

EMBRYONIC STEM CELL TEST (EST): MÉTODO *IN VITRO* PARA EVALUAR LA EMBRIOTOXICIDAD

J. de Lapuente, J. González-Linares, M. Borràs

Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia, Parc Científic de Barcelona

Josep Samitier, 1-5. 08028 Barcelona. jlapuente@pcb.ub.es.

Resumen

La investigación y desarrollo de técnicas *in vitro* se ha convertido en una prioridad de primer rango tanto para las autoridades europeas y estatales como para las propias empresas. El interés que presentan estas técnicas se basa en diversos aspectos determinantes: consideraciones éticas, rapidez y coste. La ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) ha validado recientemente tres técnicas *in vitro* para la evaluación de la embriotoxicidad en la fase de *screening*: *Embryonic Stem Cell Test* (EST), *Micromass* (MM) y *Whole Embryo Culture* (WEC). El presente trabajo muestra la puesta a punto de la técnica EST, testándola en tres moléculas conocidas y basándonos en el protocolo de trabajo de la ECVAM. Creemos conveniente el establecimiento de un protocolo combinando en batería el *Micromass Test* (MM) y el EST, que aumentaría muy significativamente la sensibilidad y la especificidad en la evaluación durante la fase de *screening* de los efectos sobre el proceso reproductivo.

Palabras clave Embryonic Stem Cell Test, teratogenia, embriotoxicidad, toxicidad de la reproducción.

Abstract

Research and development of *in vitro* techniques has become a first order priority, as well for European and national authorities as for private companies. These techniques are of great interest due to ethical considerations, rapidity and cost. ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) has recently validated three of such screening techniques for embriotoxicity assessment: *Embryonic Stem Cell Test* (EST), *Micromass* (MM) y *Whole Embryo Culture* (WEC). The present work shows the implementation in our lab of EST, following the protocol proposed by ECVAM, and testing the performance of the method with three molecules which effects on reproduction are well known. Based on this experience, we suggest that the use of both MM and EST, combined in a battery, would significantly increase sensitivity and specificity of the assessment at the screening stage of toxicological effects on the reproductive process.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas mediante las técnicas de transcriptómica y proteómica y el subsiguiente desarrollo de potenciales respuestas terapéuticas mediante la química combinatoria plantea a las empresas farmacéuticas, de manera perentoria, la necesidad de realizar un cribado rápido y eficaz de un número cada vez más elevado de nuevas entidades químicas (NCE).

En estas condiciones, la investigación y desarrollo de técnicas *in vitro* se ha convertido en una prioridad de primer rango tanto para las autoridades europeas y estatales como para las propias empresas. El interés que presentan las técnicas *in vitro* se basa en diversos aspectos determinantes: consideraciones éti-

cas sobre el uso de animales de experimentación, rapidez y coste.

Esta necesidad es particularmente relevante en lo que respecta a aquella información toxicológica que resulta especialmente sensible por diversas razones. Tal es el caso de la Toxicología de la Reproducción, que es la parte de la toxicología experimental que tiene como objeto detectar *cualquier* efecto posible de la sustancia en estudio sobre el proceso reproductivo.

Para ello es preciso diseñar una batería de ensayos que examinen cuidadosamente las diversas partes de dicho proceso, es decir, en el caso más complejo, desde el desarrollo y maduración de los gametos, la cópula, la implantación y el desarrollo embrionario y fetal, hasta el parto, el destete, el crecimiento y la

Tabla 1 Valores obtenidos de los *end-points*, funciones lineares discriminantes y clasificación embriotóxica de la molécula penicilina G.

Endpoints	IC50 3t3	9056,044	Variables	lg (IC50 3t3)	3,95693852
	IC50 d3	2622,644		lg (IC50 d3)	3,41873934
	ID50 d3	1156,29		(IC50 3t3 - ID50)/IC50 3t3	0,87231842

Funciones discriminantes lineares I, II y III:

I	15,47544215
II	14,00782119
III	-8,409863005

Clase 1	No embriotoxico
Clase 2	Moderadamente embriotoxicos
Clase 3	Fuertemente embriotoxicos

VERDADERO
FALSO
FALSO

adaptación a la vida independiente, cerrándose el ciclo de estudio al alcanzar la nueva generación su madurez sexual.

Por lo que se refiere a la farmacotoxicología, el interés, por supuesto, se centra en la reproducción de los mamíferos, ya que el objetivo final de estos estudios es la extrapolación a la especie humana, o a las especies de destino en el caso de la medicina veterinaria. En este campo existe una normativa precisa que en la actualidad, para los Estados Unidos de América, Japón y la Unión Europea, se ha unificado en las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).

En el caso de la ecotoxicología la situación está menos definida, el campo es muy amplio en cuanto a las especies potencialmente afectadas e incluso al abanico de efectos posibles, y es preciso tener en cuenta numerosos factores con capacidad moduladora, además de eventuales interacciones y efectos indirectos, por lo que las formas de la evaluación toxicológica deben adaptarse a las circunstancias concretas.

Entre los estudios de Toxicología de la Reproducción mencionados, aquellos que se refieren a la embriotoxicidad y a la teratogenia (inducción de malformaciones en los fetos cuando la madre embarazada es expuesta al tóxico) resultan de la mayor importancia, por referirse a aspectos extremadamente sensibles para la opinión pública (en especial a partir del desastre de la talidomida ocurrido entre 1959 y 1964).

Los protocolos establecidos en las normativas ICH son de ejecución larga y resultan considerablemente onerosos en dinero y en animales (es preciso realizarlos en tres especies distintas, una de las cuales debe ser no roedor), por lo cual no pueden ser utilizados en estudios de *screening*, en los que es preciso examinar un número elevado de productos.

De ahí la necesidad de desarrollar técnicas alternativas, especialmente *in vitro*.

Desde que un exhaustivo estudio de validación realizado por la agencia americana de validación de métodos alternativos (ICVAM) condujo a que tanto esta agencia como la europea ECVAM rechazaran formalmente el uso del test FETAX (*Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus*) como técnica alternativa para el *screening* de fármacos, la atención se ha centrado en las técnicas que utilizan cultivos celulares o de embriones enteros. Resumimos a continuación la situación actual.

En la teratogenia *in vitro* (tests alternativos al ensayo en mamíferos) existen tres técnicas que han sido recientemente validadas por ECVAM a través de un estudio inter-laboratorios con 20 productos seleccionados.

Hasta el momento en nuestra Unidad hemos puesto a punto uno de ellos, el Test de Células Madre Embrionarias de Ratón (EST) (Scholz *et al.*, 1999; Piersma, 2004), y hemos iniciado los primeros ensayos para la implementación del Micromass Test (MM) (Spielmann *et al.*, 2002, 2004) y el Cultivo de Embriones Enteros (WEC).

El presente trabajo muestra la puesta a punto de la técnica testándola en tres moléculas conocidas y basándonos en el protocolo de trabajo de la ECVAM (*Embryonic stem cell test for embriotoxicity*)

MATERIAL Y MÉTODOS

Las líneas celulares utilizadas fueron: fibroblastos de ratón (3T3 BALB/c Clon A31) (American Type Culture Collection, ATCC, cat. n° CCL-163) y Embryonic Stem Cells, clon D3 (ES-D3) (ATCC cat. n° CRL-1934)

El medio de cultivo utilizado para el ensayo con

Tabla 2 Valores obtenidos de los *end-points*, funciones lineares discriminantes y clasificación embriotóxica de la molécula 5-fluorouracilo.

Modelo de Predicción

Endpoints	IC50 3t3	0,09243
	IC50 d3	0,03181
	ID50 d3	0,02291

Variables	lg (IC50 3t3)	-1,03418705
	lg (IC50 d3)	-1,49743633
	(IC50 3t3 - ID50)/IC50 3t3	0,75213675

Funciones discriminantes lineares I, II y III:

I	-30,62086747
II	-15,7397735
III	1,458063955

Clase 1 No embriotóxico
Clase 2 Moderadamente embriotóxicos
Clase 3 Fuertemente embriotóxicos

FALSO
FALSO
VERDADERO

las células ES-D3 estaba compuesto de 20 % Fetal Calf Serum, 2 mM de glutamina, 50 IU/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 1 % de aminoácidos no esenciales, 0,1 mM β-mercaptoetanol.

El medio de cultivo utilizado para el ensayo con las células 3T3 estaba compuesto de 10 % Fetal Calf Serum, 4 mM de glutamina, 50 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado utilizando diferentes viales de la misma línea celular, preparándose el medio antes de ser utilizado.

Diferenciación de la células madres ES-D3

La línea ES-D3 fue cultivada permanentemente en presencia de mLIF (*Mouse Leukemia Inhibitor Factor*) antes de empezar el ensayo, en la fase de expansión del cultivo, para evitar la diferenciación espontánea.

Se testaron tres moléculas a diferentes concentraciones 5-fluorouracilo (0,008; 0,013; 0,02; 0,03; 0,045; 0,068 y 0,1 µg/ml), dexametasona (5,8; 8,8; 13,3; 20; 30; 45 y 67,5 µg/ml) y penicilina G (948; 1422; 2133; 3200; 4800; 7200 y 10800 µg/ml).

Se realizó un cultivo en gota pendiente de una suspensión celular de $3,75 \times 10^4$ células/ml y se incubaron durante 3 días con 5 % CO₂ a 37° C, para la formación de los cuerpos embrioides (EB). Los EB se depositaron en placas de Petri con tratamiento antiadherente y se mantuvieron dos días en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, los EB de cada concentración, se traspasaron a una placa de 24 pozos y se incubaron durante 5 días. El medio con las concentraciones apropiadas y los controles fueron renovados a los 3 y 5 días después del inicio del ensayo.

A los 10 días se determinó la diferenciación me-

dante la observación en microscopio óptico invertido de los miocardiocitos contráctiles de cada concentración testada.

Bajo las mismas condiciones se realizó un test de calidad de la línea celular y de los solventes de cada molécula (Phosphate Buffered Saline al 1 % para la penicilina G y 5-fluorouracilo y dimetilsulfóxido al 0,25 % en dexametasona)

Citotoxicidad en células ES-D3 y 3T3

Se prepararon, independientemente, para cada línea celular, una suspensión celular en el medio de cultivo adecuado de 1×10^4 células/ml. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron con 5 % CO₂ a 37° C durante 2 h. Tras este periodo se testaron las tres moléculas a diferentes concentraciones: 5-fluorouracilo (0,029; 0,044; 0,066; 0,1; 0,15; 0,225 y 0,337 µg/ml), dexametasona (5,8; 8,8; 13,3; 20; 30; 45 y 67,5 µg/ml) y penicilina G (948; 1422; 2133; 3200; 4800; 7200 y 10800 µg/ml), en ambas líneas celulares. El medio con las concentraciones apropiadas y los controles fueron renovados a los 3 y 5 días después del inicio del ensayo. En el mismo ensayo se utilizaron como control negativos los solventes de cada molécula (Phosphate Buffered Saline al 1 % para la penicilina G y 5-fluorouracilo y dimetilsulfóxido al 0,25 % en dexametasona) y como control positivo *sodium dodecyl sulphate* (SDS) al 0,02 %

Transcurridos 10 días se determinó el crecimiento celular por MTT.

Cálculo de los end-points

Para calcular los tres diferentes *end-points* necesarios para determinar el grado de embriotoxicidad que

Tabla 3 Valores obtenidos de los end-points, funciones lineares discriminantes y clasificación embriotóxica de la molécula *dexametasona*.

Modelo de Predicción

Endpoints	IC50 3t3	5,26
	IC50 d3	0,69324
	ID50 d3	7,47048

VARIABLES	lg (IC50 3t3)	0,72098574
	lg (IC50 d3)	-0,15911639
	(IC50 3t3 - ID50)/IC50 3t3	-0,42024335

Funciones discriminantes lineares I, II y III:

I	-9,331324253
II	-3,744250955
III	-3,085462124

Clase 1 No embriotoxico
Clase 2 Moderadamente embriotoxicos
Clase 3 Fuertemente embriotoxicos

FALSO
FALSO
VERDADERO

presenta la muestra, según el protocolo aceptado por la ECVAM: Índice de la inhibición de la diferenciación del 50 % de los EB (ID₅₀) y concentración de la inhibición de crecimiento del 50 % de las células ES y 3T3 (IC₅₀ ES y IC₅₀ 3T3), se utilizó una determinación gráfica.

Cálculo del grado de embriotoxicidad

El modelo de predicción validado por la ECVAM para el EST está basado en la obtención de tres funciones lineares discriminantes a partir de los 3 *end-points* (ID₅₀ ES, IC₅₀ ES y IC₅₀ 3T3) (Véase la página siguiente):

Y clasificando las moléculas en tres clases: No embriotóxicas (si FI > FII y FI > FIII), Moderadamente embriotóxicas (si FII > FI y FII > FIII) y fuertemente embriotóxicas (si FIII > FI y FIII > FI) (ECVAM y Walmod *et al.*, 2004)

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1, tabla 2 y tabla 3.

Según el modelo propuesto por la ECVAM en su última versión de 2002 para el Embryonic Stem Cell Test clasifican a la molécula *penicilina G* como *no embriotóxica*, a la molécula *5-fluorouracilo* como *fuertemente embriotóxica* y a la molécula *dexametasona* como *moderadamente embriotóxica*.

DISCUSIÓN

Las tres moléculas testadas han sido clasificadas correctamente según las referencias existentes en la li-

teratura y en los ensayos validados por la ECVAM, por lo que estamos en disposición de realizar el ensayo de manera rutinaria en nuestro laboratorio.

Superada la fase de puesta a punto, con las dificultades que ello puede llegar a presentar, creemos que el test de embriotoxicidad con células madres (EST) es un buen test para la fase de cribaje.

En contra de lo que se afirma en el documento de ECVAM, creemos que no es posible obviar de manera general la utilización de un activador metabólico (fracción S9+), sino que la decisión debe tomarse en cada caso atendiendo a la familia molecular concreta con la que se esté trabajando. Una mejora en el procedimiento de evaluación de la diferenciación en el test EST sería muy importante. En la actualidad, el protocolo aprobado por ECVAM solamente contempla la evaluación visual, siendo «positivos» aquellos cuerpos embrioides en los que se aprecia la contracción celular, tanto si ésta se produce únicamente en una o muy pocas células, y con una frecuencia de latidos muy baja, como si prácticamente todo el cuerpo embriode late con una frecuencia equivalente a la de un corazón. Evidentemente, una forma más precisa de cuantificación repercutiría muy sensiblemente en el poder discriminatorio del ensayo. Hay que señalar que actualmente ya se ha propuesto una técnica para la cuantificación del grado de diferenciación, basada en la tinción inmunohistoquímica de la α -actinina o de la miosina de cadena pesada (MHC) y la lectura mediante citofluorometría de flujo, o también se han ensayado técnicas de caracterización de la expresión génica mediante TaqMan PCR (Seiler *et al.*, 2005). Estas técnicas, sin embargo, complican considerablemente el protocolo, y no resultan suficientemente manejables para estudios de *screening*.

No obstante, atendiendo a las necesidades concre-

$$\begin{aligned} \text{Función I} & \quad 5,916 \log (\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) + 3,50 \log (\text{IC}_{50} \text{ ES}) - 5,307 \frac{(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50})}{\text{IC}_{50}} \text{ ES} - 15,27 \\ \text{Función II} & \quad 3,651 \log (\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) + 2,394 \log (\text{IC}_{50} \text{ ES}) - 2,033 \frac{(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50})}{\text{IC}_{50}} \text{ ES} - 6,85 \\ \text{Función III} & \quad -0,125 \log (\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) - 1,917 \log (\text{IC}_{50} \text{ ES}) + 1,50 \frac{(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50})}{\text{IC}_{50}} \text{ ES} - 2,67 \end{aligned}$$

tas de una fase de *screening* de fármacos, el bajo porcentaje de falsos positivos (7 %) hace que el *micromass test* resulte un test muy aceptable; el número de falsos negativos, relativamente elevado, hace que, en cambio, resulte problemático en otros escenarios. La combinación de este test con el EST, que presenta un nivel bajo de falsos negativos (9,5 %), ha de permitir mejorar considerablemente nuestra capacidad para distinguir entre no embriotóxicos y embriotóxicos débiles (ECVAM, Buesen *et al.*, 2004)

Por lo tanto, una buena estrategia de *screening* sería, en nuestra opinión, utilizar ambos tests en batería, actuando el MM como primer filtro, y aplicar el EST para aquellos productos que no hayan sido clasificados en el primer test como *embriotóxicos fuertes*.

BIBLIOGRAFÍA

BUESEN, R.; VISAN, A.; GENSCROW, E.; SLAWIK, B.; SPIELMANN, H.; SEILER, A. (2004) «Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview». *ALTEX*, 21(1): 15-22.

ECVAM (EUROPEAN CENTRE FOR THE VALIDATION OF

ALTERNATIVE METHODS) (2002) *Embryonic stem cell test*. <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

PIERSMA, A. (2004). «Validation of alternative methods for developmental toxicity testing». *Toxicology Letters*, 149: 147-153.

SCHOLZ, G.; POHL, I.; GENSCROW, E.; KLEMM, M.; SPIELMANN, H. (1999). «Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: correlation to *in vivo* teratogenicity». *Cells Tissues Organs*, 165: 203-211.

SEILER, A. E.; BUESEN, R.; VISAN, A.; SPIELMANN, H. (2006). «Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the embryonic stem cell test». *Methods Mol. Biol.*, 329: 371-395.

SPIELMANN, H.; GENSCROW, E.; BROWN, N. A.; PIERSMA, A. H.; VERHOEF, A.; SPANJERSBERG, M. Q.; HUSKONEN, H.; PAILLARD, F.; SEILER, A. (2004). «Validation of the rat limb bud micromass test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests». *Altern. Lab. Anim.*, 32(3): 245-274.

SPIELMANN, H.; LIEBSCH, M. (2002). «Validation successes: chemicals». *Altern. Lab. Anim.*, 30(supl. 2): 33-40.

WALMOD, P.; GRAVEMANN, U.; NAU, H.; BEREZIN, V.; BOCK, E. (2004). «Discriminative power of an assay for automated *in vitro* screening of teratogens». *Toxicology in Vitro*, 18: 511-525.