

RETI NEURONALI SU MULTIELECTRODE ARRAYS (MEAS): METODO ALTERNATIVO PER LA VALUTAZIONE DI NEUROTOSSICITÀ

M. Marcoli^{1,2,4}, B. Tedesco³, G. Maura¹, S. Martinoia³, C. Cervetto^{1,4}

¹*Dipartimento di Farmacia,*

²*Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica CEBR,*

³*Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia;*

⁴*Centro Interuniversitario per la promozione dei principi delle 3R nella didattica e nella ricerca*

La valutazione della tossicità delle sostanze chimiche è centrale nell'agenda UE anche in relazione all'entrata in vigore della normativa REACH. Metodi alternativi di valutazione neurotossicologica sono oggetto di intensa attività di ricerca, ma identificazione e caratterizzazione degli effetti neurotossici di sostanze chimiche rappresentano una sfida difficile. Si richiede infatti lo sviluppo di metodi alternativi che forniscano dati direttamente correlabili a quelli ottenuti nei tests *in vivo*, identificando end-points specifici di neurotossicità predittivi della potenziale tossicità *in vivo*. È quindi cruciale l'individuazione di metodi che, oltre a rispondere ai requisiti di high-content, high-throughput necessari per poterli proporre quali metodi alternativi di screening, considerino la complessità del sistema nervoso (SN), e permettano di identificare effetti neurotossici, distinti rispetto ai citotossici, considerando le caratteristiche funzioni delle cellule del SN. Tra tali funzioni, la comunicazione intercellulare attraverso trasmettitori e recettori, e il comportamento collettivo delle reti neuronali, mediante la misurazione del rilascio e degli effetti di trasmettitori e la registrazione dell'attività elettrica di rete, possono fornire endpoints neurono-specifici.

Abbiamo utilizzato colture neuronali cerebrocorticali accoppiate a MicroElectrode Arrays (MEAs) a 60 elettrodi, un valido modello per lo studio di dinamiche neuronali, che permette registrazioni a lungo termine, non invasive e multi-sito dell'attività di rete; questo modello è considerato un promettente metodo di valutazione *in vitro* di neurotossicità.

Attraverso un approccio multidisciplinare, elettrofisiologico, neurochimico e immunocitochimico, registrando l'attività elettrica durante lo sviluppo della rete (rielaborando i dati con un software di analisi sviluppato in proprio) ed il rilascio di trasmettitori nonché l'effetto di sostanze neuroattive, abbiamo evidenziato la maturazione di reti di neuroni glutammatergici e GABAergici, che nel SN centrale rappresentano la maggioranza dei neuroni e costituiscono bersagli per rilevanti meccanismi di neurotossicità (trasmissione glutammatergica ed eccitotossicità) oltre che per importanti classi di farmaci. In reti mature di neuroni corticali la connettività sinaptica è in gran parte correlata con l'attivazione di vie glutammatergiche, e il sistema si è rivelato un sensibile sensore di effetti sulla trasmissione glutammatergica. L'attivazione o il blocco di recettori NMDA o AMPA, o il blocco dei trasportatori del glutammato, inducevano variazioni della frequenza dell'attività di firing e bursting correlate con gli effetti sul rilascio di trasmettitore. Il sistema risultava anche sensibile alla regolazione fine della trasmissione, coinvolta nei processi di plasticità sinaptica: il comportamento collettivo di rete e il rilascio di glutammato apparivano controllati dalla via NO-cGMP NMDA-dipendente, come indicato dalla manipolazione farmacologica mediante inibizione di NO sintasi o guanilato ciclasi, ed esposizione a donatori di NO o 8Br-cGMP.

Sul sistema così caratterizzato, abbiamo valutato gli effetti di sostanze neurotossiche note. Presentando esempi di modulazione dell'attività di rete da parte di sostanze neuroattive (agonisti/antagonisti glutammatergici/GABAergici) e di note sostanze neurotossiche (e.g., acido

domoico o chlorpirifos), e comparandoli con l'inattività di sostanze non dotate di neurotossicità acuta, riportiamo evidenze che reti neuronali accoppiate a MEAs possono rappresentare un sistema integrato di valutazione di neurotossicità, con specifici end-points funzionali neuronospecifici.

In conclusione, sviluppare ed ottimizzare sistemi basati su MEA può fornire strumenti efficaci per la valutazione della neurotossicità di sostanze chimiche con metodo alternativo *in vitro*, permettendo una sostanziale riduzione dell'uso degli animali, oltre che potenzialmente un'indagine di tipo meccanicistico.