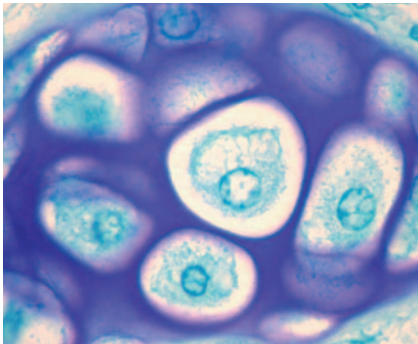

MICROMASS TEST (MM)



DEFINICIÓ

Test *in vitro* per a l'avaluació del potencial teratogen d'un agent, basat en la diferenciació de condrocits embrionaris de rosegadors.

END-POINT

Avaluació simultània de la citotoxicitat i de la inhibició de la diferenciació cel·lular.

MOSTRA

Cultius cel·lulars primaris dels esbossos de les extremitats d'embrions de rata.

INTRODUCCIÓ

El Micromass test (MM) està basat en el cultiu cel·lular primari dels esbossos de les extremitats anteriors (LB) d'embrions de rata. Degut a l'ús de cultius cel·lulars, el MM té diverses avantatges front als estudis de teratogènia *in vivo* i front a les altres tècniques alternatives de embriotoxicitat aprovades a nivell científic per ECVAM, ja que és tècnicament més simple i requereix de menys temps i de menys animals (dos o tres animals proporcionen les cèl·lules suficients per preparar les rèpliques de cultius, per tant és més econòmic que el cultiu d'embrions sencers de mamífer o el de cèl·lules aïllades d'òrgans embrionaris).

El cultiu d'embrions sencers de rosegadors té l'avantatge de permetre estudiar l'espectre dels processos normals de desenvolupament en l'organisme sencer, però la desavantatge (com els cultius de cèl·lules aïllades d'òrgans embrionaris) de ser més difícils de preparar i mantenir que els cultius cel·lulars. A més a més, la valoració dels *end-points* és més subjectiva.

D'altra banda, també s'han proposat i implementat altres assaigs de teratogènia basats en l'ús de diverses línies cel·lulars, els quals, com el MM test, no precisen d'un subministrament constant de teixit embrionari de femelles gestants, però tenen el desavantatge de ser significativament menys realistes que els cultius primaris.

En resum, el MM test ofereix la simplicitat i l'economia de l'ús de cultius cel·lulars, però al mateix temps permet l'observació dels efectes en els processos de creixement normal i en la diferenciació d'uns elements orgànics, les extremitats, especialment rellevants per que son una diana preferent de molts teratògens.

TÈCNICA

El dia 13 de gestació, s'obtenen els embrions i es seleccionen aquells amb la mida adient per a la dissecció. A continuació, s'extreuen els esbossos de les extremitats anteriors (LB) de cada embrió, es disgreguen els fragments de teixits fins a l'obtenció de cèl·lules individuals, es cultiven en placa i s'exposen a l'agent a testar, amb i sense activador metabòlic (fracció S9).

Passat el temps estipulat, es realitzen dues valoracions:

- **Valoració Citotòxica**
Càlcul de la mitjana de l'absorbància i de la desviació estàndar per a cada dosi, i del valor IC_{50} de citotoxicitat (concentració del compost que redueix la proliferació cel·lular al 50%).
- **Valoració de la diferenciació dels cultius d'extremitats**
Les cèl·lules diferenciades del mesènquima de les extremitats secreten proteoglicans sulfatats que es tenyeixen amb blau d'Alcian, la qual cosa permet quantificar a mà o amb un analitzador d'imatge els focus de condrocits tenyits. Càlcul de la ID_{50} (concentració de compost que redueix el nombre de focus al 50% del valor del control).

L'objectiu del MM test és avaluar el potencial teratogen del compost segons els valors obtinguts per als següents paràmetres: relació entre la ID_{50} (diferenciació) i la IC_{50} (citotoxicitat).

La inhibició de la diferenciació a concentracions no citotòxiques suggereix que el compost té potencial teratogen.

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

- Protocol 122 de INVITTOX (ECVAM).
- 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.