulfan, and lindane in primary neuronal cultures. *Toxicological Sciences.* 2011; 120:413–27.
14. Hu C. et al. Organoids and organoids-on-a-chip as the new testing strategies for environmental toxicology-applications & advantages. *Environ. Int.* 2024; 184:108415.
15. Rosca A et al. Impact of environmental neurotoxic: current methods and usefulness of human stem cells. *Heliyon.* 2020; 6:e05773.