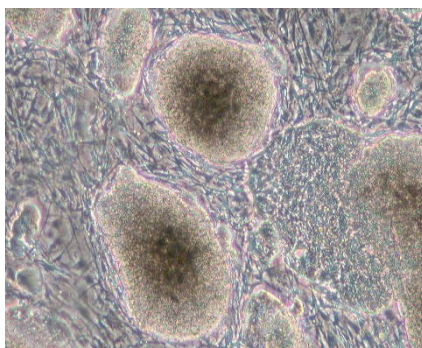


EMBRYONIC STEM CELL TEST (EST)



DEFINICIÓ

Test *in vitro* en rosegadors per a l'avaluació dels efectes teratògens, basat en dos paràmetres: el diferencial de citotoxicitat entre els fibroblasts adults i les cèl·lules mare embrionàries i el potencial del producte testat per a inhibir la diferenciació de les cèl·lules mare embrionàries.

END-POINT

Mesura de la contractibilitat dels nous miocardioblasts formats i de la inhibició comparativa del creixement cel·lular.

MOSTRA

Cèl·lules mare embrionàries ES-D3 i fibroblasts 3T3 de ratolí.

INTRODUCCIÓ

El potencial embriotòxic o teratogènic dels productes químics és determinat per mitjà de l'avaluació de la inhibició de la diferenciació i creixement de les cèl·lules mare embrionàries (ES) i de la inhibició del creixement de les cèl·lules 3T3.

Els tests d'embriotoxicitat poden ser duts a terme tant *in vivo* (utilitzant femelles gestants) com *in vitro* (cultius d'embrions sencers o de teixits embrionaris).

En concret, el test de cèl·lules mare embrionàries (EST), basat en el potencial de diferenciació en cultiu de les cèl·lules ES-D3, va ser validat a nivell científic per l'ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) com a nou test d'embriotoxicitat *in vitro* amb l'ús de línies cel·lulars permanents de ratolí.

Així doncs, l'EST és proposat avui en dia per al screening de substàncies potencialment embriotòxiques i per llur classificació en tres classes: "no teratogen", "teratogen feble" o "teratogen fort".

L'EST està basat en dos paràmetres:

- El diferencial de citotoxicitat entre els fibroblasts adults i les cèl·lules mare embrionàries.
- El potencial del producte a testar per a inhibir la diferenciació de les cèl·lules ES.

TÈCNICA

De forma paral·lela, es realitza un test complet de citotoxicitat (mitjançant el mètode MTT) en fibroblasts 3T3 (representant el teixit adult) i cèl·lules ES-D3 (teixit embrionari) de ratolí.

D'altra banda, les cèl·lules D3 són cultivades en flascons amb MLIF (*Mouse Leukemia Inhibiting Factor*), per a inhibir llur diferenciació, i sobre una capa de fibroblasts embrionaris (MEF). A l'inici de l'assaig, s'extreu el LIF i les cèl·lules (prèviament tractades amb diferents concentracions del producte a testar), són cultivades durant 3 dies en gota pendent, la qual cosa permet la formació dels cossos embrioides, i posteriorment en plaques bacterianes i en plaques de pouets. Els cossos embrioides es diferenciarien, sota les condicions adequades, en cèl·lules del miocardi.

Finalment, la diferenciació és avaluada al microscopi basant-nos en el grau de contractibilitat dels nous miocardioblasts formats.

Per tal de predir el potencial embriotòxic, els paràmetres que ens quantifiquen els tres endpoints seleccionats, i que ens donaran la classificació del producte a testar, són els següents:

- Diferenciació cel·lular: inhibició de la diferenciació de les cèl·lules ES en miocardioblasts: ID₅₀ D3^(*).
- Citotoxicitat en les cèl·lules adultes: IC₅₀ 3T3^(*).
- Citotoxicitat en les cèl·lules mare embrionàries: IC₅₀ D3^(*).

Els avantatges com a mètode de screening són els següents:

- Protocol de durada relativament curta
- Relativament econòmic
- No necessitat de sacrifici d'animals
- Bona correlació amb procediments *in vivo*

APLICACIONS

- Avaluació del potencial embriotòxic de candidats a medicaments en la fase de screening.
- Avaluació del potencial embriotòxic d'altres productes químics (REACH).
- Avaluació del potencial embriotòxic de matrius mediambientals.

NORMATIVES I BIBLIOGRAFIA

- "Embryonic Stem Cell Test", ECVAM INVITTOX protocol nº 113.
- ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) (2002). "The Use of Scientifically - Validated *In Vitro* Tests for Embryotoxicity".
- Brown NA (2002), "Selection of tests chemicals for the ECVAM international validation study on *in vitro* embriotoxicity tests", ATLA 30:177-198.
- Buesen R, Visan A, Genschow E, Slawik B, Spielmann H, Seiler A. "Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview". ALTEX 2004;21(1):15-22.
- Hannele Huuskonen. "New models and molecular markers in evaluation of developmental toxicity". Toxicology and Applied Pharmacology 2005, 207(2): 495-500.
- Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. "Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test-a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds". Toxicology and Applied Pharmacology 194 (2004) 257- 269.
- Scholz G, Pohl I, Genschow E, Klemm M, Spielmann H. "Embryotoxicity Screening Using Embryonic Stem Cells in vitro: Correlation to in vivo Teratogenicity". Cells Tissues Organs 1999;165:203-211.

(¹) IC₅₀ 3T3: concentració que causa un 50% inhibició del creixement i viabilitat de les cèl·lules 3T3.

IC₅₀ D3: concentració que causa un 50% inhibició del creixement i viabilitat de les cèl·lules D3.

ID₅₀ D3: concentració que causa un 50% inhibició de la diferenciació de les cèl·lules ES a miocardioblasts.