

OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO DE EMBRIOTOXICIDAD CON CÉLULAS MADRE DE RATÓN MEDIANTE EL USO DE GENES BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Memoria de Tesis Doctoral

Andrea Carolina Romero Lucena

Directores:

Miguel Ángel Sogorb Sánchez

Eugenio Vilanova Gisbert

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Instituto de Bioingeniería

Unidad de Toxicología y Seguridad Química

Elche, julio 2017

Los doctores Miguel Ángel Sogorb Sánchez, Profesor Titular de Universidad del Área de Toxicología y D. Eugenio Vilanova Gisbert, Catedrático de Universidad del Área de Toxicología, ambos de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que doña **Andrea Carolina Romero Lucena**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Tolima (Colombia), ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “**Optimización del ensayo de embriotoxicidad con células madre de ratón mediante el uso de genes biomarcadores de diferenciación celular**” incluido en la presente memoria de Tesis Doctoral.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman la presente certificación,

En Elche, julio de 2017

Fdo:

MIGUEL ÁNGEL SOGORB SÁNCHEZ

EUGENIO VILANOVA GISBERT

Andrea Carolina Romero Lucena fue becaria del Programa Santiago Grisolia de la Generalitat Valenciana destinado a la contratación de personal investigador de carácter pre-doctoral que haya obtenido una titulación universitaria por una institución no española.

El trabajo presentado en esta Memoria de Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- 1 **Romero AC**, Del Río E, Vilanova E, Sogorb MA. RNA transcripts for the quantification of differentiation allow marked improvements in the performance of embryonic stem cell test (EST). *Toxicol Lett.* 2015;238(3):60-69.
- 2 **Romero AC**, Del Río E, Vilanova E, Sogorb MA. Expression of biomarker genes of differentiation in D3 mouse embryonic stem cells after exposure to different embryotoxicant and non-embryotoxicant model chemicals. *Data Brief.* 2015;5:354-65.
- 3 **Romero AC**, Vilanova E, Sogorb MA. Shortening and Improving the Embryonic Stem Cell Test through the Use of Gene Biomarkers of Differentiation. *J Toxicol.* 2011;2011:286034. doi: 10.1155/2011/286034.

El trabajo presentado en esta Memoria de Tesis ha dado lugar a las siguientes ponencias invitadas en Congresos Internacionales:

- 1 20 de junio de 2012, workshop: "New in vitro methods for assessment of developmental toxicity endpoints" (48th Congress of the European Societies of Toxicology, 17-20 June 2012, Stockholm, Sweden). Ponencia: "Cell differentiation markers as endpoints for in vitro developmental toxicity assays". Por: Sogorb MA, **Romero AC**, Pamies D, Estevan C, Vilanova E.
- 2 5 de septiembre de 2016, simposio: "A multidisciplinary approach for novel developmental neurotoxicity risk assessment contributing to the AOP concept" (52nd European Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2016) 04-07 September 2016, Seville, Spain). Ponencia: From simple in vitro test to complex models: the example of developmental toxicity of organophosphorus compounds. Por: Vilanova E, **Romero AC**, Pamies D, Estevan C, Sogorb MA.

El trabajo presentado en esta Memoria de Tesis ha dado lugar a las siguientes comunicaciones a congresos:

- 1 Estevan C, Pamies D, **Romero C**, Vilanova E, Sogorb MA. Possible improvements to embryonic stem cell test (EST) using molecular markers of cell differentiation. XII International Congress of Toxicology (ICT XII), 19-23 July 2010, Barcelona (Spain).
- 2 **Romero AC**, Pamies D, Estevan C, Estévez J, Vilanova E, Sogorb MA. Use of biomarkers of differentiation for improving the embryonic stem cell test. 12th ECOPA Annual Workshop "THE FUTURE OF THE 3Rs –
- 3 Sogorb MA, **Romero AC**, Pamies D, Estevan C, Mangas I, Estévez J, Benabent M, Vilanova E. Predicting Embryotoxicity Using Gene Expression as Biomarker of Alterations in Differentiation after only 5 Days of Exposure in mouse In Vitro Embryonic Stem Cells. XIII. International Congress of Toxicology, (Seoul, Korea) June30-July 4, 2013.

A aquellos seres valiosos

que han marcado mi camino:

A mi Esposo e hijo

Andres Arturo Barbosa Riveros y

Samuel Barbosa Romero

A mis Padres

Luis Alberto Romero y Blanca Lucena



Es casi imposible agradecer a todas las personas que de una u otra manera me han apoyado y han puesto su granito de arena para la culminación de este trabajo. Aun así, quiero exaltar la labor de todos aquellos que estuvieron presentes durante la mayor parte de la realización de esta tesis que con respeto y cariño me orientaron y me guiaron, me dieron ánimo para no desistir y continuar hacia el final.

Agradezco a Dios por su infinita misericordia, por darme la vida y por permitirme gozar de buena salud para poder llevar a cabo mis proyectos, que con su gracia y bendición he cumplido a lo largo de mi vida. Sin él nada de esto habría sido posible.

A mi amado esposo por su amor, paciencia y motivación, por su tiempo y sacrificio, por creer en mi capacidad para que yo pudiera culminar el escrito de la tesis.

A mi amado Hijo, por ser mi gran motivación, me animas cada día a ser una mejor persona y a superarme para ofrecerte siempre lo mejor, gracias hijo por acompañarme en parte de este proceso, aunque fue difícil al final lo logramos.

Dirijo una sincera y cálida palabra de agradecimiento hacia mis padres Luis Alberto Romero y Blanca Lisbi Lucena por el apoyo y amor incondicional que siempre me han brindado. Por enseñarme que con esfuerzo, trabajo y perseverancia se logran las metas, gracias por su tiempo (por madrugar y traspasar conmigo) y por ayudarme con los cuidados de mi hijo, por viajar hasta Villavicencio a cuidarlo y estar pendientes de él para que yo pudiera trabajar en este escrito.

A mis hermanos Carlos y Camilo Romero, por estar pendientes de todo este proceso. A mis adorados sobrinos, María Camila Romero, David, Thomas y Juan Andrés y la pequeña Ahynoa que espero ser un ejemplo para ellos. A mis primos Linda, Mauro, Rubén Darío, Alba, Juan Carlos, Luis Alberto, Sofi, Bryan, Jova, Leidy, Ricardo, Juan P, Ronald que siempre están pendientes de mí. A mis tíos y tías Yolanda, José, Rubén Cortes, Enrique, Jorge, Luz Alba, Mery, Alonso, Hernán, por sus palabras de apoyo y consejos oportunos. A mis abuelitas que están en el cielo por su gran amor que aún siento. A la familia de mi esposo, en especial a mis suegros por estar pendientes de mi esposo y mi hijo, y brindarnos su apoyo en Villavicencio.

Debo una enorme gratitud hacia la Universidad Miguel Hernández de Elche, por haberme aceptado ser parte de ella, y permitir realizar mis estudios de post grado en esta prestigiosa institución.

Doy las gracias a mi director de tesis Miguel Ángel Sogorb, a quien debo gran parte de todo este trabajo, por su gran paciencia con cada situación que se me presentaba y por no desistir a pesar de mis errores continuos y seguir siempre adelante a pesar de las diferencias. Por guiarme y orientar la realización de esta tesis fuera de España, así como su colaboración en cada aspecto y oportunas sugerencias, también por sus correcciones, además de contribuir a mi formación como investigadora.

A Eugenio Vilanova co director de mi tesis, por estar siempre pendiente de mi tesis, aun fuera de España, por animarme a seguir siempre adelante, por sus enseñanzas, oportunas sugerencias y por sus correcciones. Gracias por sus ideas, consejos y supervisión durante estos años, agradezco una vez más por confiar en mí.

A mis compañeros de laboratorio Carmen, David e Iris, que hicieron más amena mi estadía en la universidad, gracias por resolver siempre mis dudas es aspectos técnicos como personales. A Karima con quien hice una bonita amistad y a pesar de la distancia la llevo en mi corazón. A Jordi, Roberto, Oscar, María Jesús, Jose María, Eva y Lucia, gracias por ser tan buenos compañeros de trabajo. A mi compañera y amiga Rosa Isabel, por brindarme siempre su apoyo y amistad, por animarme siempre a terminar esta tesis, a su hijo Allam, gracias por su colaboración y por estar siempre dispuesto a ayudarme. A Jose, gracias por escucharme siempre, por su tiempo y consejos y sus conversaciones siempre tan agradables, a Javier y Mari Carmen por saludarme siempre con una sonrisa. Agradezco también a aquellos profesores de la Unidad de Toxicología que no mencioné, pero que sin embargo contribuyeron a mi formación, por hacer más amena mi estadía en el Instituto, y por su ayuda tanto en el laboratorio como en aspectos de carácter personal.

A mis amigos por estar siempre a mi lado, a mis amigas de infancia Natalia y Lorena Florez, que las llevo en mi corazón y son un ejemplo de responsabilidad y méritos. A William, Magdis, Claudia, Luisa, Yuli, Diana, en Villavo a Maye, Leidy, Julita, Andre, Yenny, Tatiana, Hernando, Jose, a mi compadre Wilson y su familia, mi otro compadre Hainer y mi ahijada Sarahi, las esposas de mis tíos Marta y Rosita, mi madrina Normita y Jaime por estar siempre ahí aunque no los vea a diario sé que me apoyan y celebran mis logros, gracias por alentarme siempre a seguir adelante. A mis amigas de cole que tanto aprecio Yami y Pío, porque siempre han estado ahí, apoyándome y pendientes de mí, gracias por estar en España por esa época, porque ustedes fueron un gran apoyo en mi tiempo de estadía y me hacían sentir en casa.

Y por último, quiero agradecer de manera especial a todas aquellas personas que conocí en Altabix, barrio donde viví durante mi estadía en Elche, a las primeras personas que me recibieron en Elche, a Fausto y Susana, gracias por recibirme en su hogar y por su confianza. A mi amiga Celia que siempre estuvo dispuesta a brindarme su amistad y hacerme sentir como una más de su familia, gracias por sus consejos y amistad, y por sus palabras de aliento en momentos difíciles, agradezco también a Fanny por brindarme siempre su colaboración y por ayudarme a encontrar junto con Celia un hogar en España, porque sin su ayuda y cosas del destino no hubiera conocido a los hermanos Romero (Martica, Miguel e Inelda) que me acogieron como una más en su hogar durante los últimos años de mi estadía en España, gracias a esta hermosa familia por brindarme su amistad, apoyo incondicional y confianza, por estar siempre pendientes de mí, a Martica por pagar mis tutelas académicas cada año, mil gracias.

A los hermanos venezolanos Michelli (Claudia y Jose), y a Santi, a quienes recuerdo con inmenso Cariño, gracias por brindarme su amistad y a Clau por acogerme siempre en sus festejos y paseos, que momentos más agradables pase junto a ustedes, me hacían olvidar que estaba lejos de casa, además de distraer mi mente, gracias por apoyarme y creer siempre en mí. A crucecita, por su dulzura como persona y por estar pendiente de mí. A Juan Pablo y Lucia. Gracias a todos ustedes por acompañarme en este proceso de formación académica.



RESUMEN

La prueba de las células madre embrionarias (EST, por Embryonic Stem cell Test) es el único método de ensayo embriotóxico validado que suprime totalmente la utilización de animales de experimentación. El ensayo EST emplea dos diferentes líneas celulares, las células madre embrionarias de ratón D3 (como modelo de célula en diferenciación) y los fibroblastos de ratón 3T3 (como modelo de células no diferenciadas). En el ensayo EST validado tras 10 días de exposición de fibroblastos cultivados en monocapa se ha de determinar la concentración de agente potencialmente embriotóxico capaz de inducir una disminución de viabilidad del 50% (IC503T3). Igualmente se determina el IC50D3 como la concentración de agente potencialmente embriotóxico capaz de inducir una disminución de viabilidad del 50% en células D3 cultivadas en monocapa expuestas durante 10 días. También se ha de estimar la concentración de agente tóxico capaz de inhibir un 50% la diferenciación de cuerpos embrionarios de células D3 cultivados con la técnica de la gota colgante en cardiomiocitos latentes (ID50). Finalmente, unas funciones matemáticas de discriminación basadas en estos tres parámetros permiten asignar una clasificación al potencial embriotóxico del compuesto evaluado, que puede ser embriotóxico fuerte, débil o no embriotóxico.

El European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM) decidió que el EST era un método científicamente válido y validado, pero que era necesario implementar mejoras en la cuantificación de las alteraciones de la diferenciación (preferiblemente a través de determinaciones cuantitativas de tipo molecular) antes de poder ser utilizado con finalidades reguladoras. Esta Tesis Doctoral estudia la implementación de posibles mejoras en el EST en línea con lo requerido por EURL-ECVAM introduciendo la cuantificación de la expresión génica como criterio de monitorización de alteraciones en la diferenciación (lo que además supone un valor añadido al permitir estudiar mecanismos moleculares de embriotoxicidad), reduciendo la duración total de la exposición a 5 días y simplificando la metodología empleando solamente cultivos de células D3 y 3T3 en monocapa.

Se determinó la IC50D3 y la IC503T3 de células expuestas en monocapa durante 5 días a 7 diferentes compuestos modelo empleados en la validación del EST convencional (2 embriotóxicos fuertes, 3 embriotóxicos débiles y 2 no embriotóxicos). También se determinó para estos siete compuestos lo que denominamos CE50 o CE200, que se definen como las concentraciones del compuesto evaluado capaces de, bien reducir o bien aumentar la expresión un 50 o un 200%, respectivamente, de un total de 16 genes entre los cuáles se encontraban biomarcadores de formación de mesodermo (*Mesp1*, *Vegfa*, *Myo1e* y *Hdac7*), de ectodermo (*Nrcam*, *Nes*, *Shh* y *Pnpla6*) y de endodermo (*Flk1* y *Afp*); así como también de procesos básicos para la supervivencia celular (*Cdk1*, *Myc*, *Jun*, *Mixl1*, *Cer1* y *Wnt3*).

Finalmente, se aplicaron las funciones matemáticas de discriminación del EST convencional utilizando los IC50D3 y IC50T3 calculados y sustituyendo el parámetro ID50 bien por CE50 o bien por CE200 (dependiendo de si el compuesto evaluado inducía una sobreexpresión o una represión de cada gen). Esto produjo para cada compuesto evaluado un conjunto de 16 diferentes predicciones de potencial embriotóxico (una por cada uno de los 16 genes empleados) y se consideró como predicción global final aquella categoría de embriotóxico para la que se hubiera obtenido un mayor número de predicciones individuales.

Esta metodología obtuvo un 100% de predicciones correctas para los 7 compuestos modelo evaluados, lo cual es una mejora muy prometedora con respecto a los resultados del EST convencional validado, especialmente en lo relativo a la discriminación entre agentes embriotóxicos débiles y no embriotóxicos.

Además la estrategia de evaluación propuesta aporta una aproximación mecanicista para comprender las alteraciones en la diferenciación celular y en el desarrollo embrionario inducidas por exposición a sustancias químicas, lo que dotará de una mayor robustez a los procesos de evaluación del riesgo de embriotoxicidad.

Las mejoras implementadas en el método EST lo acercan a una futura utilización, probablemente en combinación con otras metodologías alternativas a la experimentación animal, con finalidades reguladoras y en procesos de cribado y detección de embriotoxicidad en ensayos masivos con librerías de compuestos.

ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracilo (*5-fluorouracil*).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ACDC: Ensayo de Células Adheridas en Diferenciación y Citotoxicidad (*The Adherent Cell Differentiation and Cytotoxicity*).

AMP: Adenosin monofosfato (*Adenosine monophosphate*).

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNasa: Ribonucleasas.

bFGF: Factor básico de crecimiento de fibroblasto (*Basic fibroblast growth factor*).

BrEt: Bromuro de etidio.

BSA: Albúmina sérica bovina.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CE200: Concentración de la sustancia de ensayo que causa un aumento del 200% en la expresión de un gen en células diferenciadas de manera espontánea durante 5 días.

CE50: Concentración de la sustancia de ensayo que causa una disminución del 50% en la expresión de un gen en células diferenciadas de manera espontánea durante 5 días.

DEPC: Dietil pirocarbonato.

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

DPH: 5,5-Difenilhidantoina (*5,5-diphenylhydantoin*).

DTT: Ditioneitol (*Dithiothreitol*).

EBs: Cuerpos embrionarios (*Embryoid bodies*).

ECVAM: Comité Europeo de Validación de Métodos Alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*).

EST: Test de células madre embrionarias (*Embryonic stem cell test*).

EURL-ECVAM: Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Alternativas a la Experimentación Animal (*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*).

FBS: Suero fetal bovino (*fetal bovine serum*).

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ESC: Células madre embrionarias (*Embryonic stem cell*).

FETAX: Ensayo de teratogénesis con embriones de rana *Xenopus* (*Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus*)

IC503T3: Concentración de compuesto capaz de reducir un 50% la viabilidad de fibroblastos de ratón de la línea 3T3 tras 5 días de exposición.

IC50D3: Concentración de compuesto capaz de reducir un 50% la viabilidad de células madre embrionarias de ratón de la línea D3 en diferenciación espontánea tras 5 días de exposición.

ID50: Concentración de compuesto capaz de reducir al 50% la formación de cardiomiocitos latentes a partir de células madre embrionarias de ratón D3 diferenciadas espontáneamente durante 10 días.

mARN: ARN mensajero.

MM: Método de las Micromasas (*Micromass Method*).

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

NOAEL: Nivel sin efecto adverso observable (*No observed adverse effect level*).

NTE: Esterasa diana de neuropatía (*Neuropathy target esterase*).

LIF: Factor inhibidor de la leucemia (*Leukemia Inhibition Factor*).

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (*Organisation for Economic Cooperation and Development*).

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*).

PCA: Análisis de componente principal (*principal component analysis*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*).

PG: Penicilina G (*penicillin G*).

PM: Modelo de predicción (*Prediction model*).

RA: Ácido retinoico (*Retinoic acid*).

RIN: Número de integridad del ARN (RNA Integrity number).

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a partir de la retrotranscripción del ARNm (*Reverse transcription polymerase chain reaction*).

SDS: Dodecilsulfato sódico.

TBE: Tris/Borato/EDTA.

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano.

VA: Ácido valproico (*valproic acid*).

WEC: Método de Embriones Enteros en Cultivo (*whole embryonic culture*).

ABREVIATURAS DE GENES:

Afp: α -fetoproteína (Alpha fetoprotein).

Cdk1: Quinasa dependiente de ciclina 1 (*Cyclin-dependent kinase 1*).

Cer1: Cerberus 1 homolog (*Xenopus laevis*) gene.

Flk1 (Kdr): Quinasa de hígado fetal (*Fetal liver Kinase 1*).

Hdac7: Histona desacetilasa 7 (*Histone deacetylase 7*).

Jun: Jun oncogene.

Mesp1: Mesodermo posterior 1 (*Mesoderm posterior 1*).

Mixl1: Mix1 homeobox-like 1.

Myc: Oncogen de la mielocitomatosis (*Myelocytomatosis oncogene*).

Myo1e: Miosina IE (*Myosin IE*).

Nes: Nestina (*Nestin*).

Nrcam: Molécula neuronal de adhesión celular (*Neuronal cell adhesion molecule*).

Pnpla6: Gen 6 que contiene dominio similar al de la fosfolipasa papatina (*Patatin-like phospholipase domain containing 6 gene*) (Gen codificante de NTE).

Shh: Erizo Sonic (*Sonic hedgehog*).

Vegfa: Factor de crecimiento vascular endotelial A (*Vascular endothelial growth factor A gene*).

Wnt3: Gen 3 del dominio de integración MMTV sin alas (*Wingless-related MMTV integration site 3 gene*).

Índice

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	CONCEPTOS BÁSICOS DE TOXICIDAD A LA REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO Y NECESIDAD DE MÉTODOS DE ENSAYO DE BASE MECANICISTA	3
1.2	ENSAYOS <i>IN VIVO</i> DE TOXICIDAD A LA REPRODUCCIÓN Y TERATOGENICIDAD	6
1.2.1	Guías y regulaciones para ensayos de toxicidad.....	6
1.2.2	Los ensayos en las guías de la OECD y en la UE (Reglamento CE 440/2008).....	7
1.2.3	Ventajas e inconvenientes de los ensayos <i>in vivo</i> de toxicidad al desarrollo	10
1.3	CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS COMO MODELO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	11
1.3.1	Las células madre	11
1.3.2	Células madre embrionarias.....	11
1.3.3	Clasificación de las células embrionarias.....	12
1.3.4	Algunos de los factores que conllevan a la diferenciación celular	14
1.3.5	Diferenciación <i>in vitro</i>	15
1.3.6	Aplicaciones de las células madre en Toxicología.....	16
1.4	MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ENSAYO DE TOXICIDAD	18
1.4.1	Definición del concepto de método alternativo.....	18
1.4.2	Métodos alternativos disponibles	18
1.4.3	Validación de los métodos alternativos	19
1.4.4	Necesidad de métodos alternativos de ensayo de toxicidad a la reproducción y al desarrollo.....	21
1.5	MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA ENSAYO DE TOXICIDAD AL DESARROLLO	23
1.5.1	Los métodos disponibles y estado de validación	23
1.5.2	Descripción resumida de los métodos disponibles	25
1.6	MÉTODO DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (EST)	28
1.6.1	Antecedentes del EST	28
1.6.2	Fundamento del EST.....	29
1.6.3	Procedimiento detallado para el análisis de la diferenciación celular en el método EST ..	29
1.6.4	Procedimiento para el ensayo de citotoxicidad en el método EST	31
1.6.5	Variables del ensayo EST y funciones estadísticas de predicción	33
1.6.6	Variables usadas en el EST modificado en este trabajo.....	34
1.6.7	Ensayos de pre-validación y validación del método EST:	34
1.7	LIMITACIONES Y MEJORAS PROPUESTAS AL ENSAYO EST	37
1.7.1	Limitaciones de la prueba EST.....	37
1.7.2	Mejoras propuestas para la prueba EST.....	38
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1	REACTIVOS Y DISOLUCIONES	47
3.1.1	Disoluciones de los compuestos modelo	47
3.1.2	Tampones	49
3.1.3	Reactivos y disoluciones utilizados en cultivos celulares	49

3.1.4	Reactivos y disoluciones empleados en los protocolos de biología molecular.....	51
3.2	EQUIPOS EMPLEADOS.....	53
3.2.1	Equipamiento general.....	53
3.2.2	Equipos para medida expresión génica.....	55
3.3	TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTO DE CULTIVO CELULAR.....	57
3.3.1	Líneas celulares utilizadas.....	57
3.3.2	Medios de cultivo celular.....	57
3.3.3	Tratamiento con gelatina del material utilizado para el cultivo celular.....	58
3.3.4	Tripsinización de células en cultivo adherente.....	58
3.3.5	Recuento de células viables.....	59
3.3.6	Descongelación de células.....	59
3.3.7	Congelación de células.....	60
3.3.8	Cultivo en monocapa para crecimiento y diferenciación celular.....	60
3.3.9	Exposición de los cultivos celulares a sustancias embriotóxicas modelo.....	61
3.3.10	Ensayos de citotoxicidad.....	61
3.4	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	63
3.4.1	Extracción de ARN total.....	63
3.4.2	Retrotranscripción de los ARN mensajeros.....	63
3.4.3	RT-PCR y electroforesis convencional.....	64
3.4.4	Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa de retrotranscripción (qRT-PCR).....	64
3.5	VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	68
3.5.1	Cálculos de funciones de discriminación en ensayos de embriotoxicidad.....	68
3.5.2	Análisis Estadístico.....	70
4	RESULTADOS.....	71
4.1	EFFECTO DE LOS COMPUESTOS EMBRIOTÓXICOS MODELO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS 3T3 Y D3 EN DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA CULTIVADAS EN MONOCAPA. 73	
4.1.1	Efecto de compuestos modelo embriotóxicos fuertes sobre la viabilidad de células D3 y 3T3	73
4.1.2	Efecto de compuestos modelo embriotóxicos débiles sobre la viabilidad de células D3 y 3T3	75
4.1.3	Efecto de compuestos modelo no embriotóxicos sobre la viabilidad de células D3 y 3T377	
4.2	EFFECTO DE COMPUESTOS MODELO SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR.....	79
4.2.1	Selección de genes biomarcadores.....	79
4.2.2	Efecto de compuestos embriotóxicos fuertes sobre la diferenciación de células D3.....	81
4.2.3	Efecto de compuestos embriotóxicos débiles sobre la diferenciación de células D3.....	84
4.2.4	Efecto de compuestos no embriotóxicos sobre la diferenciación de células D3.....	92
4.3	PREDICCIÓN DE POTENCIAL EMBRIOTÓXICO.....	95
4.3.1	Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de embriotóxicos fuertes.....	95
4.3.2	Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de embriotóxicos débiles.....	97
4.3.3	Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de no embriotóxicos.....	99

4.4	PREDICCIÓN GLOBAL DE LOS GENES BIOMARCADORES	101
5	DISCUSIÓN	103
5.1	EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	105
5.1.1	Efecto de compuestos embriotóxicos modelo sobre la expresión de genes marcadores de endodermo	105
5.1.2	Efecto sobre la expresión de genes marcadores de mesodermo.....	106
5.1.3	Efecto sobre la expresión de genes marcadores de ectodermo.....	108
5.1.4	Efecto sobre la expresión de genes marcadores de procesos básicos para la supervivencia celular.....	109
5.2	MEJORAS IMPLEMENTADAS EN ESTE TRABAJO EN EL METODO EST.....	113
5.3	TRANSCRIPTÓMICA PARA LA DETECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE COMPUESTOS EMBRIOTOXICOS.....	114
5.4	OTROS INTENTOS DE MEJORA DEL EST PROPUESTOS POR OTROS AUTORES ...	115
5.5	ANÁLISIS DEL DESEMPEÑO DE LOS CAMBIOS PROPUESTOS EN RELACIÓN CON EL EST CLÁSICO Y OTRAS MEJORAS PROPUESTAS	119
6	CONCLUSIONES.....	121
7	BIBLIOGRAFÍA	125





1 INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE TOXICIDAD A LA REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO Y NECESIDAD DE MÉTODOS DE ENSAYO DE BASE MECANICISTA

El objetivo del presente trabajo se relaciona con la implementación de indicadores moleculares tempranos de embriotoxicidad que logren mejorar las prestaciones de los ensayos *in vitro* ya existentes para detectar este peligro. El interés en dichos indicadores moleculares se debe a que permiten una aproximación mecanicista y celular a cada una de las etapas del desarrollo, lo que contribuye a dar consistencia y base científica a las predicciones de dichos ensayos *in vitro*.

Reproducción y desarrollo

La reproducción y el desarrollo abarcan procesos fisiológicos encadenados que van desde la producción de los gametos, la fertilización, la implantación, la organogénesis, el desarrollo fetal, el desarrollo postnatal y la maduración sexual.

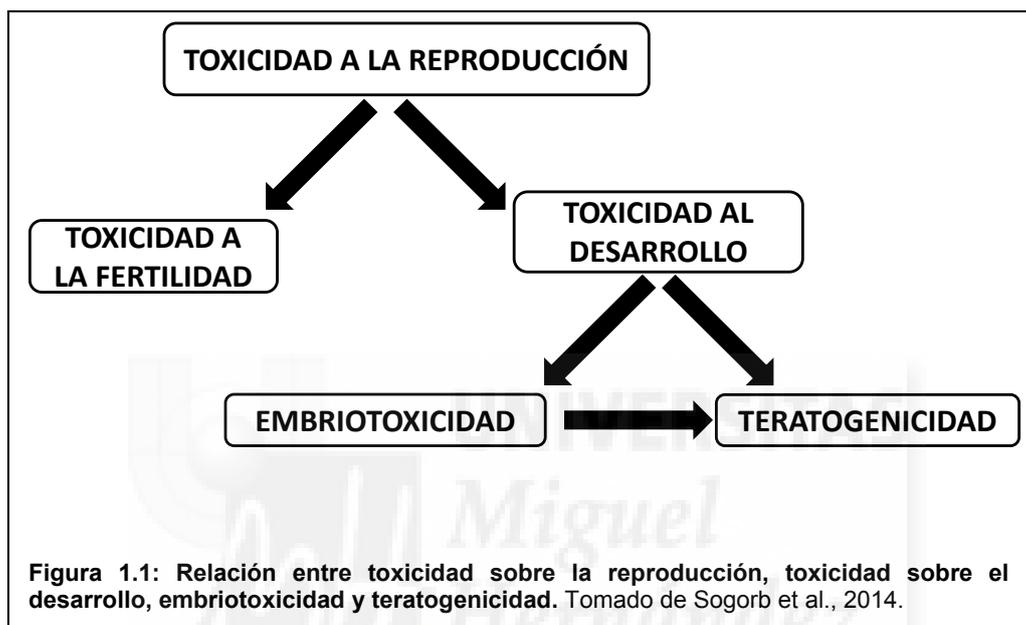
Los términos **embriogénesis** y **organogénesis** hacen referencia al proceso que se inicia tras la fertilización de los gametos para dar lugar al embrión. En las primeras fases de desarrollo de los seres vivos pluricelulares y en los animales vertebrados la embriogénesis se divide en cuatro fases secuenciales: segmentación, gastrulación, neurulación y organogénesis. Esta última comprende el conjunto de cambios que permiten que las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) se transformen en los diferentes órganos que conforman un organismo por diferenciación y maduración de los diversos tejidos.

Toxicidad a la reproducción

La toxicología a la reproducción contempla el efecto adverso de una sustancia sobre la fertilidad de los padres y sobre el desarrollo de la descendencia, es decir, hace referencia a los efectos de los diversos agentes químicos sobre todos los aspectos y etapas del ciclo reproductivo, incluyendo la inducción de infertilidad, las perturbaciones en el desarrollo de embriones y en la pre-implantación y la inducción de efectos embriotóxicos o teratogénicos en la descendencia, como el retraso del crecimiento, las malformaciones y la muerte fetal (Spielmann, 2005; Krtolica et al., 2009; Hofer et al., 2004; Sogorb et al., 2014).

Los trastornos tóxicos de la **fertilidad**, incluyen efectos causados por sustancias o preparados que pueden alterar el comportamiento sexual bien disminuyendo la libido, bien dañando la espermatogénesis, la ovogénesis o la actividad hormonal o bien alterando el ciclo menstrual, el proceso de fertilización y el desarrollo del huevo fecundado hasta la fase de implantación.

La toxicología al **desarrollo** hace referencia a los efectos adversos de los compuestos químicos sobre el organismo en desarrollo e incluye efectos embriotóxicos y fetotóxicos, como disminución del peso corporal, retraso del crecimiento y del desarrollo, lesiones en los órganos, muerte, aborto, anomalías congénitas, defectos estructurales, trastornos en la lactancia y problemas del desarrollo físico o mental; es decir los efectos adversos van desde el momento de la concepción hasta el momento de la maduración sexual, y por lo tanto la toxicología del desarrollo puede ser considerada como parte de la toxicología a la reproducción. La Figura 1.1 esquematiza las relaciones entre los diferentes tipos de toxicidad encuadrados dentro de la toxicidad a la reproducción.



El término **embriotoxicidad** hace referencia a la capacidad de una sustancia para producir efectos tóxicos en la progenie durante el primer período del embarazo; es decir, en el desarrollo embrionario temprano (Rohwedel et al., 2001), desde la concepción a la etapa fetal. Estos efectos pueden incluir malformaciones, alteraciones del crecimiento, disfunciones y muerte prenatal, por lo que está incluida dentro de la toxicología al desarrollo, y también en la toxicología a la reproducción (Figura 1.1). La teratogenicidad se refiere a las malformaciones estructurales o defectos en los hijos después del periodo de la embriogénesis, es decir alteraciones causadas por compuestos químicos detectadas en el feto en formación y se considera como un efecto de la toxicología al desarrollo (Figura 1.1).

Los ensayos de embriotoxicidad

Hasta la fecha sólo tres métodos *in vitro* han sido validados para la detección de compuestos embriotóxicos. Estos métodos son:

- el método de las micromasas (MM),
- el test de células madre embrionarias (EST) y;
- el método de los embriones enteros en cultivo (WEC).

No obstante, otros ensayos como el que se realiza con embriones de rana *Xenopus* (FETAX) y especialmente con embriones de pez cebra también han demostrado su validez para la detección de compuestos embriotóxicos y teratogénicos.



1.2 ENSAYOS *IN VIVO* DE TOXICIDAD A LA REPRODUCCIÓN Y TERATOGENICIDAD

1.2.1 Guías y regulaciones para ensayos de toxicidad

La correcta y apropiada caracterización de la toxicidad de productos químicos implica la necesidad de disponer de métodos de ensayo fiables para evaluar su capacidad de producir efectos adversos en los organismos vivos. Por ello, es necesario el desarrollo de métodos reconocidos internacionalmente para ser empleados por los gobiernos, la industria y los laboratorios independientes para evaluar la seguridad de los productos químicos (Estevan et al., 2011a; Estevan et al., 2017).

Durante varias décadas los ensayos *in vivo* se han desarrollado y perfeccionado con el objetivo de detectar y caracterizar sus propiedades tóxicas inherentes y sus correspondientes relaciones dosis-respuesta. Las pruebas se han ido estandarizado a nivel internacional e incluyendo dentro de las guías del programa de la OECD (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico) para el ensayo de propiedades toxicológicas de sustancias químicas¹. Aunque la aceptación es solo para los países miembros de la OECD, los resultados obtenidos en ensayos de toxicidad realizados siguiendo estas guías son aceptados por los reguladores de todo el mundo.

En la Unión Europea (UE) se han adoptado oficialmente los métodos de ensayo descritos en el Reglamento CE 440/2008 por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) no 1907/2006 para la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos. Los métodos de ensayo descritos en dicho Reglamento CE 440/2008 son equivalentes a las correspondientes guías OECD, si bien la lista de los ensayos contemplados por la OECD es algo más extensa que la de los contemplados por la UE.

Los reglamentos establecidos en todos los países desarrollados exigen estudios *in vivo* sobre la toxicidad a la reproducción y al desarrollo (Hofer et al., 2004). Así pues, cabe concluir que tanto la OECD como la UE poseen guías adoptadas y estandarizadas para los ensayos *in vivo* de toxicidad a la reproducción y al desarrollo necesarias para cumplir con la legislación para la autorización del uso de sustancias químicas que vayan a estar en contacto con el ser humano. Estevan y colaboradores (2011a; 2017) realizaron una revisión de estos métodos de ensayo cuyas principales características se describen brevemente a continuación y se resumen en la Tabla 1.1.

¹ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Disponible en: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>

1.2.2 Los ensayos en las guías de la OECD y en la UE (Reglamento CE 440/2008)

Ensayo de toxicidad al desarrollo prenatal (Guía OECD 414 equivalente al protocolo B.31 de la UE) (OECD 2001a)

La prueba analiza el período de la organogénesis (desde el día 5 al 15 en ratas y desde el día 6 a 18 en conejos). Así pues, determina los efectos adversos de las sustancias químicas desde la pre-implantación hasta el día antes de la cesárea (Estevan et al., 2011a; Estevan et al., 2017). Desde el 2001 se recomienda un mínimo de 20 animales por dosis frente a los 12 usados anteriormente. La sustancia de ensayo debe administrarse todos los días desde la implantación hasta el día antes de la cesárea programada. Se debe utilizar por lo menos tres niveles de dosis y un control no expuesto (OECD, 2001a; Jiménez et al., 2010).

Ensayo de toxicidad a la reproducción a 1 generación (Guía OECD 415 equivalente al protocolo B.34 de la UE) (OECD 1983)

Este ensayo está diseñado para proporcionar información general con respecto a los efectos de la sustancia de ensayo en el macho y el rendimiento reproductivo en la hembra. El estudio también proporciona información sobre los efectos del desarrollo, como la morbilidad neonatal, mortalidad, comportamiento y teratogénesis. Se registran cambios de comportamiento como signos de dificultad o prolongación del parto y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad.

Ensayo de toxicidad a la reproducción a 2 generaciones (Guía OECD 416 equivalente al protocolo B.35 de la UE) (OECD 2001b)

Es el ensayo de reproducción más completo en mamíferos entre todos los protocolos de la OECD y UE. Supone un estudio profundo de crecimiento, desarrollo y función sexual en la generación F1, con monitorización de los efectos sobre la F2. El estudio de reproducción en dos generaciones proporciona información sobre los efectos de la exposición repetida a una sustancia durante todas las fases del ciclo reproductivo, proporcionando también información sobre los parámetros reproductivos y en el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las crías.

Ensayo de cribado de toxicidad a la reproducción y al desarrollo (Guía OECD 421) (OECD 2016a)

La prueba se utiliza como parte de un conjunto de pruebas de detección iniciales para los productos químicos existentes en las que se dispone de poca o ninguna información toxicológica. Esta prueba no proporciona información completa sobre todos los aspectos de la reproducción y el desarrollo. Se realiza el sacrificio de las crías a los 4 días de edad, lo que restringe los indicadores estudiados en los hijos (crecimiento y desarrollo) y limita la investigación de la conducta materna (duración de la gestación, habilidad de la lactancia). La duración del estudio es de aproximadamente 54 días (al

menos 14 días de pre-apareamiento, 14 días de apareamiento, 22 días de gestación y 4 días de lactancia).

Ensayo combinado de cribado de toxicidad repetida y de toxicidad a la reproducción y al desarrollo (Guía OECD 422) (OECD 2016b)

Incluye posibles indicadores opcionales, como niveles hormonales, cuerpo lúteo, etc., aprovechando mejor los animales del ensayo por dosis repetidas. Esta prueba no proporciona información completa en todos los aspectos de la reproducción y el desarrollo, solo ofrece opciones muy limitadas de detección de anomalías después del parto debido a la exposición prenatal. La duración de la prueba es de aproximadamente 54 días.

Ensayo de neurotoxicidad en el desarrollo (Guía OECD 426) (OECD 2007)

Corresponde al estudio sobre la toxicidad al neurodesarrollo y diseñado para proporcionar datos de caracterización de los posibles efectos funcionales y morfológicos en el desarrollo del sistema nervioso que puedan surgir durante la exposición de la sustancia de ensayo en el útero y durante la vida temprana. Las observaciones clínicas incluyen cambios en la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, tamaño de la pupila, respiración anómala y/o respiración por la boca), coordinación, la postura, convulsiones, temblores, comportamiento extraño (morder, la automutilación, marcha hacia atrás).

Ensayo de toxicidad al desarrollo a 1 generación extendida (Guía OECD 443) (OECD 2012)

El objetivo principal de la evaluación de la toxicidad a la reproducción a una generación extendida es el de evaluar las etapas específicas que no están cubiertas por otros tipos de estudios de toxicidad y los efectos que pueden ocurrir como resultado de la exposición a productos químicos en periodos pre- y post-natal. Los datos derivados de estas pruebas deberán permitir la determinación del nivel del efecto adverso no observado (NOAEL), el nivel más bajo con efecto adverso observado (LOAEL) y/o dosis de referencia para los diferentes criterios de valoración. Este protocolo alarga el tiempo de los neonatos (F2) hasta la edad adulta, mientras que el ensayo a 1 generación termina con su nacimiento. Se incrementa el número de parámetros que se evalúan, especialmente los parámetros hormonales y evaluación de los órganos de reproducción de la generación F2, de forma que esta evaluación permite suprimir la reproducción de la segunda generación F2 para obtener la Fb como se hace en el ensayo de dos generaciones.

Tabla 1.1 Protocolos de ensayo a la reproducción in vivo OECD. Descripción de los parámetros a evaluar, dosis, especie, etc. (Tomado de Estevan et al. 2011a y Estevan et al., 2017).

PROTOCOLO	ESPECIE / NUMERO Y SEXO	PARÁMETROS A EVALUAR	VÍA ADMINISTRACIÓN DOSIS
OECD 414	Rata	Camadas con implantes	ORAL
B.31	Conejo	Camadas con fetos vivos	3 concentraciones y un control no expuesto
Estudio de toxicidad prenatal al desarrollo	"Especies con metabolismo del compuesto similar a los humanos" 20 Hembras por dosis Requeridos 150 animales	Efectos letales, teratogénicos, otro tipo en el embrión o feto Mortalidad materna Alteraciones en tejidos blandos y óseos	
OECD 415	Rata	Fertilidad	ORAL
B.34	Ratón	Estudio de una generación examina: útero, ovarios, cuello uterino, vagina, testículos, vesículas seminales, próstata y glándula pituitaria. En descendencia evalúa: número y sexo de las crías Necropsia	3 concentraciones y un control no expuesto (ambos sexos durante el periodo del apareamiento)
Estudio de toxicidad a la reproducción de 1 generación	(Edad comprendida entre 10 y 12 semanas) 20 Hembras y machos por dosis		Hembras se administra durante la gestación y el periodo de la lactancia Los machos (F ₀) se dosifican hasta alcanzar un ciclo de la espermatogénesis
OECD 416	Rata	F ₁ : Evalúa el crecimiento, desarrollo y sistema reproductivo	ORAL
B.35	20 ratas preñadas por dosis	F ₂ : Evalúa el crecimiento y desarrollo	3 concentraciones y un control no expuesto
Estudio de toxicidad a la reproducción de 2 generaciones	Requeridos 3200 animales	Estudia los efectos en los sistemas reproductivos masculinos y femeninos	Machos: espermatogénesis (al menos durante 1 ciclo completo). Hembras: varios ciclos estrogénicos.
OECD 421	Rata	Estudio de alteraciones anatomopatológicas en órganos sexuales de los padres, lo que se podría ampliar a los hijos	ORAL
Test de escrutinio de toxicidad a la reproducción y al desarrollo	8 Hembras gestantes por dosis Requeridos 560 animales	Hembras: Estudio de órganos del sistema reproductivo, infertilidad, conteo cuerpos lúteos, implantaciones Machos: Evaluación de testículos, detección de efectos sobre la fertilidad masculina y la espermatogénesis Número de crías nacidos vivos, con anomalías, tamaño de la camada	3 concentraciones y un control no expuesto Machos: Dosis como mínimo 4 semanas: 2 antes del apareamiento, durante y, 2 después (machos de 28 días) Hembras: Dosis durante todo el estudio: 2 semanas antes, durante la concepción, embarazo y 3 días después del parto
OECD 422	Rata	Evalúa: fertilidad, función gonadal, gestación, desarrollo del embrión, parto, crecimiento, actividad sensorial, exámenes hematológicos y de bioquímica, número de nacidos vivos (tamaño de la camada) y pérdida después de la implantación, número de crías con anomalías macroscópicas visibles	ORAL
Test combinado de escrutinio de toxicidad repetida y de toxicidad a la reproducción y al desarrollo	8 Hembras gestantes		3 concentraciones y un control no expuesto 54 días aproximadamente. Período de dosificación más largo que en un ensayo convencional: 28 días de dosis repetidas.
OECD 426	Rata	Anormalidades neurológicas importantes o en el comportamiento; la valoración del desarrollo físico, ontogenia del reflejo, actividad motora, funciones motora y sensorial, aprendizaje y memoria; y la evaluación neuropatológica durante el desarrollo postnatal y la madurez.	ORAL
Test de toxicidad al neurodesarrollo	20 por dosis.	Se evalúa el peso corporal, peso del cerebro, neuropatología, madurez sexual	3 concentraciones y un control no expuesto La sustancia se administra en: gestación y lactancia Dosis hembras: Desde la implantación (día 6 de gestación) hasta después del parto y lactancia
OECD 443	Rata	Evalúa reproducción y desarrollo (incluida la generación F ₂)	ORAL
Ensayo de toxicidad a la reproducción de 1 generación extendida	Machos y hembras sexualmente maduros 20 hembras preñadas por grupo de dosis	Evalúa exposición a los productos químicos en los sistemas nervioso e inmune en el desarrollo. Evalúa las hembras con crías y la generación F ₁ hasta después de la madurez sexual	3 concentraciones y un control no expuesto Dosis: generación parental (P) período de apareamiento (mínimo de 2 semanas) y acoplamiento de 2 semanas. Los machos (P) son tratados hasta el destete de la F ₁ (10 semanas) Las hembras (P) son tratadas en el embarazo, lactancia y después del destete de sus crías (8-10 semanas de tratamiento)

En conclusión, la OECD cuenta con una serie de guías para la evaluación *in vivo* de toxicología reproductiva (que cubre en el mismo ensayo la fertilidad y el desarrollo) y de estudios *in vivo* de toxicología al desarrollo (que abarca teratogenicidad, puesto que la exposición se inicia después de la embriogénesis). Sin embargo, es importante mencionar que no existen guías OECD para el análisis *in vivo* de embriotoxicidad, y que una directriz para este propósito permitiría la detección de toxicidad sobre las primeras etapas de desarrollo sin esperar a que ocurra teratogenicidad, así que éstas tienen que ser analizadas por la directriz de la OECD 416.

1.2.3 Ventajas e inconvenientes de los ensayos *in vivo* de toxicidad al desarrollo

Las ventajas que presentan los ensayos *in vivo* de toxicidad al desarrollo es que permiten definir el tipo de efecto (embriotóxico, teratogénico, fertilidad, etc.) y permiten establecer dosis sin efecto (NOAEL) así como las correspondientes dosis respuesta. En el caso particular de las guías de la OECD, algunas de las pruebas más importantes son los estudios de reproducción / desarrollo, los NOAEL, se suelen tener en cuenta no sólo para las pruebas de toxicidad para la reproducción, sino también para la evaluación del riesgo de interés general en efectos sistémicos. Por ejemplo, los NOAEL de toxicidad sistémica materna en el estudio de la teratogenicidad son frecuentemente considerados para la caracterización del riesgo en escenarios de exposición a corto-medio plazo (Estevan et al., 2011a; Estevan et al., 2017). Sin embargo, los inconvenientes observados en este tipo de ensayos son el sufrimiento animal, el costo elevado, los largos periodos de tiempo necesarios y que se requiere personal especializado en manejo de animales y estudio de sus patologías. No obstante, los ensayos *in vivo* todavía son muy relevantes para la evaluación del riesgo de los productos químicos y para su posterior clasificación y etiquetado.

1.3 CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS COMO MODELO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

1.3.1 Las células madre

Las células madre son un tipo particular de células presentes en los organismos vivos. En los vertebrados las células madre se han dividido en tres subgrupos: las células madre embrionarias (ESC), las células madre adultas y las células madre germinales (Anderson et al., 2001; Sell, 2004) (Tabla 1.2). Todas estas células presentan características comunes como es su capacidad de dividirse indefinidamente dando lugar a células idénticas entre si y de diferenciarse, es decir de dar lugar a células especializadas con una función determinada a partir de células indiferenciadas. Todo ello permite la manipulación de células madre *in vitro* para llegar a células con un cierto nivel final de especialización. Sin embargo, ahora se debaten algunas posibles diferencias entre las ESC y las células madre adultas debido a que estas últimas tienen cierta capacidad de diferenciación pero no pueden dar lugar a todos los tipos celulares, mientras que por el contrario las ESC tienen la propiedad de dar lugar a células derivadas de los tres linajes embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo) además de la línea germinal (Hamazaki et al., 2001; Ying et al., 2003). En la Tabla 1.2 se presenta la clasificación de las células madre según su papel en el desarrollo.

Tabla 1.2 Clasificación de células madre según su papel en el desarrollo. Adaptado de Pamies (2012)

Células Somáticas	Células Germinales	Células Madre Troncales
Se encuentran diferenciadas en el organismo formando tejidos concretos.	Se encuentran ubicadas en las gónadas sexuales.	Tienen la capacidad de dividirse indefinidamente.
Tienen capacidad de división pero corta vida (Hayflick., 2003).	Su función es transferir descendencia de material genético de los progenitores.	En vertebrados se dividen en dos subgrupos: <ul style="list-style-type: none"> • Células madre embrionarias • Células madre somáticas

1.3.2 Células madre embrionarias

En 1954, estudiando los teratocarcinomas observados en las células germinales de ratones se encontraron varios tejidos adultos como tejido nervioso, epitelios de varios tipos, cartílago, hueso con médula bien diferenciados, músculos y tejido glandular, entre otros. De igual manera, se identificaron tejidos embrionarios procedentes de las tres líneas germinales además de tejidos indiferenciados. Aunque fueron descritas en su momento no fue sino hasta años posteriores que se habló de células madre embrionarias y se aplicó la abreviatura de ESC de su expresión en inglés (*Embryonic Stem Cells*) y del concepto de pluripotencialidad (Stevens and Little., 1954; Tani et al., 1997).

Luego de algunos años se demostró que una sola célula de carcinoma era apta para auto renovarse así como para dar origen a diferentes linajes, constituyendo y afianzando así la existencia de las células madre pluripotentes y abriendo un amplio espacio para la investigación en células madre de ratón y humanas (Kleinsmith and Pierce., 1964).

Iniciando los años 70 se logró por parte de algunos investigadores el establecimiento de líneas de células madre carcinogénicas reproducidas *in vitro*. Así fue posible cultivar células madre de manera indefinida y en cantidades suficientes como para realizar estudios de experimentación sin tener que utilizar embriones de mamíferos. En 1981 se logró establecer la primera línea de ESC de ratón a partir de células aisladas de la masa celular interna de blastocitos, así pues, desde los estudios iniciales con teratocarcinomas hasta los estudios actuales con ESC de ratón o incluso humanas se lleva ya más de 40 años tratando de dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la pluripotencialidad, si bien aún queda mucho por esclarecer (Yu and Thomson., 2008).

Los avances en la investigación de procesos como la diferenciación y la pluripotencialidad en las ESC permiten ampliar las posibilidades de aplicación éstas en diversas áreas. Actualmente estas líneas celulares se utilizan para estudios en medicina regenerativa, así como para la evaluación de embriotoxicidad de productos químicos, medicamentos y sustancias nuevas que salen al mercado, reconociendo de esta manera compuestos potencialmente teratogénicos y embriotóxicos, ya que la exposición de ESC a éstos puede interferir en procesos de los proliferación y diferenciación (Ahuja et al., 2007) ocasionando la embriogénesis anormal en las primeras etapas de desarrollo y causando posteriores malformaciones (Rohwedel et al., 2001).

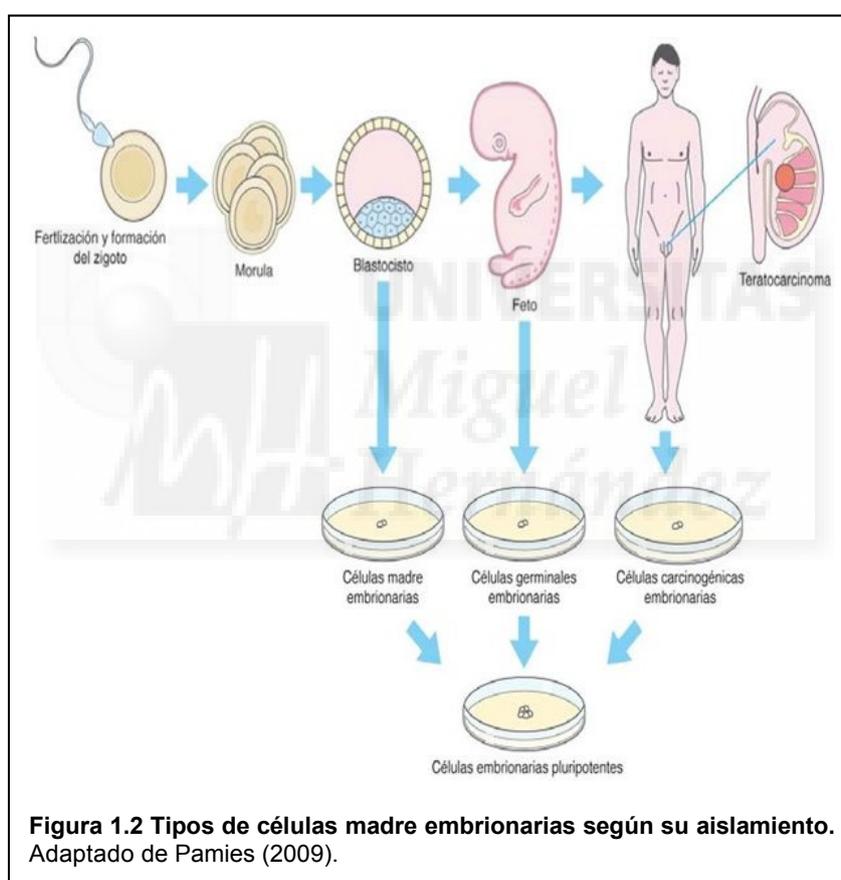
1.3.3 Clasificación de las células embrionarias

Las células embrionarias se clasifican según las características específicas que presentan unas con respecto a otras, por lo tanto, encontramos tres clases: las células embrionarias carcinogénicas, las células germinales embrionarias y las ESC (Figura 1.2) (Ahuja et al., 2007).

Estas tres clases de células embrionarias son líneas permanentes de células pluripotenciales de origen embrionario (Rohwedel et al., 2001). Las células embrionarias carcinogénicas, por su condición de pluripotencialidad, pueden ser inducidas a diferenciarse en cultivo para formar una variedad de tipos celulares (Jiang et al. 2002; Wiese et al. 2006). Estas células fueron obtenidas a partir de teratocarcinomas de ratón y dado que estas células pueden crecer y diferenciarse en cultivo han sido empleadas como sistema modelo para investigar algunos procesos de desarrollo temprano en mamíferos (Rudnicki et al., 1989). Por otro lado, las células germinales embrionarias se han implementado mediante la reprogramación de células germinales primordiales, esto se logra mediante medios de cultivo que contienen LIF, bFGF y Factor 2 de crecimiento de fibroblasto, dando como resultado la desdiferenciación de células germinales embrionarias generándose células con características similares a las ESC (O'shea., 1999) (Figura 1.2).

Finalmente, la tercera clase de líneas de células embrionarias son las llamadas ESC. Su aislamiento fue posible en el año 1981 a partir de células de la masa celular interna del blastocisto de ratón (O'Shea., 1999; Evans y Kaufman., 1981); este a su vez procede de una estructura de estadio temprano del desarrollo embrionario formada alrededor de 3 o 4 días después

de la fecundación y previo a la implantación en el endometrio. La manipulación *in vitro* de las células aisladas de la masa celular interna de carácter pluripotente ha permitido su mantenimiento en cultivo de manera indefinida y al tener una cierta similitud con el desarrollo embrionario *in vivo*, se usan como modelo para estudiar el desarrollo embrionario en el laboratorio. A parte del aislamiento de las ESC en especies como el ratón (modelo más estudiado) o la humana en el año de 1998 (Thomson et al., 1998) ha sido posible en la actualidad obtener ESC de otras especies como ratas, pollos, primates, entre otras. Las condiciones que permitieron inhibir la diferenciación celular y mantener el estado de pluripotencialidad son el cultivo sobre fibroblastos y/o en presencia de medios suplementados con LIF. Posteriormente, se observó que las ESC presentan expresión de genes marcadores de pluripotencialidad como *Oct4* y *Nanog* (Henderson et al., 2002), así como un gran potencial de diferenciación hacia células derivadas de los tres linajes embrionarios y de la línea germinal.



Aunque las dos clases de células embrionarias anteriormente mencionadas (carcinogénicas y germinales) comparten con las ESC la mayoría de sus características difieren en algunos otros aspectos. Las carcinogénicas se dividen indefinidamente y pueden diferenciarse hacia todos los tipos de células de las tres capas embrionarias, pero no pueden generar células germinales, además su diferenciación parece estar inhibida y necesita ser inducida por la acción de factores específicos (Ahuja et al., 2007). Mientras que las células embrionarias germinales aunque presentan capacidad de proliferación y de diferenciación al igual que las ESC, tienen ciertas restricciones en su capacidad de crecimiento *in vitro* y su diferenciación.

1.3.4 Algunos de los factores que conllevan a la diferenciación celular

En la diferenciación las células indiferenciadas o precursoras pasan a ser células especializadas, produciéndose una compleja cascada de activación y represión de genes y señales. Aún no se conocen muy bien los mecanismos de los factores que controlan y regulan la diferenciación celular, sin embargo, probablemente la regulación de esta diferenciación consiste en múltiples señales positivas y negativas recibidas a través de citoquinas u otros receptores en momentos determinados del desarrollo (Cross y Enver., 1997). Otros estudios revelan que la diferenciación está regulada por factores presentes en el entorno celular en el que se encuentran, lo que sugiere que el “nicho” juega un papel importante en el comportamiento de las células madre, regulando aspectos como la división, auto renovación, diferenciación, entre otros (Ahuja et al., 2007). Podemos clasificar los mecanismos de diferenciación en los siguientes 4 grupos:

Expresión génica

La regulación de la expresión génica en los estadios del desarrollo es de vital importancia para dirigir la diferenciación y formar las diferentes entidades celulares. Es primordial para la diferenciación celular, el balance entre estabilidad y plasticidad. La regulación adquiere una gran complejidad en las células embrionarias debido a que son células con mayor plasticidad. Por lo tanto, ciertos genes son expresados mientras que otros son reprimidos y la diferenciación se controla a través de la regulación de la expresión génica de las células. La forma de regulación de la diferenciación consiste en la co-expresión de genes que diferencian a los distintos linajes. Se ha demostrado la co-expresión de un número de factores supresores de genes diferenciadores (SGL, GATA2, Pu1, CD34+, CD38-), lo cual indica que tanto la activación de algunos genes como la activación de genes supresores conjuntamente darán paso a la diferenciación celular (Enver et al., 1998; Cross y Enver., 1997).

Regulación enzimática y hormonal

El término hormona hace referencia a sustancias que se introducen en el sistema circulatorio por glándulas de secreción interna alterando las funciones de las células (Hodgson et al., 2000). Además de su función endocrina (relacionada con órganos) también presentan una función paracrina relacionada con la señal de diferentes rutas (Evans, 2007). En los vertebrados hay una gran cantidad de hormonas implicadas en el desarrollo embrionario y están agrupadas según su estructura molecular (amino ácidos, péptido, proteínas, glicoproteínas, esteroides e icosanoides). Las hormonas se unen a receptores que normalmente producen la activación o inhibición de rutas de transducción o para producir mediante hormoinducción alteraciones de la expresión génica.

Factores solubles

El estado de diferenciación de las células madre, ya sean tumorales o embrionarias, depende también de la presencia o concentración de factores de crecimiento y diferenciación que causan la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células. Se ha identificado, los factores que regulan la proliferación de células madre y/o su diferenciación. Por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y varios miembros de los factores de crecimiento transformantes beta (TGF β), una superfamilia de ligandos vitales para la auto-renovación de ESCs (Azarin y Palecek, 2010). Otros factores como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) se han utilizado para dirigir la diferenciación de células madre en distintos tipos celulares (Ulloa-Montoya y col. 2005)

Epigenética. Modulación de la cromatina.

El término epigenética hace referencia a aquellos procesos implicados en la regulación heredable de la expresión genética pero sin cambios en la secuencia de ADN. Sin embargo en términos de desarrollo embrionario y diferenciación celular, este término se utiliza para definir aquellos procesos de regulación genética relacionados con el estado de la cromatina (Bernstein et al., 2007). En los últimos años se ha encontrado un gran número de evidencias que señalan a los mecanismos de regulación cromatina como un importante factor regulador de la diferenciación celular (Mohn y Schübeler, 2009). Básicamente este proceso comprendería las modificaciones post-traduccionales de las histonas del ADN, la metilación del ADN y la remodelación de la cromatina (Bernstein et al., 2007; Cairns et al., 2005). El empaquetamiento de ADN en nucleosomas produce una clara barrera de represión de la transcripción genética por la dificultad de acceso al ADN (Struhl 1999). Un pequeño cambio en la configuración de la cromatina puede hacer que una o varias partes de un gen inaccesibles y por tanto la accesibilidad puede influir en los diferentes factores de transcripción (Mohn y Schübeler., 2009). Se ha observado un bajo nivel de metilación en células embrionarias y en estados tempranos del desarrollo embrionario (Haines et al., 2001).

1.3.5 Diferenciación *in vitro*

La diferenciación *in vitro* de ESC se puede realizar mediante dos técnicas de diferenciación hasta ahora descritas, la primera consiste en la formación de agregados denominados cuerpos embrionarios (EBs), los cuales se forman en cultivo en suspensión y en ausencia de LIF. En los EBs, luego de un periodo de tiempo en cultivo aparecen derivados celulares de las tres capas embrionarias, que por ultimo generan tipos celulares diferenciados de varios linajes. La segunda técnica de diferenciación *in vitro* se basa en el cultivo de las ESC en monocapa, modalidad que fue utilizada en este estudio, en el cual las células proliferan y se diferencian (cuando son cultivadas en ausencia de LIF) en una sola capa, es decir ninguna célula crece sobre la superficie de la otra, por el contrario, crecen una al lado de la otra hasta llegar a cubrir la superficie de cultivo. La monocapa es

un modelo de trabajo de ESC útil a pesar de no ser un cultivo en 3 dimensiones como es el caso de los EBs. La utilidad de este sistema hace necesaria la implementación de protocolos de diferenciación dirigida en cultivos de monocapa, ya que estos estudios podrían complementar los resultados basados en la diferenciación en las estructuras de EBs (Pamies et al., 2010a).

1.3.6 Aplicaciones de las células madre en Toxicología

Históricamente se ha recorrido mucho camino en lo referente a la evaluación en sistemas biológicos *in vitro* de sustancias peligrosas, medicamentos y productos químicos. La caracterización de compuestos químicos implica la necesidad de tener disponibles métodos fiables para evaluar los efectos adversos sobre los organismos vivos. De esta manera, es necesario desarrollar una serie de métodos de relevancia internacional que puedan ser empleados por entidades gubernamentales y laboratorios independientes para evaluar la seguridad de sustancias químicas (Estevan et al., 2011a; Estevan et al., 2017). En los últimos años, se han desarrollado métodos que han sido validados y que están siendo usados para analizar la toxicidad de sustancias químicas y drogas farmacéuticas que garantizan la seguridad (Stummann et al., 2009).

La tecnología procedente de la aplicación de células madre es una herramienta que nos permitirá un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados que provocan efectos adversos por sustancias químicas en el desarrollo embrionario. Además, también permitirá reducir y evitar el uso de animales de experimentación en ensayos toxicológicos. Se han propuesto en los últimos años un gran número de ensayos que podrían mejorar la eficiencia y reducir los animales de experimentación sustituyendo estos clásicos modelos *in vivo* por modelos *in vitro*.

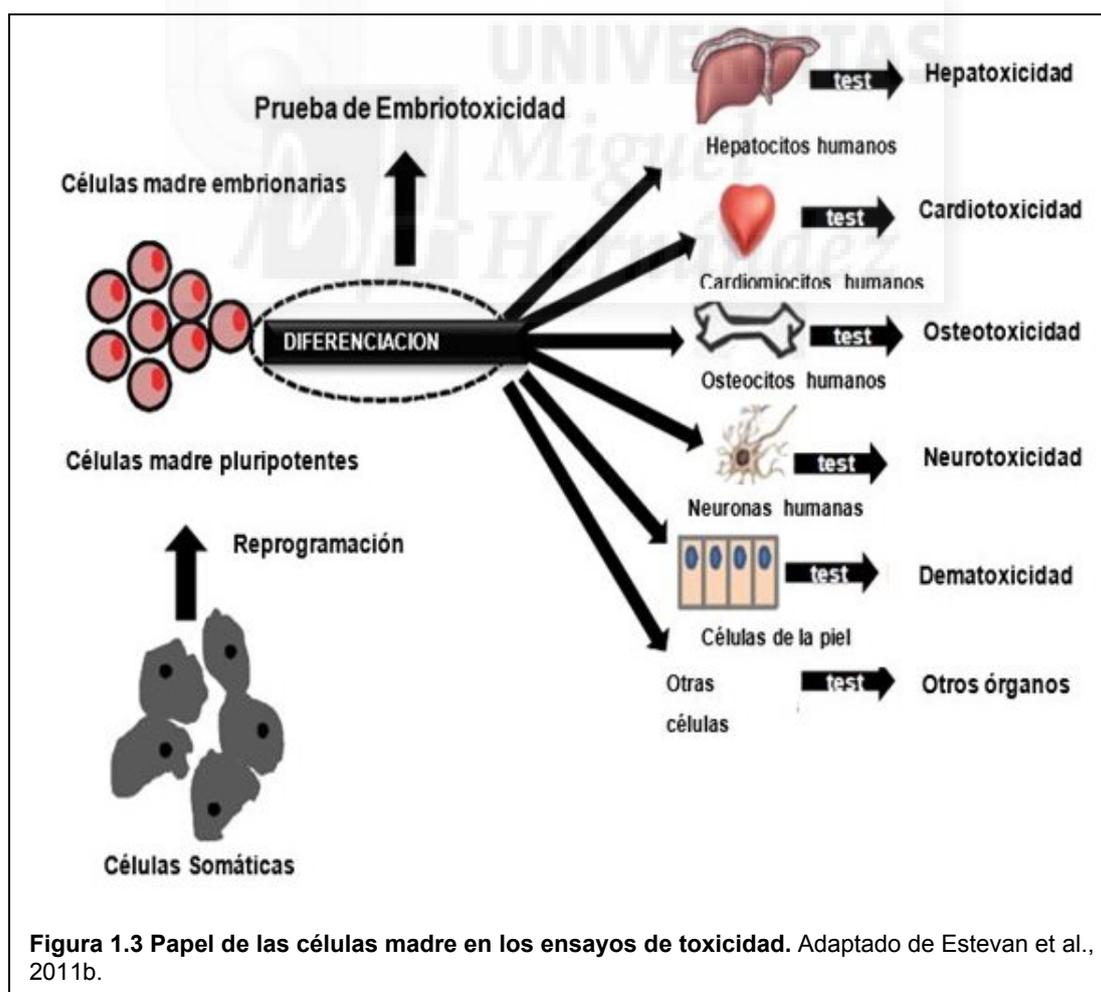
Características de las células madre aptas para estudios en Toxicología

Las posibilidades de la aplicación de las células madre en Toxicología proviene de sus características únicas en comparación con las células primarias de cualquier organismo modelo. Su gran plasticidad a la hora de generar diferentes tipos celulares y su capacidad de regenerarse ofrecen un sistema innovador y muy prometedor, ya que permite la obtención de un gran número de células de carácter pluripotente, multipotente o unipotente para ensayos *in vitro*. Esto permite a los científicos mejorar la evaluación de los efectos adversos de sustancias químicas antes de su aparición en el mercado (Dávila et al., 2004), con ensayos para el escrutinio toxicológico de alta eficacia y aplicación masiva a un alto número de sustancias. Así, las ESC pueden ayudar a la identificación de sustancias embriotóxicas en los procesos de desarrollo de nuevas sustancias químicas (Rohwedel et al., 2001). Por otro lado, las líneas celulares derivadas de estas células pluripotenciales pueden ser utilizadas como tejidos *in vitro* para ensayar medicamentos y nuevas sustancias que serán incorporadas al mercado (Ebert y Svendsen, 2010). Un ejemplo son las ESC de ratón, que son utilizadas para ensayar efectos teratogénos de productos químicos (Rohwedel et al., 2001) en un ensayo que ha sido

aprobado y validado por el EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) (Genschow et al., 2002; Seiler et al., 2002).

Las células madre podrían jugar un papel importante para evaluar la embriotoxicidad o en la generación celular de tejidos adultos para estudiar toxicidad en ella. En la actualidad ya se han usado las células madre en numerosas aplicaciones en el área de la Toxicología; por ejemplo, en el uso de ESC para la obtención de cardiomiocitos (Lavon y Benvenisty, 2003), y en la obtención de hepatocitos que son de interés en el estudio de la hepatotoxicidad (Ek et al., 2007; Ruch y Trosko, 1999), entre otras (Figura 1.3). Y por último en el uso de células madre adultas para el escrutinio genotóxico/epigenético de sustancias y toxicología reproductiva (Trosko et al., 2000), etc.

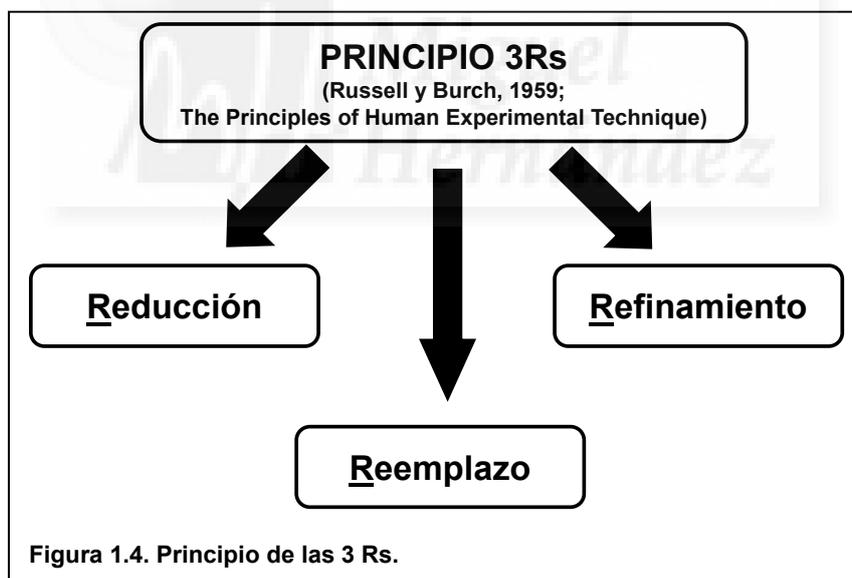
Otro papel importante de las células madre es que permiten estudiar los efectos de sustancias químicas sobre los diferentes procesos de diferenciación. Además, la ventaja de estos modelos es que permite aproximaciones de genética molecular y un exhaustivo análisis de genes afectados. También conllevan a un conocimiento de los distintos mecanismos de acción subyacentes de los efectos teratogénicos o embriotóxicos (Estevan et al., 2011b).



1.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ENSAYO DE TOXICIDAD

1.4.1 Definición del concepto de método alternativo.

Además de los ensayos *in vivo* que implican la utilización de animales de experimentación, específicamente en el área de la Toxicología, el desarrollo de técnicas alternativas a la experimentación con animales adquiere una mayor relevancia en los últimos 30 años. Se define como método alternativo aquel procedimiento basado en el principio de las 3 Rs (Figura 1.4) postulado por Russell y Burch en 1959, que implica la utilización de métodos que, o bien causen una reducción del número de animales empleados, o bien un reemplazo total de los mismos, o bien un refinamiento del sufrimiento que se le induce al animal durante el procedimiento, siempre que se obtenga una información igual a la de un ensayo *in vivo* (Piersma., 2006). Dentro de los métodos alternativos a la experimentación animal juegan un papel importante los ensayos *in vitro* con cultivos celulares. Existe una fuerte demanda de métodos *in vitro* válidos, fiables y rápidos porque dichos métodos permiten reducir el número de animales de experimentación empleados para estudiar la toxicidad de compuestos químicos, disminuyendo el costo económico asociado a los ensayos *in vivo* y el tiempo necesario para su realización, además de las connotaciones sociales y éticas relacionadas con la utilización de animales de experimentación.



1.4.2 Métodos alternativos disponibles

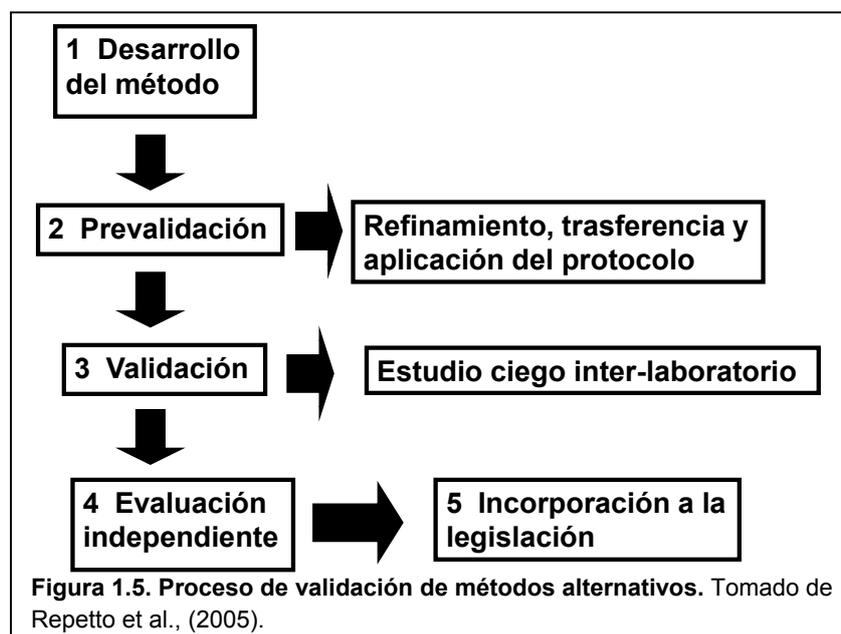
El uso de los animales de experimentación sigue siendo la base principal en muchos temas de investigación en ciencias biomédicas, por lo que es necesario su uso, aunque lo ideal es su sustitución por métodos 3Rs. Entre los métodos alternativos posibles podemos destacar los modelos matemáticos de predicción toxicocinética y de relación estructura química-actividad, mejoras en el diseño de estudios de animales (reducción y refinamiento), uso de organismos inferiores no

protegidos (bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas, animales invertebrados) o de vertebrados en etapas iniciales de desarrollo (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) y los métodos *in vitro*, que son aquellos que se llevan a cabo fuera del cuerpo del animal (perfusión de órganos, cultivo, cortes, órganos reconstituidos, explantes, micromasas, agregados celulares; cultivo primario de células, homogeneizados, líneas celulares, transgénesis, sistemas libres de células, entre otros) (Repetto et al., 2005). Los métodos *in vitro* no sólo son muy importantes desde el punto de vista aplicado, sino también desde un punto de vista científico básico, ya que con ellos es viable una aproximación mecanicista molecular y celular que nos aporte las bases científicas para dar consistencia a las predicciones resultantes de dichos ensayos *in vitro*.

1.4.3 Validación de los métodos alternativos

La validación es un estudio que establece si un método es aceptable para un propósito determinado y que consiste en establecer la fiabilidad y relevancia del método validado. La fiabilidad se refiere a reproducibilidad y la relevancia a sensibilidad, especificidad y asociación entre parámetros que se utilizan para determinar dicho efecto tóxico. No existen umbrales de fiabilidad y relevancia, y es un comité de expertos independiente y donde no participan los creadores del método el que determina si la fiabilidad y relevancia es suficiente para considerar el método como validado. En el caso de la validación de métodos alternativos en Toxicología el valor predictivo se basa en la coincidencia entre la toxicidad predicha por el método alternativo para un determinado compuesto y la toxicidad conocida en humanos y en ensayos de animales para ese mismo compuesto. Por lo tanto validar implica demostrar una predictibilidad similar a la de los ensayos con animales, que por otra parte no tuvieron un proceso de “validación” si no de “adopción” o de “aceptación” por parte de los países miembros de la OECD y/o de la UE.

Los métodos alternativos han de estar validados para ser considerados con finalidades reguladoras. Dicha validación se desarrolla siguiendo las etapas descritas en la Figura 1.5.



La validez de un ensayo de toxicidad por ejemplo, depende de dos principales factores: (a) reproducibilidad, y; (b) valor predictivo.

La reproducibilidad se refiere no sólo a los resultados dentro de un laboratorio, sino que la prueba debe dar resultados comparables en los diferentes laboratorios, es decir que el ensayo en cuestión tenga la capacidad de ser replicado y arroje los mismos resultados independientemente del lugar en donde se realice. El valor predictivo debe ser definido por comparación de los resultados *in vitro* con los ya existentes datos *in vivo* (Piersma., 2006).

Así pues, se puede dar el caso de que un método alternativo sea válido, es decir, que ofrezca resultados altamente reproducibles y de un gran valor predictivo, pero que no haya sido validado; es decir, que no haya sido sometido al correspondiente estudio ciego inter-laboratorio (Figura 1.5)

El 24 de noviembre de 1986 la Unión Europea estableció la Directiva 86/609/CEE para la protección de los animales utilizados en experimentación u otros fines científicos a fin de garantizar que se les conceda la atención adecuada, sin causarles ningún dolor ni sufrimiento innecesario. La participación de la Comisión Europea en actividades encaminadas a la validación de métodos alternativos a la experimentación con animales comenzó en 1991 con la creación del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), organizado por el JRC (*Joint Research Centre*).

Después de algunos años la nueva Directiva Europea 2010/63/UE fue presentada por la Comisión Europea en noviembre 2010 a los diferentes estados miembros iniciándose el periodo de implementación de esta Directiva en sus respectivas legislaciones nacionales. A partir del año 2011 el ECVAM pasó a ser *European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing* (EURL ECVAM).

Algunas de las funciones del EURL ECVAM son promover la aceptación científica y reguladora de las pruebas sin el uso de animales de experimentación por medio de la investigación, el desarrollo y validación de métodos y el establecimiento de una base de datos especializada con el fin de coordinar a nivel europeo la evaluación independiente de la relevancia y fiabilidad de las pruebas para fines específicos. Así mismo, EURL ECVAM también sirve de apoyo a los estados miembros de la UE y es el centro de referencia internacional para coordinar la validación de métodos alternativos.

Si un método alternativo ha sido validado y es suficientemente fiable como para ser incorporado a la legislación, los ensayos realizados en el campo de Toxicología al desarrollo, que arrojen un resultado positivo permitirían clasificar un compuesto directamente como tóxico a la reproducción sin necesidad de realizar ensayos con animales.

Aunque, un resultado negativo en principio puede usarse para no clasificación, difícilmente pueden suprimir la necesidad de hacer ensayos con animales, para la autorización definitiva de

comercialización de una sustancia, ahora bien, si permitiría que estos ensayos fueran más dirigidos y reducidos, disminuyendo en cualquier caso el número de animales necesarios en la evaluación de seguridad de una sustancia química.

Sin embargo, la validación de algunos métodos alternativos a la experimentación animal en la toxicología al desarrollo no permite garantizar la inocuidad de los productos químicos debido a la relativa complejidad de los mamíferos en la etapa de desarrollo. Las pruebas *in vitro* permiten únicamente el estudio de los efectos de un solo mecanismo, por ejemplo en la proliferación celular, diferenciación celular u cualquier otro proceso celular importante. Carecen de la interacción entre los diferentes mecanismos de regulación y formación de patrones en la embriogénesis que son cruciales para el desarrollo (Piersma., 2006).

1.4.4 Necesidad de métodos alternativos de ensayo de toxicidad a la reproducción y al desarrollo

Los reglamentos establecidos en todos los países desarrollados requieren estudios *in vivo* sobre la toxicidad a la reproducción con el objetivo de realizar la necesaria evaluación de riesgos antes de registrar y autorizar el uso de productos químicos de mediano y alto volumen de producción. Estos estudios suponen la utilización de un gran número de animales de experimentación con las correspondientes implicaciones éticas, científicas, logísticas y económicas (Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2012). El Reglamento REACH regula el “Registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y los preparados químicos”, para garantizar un elevado nivel de protección para la salud humana y del medio ambiente, por lo tanto intensifica en el uso de la experimentación con animales de manera importante, y por ello es necesario una acción inmediata para la introducción de métodos alternativos válidos (Piersma., 2006). Se ha estimado el número de animales necesarios y el costo económico para realizar un conjunto básico de ensayos para pruebas de toxicidad en la reproducción (Tabla 1.3).

Teniendo en cuenta las cifras descritas en la Tabla 1.3, es fácil de entender que son necesarios modelos alternativos *in vitro*, seguros y fiables para los ensayos de toxicología a la reproducción y al desarrollo, siendo particularmente bienvenidos los métodos de embriotoxicidad. Estos modelos pueden ser especialmente relevantes para el proceso de detección masiva de alto rendimiento realizada en las etapas iniciales del desarrollo de moléculas empleadas como biocidas, cosméticos, aditivos alimentarios, entre otros.

Algunas de las aplicaciones potenciales de métodos alternativos a la experimentación animal para evaluar toxicidad a la reproducción serían: i) comparar el potencial de toxicidad para el desarrollo de un nuevo producto químico que es sólo una ligera modificación de una sustancia química existente que ya ha sido probado *in vivo*; y ii) la evaluación de compuestos para los que la prueba no se realiza rutinariamente por lo general ya que la exposición anticipada es muy baja (Spielmann., 2005).

Por otra parte, es notable una falta de protocolos adoptados *in vivo* para ensayar exclusivamente los efectos tóxicos que se ejercen sobre la progenie en el primer periodo de la gestación, entre la implantación y la organogénesis; siendo un aspecto relevante ya que una directriz para este propósito permitiría la valoración de toxicidad implicada en las primeras etapas de desarrollo sin esperar a que ocurra teratogenicidad, así que éstas tienen que ser analizadas por la directriz de la OCDE 416 (Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2017).

Tabla 1.3 Costo y número de animales requerido en las pruebas de toxicología reproductiva. Estimación económica realizada por Fleischer (2007) en la segunda mitad de 2004. Número de animales estimado por Hofer et al., 2004.

OECD	OBJETIVO	ANIMALES	COSTO (€)
414	Teratogenicidad	150	Rata: 63.100 Conejo: 92.500
416	Toxicidad a la reproducción en (2 generaciones)	3200	327.975
421	Escrutinio a la reproducción y desarrollo	560	54.597
443	Toxicidad a la reproducción (1 generación extendida)	412	92.000
426	Neurotoxicidad al desarrollo	1.400	1.100



1.5 MÉTODOS *IN VITRO* PARA ENSAYO DE TOXICIDAD AL DESARROLLO

1.5.1 Los métodos disponibles y estado de validación

Las principales alternativas disponibles actualmente para el ensayo de toxicidad al desarrollo se muestran en la Tabla 1.4, clasificadas según que evalúen embriotoxicidad o la teratogenicidad. Los ensayos de embriotoxicidad son ensayos *in vitro* con células madre embrionarias, en los que se estudian alteraciones en la diferenciación celular, mientras que los ensayos de teratogenicidad se basan en la exposición *in vitro* o *ex vivo* de embriones de peces, anfibios o roedores o bien en la diferenciación de células de embrión de 14 días, en el caso del método de las micromasas. En la Tabla 1.5 se muestran y resumen los ensayos diferenciando entre validados y no validados.

Tabla 1.4. Principales alternativas disponibles para el ensayo de toxicidad al desarrollo.

EMBRIOTOXICIDAD	TERATOGENICIDAD
<ul style="list-style-type: none"> • Células madre embrionarias D3 (EST) • Células adheridas en diferenciación y citotoxicidad (ACDC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Micromasas (rata, ratón, pollo) (MM) • Embrión entero en cultivo (rata, ratón) (WEC) • Embriones de pez cebra (<i>Dario rerio</i>) • Embriones de rana <i>Xenopus</i> (FETAX) • Ensayo con células de carcinoma embrionario

Los métodos clasificados en la Tabla 1.4 para “embriotoxicidad” se basan en observar alteraciones en la diferenciación celular. El ensayo más empleado es el de las células madre embrionarias de ratón D3 (EST). Recientemente, también está tomando cierto auge el ensayo de células adheridas en diferenciación y citotoxicidad (conocido por su acrónimo del inglés ACDC), basado en los mismos principios del EST, pero empleando la línea celular J1. Ambos métodos (EST y ACDC), presentan la ventaja sobre el resto de métodos que reemplazan totalmente la experimentación animal.

Los métodos considerados de “teratogenicidad” presentados en la Tabla 1.4, implican observaciones de procesos más complejos que incluyen formación de tejidos, órganos y alteraciones morfológicas. Los métodos para ensayos de teratogenicidad de las micromasas (MM) y del cultivo de embriones enteros (WEC) de rata se encuentran ambos validados por el EURL-ECVAM, aunque sus prestaciones todavía no son suficientes para ser utilizado con finalidad reguladora (Balls, 2002). El ensayo de pez cebra (*Dario rerio*), se ha incorporado a la nueva guía OECD 236. Ninguno de estos ensayos reemplaza totalmente la experimentación animal aunque si reduce el número de animales necesarios frente a los protocolos *in vivo* de la OECD, a la vez que refina estos procedimientos, porque la exposición a las sustancias se efectúa *in vitro* o *ex vivo*. Además, los procedimientos de FETAX, WEC y pez cebra, presentan la ventaja de que permiten determinar anomalías morfológicas.

Tabla 1.5. Métodos alternativos para la prueba de toxicidad al desarrollo.

ESTADO	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	VALIDEZ CIENTÍFICA
VALIDADOS	Embriones enteros en cultivo (WEC)	Utiliza embriones enteros de rata con 9.5 días de gestación.	Para distinguir los compuestos evaluados en tres categorías (no embriotóxicos, embriotóxicos débiles y embriotóxicos fuertes).
		Extracción del útero: cultivo de los embriones durante 48 h (exposición a la sustancia embriotóxica en frascos cerrados con variaciones en la presión parcial de O ₂ y CO ₂)	Predicción global del método: 71% Predicción del método para embriotóxicos fuertes, débiles y no embriotóxicos: 100, 65 y 70%, respectivamente.
	Prueba de las micromasas (MM)	Requieren material de origen animal, sacrificio de los animales al día 14.	Aceptado únicamente para la identificación de los compuestos embriotóxicos fuertes.
		Aislamiento de los esbozos y cultivo de las células durante 5 días de exposición. No hay diferenciación a otros linajes.	Predicción global del método: 80% Predicción del método para embriotóxicos fuertes, débiles y no embriotóxicos: 100, 71 y 57%, respectivamente.
SIN VALIDAR	Prueba con células madre embrionarias de ratón (EST)	Utiliza líneas celulares permanentes de ratón: D3 (células madre embrionarias) y 3T3 (fibroblastos).	Para distinguir los compuestos evaluados en tres categorías (no embriotóxicos, embriotóxicos débiles y embriotóxicos fuertes).
		No usa animales (células en cultivo)	Predicción global del método: 78%
		Evalúa citotoxicidad y diferenciación de las células embrionarias a cardiomiocitos.	Predicción del método para embriotóxicos fuertes, débiles y no embriotóxicos: 100, 70 y 72%, respectivamente.
SIN VALIDAR	Ensayo de embriotoxicidad con pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Se basa en el estudio del efecto sobre los embriones como consecuencia de exposición durante 48 h.	Se ha demostrado científicamente su validez.
		Posibilidad de acoplar un sistema de activación metabólica.	Se considera como una prueba <i>in vitro</i> y se acepta como un método alternativo a la experimentación animal.
		Analiza mecanismos de la teratogénesis y cambios en la expresión génica de los diferentes genes marcadores.	Se ha establecido guía OCDE 236
	Ensayo de teratogénesis con embrión de rana (FETAX)	Evalúa las alteraciones en el desarrollo de los vertebrados.	En el año 2000 expertos científicos concluyeron que el ensayo de FETAX no está lo suficientemente validado y no es óptimo para su uso reglamentario.
Utiliza embriones enteros. Embriones de los anfibios son muy sensibles a los productos químicos. Posibilidad de acoplar un sistema de activación metabólica.			

Entre el periodo de 1996 al 2000, el EURL ECVAM patrocinó los estudios de prevalidación y validación de los métodos WEC, MM y EST (Spielmann., 2005). Estos tres métodos aplican el principio de las 3Rs y por tanto se incluyen dentro de los llamados métodos alternativos validados (Tabla 1.5). También comparten un enfoque común basado en la obtención de los registros de sus respectivos criterios de valoración y el posterior análisis mediante tres algoritmos matemáticos que permiten asignar al compuesto evaluado la categoría de no embriotóxico, embriotóxico débil o embriotóxico fuerte (Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2017).

Resulta evidente que dentro de los métodos alternativos, los métodos *in vitro* basados en el uso de cultivos celulares juegan un papel importante ya que reemplazan totalmente el uso de animales de experimentación.

1.5.2 Descripción resumida de los métodos disponibles

Método de las células madre embrionarias de ratón (EST)

Es el único de los métodos validados que suprime totalmente el uso de animales pues utiliza dos líneas celulares permanentes, la línea D3 de células madre embrionarias de ratón, que se pueden mantener en la etapa indiferenciada en presencia de la citoquina factor de inhibición de la leucemia (LIF); y otra línea celular adulta de ratón, los fibroblastos 3T3. Es posible determinar el potencial embriotóxico de los productos químicos ensayados mediante el método EST evaluando la inhibición de la diferenciación espontánea de las células D3 a cardiomiocitos latentes y las alteraciones de viabilidad de las células D3 y de la línea celular 3T3 tras exposición crónica durante 10 días. Utilizando estos tres parámetros se aplica una función estadística capaz de discriminar entre tres diferentes niveles de embriotoxicidad: no embriotoxicidad, embriotoxicidad débil y embriotoxicidad fuerte (Spielmann et al., 1997). EURL-ECVAM considera que el método es susceptible de mejora y todavía no está listo para ser utilizado para finalidades reguladoras (Balls, 2002). La mejora de este método es el objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral, por lo que este método se describirá más en detalle en el siguiente capítulo de esta memoria.

Método de células adheridas en diferenciación y citotoxicidad (ACDC)

El método de adherencia celular y citotoxicidad (Barrier et al., 2011) es una variante del método EST. Utiliza células madre de ratón de la línea J1, consideradas genéticamente más estables que las células D3. Como criterio de cuantificación de alteraciones en la diferenciación de células pluripotentes J1 hacia cardiomiocitos mide la expresión de la proteína mayoritaria en músculo cardíaco, la cadena pesada de la miosina. La principal ventaja de este método sobre el EST es que permite la determinación de ambos parámetros sobre el mismo cultivo celular, y reduce el tiempo del ensayo. Este método demostró ser adecuado para ensayar los efectos de los ácidos haloacéticos y sus principales metabolitos (Jeffay et al., 2010), pero aún no ha sido validado.

Método de las micromasas (MM)

Utiliza cultivos primarios de los esbozos de las extremidades anteriores de embriones de rata de 14 días de gestación. Este método se basa en determinar el grado de proliferación del cultivo primario y la alteración del proceso de diferenciación a tejido cartilaginoso, que es un paso fundamental en la generación del esqueleto, la proliferación y diferenciación celular y en las comunicaciones célula-célula y célula-matriz-extracelular. Durante 5 días, los cultivos primarios se exponen y finalmente se determina mediante un colorante marcador específico de cartílago, la concentración del compuesto capaz de inhibir un 50% la diferenciación (ECVAM., 2006a). Este parámetro y un algoritmo matemático permite clasificar el compuesto evaluado en no embriotóxico, embriotóxico débil o

embriotóxico fuerte. Este método también se ha utilizado empleando las mismas células de embriones de pollo, pero en este caso el método no ha seguido un proceso de validación.

Método del cultivo de embriones enteros (WEC)

Este método se basa en la exposición *ex-vivo* de embriones de rata durante el periodo en que ocurren los procesos más relevantes de la organogénesis, como la formación del corazón, formación de ojos y oídos, cierre del tubo neural, el brote de las extremidades, etc. Se determinan las anomalías morfológicas de cada embrión expuesto de acuerdo a los parámetros funcionales, morfológicos y de malformaciones, para determinar los parámetros de IC_{NOEC} TMS (concentración más baja que no causa anomalías morfológicas observables) e IC_{MAX} (la más baja concentración que causa la máxima tasa de malformaciones) (ECVAM.,2006b). Sobre la base de estos parámetros un algoritmo matemático permite clasificar el compuesto evaluado en no embriotóxico, embriotóxico débil o embriotóxico fuerte.

*Ensayo de teratogénesis con embriones de rana *Xenopus* (FETAX)*

Este método utiliza embriones de sapo de uñas sudafricano (*Xenopus laevis*) como material biológico (Bantle et al., 1990; Fort et al., 1990; 1998, 2000). Los embriones seleccionados se exponen al compuesto cuya toxicidad se desea evaluar, tras lo cual se determina la mortalidad, las malformaciones, el crecimiento (distancia entre la cola y la cabeza), la concentración mínima que inhibe el crecimiento y el índice de teratogenia (relación entre la concentración que causa mortalidad al 50% de los embriones y la concentración que causa anomalías morfológicas en el 50% de los embriones) (Bantle et al., 1998; 1996). Las primeras 96 horas del desarrollo embrionario en *Xenopus laevis*, son semejantes a muchos de los procesos principales de la organogénesis humana (NICEATM, 2000). Sin embargo, otros autores sugieren que otras especies de *Xenopus* como *Xenopus tropicalis* también puede ser utilizado de manera efectiva para estudios de teratogénesis (Fort et al., 2004). El ensayo FETAX proporciona validez científica y puede ser usado para la identificación de riesgos para la salud humana y el medio ambiente (Baccheta et al., 2008; Bosisio et al., 2009; Longo et al., 2008).

*Prueba de embriotoxicidad en pez cebra (*Danio rerio*)*

El teleosteo pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo frecuentemente usado en estudios de toxicología general y del desarrollo (Froehlicher et al., 2009), neurotoxicología (Anichtchik et al., 2004; Bretaud et al., 2004; Linney et al., 2004) y también en otras ciencias básicas como embriología (Ticho et al., 1996). Este organismo es un modelo muy útil y apropiado gracias a su pequeño tamaño, fácil mantenimiento, fácil reproducción y alta tasa de natalidad (una hembra puede poner hasta 400 huevos por semana) (Laale, 1977). Su patrón de desarrollo morfológico está bien establecido y sucede en un periodo de tiempo muy reducido (72 horas desde la formación del cigoto hasta la eclosión de los huevos). Otra ventaja es que los embriones de pez cebra son transparentes, lo que

facilita su observación morfológica. Por las características anteriormente mencionadas, el pez cebra (*Danio rerio*) está emergiendo como un candidato muy prometedor de modelo animal vertebrado, capaz de llenar el vacío entre los ensayos celulares *in vitro* y las pruebas preclínicas convencionales, ya que además esta prueba ha demostrado ser eficiente para la detección de toxicidad (Beker van Woudenberg et al., 2014).

El desarrollo embrionario del pez cebra es particularmente rápido y está dividido en siete periodos: cigoto, división, blástula, gástrula, segmentación, faríngrula y periodos de eclosión. El cigoto es formado inmediatamente después de la unión de la hembra con los gametos masculinos. La división es producida entre 45 min y 2 horas y consiste de una serie de divisiones mitóticas que permiten la diferenciación y formación de la blástula. La formación de la blástula es producida entre 2 y 4 horas y forma una capa de células. La gástrula es producida alrededor de las 10 horas después de la fertilización y consiste en la migración de células que forman diferentes estructuras que resultan en la formación de tres capas primarias, ectodermo, endodermo y mesodermo. La segmentación es un proceso morfogenético donde se desarrollan las somitas e inicia los rudimentos de los órganos primarios, el tallo se convierte más prominente y se forma un embrión de pez cebra.

El método está basado sobre el efecto que puede producir la exposición de diferentes químicos sobre los embriones de *Danio rerio* durante un periodo de 48 horas post-fertilización, tras lo cual se determinan los diferentes parámetros morfométricos que se desee analizar (Busquet et al., 2008). En los últimos años se han dado a conocer un gran número de genes relacionados con funciones mecanorreceptoras (Li et al., 2010), lo que permite que este método pueda también ser utilizado para la detección de sustancias químicas con efectos en el desarrollo de las funciones neurosensoriales. Además, el genoma completo de este organismo es conocido, lo que permite la detección de variaciones en la expresión génica que ayuda a descifrar los diferentes mecanismos de acción de los compuestos tóxicos (Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2017).

1.6 MÉTODO DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (EST)

En el apartado 1.5 se han descrito brevemente los diferentes métodos *in vitro* disponibles de embriotoxicidad. Dado que el objetivo de este trabajo está en la implementación molecular del método EST, éste se describe aquí en más detalle.

1.6.1 Antecedentes del EST

La prueba de las células madre embrionarias (EST, por **E**mbryonic **S**tem cell **T**est), fue desarrollada como un nuevo método para evaluar la embriotoxicidad *in vitro* (Spielmann et al., 2006).

Las células madre embrionarias se consideran una alternativa importante para el desarrollo de métodos de detección *in vitro* de embriotoxicidad ya que son un modelo muy útil para el conocimiento de numerosos factores implicados en las fases iniciales de la embriogénesis. Como se comentó anteriormente una de las características de las ESC es que bajo ciertas condiciones pueden formar EBs, mediante diferenciación espontánea *in vitro*, y luego de un periodo de tiempo en cultivo aparecen derivados celulares de las tres capas embrionarias, que por último generan tipos celulares diferenciados de varios linajes (Dvash y Benvenisty., 2004). Por esta razón las ESC, son utilizadas como una herramienta para observar el efecto que los compuestos químicos pueden causar en los diferentes estadios del desarrollo embrionario ya que la perturbación de estos procesos ya sea mediante un estímulo químico inapropiado como por ejemplo un producto tóxico puede desencadenar una diferenciación inapropiada generando alteraciones en la formación del cuerpo embrionario, causando embriotoxicidad y la generación de malformaciones que conllevan a que se presente teratogenicidad; por lo tanto las ESC se pueden considerar como una alternativa *in vitro* a los ensayos con animales para estudios de embriotoxicidad (Rohwedel et al., 2001). Además de lo anterior, las células madre embrionarias se usan en el método EST que fue adoptado y validado por el ECVAM (Genschow et al., 2002).

Algunos grupos de investigación han utilizado las ESC de ratón para establecer ensayos de embriotoxicidad *in vitro* comparando la citotoxicidad en ESC con citotoxicidad en fibroblastos de ratón (células adultas) con el fin de evaluar el potencial embriotóxico de los agentes teratogénicos. Los resultados de estos estudios mostraron que las ESC fueron más sensibles a algunos agentes embriotóxicos *in vivo* que los fibroblastos. Así, la citotoxicidad en células embrionarias y adultas fue un aspecto importante a considerar permitiendo la posterior clasificación de los compuestos en categorías de embriotoxicidad (Laschinsky et al., 1991; Estevan C. et al, 2011a).

El objetivo fundamental de la presente tesis de Doctorado es de proponer mejoras al método EST, este método suprime totalmente la experimentación animal, utiliza líneas celulares permanentes de ratón, e intenta determinar el potencial embriotóxico de los productos químicos ensayados (contaminantes ambientales, aditivos alimentarios, productos industriales, agrícolas y medicamentos)

sobre la base de la evaluación de la inhibición de la diferenciación de las células ESC D3 (que representarían tejidos embrionarios en el proceso de desarrollo) y las alteraciones de viabilidad de estas células D3 y de la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3 utilizada como modelo de célula no diferenciante (Spielmann et al., 1997).

La línea de células embrionarias D3 se pueden mantener en la etapa indiferenciada en presencia del factor de inhibición de la leucemia (LIF). Cuando se elimina este LIF las células madre embrionarias forman EBs, los cuales se diferencian hacia los linajes de células embrionarias importantes. Por lo tanto, esta prueba fue desarrollada cuando se descubrió que las ESC de ratón de la línea D3 eran capaces de formar EBs latentes en ausencia del LIF después de 10 días de cultivo en diferenciación espontánea (Spielmann et al., 1997).

1.6.2 Fundamento del EST

Esta prueba se basa en la determinación de importantes parámetros del desarrollo embrionario. Las ESC presentan alteraciones en su patrón de diferenciación *in vitro* cuando son expuestas a productos químicos embriotóxicos durante la diferenciación de los EBs (Wobus et al., 1994). Específicamente, el método EST se basa en el potencial de las ESC de ratón de la línea D3 en diferenciarse en cardiomiocitos latentes, y en determinar la alteración de dicha diferenciación celular causada por la exposición a productos químicos, junto con las alteraciones de viabilidad de estas células D3 y de un modelo de línea celular adulta (fibroblastos 3T3). El estudio de la inhibición de la diferenciación se combina con el estudio de las diferencias de sensibilidad entre las células embrionarias y adultas y los posibles daños citotóxicos. La prueba se desarrolló al descubrir que las ESC de ratón de la línea D3, son capaces de formar EBs latentes después de 10 días de cultivo en diferenciación espontánea (Estevan et al, 2011a).

El ensayo EST consiste en el análisis morfológico de los cardiomiocitos latentes luego de la diferenciación de los EBs. La inhibición de la diferenciación de células D3 y la citotoxicidad de las células D3 y 3T3 son los tres parámetros seleccionados en la prueba EST para la predicción del potencial embriotóxico de los productos químicos (Spielmann et al., 1997; Genschow et al, 2000; ECVAM., 2006c).

1.6.3 Procedimiento detallado para el análisis de la diferenciación celular en el método EST

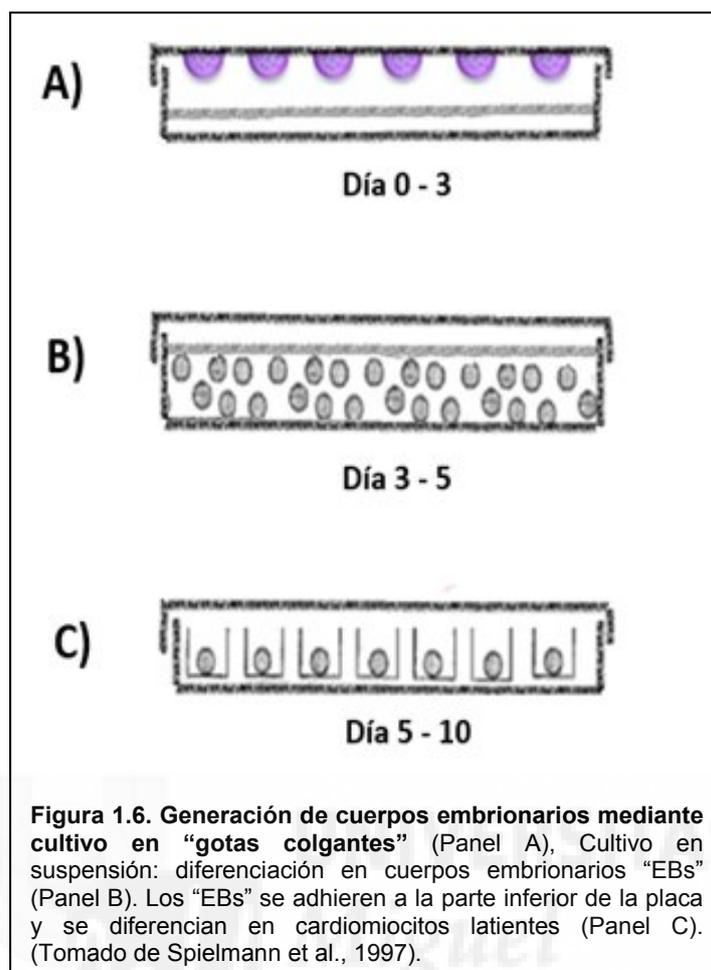
Para analizar las alteraciones en la diferenciación celular se deben ensayar de seis a ocho diferentes concentraciones (más el control) separadas por un factor de dilución entre 1.2-3 cubriendo todo el rango de concentraciones relevante para la citotoxicidad. El medio de cultivo (sin LIF) se preparará conteniendo las concentraciones del compuesto a evaluar o en ausencia del mismo en el caso de las muestras control. En el día 0 se dispensan sobre la cara interna de la tapa de una placa Petri de 100 mm (al menos 24 por cada concentración de ensayo) gotas de 20 µl de una

suspensión celular de 37500 células D3/ml (así pues conteniendo cada gota 750 células D3) preparada en medio de cultivo (sin LIF para iniciar la diferenciación espontánea) y con la concentración deseada del compuesto a evaluar. Posteriormente las tapas de las placas Petri conteniendo las gotas se colocan en su posición normal de manera cuidadosa sin deformar ni mezclar las gotas, mientras que la parte inferior de la placa Petri se llena con 5 ml de solución salina. Las gotas colgantes (“hanging-drops”) (Wobus et al., 1994) así generadas se mantienen en esta posición durante 3 días a 37 °C en presencia de atmósfera de 5% de CO₂ (Figura 1.6A).

Al día 3 las gotas colgantes son transferidas por arrastre manteniendo la tapa inclinada en un ángulo de 45° para facilitar el lavado de los EBs y su desplazamiento hacia la parte inferior, los EBs se transfieren suavemente a una placa de Petri de 60 mm con 5 ml de medio de cultivo recién preparado conteniendo el producto químico a evaluar en cada caso (Figura 1.6B). Para el día 5, los EBs así generados se transfieren a una placa de 24 pocillos (1 cuerpo embrionario por pocillo) que contiene 1 ml de medio fresco con la sustancia de ensayo en cada pocillo (Figura 1.6C). Después de otros cinco días de cultivo (día 10) los EBs deben haberse diferenciado en cardiomiocitos latientes contráctiles y su número se determina bajo el microscopio óptico, tomando nota del número de pocillos que contienen células con contracción de forma espontánea. Se calcula la ID₅₀ (concentración capaz de inhibir la diferenciación a cardiomiocitos latientes en un 50%) representando el porcentaje de inhibición de la diferenciación con respecto a la concentración del compuesto evaluado (Spielmann et al., 1997; Genschow et al., 2000 y 2002).

Además del compuesto a evaluar el ensayo se valida probando los compuestos 5-fluorouracilo (5-FU) y penicilina-G (PG) como controles positivo y negativo, respectivamente. El primero es un embriotóxico fuerte, pues una concentración de 5-FU entre 48 y 60 ng/ml es capaz de inhibir la diferenciación del 50% de los EBs, mientras que el segundo de los compuestos no es embriotóxico y por lo tanto no alterará significativamente la diferenciación de los cuerpos embrionarios a una concentración tan elevada como 1 mg/ml de PG. El ensayo es aceptable cuando al menos 21 de los 24 EBs control presentan latido. Se deben realizar al menos dos experimentos independientes que cumplan con estos criterios de calidad para dar validez a los resultados (Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2017; ECVAM., 2006a).

El proceso experimental de generación de cardiomiocitos latientes para el método EST se muestra en un vídeo en: <https://www.youtube.com/watch?v=-gPxGM606Ms>

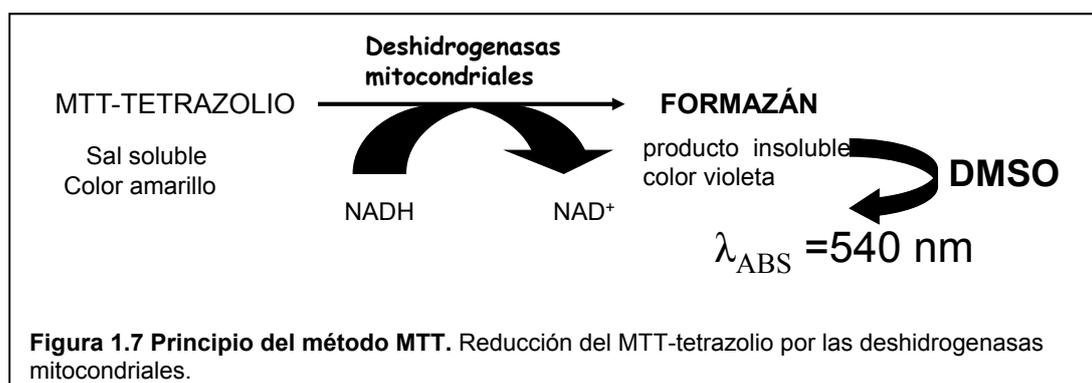


1.6.4 Procedimiento para el ensayo de citotoxicidad en el método EST

La citotoxicidad de las células 3T3 y D3 deben ser inicialmente analizadas en un estudio preliminar que abarca como concentración más alta el límite de solubilidad del compuesto más 8 diferentes diluciones escalonadas con un factor de 10. El experimento principal se realiza con 7 concentraciones cubriendo el rango relevante de dosis citotóxicas determinadas en el estudio preliminar. El experimento se inicia con la siembra de 500 células 3T3 o D3 en placas de 96 pocillos, con medio de cultivo sin LIF y con la concentración adecuada de la sustancia de ensayo. Una vez sembradas las células se incuban durante 10 días con cambios de medio en los mismos momentos del cultivo que en la prueba de diferenciación (los días 3 y 5). La viabilidad de las células expuestas se prueba en el día 10 mediante el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Spielmann et al., 2006).

El ensayo MTT se basa en la determinación colorimétrica del formazán formado en la mitocondria a partir del MTT empleado como sustrato. El MTT-tetrazolio en su forma oxidada ingresa en la célula por endocitosis y penetra en la matriz mitocondrial donde actúa como sustrato artificial para las deshidrogenasas mitocondriales del ciclo de ácido cítrico, compitiendo con el sustrato natural en su reducción a formazán, utilizando NADH o FADH₂ como cofactor (Figura 1.7). La cuantificación de la

citotoxicidad se basa en el metabolismo de la sal de tetrazolio; es decir la cantidad de formazán formado está directamente relacionada con el número de células viables, y es un reflejo tanto de la integridad mitocondrial como del nivel de funcionalidad de las deshidrogenasas mitocondriales (Borenfreud et al., 1988). Por lo tanto, una disminución en la producción de formazán es un indicativo de alteración celular, que puede ser a nivel de la endocitosis del MTT-tetrazolio al interior de la mitocondria, o del metabolismo de éste dentro de la mitocondria y en cualquiera de ambos casos, de citotoxicidad.



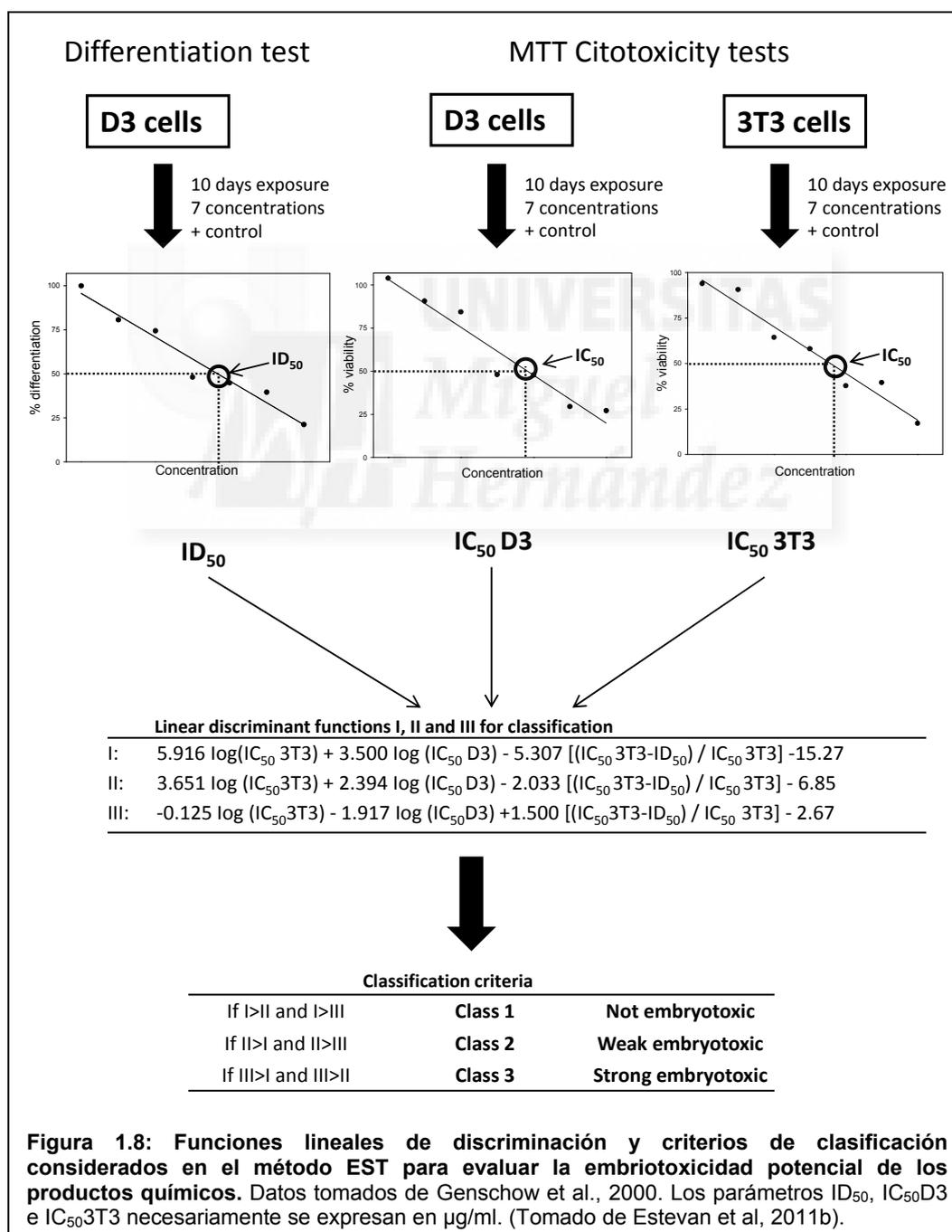
En el día 10 de exposición se extrae el medio de cultivo de las células que se han fijado al soporte para realizar la medición de la viabilidad, se añade el reactivo MTT (1 mg/ml) y se lleva a incubación durante 3 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂. Se retira el MTT y se lavan las células con tampón fosfato salino (PBS). Se añade DMSO para lisar las células, disolver cristales de formazán y estabilizar el color. Finalmente se registra la absorbancia a 540 nm. La absorbancia a esta longitud de onda de las células control se considera el 100% de viabilidad, lo que permitirá estimar el porcentaje de viabilidad de los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones del compuesto a evaluar utilizando los correspondientes registros de absorbancia.

La representación del porcentaje de viabilidad de los cultivos frente a la concentración de compuesto a la que han estado expuestos permitirá determinar las variables de IC₅₀D3 e IC₅₀T3 como las concentraciones del compuesto evaluado que reducen al 50% la viabilidad de las células D3 y 3T3, respectivamente, en las condiciones de ensayo empleadas (ECVAM., 2006a; Estevan et al, 2011b; Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2017).

Se deben realizar al menos 2 ensayos independientes cumpliendo los siguientes criterios de calidad: i) la concentración de 5-FU (control positivo) necesario para causar un 50% de citotoxicidad es de entre 48-86 ng/ml y 120-500 ng/ml para las células 3T3 y D3, respectivamente; ii) el control negativo (1 mg PG/ml) no afecta significativamente a la viabilidad de las células D3 y 3T3.

1.6.5 Variables del ensayo EST y funciones estadísticas de predicción

Las funciones estadísticas de predicción del potencial embriotóxico de las sustancias evaluadas se muestran en la Figura 1.8 y requieren de tres diferentes variables. La primera de estas variables es la ID_{50} , determinada como la concentración con capacidad para inhibir la diferenciación del 50% de los EBs hasta cardiomiocitos latentes. Las otras 2 variables son las IC_{50D3} y la IC_{50T3} , que indican respectivamente las concentraciones con capacidad de reducir al 50% la viabilidad de las células D3 y 3T3 tras exposición crónica durante 10 días (Genschow et al., 2000). Utilizando estos tres parámetros se aplica una función estadística capaz de discriminar entre 3 diferentes niveles de embriotoxicidad: no embriotoxicidad, embriotoxicidad débil y embriotoxicidad fuerte (Spielmann et al., 1997), siguiendo los criterios que se describen en la Figura 1.8.



1.6.6 Variables usadas en el EST modificado en este trabajo

En la presente Tesis de Doctorado los modelos de predicción validados y algunos criterios establecidos para la prueba EST se aplicaron con ciertas modificaciones. Se utilizó como variables de citotoxicidad IC50D3 y IC503T3 como las concentraciones del compuesto ensayado que causan una disminución de 50% de la viabilidad de las células D3 y 3T3 en cultivos de monocapa después de 5 días de exposición, respectivamente.

Con el fin de supervisar y estudiar alteraciones en la diferenciación causadas por la exposición a compuestos embriotóxicos, se definieron dos nuevos parámetros: CE50 como la concentración efectiva de la sustancia que causa una disminución del 50% en la expresión del gen marcador biológico en las células diferenciadas de forma espontánea después de 5 días de la exposición; y CE200 como la concentración efectiva de la sustancia de ensayo que causa un aumento de 200% en la expresión del gen marcador biológico en las células diferenciadas de forma espontánea después de 5 días de exposición.

Estos nuevos parámetros se introdujeron en las funciones discriminantes de la EST validados en lugar de la variable de ID50 descrita anteriormente (Tabla 1.6). CE50 y CE200 se utilizaron alternativamente dependiendo del efecto de la sustancia química en la expresión del gen (sobre-expresión o reducción en la expresión).

Tabla 1.6 Funciones lineales de discriminación y criterios de clasificación considerados en el método EST. Evaluación de la embriotoxicidad potencial de los productos químicos mediante el empleo de genes biomarcadores.

$I = 5.916 \log(IC503T3) + 3.500 \log(IC50D3) - 5.307 [(IC503T3 - CE50 \text{ o } CE200) / IC503T3] - 15.27$		
$II = 3.651 \log(IC503T3) + 2.394 \log(IC50D3) - 2.033 [(IC503T3 - CE50 \text{ o } CE200) / IC503T3] - 6.85$		
$III = -0.125 \log(IC503T3) - 1.917 \log(IC50D3) + 1.500 [(IC503T3 - CE50 \text{ o } CE200) / IC503T3] - 2.67$		
Embriotóxico fuerte	Embriotóxico débil	No embriotóxico
III > I	II > I	I > II
(y)	(y)	(y)
III > II	II > III	I > III

1.6.7 Ensayos de pre-validación y validación del método EST:

Historia de la estrategia de validación

La OECD ha señalado que los ensayos de toxicidad *in vitro* pueden ser aceptados a efectos de regulación sólo después de tener éxito en los estudios de validación experimental. En este procedimiento es esencial demostrar que las pruebas de toxicidad *in vitro* proporcionan el mismo nivel de predicción que los experimentos con animales, es decir que los experimentos *in vivo* (Spielmann y Liebsch al., 2001). Por tal razón se llevó a cabo un estudio de pre-validación y validación de las tres pruebas de embriotoxicidad *in vitro*, el cual fue coordinado desde 1997 por el ZEBET (Centro Nacional de Documentación y Evaluación de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal) y financiado por el ECVAM (Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos), cuyo principal

objetivo fue determinar la capacidad de discriminación de estos tres métodos entre compuestos embriotóxicos fuertes, débiles y compuestos no embriotóxicos.

Este estudio se dividió en varias fases: La primera fase (I): A partir de 1997, fue designada como fase de pre-validación, prueba y optimización de protocolos, y una exhaustiva búsqueda en las bases de datos *in vivo* e *in vitro* de compuestos embriotóxicos. La segunda fase (II): Desde 1998-2000, implicó un proceso formal de validación y se llevó a cabo bajo condiciones de estudio ciego de 20 compuestos químicos seleccionados de la base de datos los cuales fueron codificados y distribuidos en los laboratorios participantes. El análisis de datos y la preparación del informe final se realizaron durante el período de 1999-2000 (Genschow et al., 2002; Brown et al., 2002; Balls, M. 2002).

Cada una de las pruebas se realizó en cuatro laboratorios independientes, en un estudio ciego (Spielmann y Liebsch 2001). En la fase preliminar del estudio (Fase I) de validación, siete productos químicos fueron probados, mientras en la fase final (Fase II) fueron otros trece los compuestos químicos seleccionados de la base de datos para ser evaluados (alcanzándose así un total de 20 diferentes compuestos entre las fases de pre-validación y validación).

El análisis de los valores de ID50, IC50D3 e IC50T3 obtenidos durante el estudio de pre-validación permitieron definir de manera empírica unas funciones bioestadísticas o modelos de predicción (PM) que permitieran asignar correctamente el potencial embriotóxico de cada compuesto (Genschow et al., 2000; Spielmann et al., 2006). Los PM desarrollados en la pre-validación fueron posteriormente evaluados en la validación utilizando un número mayor de compuestos.

Selección de los compuestos químicos modelo

En 1997 se completó el proceso de selección de los compuestos químicos, primero se seleccionaron las sustancias problema de una base de datos maestra de los resultados de las pruebas *in vivo* e *in vitro* de toxicidad al desarrollo en 309 productos químicos que se habían utilizado en estudios de validación previos o que se habían sugerido para dicho uso y para lo cual se contaba con datos humanos.

A partir de esta base de datos, se construyó una lista de cerca de 30 candidatos según el siguiente criterio:

Clase 3, EMBRIOTÓXICOS FUERTES, se definen como aquellos capaces de inducir alteraciones en el desarrollo sin efectos tóxicos significativos sobre la madre;

Clase 2, EMBRIOTÓXICOS DÉBILES, son sustancias químicas de actividad intermedia, y se definen como aquellos compuestos con actividad embriotóxica a concentraciones que causan también toxicidad relevante a la madre; y

Clase 1, NO EMBRIOTÓXICOS, aquellos compuestos que inducen pequeñas alteraciones en el desarrollo embrionario a concentraciones que causan una severa alteración del estado de salud de la madre.

Debido a que el estudio ECVAM no incluiría la activación metabólica, los productos químicos que se sabe que requieren activación para sus efectos en el desarrollo se excluyeron como candidatos, aunque se incluyeron algunos metabolitos estables y conocidos.

Posteriormente se preseleccionaron los productos químicos para finalmente seleccionar 20 químicos por el ECVAM, para el ensayo de validación formal, realizado en condiciones de ciego. No hubo requisitos toxicológicos para su inclusión en la base de datos. Así que se escogieron por tres razones: primero, porque habían sido utilizados previamente en los estudios de validación de las pruebas de toxicidad en el desarrollo o sugerido por dicho uso, en segundo lugar, porque tenían buen y libre acceso de datos de toxicidad del desarrollo *in vivo*, y en tercer lugar, porque se cree que son tóxicos para el desarrollo humano. Los productos químicos usados anteriormente fueron extraídos de la lista elaborada por Smith., 1983 (Brown et al., 2002).

Capacidad de predicción de embriotoxicidad del ensayo EST

La evaluación del ensayo de validación de EST con los 20 compuestos modelo elegidos mostró una exactitud global del 78% (es decir, el 78% de las predicciones eran correctas) (Genschow et al., 2004). Los registros más altos de exactitud se registraron para embriotóxicos débiles y fuertes, y fueron del 83 y 81%, respectivamente. La exactitud más baja se registró obviamente para los agentes no embriotóxicos, con un 70%. La predictibilidad para embriotóxicos fuertes fue del 100%. Mientras que para no embriotóxicos y embriotóxicos débiles fue del 70 y 72%, respectivamente.

1.7 LIMITACIONES Y MEJORAS PROPUESTAS AL ENSAYO EST

1.7.1 Limitaciones de la prueba EST

Una de las limitaciones presentadas en el desarrollo de este método es el tiempo de exposición de las células a las sustancias químicas de ensayo, siendo relativamente largo pues supone la exposición durante 10 días. El procedimiento del desarrollo del método también resulta laborioso pues requiere dos cambios de medio de cultivo (días 3 y 5), que son preparados especialmente con cada una de las 6-8 diferentes concentraciones de compuesto empleadas en cada ensayo. Además, el método EST requiere también de cultivos celulares en monocapa para la obtención de IC50D3 y IC50T3 mediante el ensayo de citotoxicidad del MTT, el cual determina la viabilidad de las células tras 10 días de exposición a la sustancia evaluada.

La complejidad técnica es también un factor a tener en cuenta, porque utiliza cultivos celulares de EBs en “gota colgante” para las pruebas de alteraciones en la diferenciación de las células D3. Esto supone un procedimiento laborioso debido a que se deben sembrar y evaluar individualmente más de 300 EBs en cada ensayo.

Además, la cuantificación del grado de diferenciación de los EBs tratado desde células indiferenciadas hasta cardiomiocitos latientes se basa en la determinación mediante microscopía óptica de si el EB generado tras 10 días de exposición es o no contráctil, por lo cual no considera criterios de valoración molecular para detectar la diferenciación cardíaca, siendo esto también una fuente de variabilidad adicional en la determinación de la diferenciación, ya que no se tiene en cuenta que la diferenciación del EB puede ser parcial y no total, y que entre los distintos EBs podría haber diferencias en el área con capacidad de contracción. Además, el EST no proporciona información acerca de las alteraciones morfológicas causadas por el teratógeno como lo hacen otros métodos por ejemplo, el método del embrión entero en cultivo (WEC) (Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2017).

Como la mayoría de los métodos *in vitro*, la ausencia de competencia metabólica en el método EST es también un factor limitante (Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2017). Esta limitación ha sido reconocida como otro factor potencial que podría afectar los resultados experimentales del método EST y la correcta clasificación de las sustancias analizadas (Verwei et al., 2006).

1.7.2 Mejoras propuestas para la prueba EST

Mejoras para optimización

Aunque el método EST ha pasado ya los correspondientes estudios de pre-validación y validación, ECVAM concluyó que el método no está listo para reemplazar a los actuales ensayos con animales de toxicidad para el desarrollo (Balls., 2002).

El EURL-ECVAM concluyó posteriormente que el método es susceptible de mejoras y todavía no está listo para ser utilizado con finalidades reguladoras pues todavía debe mejorar sobre todo en la discriminación entre embriotóxicos débiles y no embriotóxicos (Spielmann et al., 2006). Así, el EURL-ECVAM ha sugerido varias recomendaciones para mejorar la prueba EST, destacando la necesidad de criterios de valoración basados en la cuantificación de los procesos de diferenciación mediante la utilización de marcadores específicos.

Para optimizar el funcionamiento del método EST se han propuesto, entre otras, las siguientes modificaciones:

- 1) La utilización de los datos *in vitro* en combinación con estudios de farmacocinética (Verwei et al., 2006);
- 2) La optimización de los protocolos de cultivo de células D3 (de Smedt et al., 2008; Marx-Stoelting et al., 2009);
- 3) La utilización de sistemas automatizados de procesamiento de imágenes (Paparella et al., 2002; Peters et al., 2008);
- 4) La cuantificación de la diferenciación por la expresión de genes como la actina y la cadena pesada de la miosina (Seiler et al., 2004);
- 5) La discriminación entre los efectos sobre la proliferación y la diferenciación celular (van Dartel et al., 2009);
- 6) El empleo como variable la diferenciación inducida por factores tróficos apropiados de células D3 hasta células endoteliales y la cuantificación del grado de dicha diferenciación por medio de los marcadores específicos de este linaje (Festag et al., 2007a; Festag et al., 2007b);
- 7) La cuantificación de la diferenciación celular mediante citometría de flujo (Buesen et al., 2009)
- 8) La sustitución de las células D3 por otras células troncales embrionarias de ratón;
- 9) La sustitución de la prueba de MTT para otros ensayos de viabilidad;
- 10) La generación de los EBs por agitación horizontal o en suspensión en lugar de las gotas colgantes; 11) reducir a 2 (sí / no) las categorías de embriotoxicidad;
- 11) El empleo de un protocolo de diferenciación celular que además de cardiomiocitos incluye diferenciación a tejido neuronal, cartílago, tejido vascular y hueso (Max- Stoelting et al., 2009);
- 12) La utilización de transcriptómica (van Dartel et al., 2010a)
- 13) Una reducción del tiempo de exposición combinada con la utilización de la transcriptómica (van Dartel et al., 2010b);

- 14) La mejorar la capacidad de distinción entre embriotóxicos débiles y no embriotóxicos refinando las funciones estadísticas empleadas en el ensayo original validado y disminuyendo el tiempo de 10 a 5 días (Di Guglielmo et al., 2010).

Proteómica

También se ha planteado la adaptación del protocolo EST a líneas de células madre embrionarias humanas (Stummann et al., 2009) y la medida de alteraciones basadas en proteómica (Osman et al., 2010). En los últimos años, se ha propuesto la evaluación en los cambios de expresión de los genes *Hand1* y *Cmya1*, el primero es un factor de transcripción esencial para el desarrollo del corazón de los mamíferos, mientras que el segundo, es una proteína implicada en la morfogénesis cardíaca. En este caso se evaluó la capacidad predictiva de ambos genes para la prueba de embriotoxicidad EST. Los resultados mostraron la expresión de *Hand1* y *Cmya1* desde día 6 de diferenciación de células ES en cardiomiocitos, además se demostró que la determinación quimioluminiscente mediante el ensayo del gen reportero de la luciferasa, incorporando este gen delante del promotor de genes marcadores de diferenciación a cardiomiocito (*Hand1* y *Cmya1*) puede fácilmente medir la expresión de estos genes en células ES y ofrecer una alta predictibilidad y precisión en menos tiempo y con mayor simplicidad en comparación con el protocolo del método EST original (Suzuki et al., 2011).

Adaptaciones a detección de neurotoxicidad

Varios esfuerzos se han realizado para detectar sustancias neurotóxicos en el desarrollo de enfoques basados en la EST. En este sentido, Theunissen y colaboradores (2010) propusieron un protocolo abreviado para promover la diferenciación neuronal y reprimir la diferenciación mesodérmico utilizando EB de D3 expuestos a RA. Este modelo fue útil para estudiar la neurotoxicidad al desarrollo de varios productos químicos como el metilmercurio (Theunissen et al., 2011) y otros como el ácido valpróico (VA), ciproconazol, hexaconazol (Theunissen et al., 2012a), acetaldehído, carbamazepina, flusilazol, monoethylhexyl ftalato, PG y fenitoína, a través de transcriptómica y el análisis estadístico de componentes principales (Theunissen et al., 2012b). Se ha demostrado también que un enfoque combinado que incorpora clásico EST con el enfoque EST neuronal puede mejorar la detección tóxico para el desarrollo sobre ensayos individuales (Theunissen et al., 2013).

El EURL-ECVAM ha emitido recomendaciones con el fin de superar algunas de las limitaciones del método, las cuales incluyen (Spielman et al., 2006):

- 1) Desarrollar sistemas metabólicamente activos in vitro que se puedan integrar al método EST;
- 2) Implementar protocolos de diferenciación hacia otros linajes (endodermo y ectodermo) ya que el método actual se enfoca exclusivamente hacia un linaje específico (diferenciación a cardiomiocitos procedentes de mesodermo);
- 3) Elaborar modelos de predicción adicionales para fines específicos o clases de compuestos;

- 4) Mejorar la cuantificación de los procesos de diferenciación mediante genes marcadores específicos, métodos de inmunohistoquímica o de citometría de flujo (estos enfoques mejoran la cuantificación de las alteraciones en la diferenciación con respecto al método actual basado en el simple examen del latido de los cardiomiocitos);
- 5) Desarrollar modelos matemáticos y de farmacocinética para correlacionar las concentraciones de los productos químicos a los que se exponen las células en el ensayo in vitro con las concentraciones alcanzadas in vivo en suero; y,
- 6) Desarrollar e integrar un modelo in vitro para analizar el papel de la placenta.

Sobre las aportaciones previas en el grupo de investigación

En cuanto a estas recomendaciones mencionadas por el ECVAM para mejorar el método EST, miembros de nuestro grupo de trabajo han realizado algunas aportaciones en lo que se refiere al punto número 4 anteriormente descrito. El estudio publicado en la revista *International Journal of Toxicology* (Pamies et al., 2010a) evaluó la expresión de varios genes en presencia de un amplio rango de concentraciones de 5FU, un compuesto fuertemente embriotóxico utilizado como agente quimioterapéutico. El estudio determinó que la exposición a este compuesto a concentraciones entre 0,01 y 10 nM causó una significativa disminución de la expresión del gen de la α -fetoproteína (marcador de endodermo visceral) tanto en EBs como en cultivos en monocapa de células D3. Además estas concentraciones fueron muy inferiores a la concentración de 5-FU que causó una caída total de la viabilidad celular (200 nM). Sin embargo, la expresión de varios genes marcadores de mesodermo no se afectó significativamente a estas mismas concentraciones, lo que indica una alta sensibilidad al 5FU de la diferenciación de las células madre hacia endodermo visceral. Esto sugiere que la expresión de alfa-fetoproteína podría incluirse en la batería de genes marcadores a utilizar en ensayos de embriotoxicidad in vitro con células madre embrionarias (Pamies et al., 2010a).

Aproximaciones planteadas en este trabajo

En este trabajo se plantea estudiar la posibilidad de utilización de otros genes marcadores de linajes celulares diferentes al mesodermo (Spielman et al., 2006), como indicadores de embriotoxicidad, con un total de 16 genes evaluados. De esta manera, se tuvo en cuenta las recomendaciones del EURL-ECVAM, en donde se propone la implementación de cambios en la prueba EST, dirigidos a mejorar la cuantificación de las alteraciones en la diferenciación de las células expuestas a compuestos potencialmente embriotóxicos mediante genes marcadores de diferenciación (Spielmann et al., 2006; Marx-Stoelting et al., 2009). Además, consideramos que también sería útil una reducción de la duración de la prueba (10 días a 5 días) y una simplificación técnica en los procedimientos, debido a que el protocolo actual establece cultivos de células D3 en monocapa y el protocolo EST utiliza cuerpos embrionarios (más de 300 en cada prueba individual).



2 OBJETIVOS

El análisis de los resultados del ensayo de validación del ensayo EST muestra como la predictibilidad para embriotóxicos fuertes fue del 100%, mientras que para embriotóxicos débiles y no embriotóxicos fue del 70 y 72%, respectivamente; lo que llevó a una predictibilidad global del 80% (Pamies et al., 2011; Pamies et al., 2017). Así pues, cualquier modificación del protocolo que ayude a mejorar la predictibilidad, así como la robustez de su base científica, supondría un impulso notable del método EST hacia su uso con finalidades reguladoras, al reemplazo de la experimentación animal y a su aplicación en la investigación básica de fenómenos de embriotoxicidad.

Además, en secciones anteriores de esta Memoria de Tesis Doctoral ha quedado suficientemente justificada la necesidad de mejoras en el método EST convencional reclamada por EURL-ECVAM y que se centrarían primordialmente en dos aspectos: 1) la necesidad de monitorizar alteraciones en la diferenciación celular de manera más cuantitativa que la simple determinación de si el cuerpo embrionario se ha diferenciado o no en un cardiomiocito latente; y, 2) la necesidad de introducir criterios de detección de alteraciones en la diferenciación hacia linajes diferentes del mesodermo (linaje del cual derivan los cardiomiocitos latentes utilizados actualmente en el ensayo convencional).

Además, nosotros también consideramos que una reducción de la duración total del ensayo (10 días en el protocolo validado) y una simplificación técnica de los procedimientos también serían bienvenidas por la Industria y los investigadores que lo utilizan.

Todo ello nos llevó a fijar el objetivo general y los objetivos específicos que se detallan a continuación.

Objetivo general

Implementar mejoras en el protocolo del ensayo de embriotoxicidad de las células madre embrionarias de ratón que ayuden a mejorar su predictibilidad, reduciendo si es posible su complejidad técnica y duración, y que doten al ensayo de una base molecular que facilite su utilización en la investigación científica básica y en aplicaciones reguladoras.

Objetivos específicos

1 Desarrollar y valorar la medida de alteraciones en la expresión de genes biomarcadores de los tres principales linajes embrionarios como criterio de monitorización de alteraciones en la diferenciación espontánea de células D3 en el ensayo de células madre embrionarias de ratón.

2 Valorar si es posible la utilización de la medida de alteraciones en la expresión de genes biomarcadores de funciones celulares básicas como criterio de monitorización de alteraciones en la diferenciación espontánea de células D3 en el ensayo de células madre embrionarias de ratón.

- 3 Verificar la predictibilidad de los modelos matemáticos de predicción de potencia embriotóxica del ensayo convencional de embriotoxicidad de células madre embrionarias de ratón sustituyendo el parámetro empleado para monitorizar las alteraciones en la diferenciación inducidas por agentes embriotóxicos por parámetros relacionados con cambios en la expresión génica.
- 4 Simplificar la complejidad técnica del ensayo convencional de embriotoxicidad de células madre embrionarias de ratón utilizando exclusivamente cultivos en monocapa.
- 5 Reducir la duración total del ensayo convencional de embriotoxicidad de células madre embrionarias de ratón de 10 a 5 días.



3 MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1.1 Disoluciones de los compuestos modelo

A continuación, se describe la preparación de las disoluciones de los compuestos modelo utilizados en los experimentos de la presente Tesis de Doctorado. De igual manera en la Tabla 3.1 se presenta la información de cada una de las especificaciones técnicas de los compuestos modelo empleados en este estudio.

5-Fluorouracilo (5-FU): La disolución concentrada inicial (1 mg/ml) de 5-FU, es decir la disolución madre, se preparó pesando 22.6 mg de 5-FU y disolviéndolos en 22.6 ml de PBS. Esta disolución se conservó a 4 °C. A partir de esta disolución madre de 5-FU se prepararon disoluciones de 10 µg 5-FU/ml llevando 0.1 ml de disolución madre a 10 ml de volumen final con PBS. Esta disolución se filtró y alicuotó en tubos Eppendorf que se conservaron a 4 °C.

Ácido retinoico (RA): Se pesó de 9 mg de RA que se disolvieron en 1 ml de DMSO. Así la concentración de la disolución madre quedó en 9 mg/ml, la cual se llevó a 1 mg/ml y se diluyó con DMSO hybri-max filtrado y que posteriormente se pasó por un filtro de 0.22 µm. La disolución de 10 µg/ml se hizo adicionando 100 µl de la anterior disolución (1 mg/ml) a 9.9 ml de DMSO. Fue necesario hacer una dilución más a 1 µg/ml agregando 100 µl de la tercera disolución (10 µg/ml) a 900 µl de DMSO. Las disoluciones se conservaron a 4 °C, en tubos Eppendorf oscuros, protegidos de la luz.

Difenilhidantoína (DPH): La solución stock debe estar a una concentración de 10 mg/ml. Para preparar esta concentración se pesó 103.6 mg de DPH y se agregó a 10,36 ml de PBS. Se conservó a 4 °C.

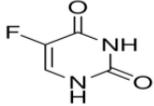
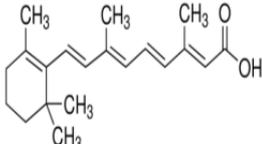
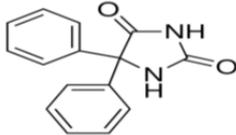
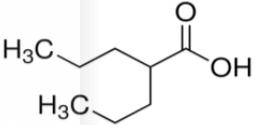
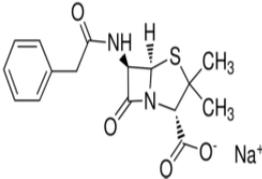
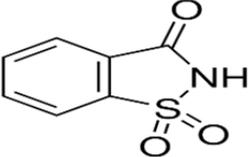
Ácido valproico (VA): La disolución stock se preparó a 50 mg/ml en etanol. Se conservó a 4 °C.

Cloruro de litio (LiCl): Se pesaron 8 g de LiCl y se disolvieron en 25 ml de PBS quedando una concentración final de 0.32 g/ml. Se conservó a 4 °C.

Penicilina G (PG): La solución stock de PG fue de 10 mg/ml y se preparó en PBS. Las diferentes concentraciones del compuesto se utilizaron a 100 mg/ml. Se conservó a 4 °C.

Sacarina: La concentración inicial fue de 3 mg/ml. Para esto se pesó 30 mg de sacarina y se diluyó en 10 ml de PBS (filtrado en membrana de 0.25). Se alicuotó en Eppendorf de 1.5 ml. Se conservó a 4 °C.

Tabla 3.1 Características técnicas de los compuestos modelo empleados en esta Tesis Doctoral.

Compuesto modelo	Procedencia-Referencia	Pureza y peso molecular	Formula Química (Numero CAS)	Estructura Química, nombre IUPAC y Sinónimos
5-fluorouracilo (5-FU)	Sigma-Aldrich Química España S.A. Referencia: F6627	>99% 130,08 g/mol	$C_4H_3FN_2O_2$ (51-21-8)	 2,4-dihidroxi-5-fluoropirimidina, 5-FU/5-fluoro-2, 4 (1H, 3H)-pirimidindiona.
Ácido retinoico (RA)	Sigma-Aldrich Química España S.A. Referencia: R2625	>98% 300,44 g/mol	$C_{20}H_{28}O_2$ (302-79-4)	 ATRA/tretinoína/vitamina A/ ácido all-trans-ácido retinoico.
Difenilhidantoína (DPH)	Sigma-Aldrich Química España S.A. Referencia: D4505	>99% 252,27 g/mol	$C_{15}H_{12}N_2O_2$ (630-93-3)	 5,5-difenil-2,4-Imidazolidindiona, 5,5-difenilhidantoína/fenitoína
Ácido valproico (VA)	Fluka Referencia: 05194	>98% 144,21 g/mol	$C_8H_{16}O_2$ (99-66-1)	 Acido 2-ropilpentanoico/
Cloruro de litio (LiCl)	Sigma-Aldrich Química España S.A. Referencia: L9650	>99% 42,39 g/mol	LiCl (7447-41-8)	LiCl
Penicilina G (PG)	Fluka Referencia: P3032	>98% 356,37 g/mol	$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$ (69-57-8)	 Sal sódica de bencilpenicilina/sal sódica penicilina G.
Sacarina	Sigma-Aldrich Química España S.A. Referencia: S6047	>99% (183.185)	$C_7H_5NO_3S$ (81-07-2)	 Sinónimos: 2,3-dihidroxi-1,2-benzisotiazol-3-un-1,1-ióxido/imida del ácido 2-sulfobenzoico/O-benzoico sulfimida.

3.1.2 Tampones

TBE: Utilizado en la preparación de los geles de agarosa. Composición: Tris 100 mM/ácido bórico 90 mM/EDTA 2 mM pH 8.3. Producto de la marca PRIME 5; suministrado por Fischer Scientific (Madrid, España).

TE: Tampón empleado para disolver los cebadores (*primers*) que luego serían utilizados en la reacción de PCR. Se utiliza para disolver el ADN. Composición: Tris-HCl 10 mM/ EDTA 1 mM, pH 8.

TNE: Se utilizó para la medición de los ácidos ribonucleicos. Composición: EDTA 1 mM/Trizma Base 0.01 M/NaCl 0.2 M, pH 7,4.

Tampón de carga 6x (Loading Buffer): Compuesto de 20% w/v de Ficoll con 0,25% m/v de azul de bromofenol y Na₂EDTA 10 mM. Suministrado por Invitrogen (Prat de Llobregat, Barcelona, España).

Tampón fosfato salino (PBS): Se preparó con los siguientes componentes: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, en agua destilada. El pH fue ajustado a 7.4 con HCl 1 M y fue posteriormente autoclavado. Utilizado en los cultivos celulares para lavar las células.

3.1.3 Reactivos y disoluciones utilizados en cultivos celulares

Agua DEPC: Se preparó con 0.1 ml de dietil pirocarbonato suministrado por Sigma-Aldrich Química S.A. (Barcelona, España), llevados a 100 ml con agua destilada.

Medio DMEM Glutamax: Medio DMEM (Dulbeco Modified Eagle Medium) Glutamax, suministrado por Sigma Aldrich, el cual contiene 4.5 g/l de glucosa. Conservado a 4 °C.

Suero Fetal Bovino (FBS): Fue suministrado por Linus y se conservó a -20 °C.

Tripsina/EDTA: Se utilizó Trypzean Solution 1x. Es una solución de tripsina bovina recombinante en una solución de PBS sin calcio ni magnesio y con EDTA 1 mM. Almacenado a -20 °C. Suministrado por Sigma-Aldrich Química S.A. (Barcelona, España).

β-mercaptoetanol: Suministrado por Invitrogen (Prat de Llobregat, Barcelona, España). Concentración de 0.1 mM. Almacenado a 4 °C.

Aminoácidos esenciales: Glicina 750 mg/l, L-alanina 890 mg/l, L-asparagina 1320 mg/l, L-ácido aspártico 1330 mg/l, L-ácido glutámico 1470mg/l, L-prolina 1150 mg/l, L-serina 1050 mg/l. Suministrado por Gibco (Barcelona, España). Fue conservado a 4 °C.

Factor de inhibición de la leucemia (LIF, Leukemia Inhibitory Factor): Los viales de 1 ml con 10^6 unidades de LIF fueron suministrados por Chemicon/ Millipore (Billerica, MA, USA) y se conservaron a 4 °C.

Penicilina 5000 U/ml, estreptomicina 5 mg/ml y neomicina 10 mg/ml: La disolución de antibióticos a las concentraciones señaladas fueron conservados a -20 °C. Suministrado por Sigma Aldrich Química S.A. (Barcelona, España).

Azul Tripán 4 g/l: Se preparó a partir de 0.5 g del reactivo colorante Azul Tripán (Trypan blue) y se disolvió en 100 ml de agua destilada. Se tomaron 80 ml de esta solución y se agregaron 20 ml de una disolución de NaCl al 4.4% p/v (se pesó 0.44 g y se añadió a 10 ml de agua destilada). Una vez preparada la disolución se filtró con una Jeringa Millipore Millex de 0.20 μm y se conservó a temperatura ambiente hasta su uso. Suministrado por Sigma-Aldrich Química S.A. (Barcelona, España).

Gelatina. Se utilizó gelatina porcina tipo A suministrada por Sigma-Aldrich Química S.A. (Barcelona, España). La disolución de trabajo fue 0.1 % (p / v) de gelatina en PBS (500 mg gelatina en 500 ml de PBS pH 7.4).

Reactivo MTT: Su forma de presentación es en polvo amarillento. Este reactivo fue almacenado a 4 °C en oscuridad absoluta. Para los ensayos se preparó un stock en medio MEM suplementado con FBS sin rojo fenol a una concentración de 5 mg/ml y tras un filtrado se mantuvo a 4 °C en oscuridad en periodos de hasta un mes. Inmediatamente antes de realizar el ensayo se preparó una disolución a 1 mg/ml por dilución del stock descrito anteriormente en FBS al 20% y PBS.

DMSO (dimetilsulfóxido): Es un líquido orgánico sin color, considerado como el de uso más frecuente entre los criopreservantes, pues actúa como un agente penetrante, es decir es permeable a través de las membranas de las células, esto permite desplazar el agua del interior de la célula evitando así la formación de cristales de hielo intercelulares que rompen las membranas. Se utilizó en el protocolo de congelación de las dos líneas celulares al 10%. Se usó para la disolución de RA. También se usó para el procedimiento del método MTT con el fin de lisar las células y disolver cristales de formazán, estabilizando el color para una correcta lectura espectrofotométrica. Este producto fue suministrado por Sigma-Aldrich Química S.A. (Barcelona, España).

3.1.4 Reactivos y disoluciones empleados en los protocolos de biología molecular

Bromuro de etidio: Agente intercalante de los ácidos nucleicos que emite fluorescencia (luz roja-anaranjada) cuando se irradia con luz ultravioleta y que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN. Se utilizó para marcar las muestras de estudio en los procesos de electroforesis. Se almacenó protegido de la luz dentro de la campana de flujo laminar donde se realizaron los geles. Marca AMRESCO y se obtuvo de Iberlabo S.A. (Tarragona, España).

Ditiotreitol DTT. Está incluido en el kit de PCR suministrado por Roche. Ditiotreitol es un agente capaz de reducir los enlaces disulfuro de las proteínas, permitiendo desplegar completamente la estructura secundaria del ARN y facilitando el inicio y reacción de la retrotranscripción.

dNTPs (deoxyribonucleotidos trifosfato): Contiene los cuatro nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Se disolvió en agua DEPC a una concentración final de 10 mM. Se conservó en viales de 100 µl a -20 °C. Suministrado por TAKARA BIO INC (Otsu, Japón) e Invitrogen.

Cloroformo (CHCl₃): Utilizado para la extracción de ADN de lisados celulares.

Etanol: Se utilizó en la extracción de ARN, para lavar el pellet. Debe conservarse a -20 °C y al 75%.

Geles de Agarosa: Para la preparación de los geles se utilizó la agarosa al 1.2% en tampón TBE 0,5 x. La agarosa se disolvió en el tampón por calentamiento en un microondas convencional. Una vez fundida la agarosa se añadió una gota de bromuro de etidio dentro de una campana de flujo tipo 3. Esta mezcla se sirvió en una cubeta con un peine se dejó polimerizar durante algún tiempo y posteriormente se sembraron las muestras en estudio. A continuación, mediante un transiluminador de luz ultravioleta se permitió la visualización de las bandas de los ácidos nucleicos separados en la electroforesis. Suministrada por Seakem LONZA (Basel, Switzerland).

Inhibidores de ARNasa: Se agregaron 0.5 µl del stock que contiene 40 U/µl a cada muestra, se utilizó como inhibidor en la reacción de la retrotranscripción de ARN a cADN para suprimir las posibles ARNasas que pueden haber disueltas y que podrían interrumpir el proceso de retrotranscripción. Suministrado por Invitrogen (RNaseOUT) (Prat de Llobregat, Barcelona, España) y conservado a -20 °C.

Isopropanol: Se utilizó para precipitar el ARN. Debe estar a -20 °C. El isopropanol se usó al 100%.

Kit de PCR. Para la realización de las RT-PCRs se utilizó el kit Expand High Fidelity PCR System de Roche. Almacenado a -20 °C hasta su uso.

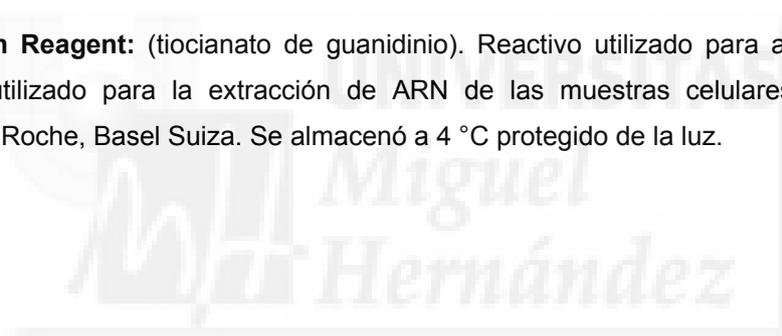
Kit de retrotranscripción. Para la reacción de retrotranscripción se utilizó la enzima Expand Reverse Transcriptase de Roche. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Kit de RT-PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR). Para la realización de las qPCR se utilizaron dos kits dependiendo del sistema utilizado (Taqman o SYBR Green). Para las qPCR realizadas con SYBR Green se utilizó el kit Power SYBR Green Master Mix, mientras que para las qPCR realizadas con Taqman se utilizó el kit Taqman Master Mix, ambos de Applied Biosystems. Los kits fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

Marcador de peso molecular: Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Se utilizó para cada pocillo 1 µl del stock diluido de 10 µg/µl en 8 µl de agua DEPC, junto a 1 µl de tampón de carga.

Poli(dt)s: Producto liofilizado diluido en condiciones estériles con agua DEPC hasta una concentración de 20 pM, alicuotado en viales de 50 µl. Suministrado por Roche y almacenado a -20 °C.

TriPure Isolation Reagent: (tiocianato de guanidinio). Reactivo utilizado para aislar ADN, ARN y proteínas. Fue utilizado para la extracción de ARN de las muestras celulares de la línea D3. Suministrado por Roche, Basel Suiza. Se almacenó a 4 °C protegido de la luz.



3.2 EQUIPOS EMPLEADOS

3.2.1 Equipamiento general

Microscopio

Se utilizó un Microscopio Olympus CKX-41 con contraste de fases, fuente de iluminación y objetivos invertidos, para el seguimiento habitual de los cultivos celulares, control morfológico, visualización de las células, viabilidad, conteo celular, multiplicación y evaluación de su progreso a lo largo de los experimentos.

Elementos de esterilización y desinfección

Para conservar un ambiente estéril en la manipulación de las muestras y los cultivos celulares, se utilizaron cabinas de flujo laminar de tipo II, ESCO class II Type A2, con sistema de filtración integrado. Los filtros independientes de impulsión y extracción dan una eficiencia del 99,999% para tamaños de partículas de 0,1 a 0,3 μm . Posee dos filtros ULPA (Ultra Low Penetration Air) de larga duración con mejor capacidad filtrante que los filtros convencionales HEPA (High Efficiency Particulate Air) H13, y tiene una corriente suave de flujo laminar vertical. Antes y después de utilizar la cabina se desinfectó impregnándola con etanol 70%. Además, un volumen de etanol (50ml) se pasó por la goma unida a la bomba de vacío, utilizada antes y después del trabajo en la cabina. Una vez al mes se utilizó BIOCIDAL ZF Wak-ZF-6 (Wak Chemie Medical GMBY, CymitQuímica, Alemania) para la limpieza de la cabina y la de los incubadores utilizados en el mantenimiento de los cultivos celulares.

Los materiales termo resistentes se autoclavaron en una autoclave eléctrica para esterilización a vapor SELECTA presoclave modelo 75 por medio de calor húmedo a una temperatura de 121 °C, a 1 atmósfera de presión (30 min).

Incubadores

Se usaron según la línea celular utilizada para cada experimento, con el fin de conservar la temperatura en una atmósfera controlada, con elevada humedad y tensión de CO₂.

Para cultivos indiferenciados de células de la línea D3 se utilizó un incubador MMM Medcenter CO₂ CELL 150, a 37 °C de temperatura, 95% de humedad y un porcentaje de CO₂ en la atmósfera del 1.5%. En el caso de los cultivos diferenciados de las líneas celulares D3 y fibroblastos 3T3, se usó un incubador de CO₂ SELECTA modelo 4000628 con una temperatura controlada de 37 °C, 95% de humedad y un porcentaje de CO₂ del 5%.

La limpieza de los incubadores se realizó mensualmente, mediante el cambio de agua y la remoción y lavado de las bandejas con BIOCIDAL ZF Wak-ZF-6 (Wak Chemie Medical GMBY, CymitQuímica, Alemania). A diario se realizó un control del nivel de CO₂, la temperatura y el porcentaje de CO₂.

Centrífugas

Se emplearon en las diferentes técnicas de cultivo celular (descongelación, tripsinización) y biología molecular (recogida de pellets en la extracción de ARN). Las centrifugas utilizadas fueron SELECTA MIXTASEL-BL y Eppendorf Centrifuge 5400R. En los protocolos de extracción de ARN se utilizó la centrifuga Eppendorf centrifuge 5415R con sistema de refrigeración (temperatura regulable de 0 a 40°C), fuerza centrífuga relativa: 16.110 x g.

Neveras, congeladores y crioconservación

En las neveras a 4 °C se almacenó el medio DMEM Glutamax, PBS, β-mercaptoetanol, aminoácidos esenciales, LIF, reactivo MTT, reactivo Tripure, entre otros. Y en los congeladores a -20 °C se conservó el Suero Fetal Bovino (FBS), soluciones enzimáticas como la tripsina/EDTA, agua DEPC (alícuotas), antibióticos, isopropanol, etanol, inhibidores de ARNasa, Poli(dt)s, dNTPs, tampón TE y kits utilizados en biología molecular (extracción ARN, retrotranscripción de los ARN mensajeros, PCR convencional y PCR cuantitativas de retrotranscripción: RT-PCR, sondas Taqman y SYBR-Green I, con los cebadores correspondientes), además de los cADN, que se conservan a esta temperatura.

En el congelador a -80 °C se conservaron las sustancias especialmente sensibles, como las muestras de ARN extraído.

Para el protocolo de congelación de líneas celulares se guardan los crioviales (pellets de células mezcladas en el medio de congelación) en el contenedor de congelación "Mr. Frosty", que logra una velocidad de enfriamiento necesaria para la crioconservación de las células ya que baja la temperatura 1 °C/minuto, evitando la formación de cristales, requiere un 100% de alcohol isopropílico.

Se usaron tanques de nitrógeno líquido para el almacenamiento de líneas celulares D3 y 3T3 fibroblastos a una temperatura de crioconservación de -196 °C.

Espectrofotómetro

Para la medida de la concentración de ARN obtenido mediante protocolo de extracción, se cuantificó la densidad óptica a 260 nm usando un Smartspect 3000 (Bio-Rad). Fue usado para determinar la concentración de ARN y evaluar su pureza. Una proporción de aproximadamente 2.0 entre la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm es generalmente aceptado como una muestra de ARN

puro. Si la proporción es sensiblemente menor puede indicar la presencia de proteína, contaminaciones de fenólicos u otros contaminantes que absorben cerca de 280 nm.

También se utilizó un espectrofotómetro WPA Biowave DNA biochrom que permite la determinación de la pureza del ácido nucleico, concentraciones y mediciones de densidad celular, etc.

Baño Termostático

Para atemperar los reactivos y disoluciones a 37°C en las técnicas de cultivo celular se utilizó un baño de la marca Termotronic P SELECTA.

3.2.2. Equipos para medida expresión génica

Material de electroforesis

La técnica de electroforesis permite la separación de las moléculas según su tamaño y movilidad en un campo eléctrico y se llevó a cabo mediante dos procedimientos descritos a continuación:

El primer procedimiento se realizó en una matriz porosa (gel de agarosa) usando como soporte una cubeta MINI-SUB CELL GT (Bio-Rad, California, USA), la cual fue conectada a una fuente de alimentación. La visualización de las electroforesis de los productos amplificados mediante la técnica de PCR, en la matriz porosa (gel agarosa), se hizo con un transiluminador modelo GEL DOC 2000, de la marca Bio-Rad, California, USA que permite la digitalización de los geles de electroforesis en proteínas y ADN, utilizando luz blanca y ultravioleta. El software usado fue GEL DOC para la toma de fotografías y manejo de la imagen.

Y el segundo procedimiento, fue a partir de un bioanalizador Agilent 2100 basado en electroforesis en gel con un chip de cristal desechable. Se utilizó el kit DNA1000 para ensayos de ARN (tamaño, cuantificación, productos de PCR), este instrumento facilita la separación y cuantificación de ADN, ARN y proteínas. El bioanalizador se basa en los patrones de movilidad electroforética de las muestras introducidas en una matriz de gel. Al introducir la muestra de RNA mensajero los ácidos nucleicos migran a través de estos microcanales y depósitos en miniatura interconectados a una velocidad proporcional a su tamaño siendo detectados al final del microcanal por un lector de fluorescencia. El número RIN (RNA integrity number) es un valor que relaciona la integridad del RNA y facilita la determinación objetiva de la calidad del RNA, en este caso del RNA extraído de la línea celular D3. Este valor de RIN va desde el 1 al 10, se basa en la cuantificación de productos de degradación del RNA a lo largo de toda su migración electroforética. Para el análisis se utilizó el kit Lab-on-a-Chip para RNA de Agilent Aplicando 1 µl de cada muestra. Los resultados se obtuvieron mediante el Software 2100 Expert Version B.02.07 que permite analizar el tamaño de los fragmentos,

alineamiento de los marcadores, cuantificación de las muestras (ADN o proteínas), reconocimiento automático de los picos, entre otras aplicaciones.

Termocicladores

Para el trabajo con PCR convencionales (no cuantitativas) y para el protocolo de retrotranscriptasa inversa de ARN mensajero se utilizó un termociclador GENEAMP PCR SYSTEM 9700 de Applied Biosystems y otro termociclador VERITI 96 Well Thermal Cycler Applied Biosystems (Madrid, España); con pantalla táctil y 96 pozos con bloque VeriFlex para 6 zonas independientes de temperatura (diferencias de 5 °C entre zona y zona) dando optimización a las reacciones de PCR.

Equipos de PCR cuantitativa

Se utilizó el Step One Plus de Applied Biosystems (Alcobendas, Madrid, España) en la realización de las PCR cuantitativas a tiempo real. Consiste en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre la muestra un haz de luz con una determinada longitud de onda que detectará la fluorescencia emitida de un fluoróforo, en nuestro caso Taqman y Sybergreen, que se insertará entre las hebras de ADN amplificadas y por tanto será proporcional a éstas. De esta manera y comparando la fluorescencia con la de un gen de referencia (housekeeping) se puede lograr la cuantificación de la expresión de los genes de interés. Este equipo permite realizar las PCR a tiempo real en placas de 96 pocillos aumentando el número de muestras a analizar. Mediante su tecnología flexiplex permite programar varias temperaturas de hibridación. El software empleado para el análisis de los datos fue el Step One Software 2.0.

Contador automático de células

El conteo de las células D3 y 3T3 se realizó con el contador de células manual de 4 dígitos hasta 9999, con puesta a cero con manecilla.

3.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTO DE CULTIVO CELULAR

3.3.1 Líneas celulares utilizadas

Los experimentos fueron realizados en las instalaciones de la Unidad de Toxicología y Seguridad Química del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para el presente estudio se utilizaron dos líneas celulares:

Células embrionarias D3 de ratón: Son una línea comercial establecida y permanente de células madre embrionarias de ratón. Se obtuvieron de un banco celular autorizado (American Type Culture Collection ATCC, Cat No CRL-1934, Rockville, MD, USA) (Doetschman et al., 1985), y fueron cultivadas siempre en monocapa de manera rutinaria en el laboratorio (Figura 3.1) para la implementación de mejoras en base a biomarcadores moleculares.

Fibroblastos 3T3 de ratón (Balb/c Clon A31): Obtenidas por colaboración del Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández de Elche, las cuales se observan en la Figura 3.1.

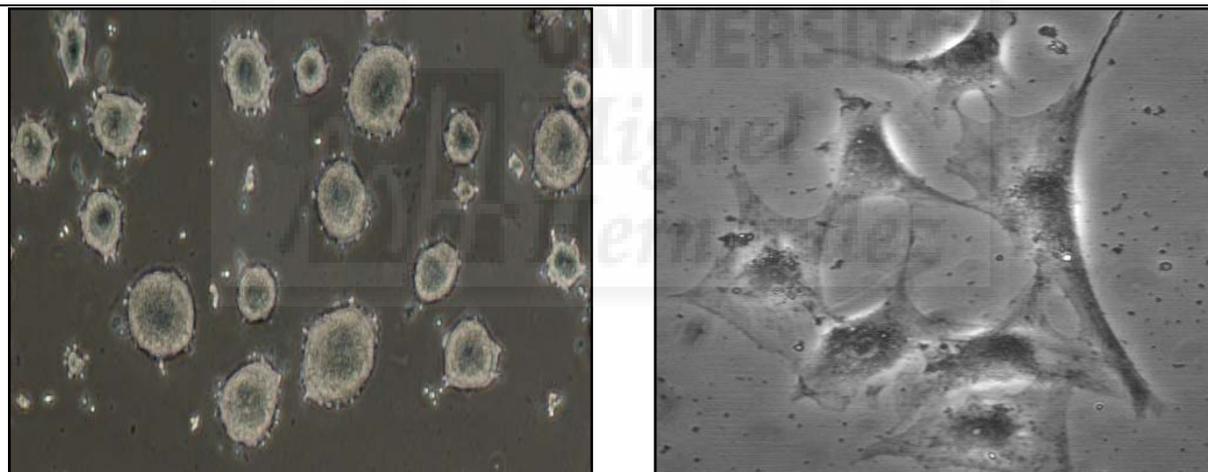


Figura 3.1 Células madre embrionarias de ratón de la línea D3 indiferenciadas (imagen izquierda) y de fibroblastos de ratón 3T3 (imagen derecha). Ambas fotografías tomadas con ampliación de 40x.

3.3.2 Medios de cultivo celular

Medio para mantener la indiferenciación de las células D3

Las células fueron cultivadas en Flask TPP de 75 cm², tratados previamente con gelatina. El medio de cultivo se preparó en DMEM con 4500 mg/l de glucosa, con los siguientes componentes:

- 15% (v/v) de FBS;
- 0,2% (v/v) de β -mercaptanol 0.1 mM;

- 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina/neomicina (5000 U/ml penicilina, 5 mg/ml estreptomicina, 10 mg/ml neomicina);
- 1% (v/v) de aminoácidos esenciales;
- 10^3 U LIF/ml de LIF.

Este medio de cultivo celular fue utilizado para el mantenimiento y crecimiento de las células embrionarias D3 en estado indiferenciado que posteriormente utilizamos en los experimentos.

Medio para inducir la diferenciación de las células D3

La misma preparación anterior pero en ausencia de LIF.

Medio de cultivo para la línea celular fibroblastos 3T3

El medio de cultivo para el mantenimiento de las células de fibroblastos 3T3 se preparó en DMEM 4500 mg/l de glucosa con los siguientes componentes:

- 10% (v/v) de FBS;
- 1% (v/v) de penicilina y estreptomicina (50 U/ml y 100 μ g /ml, respectivamente).

3.3.3 Tratamiento con gelatina del material utilizado para el cultivo celular

Las superficies de las placas de Petri (para experimentos de diferenciación celular espontánea), placas de 96 pocillos (para ensayos de MTT) y los flask TPP (para el crecimiento de células indiferenciadas) se gelatinizaron para ayudar a la adhesión celular y permitir el adecuado crecimiento celular. El procedimiento consistió en cubrir la totalidad de la superficie inferior de las placas y flask TPP con gelatina al 0.1% en PBS a 1x. Tras 10 minutos de incubación se eliminó la gelatina (líquida no solidificada) para finalmente cubrir las placas con medio de cultivo según las condiciones de cada caso.

3.3.4 Tripsinización de células en cultivo adherente

Este procedimiento se realizó con el fin de conseguir una suspensión celular desprendiendo las células de la superficie del cultivo por medio de la enzima tripsina que actúa rompiendo los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis. Esta suspensión anteriormente descrita se obtuvo retirando en primer lugar el medio de cultivo a las placas y/o flask TPP y agregando luego un volumen de PBS 1% para hacer un lavado, eliminando posibles restos celulares. Luego se eliminó el PBS, se añadió a cada una de las placas y/o flask TPP un volumen de 1-1.5 ml de una disolución de 0.05% Tripsina + 0.002% de Na_4 EDTA (Gibco, Invitrogen, Inglaterra) y se incubó a 37 °C durante 3 minutos (el tiempo varía según la adhesión y la confluencia celular). A continuación, se inhibió la reacción de

tripsinización añadiendo el doble de volumen de medio (diferenciación o indiferenciación, según sea el caso) que de la disolución Tripsina/EDTA. Finalmente, para recolectar las células la disolución se homogenizó bien repipeteando constantemente para que se desprendieran las células y para obtener una suspensión homogénea, esto conviene hacerlo con cuidado para evitar una muerte celular elevada. Se intentó arrastrar todas las células adheridas a la superficie de la placa. Posteriormente, se recogió la suspensión en un tubo Falcon de 15 ml de fondo cónico y se homogenizó de manera suave para realizar el recuento celular y la posterior siembra a la concentración deseada.

3.3.5 Recuento de células viables

Para realizar el recuento celular, se usó el método del azul tripán que es un colorante que penetra al interior de las células con roturas en la membrana. Se mezclaron 20 μ l de la suspensión celular previamente tripsinizada con 20 μ l de una solución de azul tripán al 0.4% en PBS al 1%. Se homogenizó la mezcla y se hizo el conteo por duplicado de las células viables, en una cámara de Neubauer. Aquellas células que fueron viables presentaron características como una forma circular, con el borde muy regular y sin tinción azul. La concentración celular de la suspensión original se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (células/ml)} = M_{CS} \cdot \text{Dilución} \cdot 10000$$

donde M_{CS} es la media de células contadas por cuadrado grande compuesto de 16 cuadrados pequeños de un volumen de 0.1 μ l. La dilución será generalmente 2, debido a que la dilución con la solución de azul tripán es siempre 1:1.

3.3.6 Descongelación de células

Las células utilizadas en cada uno de los experimentos se obtuvieron a partir de un stock de células almacenadas en nitrógeno líquido, las cuales fueron descongeladas según el procedimiento descrito a continuación. En primer lugar, se extrajo el criovial correspondiente del bidón con nitrógeno líquido y se colocó en un baño termostatzado a 37 °C, descongelándose rápidamente minimizando de esta manera la muerte celular; para diluir el DMSO del medio de congelación se resuspendió el volumen de suspensión celular contenida en el criovial y se mezcló con 8 ml de medio de cultivo que previamente se habían agregado a un tubo Falcon. Después se centrifugó a 800 rpm durante 3 minutos eliminando el sobrenadante. El precipitado resultante de células se resuspendió en el volumen de medio deseado. El número de las células congeladas se encuentra registrado en el criotubo así que se sembró según la densidad celular requerida para cada experimento. Al día siguiente se cambió el medio para eliminar los restos de DMSO ya que presenta cierta toxicidad en las células.

3.3.7 Congelación de células

Para la criopreservación de las células D3 y fibroblastos 3T3 se utilizó medio completo (80%) con 10% de FBS y 10% de crioprotector (DMSO). Las células fueron tripsinizadas como se indica en la sección 3.3.4 y tras el conteo se introdujeron en un tubo falcon de 15 ml que se centrifugó durante 5 minutos a 800 rpm. Se extrajo el medio y se resuspendieron las células en el medio de congelación a una densidad de 3×10^6 células/ml y se distribuyeron en crioviales de 1 ml. Se pusieron los viales en contenedor de congelación (Mr. Frosty) para evitar una disminución brusca de la temperatura y la formación de cristales. El contenedor con las células se sumergió en isopropanol y se introdujo a -80 °C por un día. Al día siguiente los viales fueron almacenados en nitrógeno líquido.

3.3.8 Cultivo en monocapa para crecimiento y diferenciación celular

Es posible mantener en cultivo las células madre embrionarias en un estado indiferenciado con el factor inhibidor de la leucemia (LIF) que frena su diferenciación, sin embargo, cuando el LIF se retira del medio las células inician una diferenciación espontánea ya sea mediante cultivos en suspensión o en monocapa. Para lograr el crecimiento y la diferenciación *in vitro* de las células madre embrionarias de ratón de la línea comercial D3 y el crecimiento de las células de fibroblastos 3T3 se empleó la técnica de cultivo en monocapa.

Se partió de una suspensión homogénea de células D3 indiferenciadas o de fibroblastos 3T3. Los cultivos celulares fueron suplementados con los medios de cultivo indicados en el apartado 3.3.2 según sea el caso: en ausencia del LIF para las células D3 en diferenciación espontánea en placas Petri P100 (para monitorizar la expresión génica) o en placas de 96 pocillos (para ensayar la pérdida de viabilidad celular); y en placas de 96 pocillos para los ensayos de citotoxicidad con células 3T3.

A partir de este momento (día 0), se dejaron las células en cultivo durante tres días bajo condiciones controladas de CO₂ (5%) y a 37 °C. Al tercer día de cultivo se retiró el medio sobrenadante con una pipeta Pasteur unida por medio de una manguera a una bomba de vacío, intentando no arrastrar las células que se encontraban adheridas en la superficie de las placas y se substituyó por medio fresco. Las sustancias embriotóxicas modelo se adicionaron al medio de cultivo a diferentes concentraciones inmediatamente antes del cambio de medio. El cultivo continuó en idénticas condiciones hasta el día 5 de exposición.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con 12 pocillos independientes por cada condición experimental, mientras que para los ensayos de expresión génica se utilizaron 3 placas P100 para cada concentración ensayada.

3.3.9 Exposición de los cultivos celulares a sustancias embriotóxicas modelo

Las sustancias embriotóxicas modelo seleccionadas en el presente estudio se especifican en la Tabla 3.2. Las sustancias utilizadas fueron empleadas en el estudio oficial de validación del método EST realizado por EURL-ECVAM y fueron extraídas de la base de datos del ECVAM. Teniendo en cuenta lo anterior, se incluyeron dos ejemplos de embriotóxicos fuertes, 3 ejemplos de compuestos embriotóxicos débiles y 2 ejemplos de sustancias no embriotóxicas.

Tabla 3.2 Compuestos modelo empleados en este estudio. Estos compuestos fueron seleccionados de entre los utilizados en el ensayo oficial de validación del método EST patrocinado por el EURL-ECVAM.

Embriotóxicos fuertes	Embriotóxicos débiles	No embriotóxicos
5-FU	DPH	PG
RA	VA	Sacarina
	LiCl	

3.3.10 Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad causada por la exposición a las sustancias embriotóxicas modelo, se evaluó mediante el método de viabilidad celular MTT, que corresponde al ensayo de citotoxicidad utilizado en el protocolo oficial del método EST (Genschow et al., 2004; 2000). Esta prueba se basa en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales para convertir el sustrato MTT amarillo en un producto formazán azul oscuro permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y por tanto su viabilidad. Así, la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, forma un compuesto coloreado de color azul (formazán) que permite evaluar la capacidad de la célula de sintetizar ATP y de la integridad de sus membranas mitocondriales. La cantidad de formazán formado está directamente relacionada con la cantidad de células viables presentes en el medio (Borenfreund et al., 1988).

Para determinar el efecto de la exposición de las sustancias embriotóxicas modelo mencionadas anteriormente (Tabla 3.2), en las células 3T3 fibroblastos (línea celular adulta) y D3 (línea de células madre embrionarias en diferenciación espontánea) se sembraron las células en monocapa a una densidad de 20.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron en presencia de las diferentes concentraciones de las sustancias químicas a ensayar. Cada condición fue probada en 12 pocillos independientes, durante 5 días (al día 3 de exposición se renovó el medio de cultivo con las sustancias embriotóxicas modelo).

En el día 5 de exposición se realizó el ensayo de viabilidad celular con MTT según lo descrito por Borenfreund (Borenfreund et al., 1988). Se retiró el medio de cultivo con las sustancias embriotóxicas y las células fueron incubadas con 200 µl de MTT (1 mg MTT/ml) en cada pozo (preparado en 60% (v/v) de medio esencial, más el 20% (v/v) de FBS), durante 3 horas a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Al final de este período el MTT se eliminó y las células fueron lavadas con tampón fosfato salino, el cual se retiró inmediatamente. A continuación, se adicionaron 200 µl de DMSO a cada pocillo con

el fin de lisar las células y disolver los cristales de formazán, se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se leyó las absorbancias resultantes a 540 nm y 690 nm en un lector de placas. A fin de calcular el efecto de la exposición a las sustancias químicas ensayadas sobre la viabilidad celular se asumió que las células control (no expuestas a sustancias embriotóxicas modelo) presentaban una viabilidad del 100%, se calculó como la diferencia entre 540 y 690. Los resultados se expresaron en porcentaje con respecto a estos controles.



3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.4.1 Extracción de ARN total

Se realizó mediante reactivo TriPure (Roche, Basel Suiza) por medio del procedimiento descrito por Chomczynski (Chomczynski y Sacchi., 1987; 2006). Los cultivos de células se tripsinizaron según la sección 3.3.4 después de la exposición a las sustancias embriotóxicas modelo. A continuación, se pasó el contenido de cada muestra a tubos Eppendorf y posteriormente se centrifugaron a 800 rpm, se retiró el medio sobrenadante y se dejó únicamente el pellet de células, es decir el precipitado de células de cada muestra a analizar. Al precipitado se añadió 1 ml de reactivo TriPure a temperatura ambiente y la mezcla se homogenizó con una micropipeta con el fin de lisar las membranas celulares. Tras incubación a temperatura ambiente durante 5 min se agregaron 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente (15 segundos), se realizó una incubación de 10 min a temperatura ambiente y se llevó a centrifugación (12000 x g, 15 minutos a 4 °C). El objetivo de este paso es separar las fases obteniendo de esta manera una fase de color rosa correspondiente a la fase proteica, una fase intermedia de color blanco que es el ADN, y una fase superior incolora correspondiente al ARN. Se tomaron 400 μ l de la fase incolora superior que contenía el ARN (con precaución de no arrastrar las otras fases) y se pasaron a un tubo estéril para posteriormente adicionar 500 μ l de isopropanol a -20 °C, invertir varias veces el tubo para facilitar la mezcla. Se incubó durante 8 min a temperatura ambiente para que se formara un precipitado de ARN antes de centrifugar a 12000 x g (10 min, 4 °C). Posteriormente se descartó el sobrenadante con cuidado y se añadió 1 ml de etanol para lavar el pellet de ARN. Se centrifugó a 7500 x g (5 min a 4 °C) y se volvió a descartar el sobrenadante. Finalmente se dejó secar completamente el pellet al aire durante unos minutos y se agregaron 25 μ l de agua DEPC al precipitado, se resuspendió e incubó la disolución a 55-60 °C durante 12 min, las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

El ARN que se obtuvo fue diluido en agua libre de ARNasas y se midió la concentración y pureza (cálculo de la ratio entre la absorbancia 260 y 280 nm). Para una pureza óptima la ratio debe de estar en torno a 1/2 o 2/1. A partir de la medida de la absorbancia 260 nm se utilizó un factor de conversión por el cual una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 40 μ g/ml de ARN.

3.4.2 Retrotranscripción de los ARN mensajeros

Este proceso se realizó con el protocolo establecido para obtener cADN a partir de ARN utilizando la enzima transcriptasa inversa (Expand Reverse Transcriptase; Roche, Basel, Suiza). Se hizo mediante dos pasos: primero se realizó la mezcla de 1 μ g ARN/ml de ARN total aislado de cada muestra con el agua y los poli(dt)s a una concentración 10 μ M. Esta mezcla se incubó 10 min a 65 °C y se introdujo en hielo con la finalidad de unir el poli(dt)s a las colas de poliadeninas presentes en los mARN. En la segunda fase tiene lugar la reacción de retrotranscripción, para esto se añadió a la mezcla anterior DTT (10 mM), dNTP's (1 mM), 20 unidades de inhibidor de ARNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y

50 unidades de enzima retrotranscriptasa. El volumen final de reacción fue siempre 20 μ l. Esta mezcla se incubó durante 60 min a 37 °C tras lo cual se desnaturalizó la enzima aumentando la temperatura hasta 93 °C durante 5 min. El ADN complementario (cADNs) así generados se conservaron a -20 °C.

3.4.3 RT-PCR y electroforesis convencional

Con el objetivo de comprobar si la extracción de ARN y el transcrito a cADN se obtuvieron de manera adecuada, se realizó una electroforesis convencional y una amplificación previa mediante la técnica de PCR. De esta manera se verificó la calidad del cADN obtenido de los experimentos mediante la amplificación de cADN para β -actina. Para la RT-PCR (Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa, del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*), se utilizó el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche, Basel, Suiza) utilizando 1 μ l de ADN complementario y una concentración final de cada cebador de 0.5 μ M, 0.2 μ M dNTP's y 1.5 unidades de enzima, todo ello en un volumen final de 25 μ l. El programa de termociclado consistió en 95 °C durante 5 min para la desnaturalización, seguido del número adecuado de ciclos, consistentes en tres fases de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a la temperatura de hibridación de los cebadores (60-70 °C) y 3 min a 72 °C. Terminados los ciclos, se procedió a una elongación final de 10 min a 72 °C.

Para la visualización de los productos amplificados en la reacción de PCR se utilizó la técnica de electroforesis, que permite la separación de las moléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz, en este caso en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio, los productos se analizaron corriendo 12.5 μ l del producto de PCR suplementado con tampón de carga (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, España) aplicando un campo eléctrico controlado. Las imágenes se tomaron a través del transiluminador. Adicionalmente, se midió la calidad del cADN en el bioanalizador de tecnología Agilent 2100 (Agilent Technologies), que también es un sistema de electroforesis en gel con un chip de cristal que facilita la separación y cuantificación de ADN, ARN y proteínas, se utilizó el kit Lab-on-a-Chip para ARN de Agilent Aplicando 1 μ l de cada muestra.

3.4.4 Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa de retrotranscripción (qRT-PCR)

La técnica de la PCR cuantitativa de retrotranscripción (qRT-PCR) incorpora un sistema de detección por fluorescencia que permite el seguimiento en tiempo real de lo que ocurre en cada ciclo de amplificación. Esta técnica se utilizó para cuantificar la expresión de algunos genes específicos como bioindicadores de embriotoxicidad, mediante comparación de la expresión génica de células control y de células expuestas a los diferentes compuestos embriotóxicos modelo para posteriormente determinar si causaron alteraciones significativas en los genes relacionados con la diferenciación celular. Para los experimentos realizados en esta Tesis de Doctorado se utilizó el equipo Step One Plus de Applied Biosystems.

Sonda TaqMan

Las sondas TaqMan poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (*quencher*). La sonda hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR. De esta manera la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa provoca la separación del *quencher* y se produce la emisión de fluorescencia. La expresión de los genes marcadores de diferenciación como: *Pnpla6* (*Patatin-like phospholipase domain containing 6*), *Wnt3* (*Wingless-related MMTV integration site 3*), *Cer1* (*cerberus 1 homologue-Xenopus laevis*), *Mesp1* (*mesoderm posterior 1*), *Cdk1* (*cyclin-dependent Kinase 1*), *Myc* (*myelocytomatosis oncogene*), *Shh* (*Sonic hedgehog*), *Nrcam* (*neuronal cell adhesión molecule*), *Mixl1* (*mix paired-like homeobox*), *Jun* (*Jun Oncogene*) y *Myo1e* (*Myosin 1E*), se determinó con el kit específico (sonda Taqman) suministrado por Applied Biosystems Alcobedas, Madrid, España. En la Tabla 3.3 se muestran las principales características de cada uno de los genes anteriormente mencionados.

Para la realización de los experimentos con la sonda TaqMan, se tomó como molde 2 μ l de ADN complementario, 10 μ l de Master Mix, 1 μ l de sonda Taqman y 7 μ l de volumen de agua DEPC, completando así un volumen final de 20 μ l.

SYBR Green I

La sonda SYBR-Green I, al igual que la sonda Taqman, es un fluoróforo específico que presenta una especial sensibilidad siendo capaz de detectar e identificar la producción de una única molécula bicatenaria, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. Mediante esta técnica, se evaluó la expresión del resto de genes utilizados en este estudio: β -actina, *Afp* (α -Fetoproteín), *Vegfa* (*Vascular endothelial growth factor A*), *Hdac7* (*Histone deacetylase 7*), *Flk1* (*Fetal liver kinase 1*) y *Nes* (*Nestin*). La Tabla 3.4, muestra información relevante acerca de los genes mencionados.

Se utilizó el kit Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche, Basel, Suiza), que contiene la sonda SYBR-Green I. Para ello se adicionó a la reacción 2 μ l de cADN, 10 μ l de Master Mix, 0.9 μ l de los cebadores correspondientes (la secuencia de los cebadores empleados y las temperaturas de hibridación para cada gen se indican en la Tabla 3.4) y un volumen de 6.2 μ l de agua DEPC. El programa de RT-PCR consistió en una primera desnaturalización y activación de la enzima de 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos (95 °C por 10 segundos + temperatura de hibridación durante 7 segundos + 72 °C a lo largo de 12 segundos).

Tabla 3.3 Sondas Taqman utilizadas en las qRT-PCR. Se muestran los genes cuya expresión se determinó mediante sondas Taqman así como las características del kit específico suministrado por Applied Biosystems. En todos los casos la temperatura de hibridación fue de 60 °C.

GEN	ESPECIE	PRODUCTO	AMPLICIÓN (pares de bases)
<i>β-Actina</i>	Mus musculus	Mm00607939_s1	115
<i>Pnpla6</i>	Mus musculus	Mm00450144_m1	65
<i>Myc</i>	Mus musculus	Mm00487804_m1	89
<i>Jun</i>	Mus musculus	Mm00495062_s1	81
<i>Shh</i>	Mus musculus	Mm00436528_m1	62
<i>Wnt3</i>	Mus musculus	Mm00437336_m1	86
<i>Cer1</i>	Mus musculus	Mm00515474_m1	125
<i>Mesp1</i>	Mus musculus	Mm00801883_g1	76
<i>Cdk1</i>	Mus musculus	Mm00772474_g1	81
<i>Nrcam</i>	Mus musculus	Mm01257700_m1	106
<i>Mix11</i>	Mus musculus	Mm00489085_m1	74
<i>Myo1e</i>	Mus musculus	Mm01173848_m1	82

Tabla 3.4 Cebadores empleados en las determinaciones de qRT-PCR con SYBR Green. Se muestra la secuencia de los cebadores y las temperaturas de hibridación utilizados para la determinación de expresión génica mediante s qRT-PCR con SYBR Green.

GEN	DIRECCIÓN 5' – 3'	DIRECCIÓN 3' – 5'	AMPLICIÓN (pares de bases)	T (°C)
<i>β-Actina</i>	CCCTAGGCACCAGGGTGTGA	TCCCAGTTGGTAACAATGC CA	128	62
<i>Afp</i>	GCTGCAAAGCTGACAACAAG	GGTTGTTGCCTGGAGGTTT C	142	63
<i>Vegfa</i>	CGTTCCTGTGAGCCTTGTTGAG	GCCTTGCAACGCGAGTCTG T	101	60
<i>Hdac7</i>	CCATGTTTCTGCCAATGTTTTGG	GCCGTGAGGTCATGTCCAC C	102	63
<i>Flk1</i>	CAGCCAGACAGACAGTGGGATGG TC	CCGAGGCCACAGACTCCCT GCTT	124	61
<i>Nes</i>	GCTTTCCTGACCCCAAGCTG	GGCAAGGGGGAAGAGAAG GA	108	61

Cuantificación de la expresión génica

El nivel de expresión de cada gen se cuantificó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen., 2001) utilizando como referencia la expresión del gen β -actina (control endógeno).

Los diferentes tratamientos no indujeron cambios significativos en la expresión de β -actina en ninguno de los casos. El número de ciclos térmicos (Ct) necesarios para alcanzar el umbral mínimo de fluorescencia predefinido osciló siempre en las muestras tratadas entre el 95 y el 102% del respectivo control (Figura 3.2). Solamente en las muestras expuestas a la más alta concentración de 5FU el número de Ct de las muestras tratadas se redujo al 91% del control. Esto demuestra que la elección de β -actina como gen de referencia es apropiada para normalizar la expresión génica de cada una de las placas individuales ya que no se ve afectada por ninguno de los tratamientos.

La expresión de cada gen en las muestras control no expuestas a agentes embriotóxicos (normalizada frente a la expresión del gen de β -actina en esa misma muestra control) se consideró el 100% de expresión de cada gen. La expresión de cada gen en las muestras expuestas a agentes

embriotóxicos modelo (normalizada frente a la expresión de β -actina en la misma muestra) se estimó en porcentaje con respecto a la expresión en la muestra control.

EMBRIOTÓXICOS FUERTES

5-fluorouracilo (5FU)		
[5FU] (ng/ml)	Cts	% Cts
0	17.68±0.09	100
10	17.84±0.10	101
25	17.81±0.22	101
50	17.43±0.12	99
100	16.03±0.52	91

Ácido retinoico (RA)		
[RA] (ng/ml)	Cts	% Cts
0	17.51±0.54	100
1	17.72±0.18	101
2.5	17.44±0.26	100
5	17.38±0.84	99
10	17.06±0.26	97

EMBRIOTÓXICOS DÉBILES

Difenilhidantoina (DPH)		
[DPH] (μ g/ml)	Cts	% Cts
0	18.81±0.40	100
15	18.82±0.59	100
40	18.52±0.22	98
75	18.01±0.36	96
150	18.58±0.21	98

Ácido valpróico (VA)		
[VA] (μ g/ml)	Cts	% Cts
0	16.50±0.14	100
100	16.39±0.16	99
200	16.70±0.07	101
300	16.67±0.24	101

Cloruro de litio		
[LiCl] (μ g/ml)	Cts	% Cts
0	17.65±0.41	100
200	17.36±0.30	98
400	17.93±0.99	102
500	17.79±0.46	101
800	16.97±0.17	96

NO EMBRIOTÓXICOS

Sacarina		
[Sacarina] (μ g/ml)	Cts	% Cts
0	17.07±0.89	100
100	16.94±0.51	99
250	16.36±0.26	96
500	16.28±0.51	95
1000	16.87±0.36	99

Penicilina G (PG)		
[PG] (μ g/ml)	Cts	% Cts
0	17.75±0.86	100
100	17.12±0.60	96
250	17.45±0.51	98
500	17.61±0.22	99
1000	17.08±0.52	96

Figura 3.2: Ct registradas para la expresión de β -actina. Se muestra el número de ciclos térmicos (media±d.e. para los tres replicados biológicos) necesarios en cada condición para alcanzar el umbral de fluorescencia fijado en los experimentos de expresión génica.

3.5 VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS

3.5.1 Cálculos de funciones de discriminación en ensayos de embriotoxicidad

La capacidad de cada gen de predecir correctamente la embriotoxicidad del compuesto modelo ensayado se valoró aplicando las mismas funciones lineales de discriminación y los criterios de clasificación utilizados en el protocolo de EST convencional (ver sección 1.6 en Introducción), pero con algunas modificaciones en sus variables. En la Tabla 3.5 se muestran las variables evaluadas en el método EST convencional y en la Tabla 3.6 se presentan las ecuaciones utilizadas en dicho procedimiento para predecir el potencial embriotóxico de las sustancias utilizando dichas tres variables. La primera de estas variables es la ID_{50} , determinada como la concentración con capacidad para inhibir la diferenciación del 50% de los EBs hasta cardiomiocitos latientes. Las otras 2 variables son las IC_{50D3} y la IC_{50T3} , que indican respectivamente las concentraciones con capacidad de reducir al 50% la viabilidad de las células D3 y 3T3 (Genschow et al., 2000). Estas tres funciones estadísticas permiten asignar al compuesto evaluado la categoría de no embriotóxico, embriotóxico débil o embriotóxico fuerte de acuerdo a los criterios mostrados en la Tabla 3.6.

Algunas de las modificaciones de los criterios establecidos en el EST convencional realizadas en este estudio se muestran en las Tablas 3.5 y 3.7. Estos nuevos parámetros se introdujeron en las funciones discriminantes del método EST convencional, en lugar de la variable ID_{50} (concentración del compuesto ensayado que provoca una disminución del 50% en la diferenciación espontánea de las células indiferenciadas D3 hasta cardiomiocitos). Los dos nuevos parámetros se muestran a continuación:

CE50 o *CE200*. Definidos como la concentración del compuesto evaluado capaz de causar, una reducción del 50% de la expresión del gen (para aquellos genes que repriman su expresión) en las células en diferenciación espontánea después de 5 días de la exposición; o bien que corresponde a la concentración del compuesto evaluado capaz de inducir un incremento del 200% de la expresión de aquellos genes que aumenten su nivel de expresión como consecuencia de la exposición (Tabla 3.5). Los parámetros *CE50* y *CE200* se aplicaron alternativamente dependiendo del efecto del compuesto embriotóxico modelo en la expresión (sobre-expresión o represión) del gen (Tabla 3.7).

Y, por último, IC_{50T3} e IC_{50D3} , se definieron como las concentraciones del compuesto capaces de reducir al 50% la viabilidad (medida por el método MTT) de cultivos en monocapa de células 3T3 y D3 respectivamente tras 5 días de exposición (Tabla 3.5).

Cada uno de los genes utilizados en este estudio produjo una clasificación (fuerte, débil o no embriotóxico) estimada según se presenta en la Tabla 3.7 para la sustancia de ensayo, considerando como la clasificación final del ensayo de esa categoría con mayor porcentaje de predicciones de genes individuales.

Tabla 3.5 Definición de las variables consideradas según los criterios del EST convencional y de las variables consideradas en el presente estudio.

VARIABLE	DEFINICION
<i>Usado en EST convencional y en este trabajo</i>	
IC503T3	Concentración del compuesto modelo capaz de reducir un 50% la viabilidad (MTT) en células 3T3.
IC50D3	Concentración del compuesto modelo capaz de reducir un 50% la viabilidad (MTT) en células D3.
<i>Usado en EST convencional</i>	
ID50	Concentración del compuesto modelo capaz de inhibir un 50% la formación de cardiomiocitos latentes en células D3 en diferenciación.
<i>Usado en este trabajo</i>	
CE50 (Si la expresión del gen disminuye)	Concentración del compuesto modelo capaz de reducir un 50% la expresión de un gen en células D3 en diferenciación.
CE200 (Si la expresión del gen aumenta)	Concentración del compuesto modelo capaz de aumentar un 200% la expresión de un gen en células D3 en diferenciación.

Tabla 3.6 Funciones lineales de discriminación y criterios de clasificación considerados en el método EST convencional para evaluar la embriotoxicidad potencial de los productos químicos. Datos tomados de Genschow et al., 2000. Los parámetros ID₅₀, IC₅₀D3 e IC₅₀3T3 necesariamente se expresan en µg/ml.

$I = 5.916 \log(IC_{50}3T3) + 3.500 \log(IC_{50}D3) - 5.307 [(IC_{50}3T3 - ID_{50}) / IC_{50}3T3] - 15.27$		
$II = 3.651 \log(IC_{50}3T3) + 2.394 \log(IC_{50}D3) - 2.033 [(IC_{50}3T3 - ID_{50}) / IC_{50}3T3] - 6.85$		
$III = -0.125 \log(IC_{50}3T3) - 1.917 \log(IC_{50}D3) + 1.500 [(IC_{50}3T3 - ID_{50}) / IC_{50}3T3] - 2.67$		
Embriotóxico fuerte	Embriotóxico débil	No embriotóxico
III > I	II > I	I > II
y	y	y
III > II	II > III	I > III

Tabla 3.7 Funciones lineales de discriminación y criterios de clasificación empleados en este trabajo para evaluar el potencial de embriotoxicidad de productos químicos mediante el empleo de genes biomarcadores. Se incluyeron dos nuevos parámetros a evaluar los cuales se introdujeron en las funciones discriminantes del método EST validado. Así, CE50 corresponde a la concentración del compuesto evaluado capaz de causar una reducción del 50% de expresión del gen (genes que reprimen su expresión-baja expresión) después de 5 días de exposición; o bien CE₂₀₀ que corresponde a la concentración del compuesto evaluado capaz de causar un incremento del 200% en la expresión del gen (genes que aumentan su expresión-sobre expresión) después de 5 días de exposición. Por último, IC50D3 se definió como la concentración de compuesto capaz de causar una reducción de viabilidad del 50% en células D3 después de 5 días de exposición. IC503T3 se definió como la concentración de compuesto capaz de causar una reducción de viabilidad del 50% en células 3T3 después de 5 días de exposición. Los parámetros CE50, CE200, IC50D3 e IC503T3 necesariamente se expresan en µg/ml.

$$I = 5.916 \log(IC503T3) + 3.500 \log(IC50D3) - 5.307 [(IC503T3 - CE50 \text{ o } CE200) / IC503T3] - 15.27$$

$$II = 3.651 \log(IC503T3) + 2.394 \log(IC50D3) - 2.033 [(IC503T3 - CE50 \text{ o } CE200) / IC503T3] - 6.85$$

$$III = -0.125 \log(IC503T3) - 1.917 \log(IC50D3) + 1.500 [(IC503T3 - CE50 \text{ o } CE200) / IC503T3] - 2.67$$

Embriotóxico fuerte	Embriotóxico débil	No embriotóxico
III > I	II > I	I > II
y	y	y
III > II	II > III	I > III

3.5.2 Análisis Estadístico

Las diferencias entre la expresión génica de células control (no expuestas a sustancias embriotóxicas modelo) y la expresión génica de células expuestas a sustancias embriotóxicas fuertes (5-FU, RA), embriotóxicas débiles (DPH, LiCl, VA) y no embriotóxicas (PG, sacarina), se analizó de acuerdo al test de Dunnett. Se utilizó el software Graph-Pad InStat (versión 3.06). El nivel de significación estadística (p) se indica en la sección de resultados para cada caso.



4 RESULTADOS

4.1 EFECTO DE LOS COMPUESTOS EMBRIOTÓXICOS MODELO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS 3T3 Y D3 EN DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA CULTIVADAS EN MONOCAPA

El efecto de la exposición crónica durante 5 días a los compuestos embriotóxicos modelo sobre la viabilidad de células 3T3 cultivadas en monocapa y D3 en diferenciación espontánea (también cultivadas en monocapa) se determinó mediante el ensayo MTT descrito en el apartado 3.3.10 de esta Memoria. Las Figuras 4.1 a 4.7 muestran ejemplos representativos de cada uno de los experimentos realizados, mientras que la Tabla 4.1 muestra la media de los diferentes IC₅₀ obtenidos para cada compuesto en todos los experimentos independientes realizados. Los valores de IC₅₀ oscilaron entre 0.005 y más de 5000 µg/ml para las células D3 y entre 0.39 y 1800 µg/ml para las células 3T3 (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Efecto de los compuestos modelo sobre la viabilidad de las células D3 en diferenciación espontánea y 3T3. Las células cultivadas en monocapa fueron expuestas a varias concentraciones de cada compuesto modelo durante 5 días. Posteriormente, la viabilidad del cultivo se ensayó con el método MTT como se describe en la sección de Materiales y Métodos. IC₅₀D3 e IC₅₀3T3 se estimaron como las concentraciones de cada compuesto capaz de reducir la viabilidad del cultivo de cada línea celular al 50%. Cada condición se ensayó en cada experimento con 12 pocillos replicados. Se muestra la media±d.e. para n experimentos independientes. Cuando n=2 la media de los dos experimentos independientes se muestra junto a los resultados independientes de cada ensayo.

Compuesto	IC ₅₀ D3 (µg/ml)	IC ₅₀ 3T3 (µg/ml)
5FU	0.17±0.02 (n=3)	0.39 (0.34/0.44) (n=2)
RA	0.005 (0.005/0.005) (n=2)	20 (19 / 21) (n=2)
VA	240 (200/274) (n=2)	1300 (1300/1300) (n=2)
LiCl	650±100 (n=3)	1560±720 (n=4)
DPH	120±30 (n=3)	80 (66/96) (n=2)
Sacarina	4500±2900 (n=3)	1800 (1900/1700) (n=2)
PG	Mayor de 5000 (ambos mayores de 5000) (n=2)	640 (670/600) (n=2)

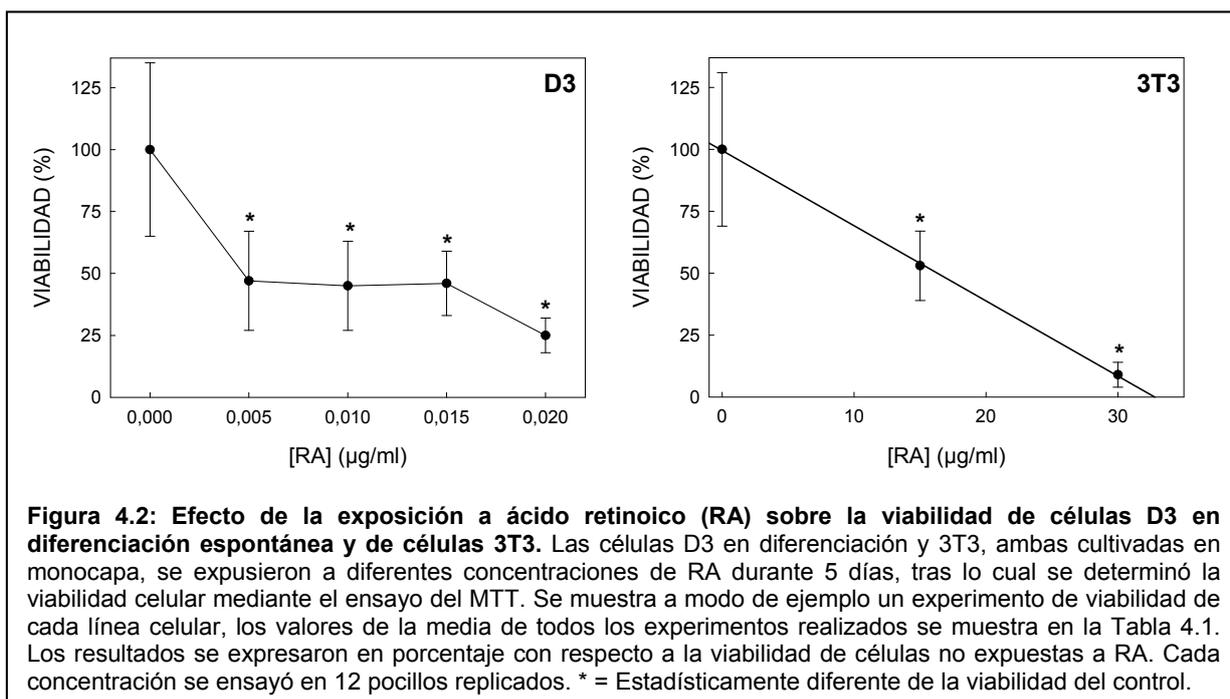
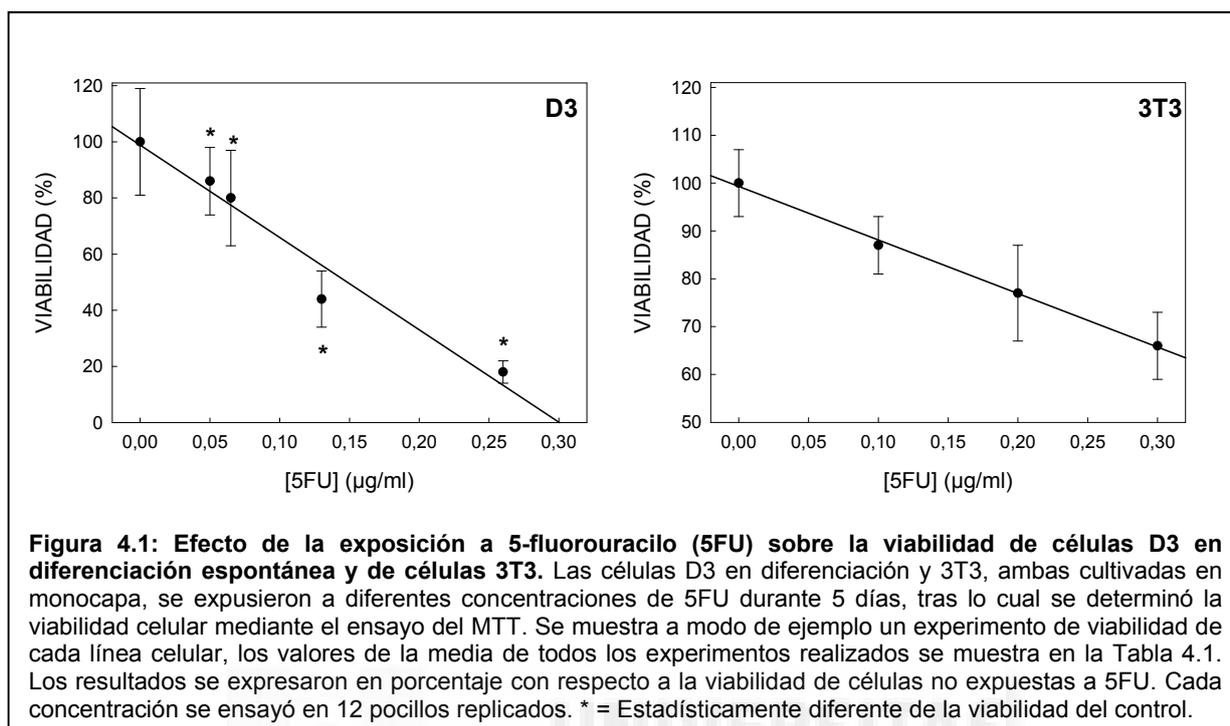
4.1.1 Efecto de compuestos modelo embriotóxicos fuertes sobre la viabilidad de células D3 y 3T3

Los embriotóxicos fuertes como el 5FU y el RA presentaron mayor citotoxicidad (es decir, un menor valor de IC₅₀) que los embriotóxicos débiles o los no embriotóxicos en ambas líneas celulares. Para las células D3 la citotoxicidad de RA fue 34 veces superior a la de 5FU, mientras que para las células 3T3 la situación fue la inversa, es decir, el 5FU fue 51 veces más citotóxico que el RA (Tabla 4.1).

El 5FU causó un descenso de viabilidad en ambas líneas celulares dependiente de concentración (Figura 4.1), descenso que además fue estadísticamente significativo para todas las concentraciones ensayadas con células D3 (Figura 4.1).

El RA también causó un descenso de viabilidad en ambas líneas celulares dependiente de concentración y estadísticamente significativo (Figura 4.2). Sin embargo, en las condiciones de

ensayo empleadas no fue posible estimar la IC50 para células D3 mediante regresión lineal, por lo que este parámetro hubo de ser estimado gráficamente.



4.1.2 Efecto de compuestos modelo embriotóxicos débiles sobre la viabilidad de células D3 y 3T3

Los tres compuestos embriotóxicos débiles empleados en este estudio fueron considerablemente más citotóxicos (entre 7 y 42 veces) para células D3 que los compuestos no embriotóxicos, pero menos citotóxicos (700 y 130000 veces) que los embriotóxicos fuertes (Tabla 4.1). El rango de IC50 para estas células osciló entre 120 y 650 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 4.1).

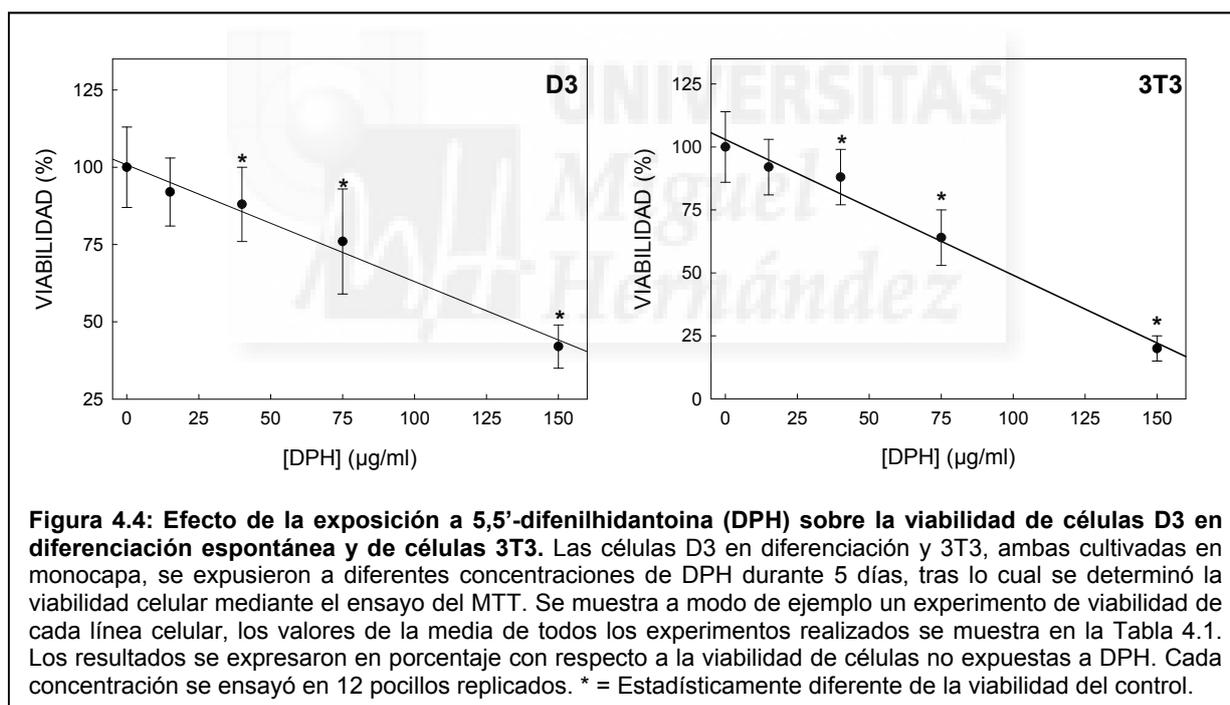
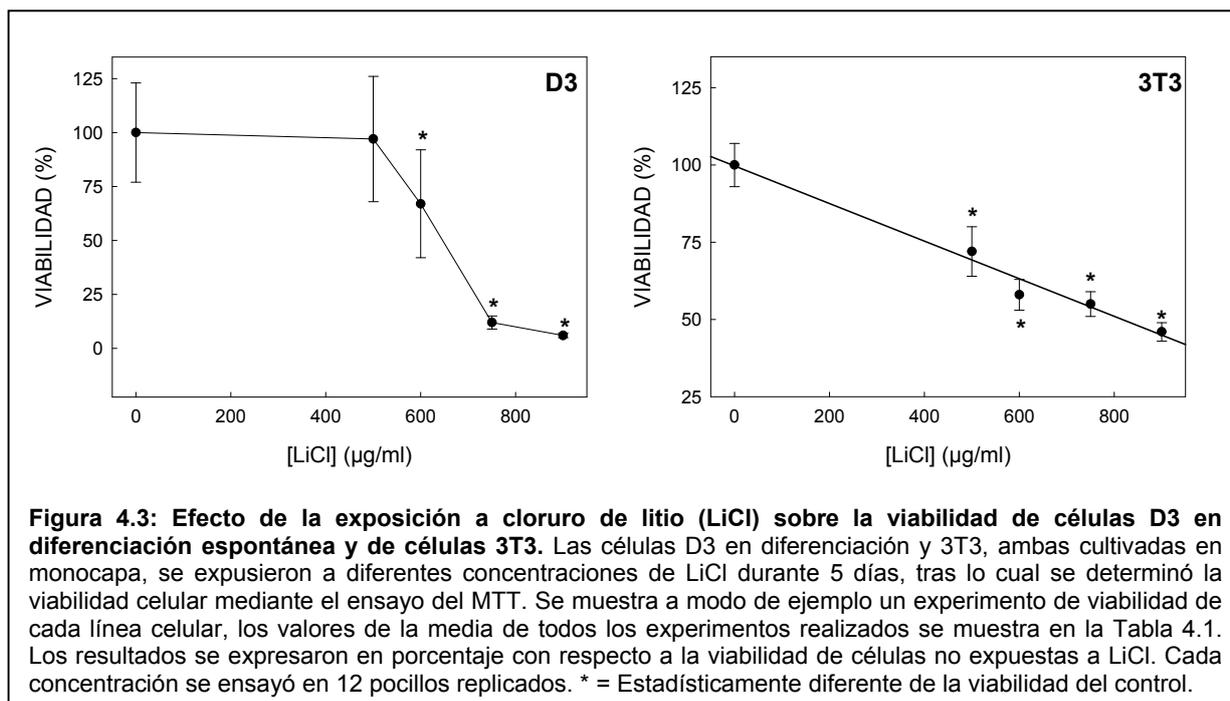
La citotoxicidad de DPH fue 1.5 veces superior para células 3T3 que para D3, mientras que la citotoxicidad de LiCl y VA fue 2.4 y 5.4 veces inferior, respectivamente para células 3T3 que para células D3 (Tabla 4.1).

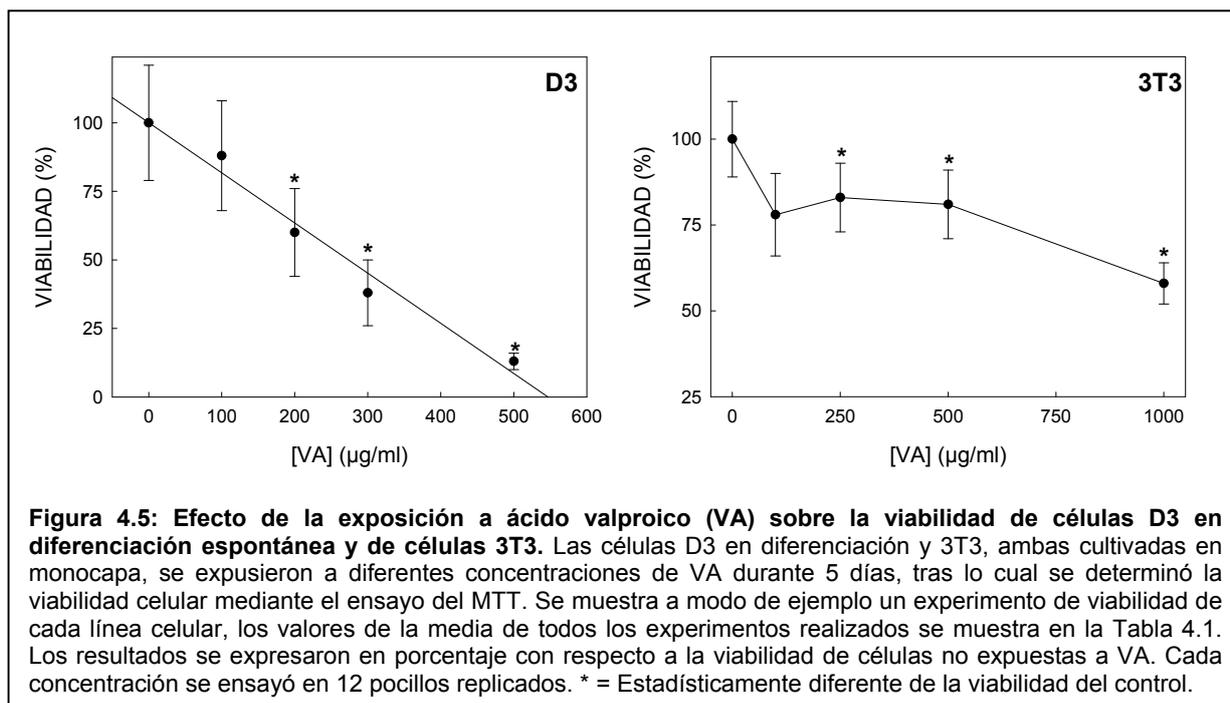
Las IC₅₀ de los embriotóxicos débiles para las células 3T3 osciló entre 80 y 1560 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 4.1); siendo estos valores entre 4 y 4000 veces superiores a los valores de IC50 encontrados para los embriotóxicos fuertes (Tabla 4.1). Al contrario que para las células D3 no todos los embriotóxicos débiles fueron menos citotóxicos que los no embriotóxicos, ya que las IC50 para el LiCl y VA fueron del mismo orden de magnitud que la sacarina y entre 2.4 y 2.0 veces superiores, respectivamente a las de la PG (Tabla 4.1).

El efecto del LiCl sobre la viabilidad de células D3 a concentraciones inferiores a 500 $\mu\text{g/ml}$ fue apenas detectable, sin embargo, a partir de este punto la pendiente de la relación dosis-respuesta fue mucho más aguda que para ningún otro de los compuestos ensayados (Figura 4.3). La pendiente de la relación dosis-respuesta para LiCl en células 3T3 no fue tan aguda como la encontrada para células D3 (Figura 4.3).

El DPH mostró la mayor citotoxicidad entre todos los embriotóxicos débiles ensayados tanto para células 3T3 como para células D3 (Tabla 4.1). El DPH disminuyó la viabilidad de ambas líneas celulares de manera lineal con la concentración, siendo el descenso de viabilidad estadísticamente significativo en ambos casos a partir de una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 4.4).

La Figura 4.5 muestra el efecto del VA sobre la viabilidad de ambas líneas celulares. Este embriotóxico débil fue capaz de reducir la viabilidad de manera lineal con la concentración en células D3, pero no en células 3T3, si bien en este último caso la variabilidad experimental fue relativamente alta.

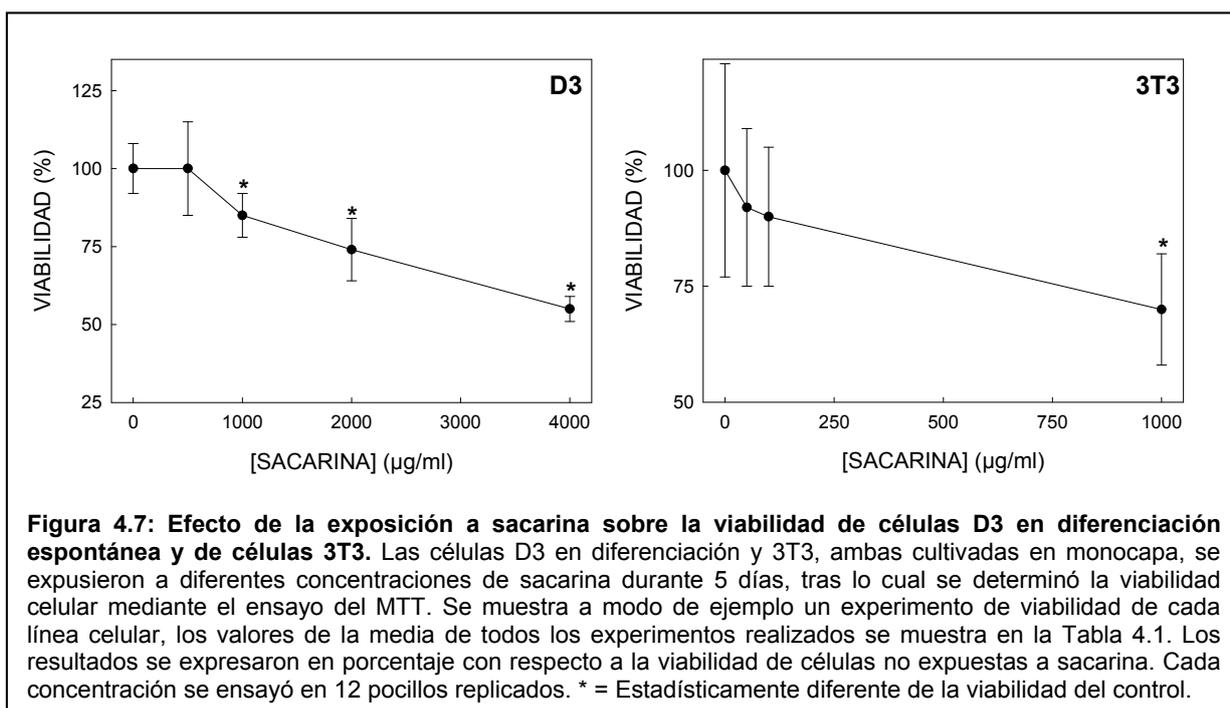
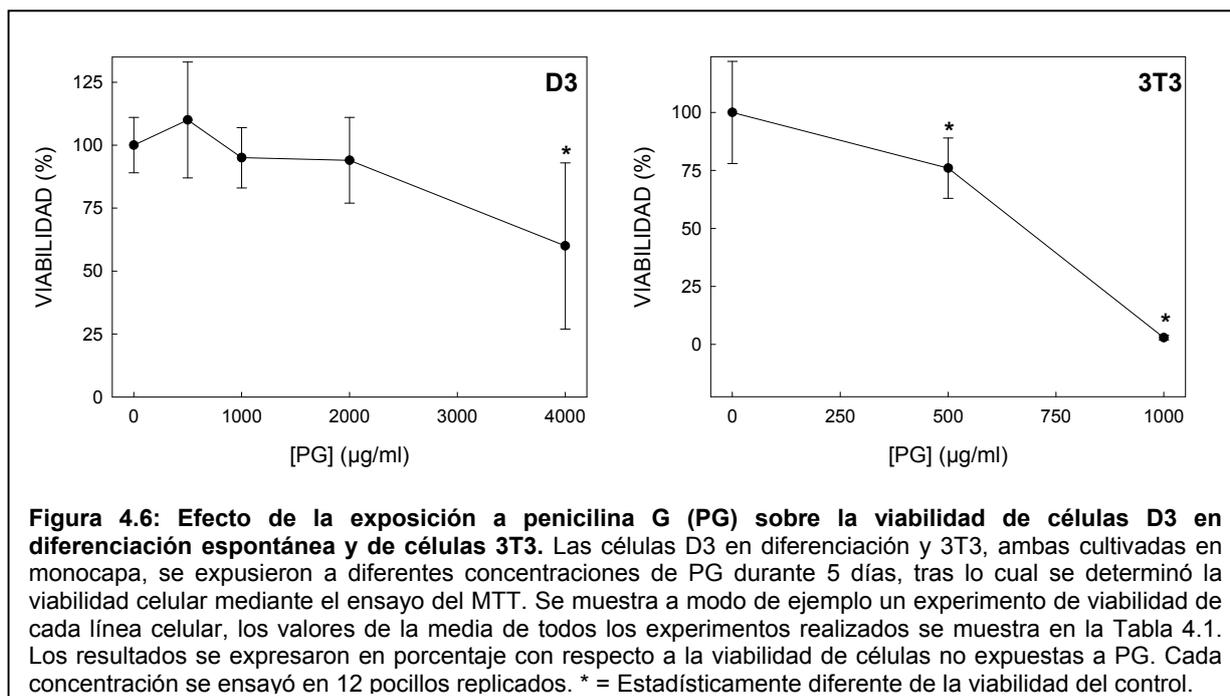




4.1.3 Efecto de compuestos modelo no embriotóxicos sobre la viabilidad de células D3 y 3T3

Los compuestos no embriotóxicos mostraron en general muy baja citotoxicidad. Estos compuestos fueron más citotóxicos para las células 3T3 que para las células D3. En concreto, la IC₅₀ para sacarina fue 2.5 veces superior en células D3 que en células 3T3, mientras que dicho registro fue superior a 7.8 veces en el caso de PG (Tabla 4.1).

La PG no tuvo efectos significativos sobre la viabilidad de células D3 a concentraciones inferiores a 2000 µg/ml, siendo además el efecto de 4000 µg/ml sobre la reducción de la viabilidad celular inferior al 50% (Figura 4.6). La reducción de viabilidad causada por sacarina sobre células D3 solo fue estadísticamente significativa a partir de concentraciones de 1000 µg/ml. Ello hizo que en las condiciones de ensayo empleados la IC₅₀ para células 3T3 tuvo que ser estimada mediante extrapolación (Figura 4.7).



4.2 EFECTO DE COMPUESTOS MODELO SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Se evaluó el efecto de la exposición durante 5 días a 7 diferentes compuestos modelo sobre la diferenciación espontánea de células D3 cultivadas en monocapa. Para ello, después de la exposición se extrajo el ARN de los cultivos según lo descrito en la sección 3.4.1, se retrotranscribió según lo descrito en la sección 3.4.2 y se determinó la expresión de los genes objeto de nuestro interés mediante RT-PCR según lo descrito en la sección 3.4.4. Finalmente, la expresión de cada gen se normalizó respecto a la expresión de un gen control cuya expresión no resultó afectada por los agentes embriotóxicos analizados (Figura 3.2 de sección Materiales y Métodos) y que en nuestro caso fue la β -actina.

La monitorización de las alteraciones en la diferenciación causadas por exposición a los diferentes compuestos mediante esta aproximación nos sitúa en tres diferentes escenarios, ya que cada agente evaluado podría, o bien no alterar la expresión del gen biomarcador, o bien causar la sobreexpresión del mismo, o bien causar una disminución en la expresión. En estos dos últimos casos procedimos utilizando las correspondientes relaciones dosis-respuesta, estimar las correspondientes CE_{200} o CE_{50} , definidas como las concentraciones del compuesto evaluado capaces de inducir una expresión del gen del 200 y 50%, respectivamente. En los casos donde la relación dosis-respuesta permitía estimar o bien dos diferentes CE_{50} , o bien dos diferentes CE_{200} o bien una CE_{50} y una CE_{200} se utilizó para el análisis siempre el menor de los valores posibles.

4.2.1 Selección de genes biomarcadores

La Tabla 4.2 muestra los genes seleccionados para este estudio junto con el linaje celular al que están asociados y su papel en la diferenciación. El conjunto de genes empleados incluye una representación de genes biomarcadores de diferenciación celular de los 3 linajes embrionarios (mesodermo, endodermo y ectodermo) así como genes implicados en diversos procesos básicos para la supervivencia celular.

Tabla 4.2: Genes empleados en este trabajo. El código NCBI mostrado se refiere a la especie *Mus musculus*.

Símbolo Gene	Código NCBI	Nombre (Name)	Función	Principal linaje asociado
<i>Nrcam</i>	319504	Molécula neuronal de adhesión celular (<i>Neuronal cell adhesion molecule gene</i>)	Adhesión neurona-neurona y promueve la señalización direccional durante el crecimiento del cono axonal	Ectodermo
<i>Nes</i>	18008	Nestina (<i>Nestin</i>)	Proteína del filamento intermedio	Ectodermo
<i>Shh</i>	20423	Erizo Sonic (<i>Sonic hedgehog</i>)	Formación del tubo neural	Ectodermo
<i>Pnpla6</i>	50767	Gen 6 que contiene dominio similar al de la fosfolipasa papatina (<i>Patatin-like phospholipase domain containing 6</i>)	Desarrollo neuronal y vascular	Ectodermo
<i>Mesp1</i>	17292	Mesodermo posterior 1 (<i>Mesoderm posterior 1</i>)	Epitelización del mesodermo y desarrollo del mesodermo cardiaco	Mesodermo
<i>Vegfa</i>	22339	Factor de crecimiento vascular endotelial A (<i>Vascular endothelial growth factor A</i>)	Inductor de angiogenesis, vasculogénesis, crecimiento celular endotelial, promotor de migración celular	Mesodermo
<i>Myo1e</i>	71602	Miosina IE (<i>Myosin IE</i>)	Miosina I no convencional	Mesodermo
<i>Hdac7</i>	56233	Histona desacetilasa 7 (<i>Histone deacetylase 7</i>)	Regulación transcripción, progresión del ciclo celular y otros eventos del desarrollo embrionario	Mesodermo
<i>Flk1</i>	16542	Quinasa 1 de hígado fetal (<i>Fetal liver kinase 1</i>)	Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial	Endodermo
<i>Afp</i>	11576	Alfa fetoproteína (<i>Alpha fetoprotein</i>)	Proteína mayoritaria producida por la yema del saco y el hígado durante el desarrollo del hígado fetal	Endodermo
<i>Cdk1</i>	12534	Quinasa 1 dependiente de ciclina (<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>)	Regulador del ciclo celular	Miscelánea
<i>Myc</i>	17869	Oncogen de la mielocitomatosis (<i>Myelocytomatosis oncogene</i>)	Regulador del ciclo celular	Miscelánea
<i>Jun</i>	16476	Oncogen Jun (<i>Jun oncogene</i>)	Regulador del ciclo celular	Miscelánea
<i>Mix1</i>	27217	Mix1 homeobox-like 1 (<i>Mix1 homeobox-like 1</i>)	Regulador del destino celular durante el desarrollo	Miscelánea
<i>Cer1</i>	12622	Cerberus 1 homolog (<i>Cerberus 1 homolog</i>)	Inhibidor en la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta secretado durante la fase de gastrulación de la embriogénesis	Miscelánea
<i>Wnt3</i>	22415	Gen 3 del dominio de integración MMTV sin alas (<i>Wingless-related MMTV integration site 3</i>)	Regulación del destino celular durante la embriogénesis	Miscelánea

4.2.2 Efecto de compuestos embriotóxicos fuertes sobre la diferenciación de células D3

Efecto sobre la expresión de marcadores de endodermo

El compuesto 5FU tuvo efectos diferenciados sobre los genes marcadores de endodermo (Figura 4.8). En el caso del gen *Afp*, su nivel de expresión disminuyó después de la exposición, los resultados mostraron una reducción del 95% del nivel de expresión con respecto a las células control para la máxima concentración ensayada (100 ng/ml). La CE_{50} estimada para este gen fue de 0.025 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 4.3, Figura 4.8). Por otro lado, los niveles de expresión del gen *Flk1*, aumentaron como consecuencia de la exposición al compuesto, llegando a registrarse una expresión unas 13 veces superior a la expresión en los cultivos control (Figura 4.8) para la concentración a 100 ng 5FU/ml. La relación dosis-respuesta permitió estimar una CE_{200} de 0.048 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 4.3, Figura 4.8).

El comportamiento de los genes con RA fue diferente a lo observado con 5FU. En ambos genes se observó un aumento de la expresión hasta un máximo de aproximadamente 80 y 2.5 veces la expresión de los cultivos control para los genes *Afp* y *Flk1*, respectivamente (Figura 4.9). Después de alcanzar el máximo de expresión ésta disminuyó, si bien a la concentración de RA más alta ensayada (10 ng/ml) la expresión todavía continuó siendo en ambos casos superior a la expresión de los controles (Figura 4.9). Las CE_{200} para *Flk1* y *Afp* se estimaron en 0.0015 y 1.3×10^{-5} $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Tabla 4.3, Figura 4.9).

Efecto sobre la expresión de marcadores de mesodermo

Todos los genes marcadores de mesodermo vieron reducida significativamente su expresión al exponer células D3 a 100 ng 5FU/ml; dichas reducciones se correspondieron a un 65, 73, 39 y 73% del control para los casos de *Mesp1*, *Vegfa*, *Myo1e* y *Hdac7*, respectivamente (Figura 4.8). La CE_{50} para el gen *Myo1e* no se pudo estimar al ser el efecto máximo inferior al 50%, pero las EC_{50} estimadas para *Mesp1*, *Vegfa* y *Hdac7* fueron de 0.052, 0.016 y 0.050 mg 5FU/ml, respectivamente (Tabla 4.3, Figura 4.8).

El gen *Mesp1* disminuyó su expresión hasta un máximo de aproximadamente un 50% cuando las células D3 se expusieron a 2.5 ng/ml de RA (Figura 4.9, Tabla 4.3). La expresión del gen *Vegfa* aumentó de manera estadísticamente significativa hasta aproximadamente 4 veces la expresión de las células control para una concentración de 2.5 ng/ml (Figura 4.9). A concentraciones superiores a ésta la expresión del gen fue superior a la del control, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. La CE_{200} se estimó en 3.3×10^{-4} ng/ml (Tabla 4.3). La exposición a RA causó sobreexpresiones estadísticamente significativas de la expresión de *Hdac7*, pero ninguna de ellas alcanzó el 200% de expresión de las células control (Figura 4.9), por lo que no se pudo estimar la CE_{200} . La exposición a RA causó disminuciones en la expresión de la expresión de *Myo1e*, pero ninguna de ellas fue estadísticamente significativa ni alcanzó el 50% de expresión de las células control (Figura 4.9), por lo que no se pudo estimar la CE_{50} .

Efecto sobre la expresión de marcadores de ectodermo

La expresión de *Nrcam* solamente se vio alterada de manera estadísticamente significativa por exposición a 5FU a la concentración de 50 ng/ml, aunque el porcentaje de sobreexpresión fue solamente del 150% de la expresión de cultivos control (Figura 4.8). Por lo tanto, no se pudo determinar CE50 ni CE200 (Tabla 4.3). La expresión de *Nes* solamente se vio alterada de manera estadísticamente significativa por exposición a 5FU a concentraciones de 50 ng/ml y superiores, registrándose una disminución de la expresión del 50% para la exposición a 0.050 µg/ml y no causando la exposición a 0.1 µg/ml una expresión significativamente diferente de la registrada para 0.050 µg/ml (Figura 4.8). La expresión del gen *Shh* se vio significativamente incrementada a concentraciones de 50 ng/ml, que consiguió alcanzar un 200% de la expresión del control y siendo esta concentración por tanto la CE200 (Tabla 4.3, Figura 4.8). La expresión del gen *Pnpla6* disminuyó de manera lineal con la concentración de 5FU, alcanzándose un máximo de inhibición del 50% para la concentración de 100 ng/ml (CE50) (Tabla 4.3, Figura 4.8).

La expresión del gen *Nrcam* disminuyó de manera aproximadamente lineal con la concentración de RA, alcanzándose alteraciones de la expresión estadísticamente significativas a partir de la exposición de los cultivos celulares a 2 ng/ml (Figura 4.9). La máxima represión de la expresión del gen *Nrcam* alcanzada fue del 75% (Figura 4.9). La expresión del gen *Nes* se redujo significativamente (aproximadamente un 80%) para la concentración de RA más baja utilizada (1 ng/ml), aunque la expresión del gen empezó a recuperarse paulatinamente con la concentración de RA alcanzando los niveles control a aproximadamente 10 ng/ml (Figura 4.9). Las CE50 de RA para los genes *Nrcam* y *Nes* se estimaron a partir de las correspondientes relaciones dosis-respuesta en 0.0023 y 6.2×10^{-4} µg/ml, respectivamente (Tabla 4.3). La expresión del gen *Shh* aumentó de manera dependiente de concentración de RA, alcanzándose sobreexpresiones de este gen estadísticamente significativas a partir de 2 ng RA/ml (Figura 4.9). La máxima sobreexpresión (aproximadamente 4 veces el control) se alcanzó para la concentración de RA más alta utilizada (Figura 4.9). La CE200 para este gen se estimó en 0.0014 µg RA/ml (Tabla 4.3). La exposición a RA alteró la expresión de *Pnpla6* de manera estadísticamente significativa, pero en ningún caso con una intensidad que alcanzara el 50% de represión o el 200% de sobreexpresión y por lo tanto no se pudo estimar la correspondiente CE50 o CE200 (Figura 4.9, Tabla 4.3).

Efecto sobre la expresión de marcadores de procesos básicos para la supervivencia celular

La exposición de las células D3 en diferenciación a 5FU causó descensos en la expresión de los genes *Myc* y *Cdk1*, aunque estos descensos solamente fueron estadísticamente significativos a la máxima concentración ensayada de 100 ng/ml. Se estimaron CE50 para *Cdk1* y *Myc* de 0.087 y 0.095 µg/ml, respectivamente (Figura 4.8, Tabla 4.3). El efecto del 5FU sobre la expresión de *Cer1* y *Wnt3* fue incrementar su expresión de manera estadísticamente significativa hasta unos máximos de 4 (en el caso de *Cer1*) y 3 (en el caso de *Wnt3*) veces la expresión del gen en células control (Figura

4.8). Las CE200 estimadas a partir de las correspondientes relaciones dosis-respuesta (Figura 4.8) fueron de 0.030 y 0.038 $\mu\text{g/ml}$ para *Cer1* y *Wnt3*, respectivamente (Tabla 4.3). El 5FU no alteró la expresión del gen *Jun* de manera significativa, aunque sí consiguió sobre-expresar un máximo de 1.5 veces el gen *Mixl1* (Figura 4.8). Para ninguno de estos dos genes se pudo estimar CE50 ni CE200 (Tabla 4.3).

La exposición de las células D3 en diferenciación a RA indujo sobreexpresiones estadísticamente significativas de los genes *Myc*, *Cer1* y *Jun*. Los máximos de sobreexpresión alcanzaron correspondieron a aproximadamente 2, 3 y 50 veces la expresión de *Myc*, *Jun* y *Cer1*, respectivamente en células control (Figura 4.9). Las respectivas CE200 fueron de 0.001, 2.2×10^{-5} y 0.0082 $\mu\text{g RA/ml}$ para *Myc*, *Cer1* y *Jun*, respectivamente (Tabla 4.3). La expresión de *Myc* y *Cer1* se redujo hasta niveles similares a los de las células control para exposiciones de 10 ng RA/ml (Figura 4.9). La expresión del gen *Cdk1* apenas registró variaciones con la exposición a RA (Figura 4.9), mientras que la de *Mixl1* y *Wnt3* se redujo de manera estadísticamente significativa hasta alcanzar unos mínimos de aproximadamente el 25 (en el caso del gen *Mixl1*) y el 5% (en el caso de *Wnt3*) de las células control, lo que permitió estimar unas CE50 de 0.0042 y 5.9×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Figura 4.9, Tabla 4.3).



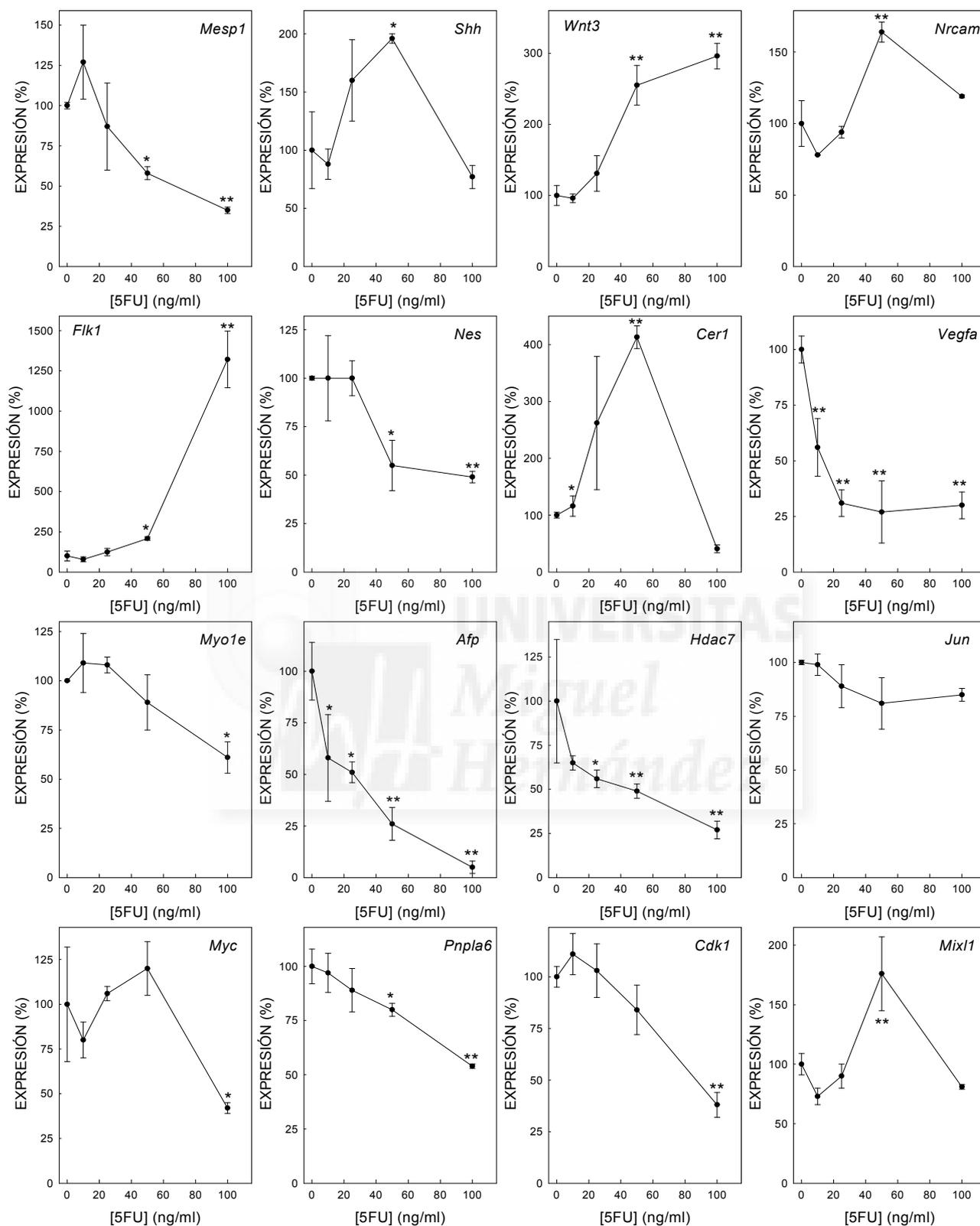


Figura 4.8: Efecto del 5-fluorouracilo (5FU) sobre la expresión de genes biomarcadores. Las células D3 se cultivaron en monocapa y en diferenciación espontánea expuestas a diferentes concentraciones de 5FU durante 5 días. Al final de la exposición las células se lisaron, se extrajo el RNA, se retrotranscribió hasta cDNA y cada gen se amplificó y cuantificó utilizando RT-PCR como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La expresión de cada gen se normalizó frente a la expresión de β -actina y se expresó en porcentaje con respecto a la expresión del mismo gen en los cultivos control no expuestos a 5FU. Se muestra la media \pm d.e. de la expresión de los tres replicados biológicos independientes utilizados en el experimento. Estas figuras se utilizaron para estimar las CE_{50} y CE_{200} mostradas en la Tabla 4.3. (* = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.05$ según el test de Dunnett; ** = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.01$ según el test de Dunnett).

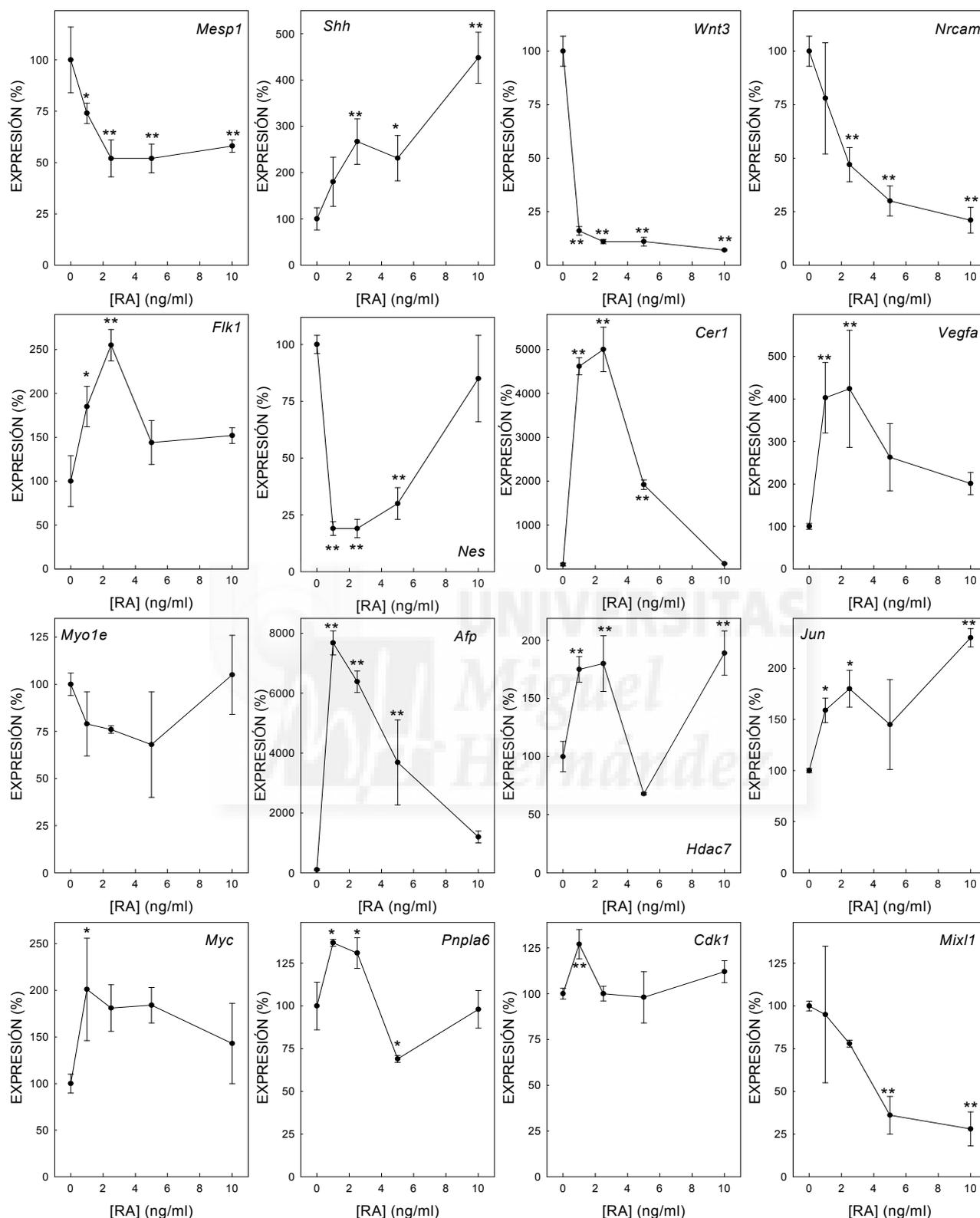


Figura 4.9: Efecto del ácido retinoico (RA) sobre la expresión de genes biomarcadores. Las células D3 se cultivaron en monocapa y en diferenciación espontánea expuestas a diferentes concentraciones de RA durante 5 días. Al final de la exposición las células se lisaron, se extrajo el RNA, se retrotranscribió hasta cDNA y cada gen se amplificó y cuantificó utilizando RT-PCR como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La expresión de cada gen se normalizó frente a la expresión de β -actina y se expresó en porcentaje con respecto a la expresión del mismo gen en los cultivos control no expuestos a RA. Se muestra la media \pm d.e. de la expresión de los tres replicados biológicos independientes utilizados en el experimento. Estas figuras se utilizaron para estimar las CE_{50} y CE_{200} mostradas en la Tabla 4.3. (* = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.05$ según el test de Dunnett; ** = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.01$ según el test de Dunnett).

4.2.3 Efecto de compuestos embriotóxicos débiles sobre la diferenciación de células D3

Efecto sobre la expresión de marcadores de endodermo

La exposición de células D3 en diferenciación a DPH causó un incremento significativo de expresión en el gen *Flk1* hasta un máximo aproximado de 2.5 veces la expresión en células control (para una exposición a 80 µg/ml) seguido de un descenso también estadísticamente significativo hasta un mínimo aproximado del 50% para una exposición de 150 µg/ml (Figura 4.10). La exposición de las células a 150 µg DPH/ml fue capaz de reducir la expresión del gen *Afp* hasta niveles prácticamente indetectables (Figura 4.10). Las correspondientes relaciones dosis-respuesta permitieron estimar una CE200 de 63 µg/ml para *Flk1* y una CE₅₀ de 75 µg/ml para *Afp* (Tabla 4.4).

La exposición de células D3 en diferenciación a VA causó descensos de aproximadamente el 50 y el 60% del control en la expresión de los genes *Flk1* y *Afp*, respectivamente (Figura 4.11). Las CE50 estimadas para ambos *Flk1* y *Afp* fueron de 200 y 165 µg/ml, respectivamente (Tabla 4.4).

La exposición de células D3 en diferenciación a LiCl causó incrementos máximos de la expresión del gen *Flk1* de aproximadamente 25 veces la expresión del mismo gen en células control (Figura 4.12), lo que permitió estimar una CE200 de 245 µg/ml (Tabla 4.4). Sin embargo, la máxima concentración de LiCl ensayada (600 µg/ml) no pudo alterar de manera estadísticamente significativa la expresión del gen *Afp* (Figura 4.12).

Efecto sobre la expresión de marcadores de mesodermo

La expresión de los genes *Mesp1* y *Myo1e* en células D3 en diferenciación expuestas a 140 µg DPH/ml sufrió incrementos dependientes de concentración hasta unos máximos de 3 veces la expresión de dichos genes en cultivos control (Figura 4.10), lo que permitió estimar CE200 de 70 y 105 µg/ml para *Mesp1* y *Myo1e*, respectivamente (Tabla 4.4). La exposición de estas células a 150 µg DPH/ml redujo la expresión del gen *Vegfa* hasta aproximadamente el 10% de la expresión en células control (Figura 4.10), lo que permitió estimar una CE50 de 40 µg/ml (Tabla 4.4). El DPH incrementó la expresión de *Hdac7* hasta aproximadamente 2.3 veces la expresión en cultivos control a concentraciones de 20 µg/ml y causó descensos en la expresión que llegaron a ser de aproximadamente el 50% a concentraciones de 140 µg/ml (Figura 4.10). La CE200 estimada para *Hdac7* fue de 13 µg DPH/ml (Tabla 4.4).

La exposición de células D3 en diferenciación a VA causó incrementos estadísticamente significativos en la expresión de los genes *Mesp1* y *Myo1e* dependientes de concentración (Figura 4.11), siendo el máximo de expresión registrado y las correspondientes CE200 de 300% y 100 µg/ml para el caso de *Mesp1*. El incremento máximo del 170% con respecto a las células control no permitió establecer la CE200 para el caso de *Myo1e* (Figura 4.11, Tabla 4.4).

El VA causó descensos estadísticamente significativos en la expresión de los genes *Vegfa* y *Hdac7* dependientes de concentración (Figura 4.11), siendo los mínimos de expresión registrados y las correspondientes CE50 de 40% y 165 µg/ml para el caso de *Vegfa* y de 40% y 172 µg/ml para el caso de *Hdac7* (Figura 4.11, Tabla 4.4).

Las células D3 en diferenciación espontánea expuestas a LiCl vieron alterada la expresión de los genes *Mesp1*, *Vegfa* y *Myo1e*, ya que concentraciones de entre 400 y 500 µg/ml de este embriotóxico débil indujeron la sobreexpresión (estadísticamente significativa en todos los casos) de estos genes de entre 3 y 4 veces (Figura 4.12). Las CE200 estimadas para *Mesp1*, *Vegfa* y *Myo1e* fueron de 313, 245 y 328 µg/ml, respectivamente (Tabla 4.4). La CE50 estimada para la expresión del gen *Hdac7* fue de 142 µg LiCl/ml (Figura 4.12, Tabla 4.4).

Efecto sobre la expresión de marcadores de ectodermo

El embriotóxico débil DPH redujo de manera estadísticamente significativa la expresión de los genes *Nrcam* y *Nes* con similar potencia, ya que las CE50 estimadas fueron de 11 y 15 µg/ml, respectivamente (Figura 4.10, Tabla 4.4). Este compuesto redujo la expresión del gen *Pnpla6* de manera estadísticamente significativa, pero en una extensión inferior al 50% (Figura 4.10), mientras que el efecto sobre la expresión del gen *Shh* fue un incremento estadísticamente significativo de hasta aproximadamente 6 veces la expresión en los cultivos control (Figura 4.10) con una CE200 de 57 µg/ml (Tabla 4.4).

La expresión de los genes *Nes* y *Nrcam* de células D3 expuestas a VA se redujo de manera estadísticamente significativa y dependiente de concentración hasta unos máximos de aproximadamente el 20% de la expresión de ambos genes en cultivos control (Figura 4.11). Las CE50 estimadas a partir de las correspondientes relaciones dosis-respuesta fueron de 117 y 88 µg VA/ml para *Nrcam* y *Nes*, respectivamente (Tabla 4.4). El VA indujo un incremento de expresión del gen *Shh* de aproximadamente 6 veces la expresión del control para una concentración de VA de 300 µg/ml (Figura 4.11), la correspondiente CE200 fue de 41 µg/ml. El VA no alteró de manera significativa la expresión del gen *Pnpla6* en ninguna de las condiciones empleadas (Figura 4.11).

El LiCl redujo de manera estadísticamente significativa (hasta un máximo de aproximadamente el 75%) la expresión del gen *Nrcam* en células D3 en diferenciación espontánea (Figura 4.12), permitiendo estimar una CE50 de 392 µg/ml (Tabla 4.4). La expresión del gen *Nes* se vio incrementada por LiCl para concentraciones de 400 µg/ml (CE200 = 365 µg/ml (Tabla 4.4)), aunque a concentraciones superiores disminuyó notablemente (Figura 4.12). La expresión del gen *Shh* se vio reducida a la concentración de LiCl más baja (CE50 = 185 µg/ml), aunque a concentraciones superiores la expresión se recuperó hasta niveles similares al de los controles (Figura 4.12). La expresión del gen *Pnpla6* se vio ligeramente incrementada para exposición a concentraciones de 500 µg LiCl/ml, aunque con una intensidad inferior al 200% (Figura 4.12).

Efecto sobre la expresión de marcadores de procesos básicos para la supervivencia celular

Los genes *Cdk1* y *Wnt3* vieron su expresión reducida de manera estadísticamente significativa y dependiente de concentración en células D3 en diferenciación como consecuencia de su exposición a DPH (Figura 4.10). En ambos casos el máximo de represión alcanzado fue de alrededor del 75%, mientras que las CE50 para *Cdk1* y *Wnt3* fueron de 10 y 31 $\mu\text{g DPH/ml}$, respectivamente (Tabla 4.4). La expresión del gen *Myc* también se vio reducida hasta aproximadamente un 50% de manera estadísticamente significativa por exposición a DPH hasta concentraciones de 80 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, a concentraciones superiores a ésta la expresión se recuperó e incluso superó la expresión de este gen en los cultivos control (Figura 4.10), la CE50 estimada fue de 34 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 4.4). La expresión del gen *Cer1* alcanzó un máximo de expresión del 200% del control para concentraciones de 15 $\mu\text{g DPH/ml}$ (Figura 4.10, Tabla 4.4). El DPH redujo ligeramente la expresión de los genes *Jun* y *Mix11* (en este caso de manera estadísticamente significativa), pero sin alcanzar en ninguna de las concentraciones ensayadas el 50% de reducción de la expresión (Figura 4.10).

La exposición de células D3 en diferenciación a VA causó reducciones estadísticamente significativas de un 75% en la expresión del gen *Cer1* y de un 90% en la expresión del gen *Wnt3* (Figura 4.11); lo que permitió estimar las respectivas CE50 de 75 y 63 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 4.4). El VA no alteró de manera significativa en ninguna de las condiciones ensayadas la expresión de los genes *Cdk1*, *Myc*, *Jun* y *Mix11* (Figura 4.11).

La exposición de células D3 en diferenciación a LiCl aumentó de manera estadísticamente significativa la expresión de los genes *Myc*, *Mix11* y *Cer1* hasta aproximadamente 2.5, 2.0 y 2.0 veces la expresión de los cultivos control, respectivamente (Figura 4.12). Las CE200 registradas para estos mismos genes fueron de 442, 409 y 592 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 4.4). El LiCl también causó descensos estadísticamente significativos (de hasta un 80%) y dependientes de concentración en la expresión de los genes *Wnt3* y *Jun* (Figura 4.12), siendo las CE50 estimadas en ambos casos de 337 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 4.4). La expresión del gen *Cdk1* no se vio alterada significativamente en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 4.12).

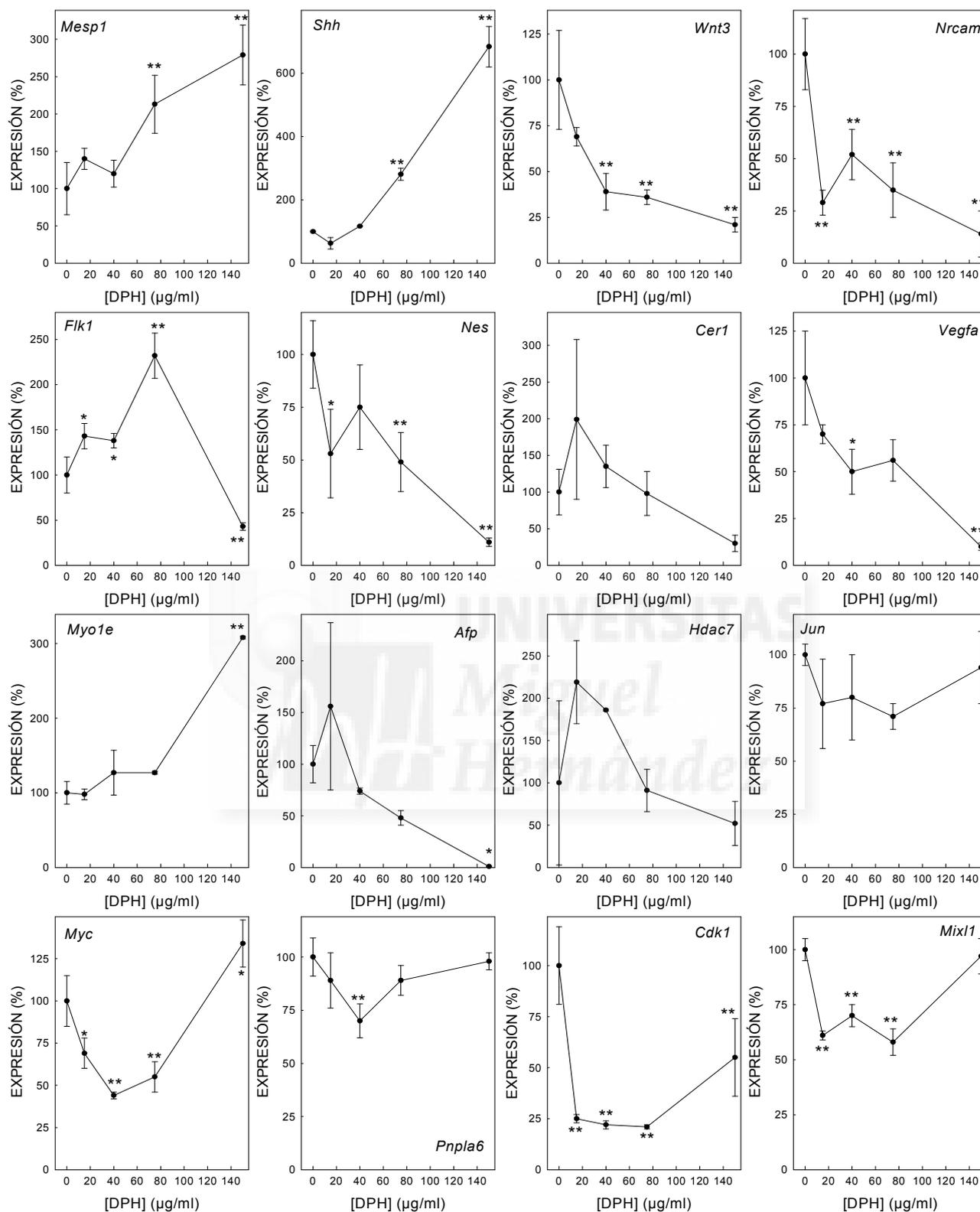


Figura 4.10: Efecto del 5,5'-difenilhidantoina (DPH) sobre la expresión de genes biomarcadores. Las células D3 se cultivaron en monocapa y en diferenciación espontánea expuestas a diferentes concentraciones de DPH durante 5 días. Al final de la exposición las células se lisaron, se extrajo el RNA, se retrotranscribió hasta cDNA y cada gen se amplificó y cuantificó utilizando RT-PCR como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La expresión de cada gen se normalizó frente a la expresión de β -actina y se expresó en porcentaje con respecto a la expresión del mismo gen en los cultivos control no expuestos a DPH. Se muestra la media \pm d.e. de la expresión de los tres replicados biológicos independientes utilizados en el experimento. Estas figuras se utilizaron para estimar las CE_{50} y CE_{20} mostradas en la Tabla 4.4. (* = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.05$ según el test de Dunnett; ** = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.01$ según el test de Dunnett).

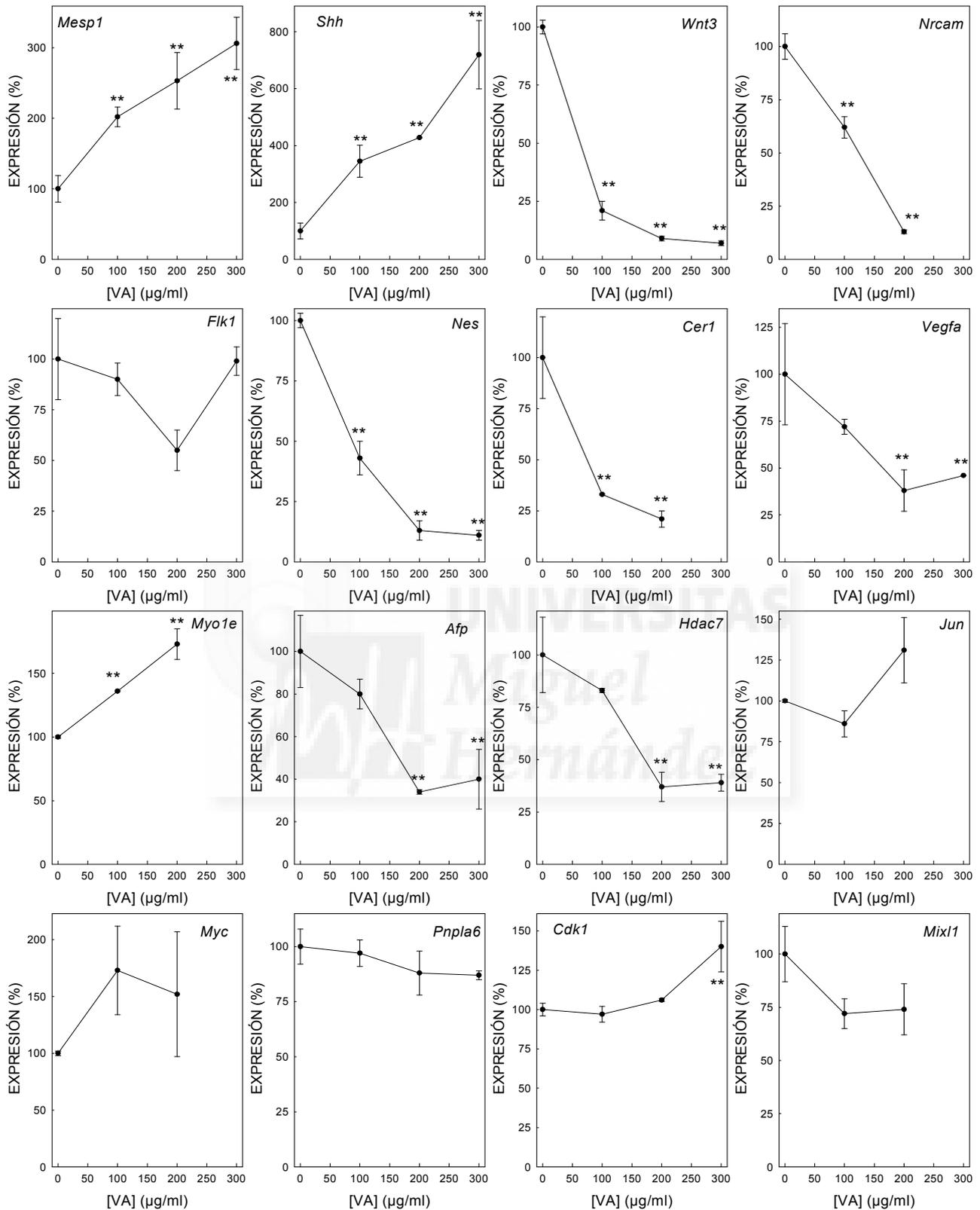


Figura 4.11: Efecto del ácido valproico (VA) sobre la expresión de genes biomarcadores. Las células D3 se cultivaron en monocapa y en diferenciación espontánea expuestas a diferentes concentraciones de VA durante 5 días. Al final de la exposición las células se lisaron, se extrajo el RNA, se retrotranscribió hasta cDNA y cada gen se amplificó y cuantificó utilizando RT-PCR como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La expresión de cada gen se normalizó frente a la expresión de β -actina y se expresó en porcentaje con respecto a la expresión del mismo gen en los cultivos control no expuestos a VA. Se muestra la media \pm d.e. de la expresión de los tres replicados biológicos independientes utilizados en el experimento. Estas figuras se utilizaron para estimar las CE_{50} y CE_{200} mostradas en la Tabla 4.4. (* = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.05$ según el test de Dunnett; ** = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.01$ según el test de Dunnett).

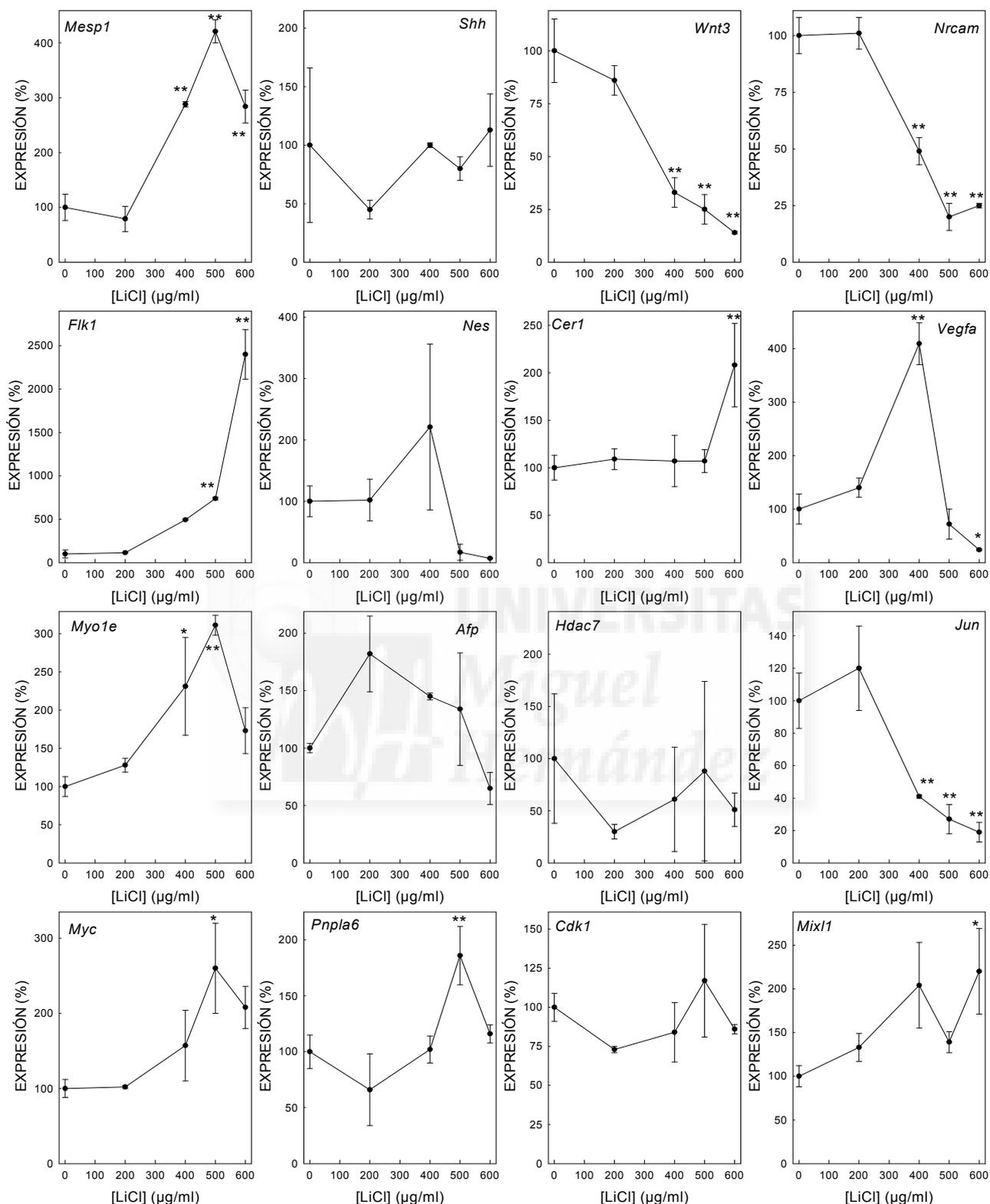


Figura 4.12: Efecto del cloruro de litio (LiCl) sobre la expresión de genes biomarcadores. Las células D3 se cultivaron en monocapa y en diferenciación espontánea expuestas a diferentes concentraciones de LiCl durante 5 días. Al final de la exposición las células se lisaron, se extrajo el RNA, se retrotranscribió hasta cDNA y cada gen se amplificó y cuantificó utilizando RT-PCR como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La expresión de cada gen se normalizó frente a la expresión de β -actina y se expresó en porcentaje con respecto a la expresión del mismo gen en los cultivos control no expuestos a LiCl. Se muestra la media \pm d.e. de la expresión de los tres replicados biológicos independientes utilizados en el experimento. Estas figuras se utilizaron para estimar las CE₅₀ y CE₂₀₀ mostradas en la Tabla 4.4. (* = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.05$ según el test de Dunnett; ** = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.01$ según el test de Dunnett).

4.2.4 Efecto de compuestos no embriotóxicos sobre la diferenciación de células D3

Efecto sobre la expresión de marcadores de endodermo

La exposición de células D3 en diferenciación al agente no embriotóxico PG causó descensos estadísticamente significativos ligeramente superiores al 50% de la expresión de los genes *Flk1* y *Afp* (Figura 4.13), siendo las respectivas CE50 de 195 y 576 µg/ml (Tabla 4.5).

El agente no embriotóxico sacarina aumentó la expresión del gen *Flk1* en células D3 en diferenciación hasta aproximadamente 2.5 veces la expresión de este gen con respecto a los cultivos control, si bien a la concentración de 1000 µg/ml la expresión del gen fue similar a la del control. La expresión del gen *Afp* se incrementó hasta aproximadamente 2 veces la expresión del cultivo control por exposición a concentraciones de sacarina superiores a 200 µg/ml (Figura 4.14). Las CE200 para *Flk1* y *Afp* estimadas a partir de las correspondientes relaciones dosis respuesta fueron de 450 y 1000 µg/ml (Tabla 4.5).

Efecto sobre la expresión de marcadores de mesodermo

Los cultivos de células D3 en diferenciación redujeron la expresión del gen *Mesp1* y *Hdac7* hasta el 50% por exposición a 100 y 230 µg PG/ml, respectivamente (Figura 4.13, Tabla 4.5); mientras que ninguna de las condiciones ensayadas consiguió alcanzar niveles de sobreexpresión del 200% o de represión del 50% de los genes *Vegfa* y *Myo1e* (Figura 4.13).

La sacarina redujo la expresión de los genes *Mesp1* y *Hdac7* en cultivos de células D3 en diferenciación. La reducción máxima para *Mesp1* fue ligeramente superior al 50%, mientras para *Hdac7* fue prácticamente del 100% (Figura 4.14). Además, en ambos casos, una vez alcanzado el máximo de disminución de expresión ésta se recuperó al seguir incrementando la concentración. Las CE50 estimadas para *Mesp1* y *Hdac7* fue de 89 y 59 µg/ml, respectivamente (Tabla 4.5). La sacarina aumentó de manera estadísticamente significativa la expresión de los genes *Vegfa* y *Myo1e*, siendo los máximos de expresión alcanzados de 7.5 (para *Vegfa*) y 3.0 (para *Myo1e*) veces la expresión de los cultivos control en ambos casos para exposiciones a 600 µg sacarina/ml (Figura 4.14). Las CE200 para ambos genes fueron de aproximadamente 250 µg/ml (Tabla 4.5).

Efecto sobre la expresión de marcadores de ectodermo

PG indujo un incremento (estadísticamente no significativo) de aproximadamente dos veces la expresión del gen *Shh* en los cultivos control de células D3 en diferenciación (Figura 4.13, Tabla 4.5) para una exposición de 100 µg/ml; sin embargo, la exposición de estas células a concentraciones de 1000 µg PG/ml no alteró la expresión de los genes *Nrcam*, *Nes* y *Pnpla6* en porcentajes superiores al 200% o inferiores al 50% (Figura 4.13).

La exposición de células D3 en diferenciación a concentraciones de sacarina de 500 µg/ml indujo una sobreexpresión (estadísticamente significativa) del gen de *Nes* de 4 veces la expresión del cultivo control (Figura 4.14), siendo la CE200 estimada de 100 µg/ml (Tabla 4.5). Por otra parte, esta misma concentración de sacarina (500 µg/ml) redujo la expresión de los genes *Pnpla6* y *Shh* en aproximadamente un 80 y un 75% del control, respectivamente (Figura 4.14); observándose además para los dos genes una recuperación de la expresión de ambos genes para exposiciones de 1000 µg sacarina/ml. Las CE50 estimadas fueron de 284 y 91 µg sacarina/ml para los genes *Pnpla6* y *Shh*, respectivamente (Tabla 4.5). La exposición de estas células a concentraciones de 1000 µg sacarina/ml no alteró la expresión del gen *Nrcam* en porcentajes superiores al 200% o inferiores al 50% (Figura 4.14).

Efecto sobre la expresión de marcadores de procesos básicos para la supervivencia celular

La exposición de células D3 en diferenciación a PG causó incrementos de la expresión de los genes *Myc*, *Jun*, *Cer1* y *Wnt3* hasta alcanzar unos máximos de expresión estadísticamente significativos de entre 2.0 y 2.5 veces la expresión en cultivos control (Figura 4.13). En todos estos casos, una vez alcanzados los respectivos máximos la expresión disminuyó hasta valores cercanos al control para concentraciones de PG de 1000 µg/ml (Figura 4.13). Las CE200 estimadas a partir de las respectivas relaciones dosis-respuesta fueron de 313, 284, 461 y 500 µg PG/ml para *Myc*, *Jun*, *Cer1* y *Wnt3*, respectivamente (Tabla 4.5). La exposición de estas células a concentraciones de 1000 µg PG/ml no alteró la expresión de los genes *Mixl1* y *Cdk1* en porcentajes superiores al 200% o inferiores al 50% (Figura 4.13).

La exposición de células D3 en diferenciación a sacarina causó incrementos de la expresión de los genes *Cdk1*, *Myc*, *Wnt3* y *Cer1* hasta alcanzar unos máximos de expresión estadísticamente significativos de entre 3 y 4 veces la expresión en cultivos control (Figura 4.14). En todos estos casos, una vez alcanzados los respectivos máximos la expresión disminuyó hasta valores cercanos al control para concentraciones de sacarina de 1000 µg/ml (Figura 4.14). Las CE200 estimadas a partir de las respectivas relaciones dosis-respuesta fueron de 235, 214, 178 y 355 µg PG/ml para *Cdk1*, *Myc*, *Wnt3* y *Cer1*, respectivamente (Tabla 4.5). La exposición de estas células a concentraciones de 1000 µg PG/ml no alteró la expresión de los genes *Mixl1* y *Jun* en porcentajes superiores al 200% o inferiores al 50% (Figura 4.14).

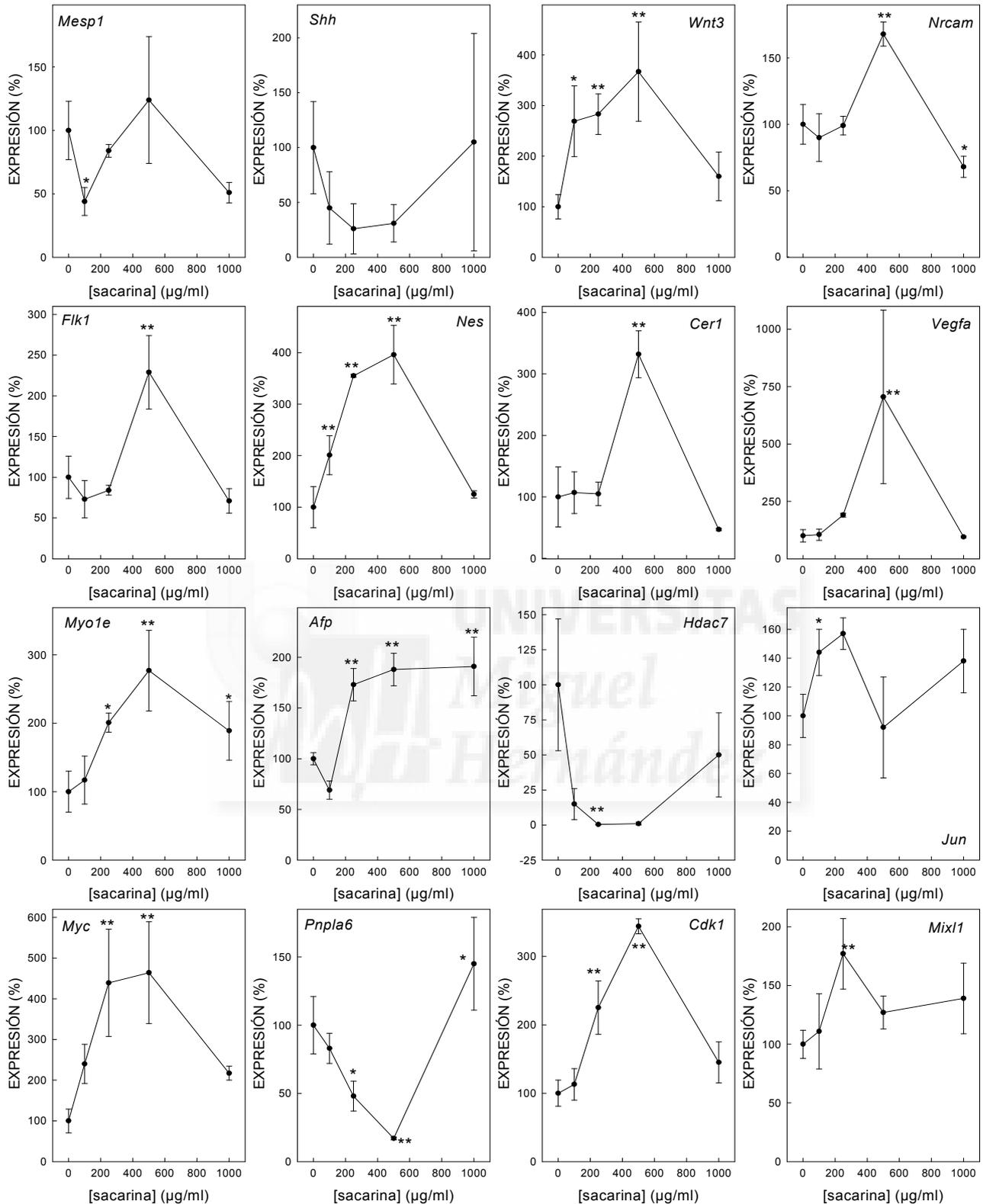


Figura 4.14: Efecto de la sacarina sobre la expresión de genes biomarcadores. Las células D3 se cultivaron en monocapa y en diferenciación espontánea expuestas a diferentes concentraciones de sacarina durante 5 días. Al final de la exposición las células se lisaron, se extrajo el RNA, se retrotranscribió hasta cDNA y cada gen se amplificó y cuantificó utilizando RT-PCR como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La expresión de cada gen se normalizó frente a la expresión de β -actina y se expresó en porcentaje con respecto a la expresión del mismo gen en los cultivos control no expuestos a sacarina. Se muestra la media \pm d.e. de la expresión de los tres replicados biológicos independientes utilizados en el experimento. Estas figuras se utilizaron para estimar las CE_{50} y CE_{200} mostradas en la Tabla 4.5. (* = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.05$ según el test de Dunnett; ** = estadísticamente diferente a la expresión del control para al menos $p < 0.01$ según el test de Dunnett).

4.3 PREDICCIÓN DE POTENCIAL EMBRIOTÓXICO

El efecto de los compuestos embriotóxicos modelo sobre la expresión de genes biomarcadores de diferenciación se ensayó con la intención de mejorar la cuantificación de las alteraciones en la diferenciación inducidas por éstos y sustituir la aproximación clásica del método EST de observación óptica de cardiomiocitos latientes diferenciados durante 10 días por una cuantificación basada en la determinación de alteraciones moleculares. Para ello, las CE50 o CE200 deducidos en la sección anterior se utilizaron para predecir la potencial embriotoxicidad de cada compuesto utilizando los PM del EST clásico pero modificados según lo descrito en la sección 3.5.

4.3.1 Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de embriotóxicos fuertes

Ocho de los genes analizados resultaron reprimidos y 4 sobre-expresados tras exposición a 5FU (Figuras 4.8 y 4.9). No fue posible obtener ni CE50 ni CE200 para los restantes cuatro genes, así pues, éstas deberían ser necesariamente mayores de 100 ng/ml (la máxima concentración de 5FU ensayada). Las CE50 oscilaron entre 16 (para *Vegfa*) y 100 (para *Pnpla6*) ng/ml (Tabla 4.3), mientras que las CE200 oscilaron entre 30 (para *Cer1*) y 50 (para *Shh*) ng/ml (Tabla 4.3).

Las PM descritas en la sección 3.5 predijeron correctamente con los 16 genes que 5FU era un embriotóxico fuerte *in vivo* (Tabla 4.3). Un análisis matemático de las PM basado en los valores de IC_{50} para células 3T3 y D3 predice que los compuestos serán embriotóxicos fuertes (función III mayor que función II y que función I) siempre que CE50 o CE200 sean menores de 1380 ng/ml. Esta concentración es 3 órdenes de magnitud mayor que la IC_{50} para ambas líneas celulares (Tabla 4.1) y es, por lo tanto, incompatible con la supervivencia celular. Consecuentemente, las predicciones de embriotoxicidad de los genes *Jun*, *Mixl1*, *Nrcam* y *Myo1e* (aquellos para los que solamente se dedujo que la CE50 o CE200 debería de ser mayor de 100 ng/ml) deberían ser necesariamente de embriotóxico fuerte para cualquier concentración de 5FU compatible con la supervivencia celular.

Los 16 genes biomarcadores predijeron correctamente que RA es un embriotóxico fuerte *in vivo* (5 de los genes mediante represión de la expresión, 7 mediante sobre-expresión y 4 (*Myo1e*, *Hdac7*, *Pnpla6* y *Cdk1*) mediante registros indeterminados de CE50 o CE200, pero que necesariamente deberían ser mayores que la concentración de RA más alta ensayada (10 ng/ml) (Tabla 4.3). Las CE50 y CE200 más bajas se registraron para los genes *Wnt3* y *Afp*, respectivamente (Tabla 4.3). Con los valores de IC_{50} para células 3T3 y D3 mostrados en la Tabla 4.1 la predicción de embriotóxico fuerte *in vivo* se mantiene hasta una concentración de RA de 72 µg/ml, que es de nuevo varios órdenes de magnitud superior a las IC_{50} para ambas líneas celulares. Por lo tanto, de nuevo es necesario concluir que en este escenario, la predicción de embriotoxicidad de cualquier compuesto deberá ser necesariamente de embriotóxico fuerte a cualquier concentración compatible con la supervivencia celular.

Tabla 4.3: Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de embriotóxicos fuertes.

La capacidad de los genes para predecir la embriotoxicidad *in vivo* de los compuestos analizados se validó utilizando los PM descritos en la Tabla 1.4 basados en los PM del EST clásico pero utilizando la expresión de los genes biomarcadores para cuantificar los efectos de los agentes evaluados sobre la diferenciación celular. Los valores de IC50T3 e IC50D3 se obtuvieron de la Tabla 4.1. Los valores de CE50 y CE200 se dedujeron a partir de las Figuras 4.8 y 4.9. Todos los valores se expresan en µg/ml como exigen las PM del EST. Efecto: ↑ = Incremento de expresión con respecto al control. Efecto: ↓ = Reducción de la expresión con respecto al control. Efecto: ¿? = No se pudo determinar en las condiciones de ensayo y por lo tanto EC50 o EC200 mayores que la más alta concentración ensayada.

Compuesto	Gen	Efecto	CE50 (µg/ml)	CE200 (µg/ml)	Funciones discriminantes			CLA (*)
					I	I	III	
5FU	<i>Mesp1</i>	↓	0.052	-	-25	-12	0.16	F
	<i>Shh</i>	↑	-	0.050	-25	-12	0.16	F
IC50D3 = 0.21 µg/ml	<i>Wnt3</i>	↑	-	0.038	-25	-12	0.21	F
	<i>Nrcam</i>	¿?	>0.1	-	>-24	>-11	<-0.03	F
IC503T3 = 0.39 µg/ml	<i>Fik1</i>	↑	-	0.048	-25	-12	0.17	F
	<i>Nes</i>	↑	0.050	-	-25	-12	0.16	F
	<i>Cer1</i>	↑	-	0.030	-25	-12	0.24	F
	<i>Vegfa</i>	↓	0.016	-	-25	-12	0.29	F
	<i>Myo1e</i>	¿?	>0.1	-	>-24	>-11	<-0.03	F
	<i>Afp</i>	↓	0.025	-	-25	-12	0.26	F
	<i>Hdac7</i>	↓	0.050	-	-25	-12	0.16	F
	<i>Jun</i>	¿?	>0.1	-	>-24	>-11	<-0.03	F
	<i>Myc</i>	↓	0.095	-	-24	-12	-0.01	F
	<i>Pnpla6</i>	↓	0.100	-	-24	-12	-0.03	F
	<i>Cdk1</i>	↓	0.087	-	-24	-12	0.02	F
	<i>Mixl1</i>	¿?	>0.1	-	>-24	>-11	<-0.03	F
	RA	<i>Mesp1</i>	↓	0.0025	-	-21	-10	3.1
IC50D3 = 0.005 µg/ml	<i>Shh</i>	↑	-	0.0014	-21	-10	3.1	F
	<i>Wnt3</i>	↓	5.9×10^{-4}	-	-21	-10	3.1	F
IC503T3 = 20 µg/ml	<i>Nrcam</i>	↓	0.0023	-	-21	-10	3.1	F
	<i>Fik1</i>	↑	-	0.0015	-21	-10	3.1	F
	<i>Nes</i>	↓	6.2×10^{-4}	-	-21	-10	3.1	F
	<i>Cer1</i>	↑	-	2.2×10^{-5}	-21	-10	3.1	F
	<i>Vegfa</i>	↑	-	3.3×10^{-4}	-21	-10	3.1	F
	<i>Myo1e</i>	¿?	>0.01	-	>-21	>-10	<3.1	F
	<i>Afp</i>	↑	-	1.3×10^{-5}	-21	-10	3.1	F
	<i>Hdac7</i>	¿?	>0.01	-	-21	-10	3.1	F
	<i>Jun</i>	↑	-	0.0082	-21	-10	3.1	F
	<i>Myc</i>	↑	-	0.001	-21	-10	3.1	F
	<i>Pnpla6</i>	¿?	>0.01	-	>-21	>-10	<3.1	F
<i>Cdk1</i>	¿?	>0.01	-	>-21	>-10	<3.1	F	
<i>Mixl1</i>	↓	0.0042	-	-21	-10	3.1	F	

CLA = Clasificación *in vitro*. F = Fuerte (criterio III > I y II > I). ¿? = No se pudo determinar ni CE50 ni CE200.

4.3.2 Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de embriotóxicos débiles

Los valores de CE50 o CE200 tras exposición a DPH se pudieron determinar para 13 de los 16 genes analizados, siendo el gen más sensible *Cdk1* (CE50 = 10 µg/ml) y el más resistente *Myo1e* (CE200 = 105 µg/ml) (Tabla 4.4). La exposición a DPH causó sobreexpresión en 5 genes, represión en 8 genes y alteraciones de expresión apenas detectables para *Jun*, *Pnpla6* y *Mixl1* (Figura 4.10). Concluimos por tanto que para estos 3 últimos genes la CE50 o CE200 deberá ser necesariamente mayor de 150 µg/ml (la concentración de DPH más alta ensayada). Los PM empleados predijeron correctamente que DPH es un embriotóxico débil *in vivo* con los 13 genes para los que se pudo determinar la CE₅₀ o CE200 (Tabla 4.4). Sin embargo, considerando las IC50 para células 3T3 y D3 mostradas en la Tabla 4.1 y que la EC50 o EC200 sea mayor de 150 µg/ml la función I es siempre mayor que la II y que la III y por lo tanto la predicción habrá de ser en este caso necesariamente de no embriotóxico *in vivo*.

La expresión de 8 genes resultó reprimida tras exposición de las células D3 a VA (CE50 en el rango entre 63 y 200 µg/ml para *Wnt3* y *Flk1*, respectivamente) y 2 genes resultaron sobre-expresados (CE200 de 41 y 100 µg/ml para *Shh* y *Mesp1*, respectivamente) (Tabla 4.4). Todos estos 10 genes predijeron correctamente que VA es un embriotóxico débil *in vivo* (Tabla 4.4). Sin embargo, la expresión de 6 genes no resultó alterada significativamente tras exposición a VA y por lo tanto la CE200 o CE50 deberán ser necesariamente mayores que las más altas concentraciones ensayadas en cada uno de los respectivos casos (entre 200 y 300 µg/ml). El análisis de las PM utilizando los IC50 mostrados en la Tabla 4.1 predice que la embriotoxicidad sería débil hasta una concentración de 800 µg VA/ml, lo que induciría citotoxicidad compatible con la supervivencia de una parte importante de las células del cultivo al ser la IC50 para células D3 de 1300 µg/ml (Tabla 4.1). Por lo tanto, en este escenario, no nos resulta posible hacer una predicción de la embriotoxicidad *in vivo* del VA basada en los resultados obtenidos con *Myo1e*, *Jun*, *Myc*, *Pnpla6*, *Cdk1* y *Mixl1* (Tabla 4.1).

El efecto del LiCl encontrado más habitualmente fue la sobreexpresión de los genes biomarcadores (Tabla 4.4, Figura 4.12). En todos los casos, excepto para *Cdk1*, *Afp* y *Pnpla6* las CE50 y CE200 estuvieron por debajo de 600 µg/ml y predijeron embriotoxicidad débil *in vivo* (Tabla 4.4). *Cdk1*, *Pnpla6* y *Afp* mostraron CE50 o CE200 superior a 600 µg/ml, prediciendo una no embriotoxicidad *in vivo* del LiCl (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de embriotóxicos débiles.

La capacidad de los genes para predecir la embriotoxicidad *in vivo* de los compuestos analizados se validó utilizando los PM descritos en la Tabla 1.4 basados en los PM del EST clásico pero utilizando la expresión de los genes biomarcadores para cuantificar los efectos de los agentes evaluados sobre la diferenciación celular. Los valores de IC50T3 e IC50D3 se obtuvieron de la Tabla 4.1. Los valores de CE50 y CE200 se dedujeron a partir de las Figuras 4.10, 4.11 y 4.12. Todos los valores se expresan en $\mu\text{g/ml}$ como exigen las PM del EST. Efecto: \uparrow = Incremento de expresión con respecto al control. Efecto: \downarrow = Reducción de la expresión con respecto al control. Efecto: $\zeta?$ = No se pudo determinar en las condiciones de ensayo y por lo tanto EC50 o EC200 mayores que la más alta concentración ensayada.

Compuesto	Gen	Efecto	CE50 ($\mu\text{g/ml}$)	CE200 ($\mu\text{g/ml}$)	Funciones discriminantes			CLA (*)
					I	II	III	
DPH	<i>Mesp1</i>	\uparrow	-	70	267	4.8	-6.7	D
	<i>Shh</i>	\uparrow	-	57	1.7	4.5	-6.4	D
IC50D3 = 120 $\mu\text{g/ml}$	<i>Wnt3</i>	\downarrow	31	-	0.02	3.8	-6.0	D
	<i>Nrcam</i>	\downarrow	11	-	-1.3	3.3	-5.6	D
	<i>Flk1</i>	\uparrow	-	63	2.1	4.6	-6.6	D
IC50T3 = 80 $\mu\text{g/ml}$	<i>Nes</i>	\downarrow	15	-	-1.1	3.4	-5.7	D
	<i>Cer1</i>	\downarrow	15	-	-1.1	3.4	-5.7	D
	<i>Vegfa</i>	\downarrow	40	-	0.61	4.1	<-6.1	D
	<i>Myo1e</i>	\uparrow	-	105	4.9	5.7	-7.4	D
	<i>Afp</i>	\downarrow	75	-	2.9	5.0	-6.8	D
	<i>Hdac7</i>	\uparrow	-	13	-1.2	3.4	-5.6	D
	<i>Jun</i>	$\zeta?$	-	>150	>7.9	>6.9	<-8.2	N
	<i>Myc</i>	\downarrow	34	-	0.21	3.9	-6.0	D
	<i>Pnpla6</i>	$\zeta?$	-	>150	>7.9	>6.9	<-8.2	N
	<i>Cdk1</i>	\downarrow	10	-	-1.4	3.3	-5.6	D
	<i>Mixl1</i>	$\zeta?$	-	>150	>7.9	>6.9	<-8.2	N

VA	<i>Mesp1</i>	\uparrow	-	100	6.6	8.3	-6.2	D
	<i>Shh</i>	\uparrow	-	41	6.3	8.3	-6.2	D
IC50D3 = 240 $\mu\text{g/ml}$	<i>Wnt3</i>	\downarrow	63	-	6.4	8.3	-6.2	D
	<i>Nrcam</i>	\downarrow	117	-	6.7	8.4	-6.3	D
	<i>Flk1</i>	\downarrow	200	-	7.0	8.5	-6.4	D
IC50T3 = 1300 $\mu\text{g/ml}$	<i>Nes</i>	\downarrow	88	-	6.6	8.3	-6.2	D
	<i>Cer1</i>	\downarrow	75	-	6.5	8.3	-6.2	D
	<i>Vegfa</i>	\downarrow	165	-	6.9	8.4	-6.2	D
	<i>Myo1e</i>	$\zeta?$	-	>200	7.3	8.6	-6.4	NP
	<i>Afp</i>	\downarrow	165	-	6.9	8.4	-6.3	D
	<i>Hdac7</i>	\downarrow	172	-	6.9	8.5	-6.3	D
	<i>Jun</i>	$\zeta?$	-	>200	>7.0	>8.5	<-6.4	NP
	<i>Myc</i>	$\zeta?$	-	>200	>7.0	>8.3	<-6.4	NP
	<i>Pnpla6</i>	$\zeta?$	-	>300	>7.4	>8.7	<-6.4	NP
	<i>Cdk1</i>	$\zeta?$	-	>300	>7.4	>8.7	<-6.4	NP
<i>Mixl1</i>	$\zeta?$	-	>200	>7.0	>8.5	<-6.4	NP	

LICI	<i>Mesp1</i>	\uparrow	-	313	9.2	9.9	-7.3	D
	<i>Shh</i>	\downarrow	185	-	8.8	9.8	-7.2	D
IC50D3 = 650 $\mu\text{g/ml}$	<i>Wnt3</i>	\downarrow	336	-	9.3	10.0	-7.3	D
	<i>Nrcam</i>	\downarrow	392	-	9.5	10.0	-7.4	D
	<i>Flk1</i>	\uparrow	-	245	9.0	9.8	-7.3	D
IC50T3 = 1560 $\mu\text{g/ml}$	<i>Nes</i>	\uparrow	-	365	9.4	10.0	-7.3	D
	<i>Cer1</i>	\uparrow	-	592	10.2	10.3	-7.5	D
	<i>Vegfa</i>	\uparrow	-	245	9.0	9.8	-7.2	D
	<i>Myo1e</i>	\uparrow	-	328	9.3	9.9	-7.3	D
	<i>Afp</i>	$\zeta?$	-	>600	8.8	9.8	-7.2	N
	<i>Hdac7</i>	\downarrow	142	-	8.7	9.7	-7.1	D
	<i>Jun</i>	\downarrow	337	-	9.4	10.0	-7.3	D
	<i>Myc</i>	\uparrow	-	442	9.7	10.1	-7.4	D
	<i>Pnpla6</i>	$\zeta?$	-	>600	>9.9	>10.2	-7.5	N
	<i>Cdk1</i>	$\zeta?$	-	>600	>10.2	>10.3	<-7.56	N
<i>Mixl1</i>	\uparrow	-	409	9.0	9.8	-7.2	D	

* CLA = Clasificación *in vitro*. D = Débil (criterio II > I y III > I); N = No embriotóxico (Criterio I > II, I > III); NP = No predicción. Se marcan en negrita aquellas predicciones erróneas. > = Mayor que. < = Menor que. $\zeta?$ = No se pudo determinar ni CE50 ni CE200.

4.3.3 Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de no embriotóxicos

El agente no embriotóxico sacarina alteró significativamente la expresión de 4 genes a concentraciones inferiores a 145 µg/ml, lo cual condujo a predicciones de compuesto embriotóxico débil *in vivo* (Tabla 4.5). Sin embargo, otros 11 genes resultaron con CE50 o CE200 mayores de 178 µg/ml y predijeron la no embriotoxicidad de la sacarina *in vivo*, incluso aquellos para los que las EC50 o EC200 fueron superiores a 1000 µg/ml (Tabla 4.5).

La expresión de 6 genes fue incrementada por exposición a PG, mientras que fue disminuida en otros 3 (Tabla 4.5). Todos aquellos genes con CE50 o CE200 mayores de 250 µg/ml (12 de los 16 ensayados) predijeron la no embriotoxicidad de PG *in vivo* (Tabla 4.5). Solo aquellos genes con CE50 o CE200 menores de 230 µg/ml (*Mesp1*, *Shh*, *Fik1* y *Hdac7*) predijeron que la PG era un embriotóxico débil *in vivo* (Tabla 4.5).



Tabla 4.5: Funcionamiento de genes biomarcadores de diferenciación en la predicción de agentes no embriotóxicos. La capacidad de los genes para predecir la embriotoxicidad *in vivo* de los compuestos analizados se validó utilizando los PM descritos en la Tabla 1.4 basados en los PM del EST clásico pero utilizando la expresión de los genes biomarcadores para cuantificar los efectos de los agentes evaluados sobre la diferenciación celular. Los valores de IC50T3 e IC50D3 se obtuvieron de la Tabla 4.1. Los valores de CE₅₀ y CE₂₀₀ se dedujeron a partir de las Figuras 4.13 y 4.14. Todos los valores se expresan en µg/ml como exigen las PM del EST. Efecto: ↑ = Incremento de expresión con respecto al control. Efecto: ↓ = Reducción de la expresión con respecto al control. Efecto: ¿? = No se pudo determinar en las condiciones de ensayo y por lo tanto EC₅₀ o EC₂₀₀ mayores que la más alta concentración ensayada.

Compuesto	Gen	Efecto	CE50 (µg/ml)	CE200 (µg/m)	Funciones discriminantes			CLA (*)
					I	II	III	
Sacarina	<i>Mesp1</i>	↓	89	-	11.7	11.9	-8.6	D
	<i>Shh</i>	↓	91	-	11.7	11.9	-8.7	D
IC50D3 = 4500 µg/ml	<i>Wnt3</i>	↑	-	178	12.0	12.0	-8.8	NP
IC503T3 = 1800 µg/ml	<i>Nrcam</i>	¿?	>1000	-	>14.4	>12.9	<-9.4	N
	<i>Fik1</i>	↑	-	450	12.8	12.3	-12.4	N
	<i>Nes</i>	↑	-	100	11.8	11.9	-8.7	D
	<i>Cer1</i>	↑	-	355	12.5	12.2	-8.9	N
	<i>Vegfa</i>	↑	-	254	12.2	12.0	-8.8	N
	<i>Myo1e</i>	↑	-	250	12.2	12.0	-8.8	N
	<i>Afp</i>	↑	-	1000	14.4	12.9	-9.4	N
	<i>Hdac7</i>	↓	59	-	11.8	12.9	-8.7	D
	<i>Jun</i>	¿?	>1000	-	>14.4	>12.9	<-9.4	N
	<i>Myc</i>	↑	-	214	12.1	12.0	-8.7	N
	<i>Pnpla6</i>	↓	284	-	12.3	12.1	-8.8	N
	<i>Cdk1</i>	↑	-	235	12.2	12.0	-8.8	N
	<i>Mixl1</i>	¿?	>1000	-	>14.4	>12.9	<-9.4	N
<hr/>								
PG	<i>Mesp1</i>	↓	100	-	9.8	10.5	-8.8	D
	<i>Shh</i>	↑	-	100	10.0	10.6	-8.9	D
IC50D3 > 5000 µg/ml	<i>Wnt3</i>	↑	-	500	13.1	11.8	-9.8	N
	<i>Nrcam</i>	¿?	>1000	-	>17.3	>13.4	<-11.0	N
	<i>Fik1</i>	↓	195	-	10.6	10.9	-9.1	D
IC503T3 = 640 µg/ml	<i>Nes</i>	¿?	>1000	-	13.6	12.0	-9.9	N
	<i>Cer1</i>	↑	-	461	12.8	11.7	-9.7	N
	<i>Vegfa</i>	¿?	>1000	-	>17.3	>13.4	<-11.0	N
	<i>Myo1e</i>	¿?	>1000	-	>17.3	>13.4	<-11.0	N
	<i>Afp</i>	↓	576	-	13.8	12.1	-10.0	N
	<i>Hdac7</i>	↑	-	230	10.9	11.0	-9.2	D
	<i>Jun</i>	↑	-	284	9.7	10.5	-8.8	N
	<i>Myc</i>	↑	-	313	11.6	11.2	-9.3	N
	<i>Pnpla6</i>	¿?	>1000	-	>17.3	>13.4	<-11.0	N
	<i>Cdk1</i>	¿?	>1000	-	>17.3	>13.4	<-11.0	N
	<i>Mixl1</i>	¿?	>1000	-	>17.3	>13.4	<-11.0	N

* CLA = Clasificación *in vitro*. D = Débil (criterio II > I y III > I); N = No embriotóxico (Criterio I > II, I > III); NP = No predicción. Se marcan en negrita aquellas predicciones erróneas. > = Mayor que. < = Menor que. ¿? = No se pudo determinar ni CE₅₀ ni CE₂₀₀.

4.4 PREDICCIÓN GLOBAL DE LOS GENES BIOMARCADORES

La Tabla 4.6 resume la predicción de cada uno de los 16 genes analizados para cada uno de los 7 compuestos modelo empleados. Seis genes (*Wnt3*, *Nrcam*, *Cer1*, *Myo1e*, *Myc* y *Vegfa*) fueron capaces de predecir correctamente la embriotoxicidad *in vivo* de los 7 compuestos estudiados; mientras que 3 genes predijeron correctamente la embriotoxicidad de 6 de los 7 compuestos y 3 genes de 5 de 6 compuestos (Tabla 4.6). La peor predicción se encontró para *Shh*, *Mesp1* y *Hdac7* (5 aciertos de 7 predicciones en todos los casos) y para *Pnpla6* (4 aciertos de 6 predicciones) (Tabla 4.6).

Se obtuvo un 100% de concordancia entre la embriotoxicidad *in vitro* e *in vivo* cuando se asignó como potencial embriotóxico aquel para el cual se obtuvo el mayor porcentaje de predicciones de entre todas las disponibles (Tabla 4.6). Los embriotóxicos fuertes se predijeron correctamente con los 16 genes empleados, mientras que el porcentaje de predicciones correctas de embriotóxicos débiles osciló entre el 81% (para DPH) y el 100% (para VA) (Tabla 4.6). Finalmente, los no embriotóxicos obtuvieron los peores porcentajes de predicciones correctas con el 73% (para sacarina) y el 75% (para PG) (Tabla 4.6). No obstante, es remarcable que en los casos de los embriotóxicos débiles y en el de los no embriotóxicos más de 2/3 de los genes empleados predijeron siempre correctamente el correspondiente potencial embriotóxico. Así pues, si consideramos como predicción global aquella con un mayor número de predicciones individuales se alcanzó el 100% de concordancia entre la predicción de embriotoxicidad *in vitro* y la embriotoxicidad *in vivo*.

Tabla 4.6: Predicción global *in vitro* de compuestos embriotóxicos modelo empleando genes biomarcadores de diferenciación celular. La predicción individual de cada gen se tomó de las Tablas 4.3, 4.4 y 4.5. La clasificación final se asignó considerando aquella categoría que había obtenido un mayor porcentaje de predicciones individuales. F = Embriotóxico fuerte; D = Embriotóxico débil; N = No embriotóxico. Las predicciones de embriotoxicidad *in vivo* erróneas se muestran en celdillas sombreadas.

Compuesto	<i>In vivo</i>	Predicción individual de cada gen															Predicción final <i>in vitro</i>				
		<i>Mesp1</i>	<i>Shh</i>	<i>Wnt3</i>	<i>Nrcam</i>	<i>Fik1</i>	<i>Nes</i>	<i>Cer1</i>	<i>Vegfa</i>	<i>Myo1e</i>	<i>Afp</i>	<i>Hdac7</i>	<i>Jun</i>	<i>Myc</i>	<i>Pnpla6</i>	<i>Cdk1</i>	<i>Mixl1</i>	%F	%D	%N	Clasificación
5FU	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	100	0	0	F
RA	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	100	0	0	F
DPH	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	N	D	N	D	N	0	81	19	D
VA	D	D	D	D	D	D	D	D	D	-	D	D	-	-	-	-	-	0	100	0	D
LiCl	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	N	D	D	N	N	D	0	81	19	D	
Sacarina	N	D	D	-	N	N	D	N	N	N	N	D	N	N	N	N	N	0	27	73	N
PG	N	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	D	N	N	N	N	N	0	25	75	N
Predicción correcta/total de predicciones	-	5/7	5/7	6/6	7/7	6/7	6/7	7/7	7/7	6/6	6/7	5/7	5/6	6/6	4/6	5/6	5/6	Concordancia <i>in vitro-in vivo</i> = 100%			



5 DISCUSIÓN

5.1 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES BIOMARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Los genes biomarcadores de diferenciación celular empleados en este estudio representan los 3 linajes embrionarios (mesodermo, endodermo y ectodermo) así como genes implicados en diversos procesos básicos para la supervivencia celular (Tabla 4.2). A continuación se discute, sobre la base de los resultados obtenidos y de la literatura existente la idoneidad de estos 16 genes biomarcadores empleados en este trabajo.

5.1.1 Efecto de compuestos embriotóxicos modelo sobre la expresión de genes marcadores de endodermo

Dos de los genes biomarcadores del linaje endodermo que fueron ensayados a diferentes concentraciones de compuestos embriotóxicos pertenecientes a las distintas categorías de embriotoxicidad como 5FU y RA (embriotóxicos fuertes), DPH, LiCL y VA (embriotóxicos débiles) y por último PG y sacarina (no embriotóxicos) presentaron distintos comportamientos en sus niveles de expresión. *Afp* codifica para la proteína sérica más abundante en el embrión en desarrollo, que es producida por el saco vitelino y el hígado durante el desarrollo fetal. Este gen es considerado un biomarcador de endodermo visceral típico y necesario para el comienzo del desarrollo hepático debido a que se expresa principalmente en el hígado fetal en niveles altos y en el endodermo visceral (Kwon et al., 2006; Jin et al., 2009). En nuestros resultados encontramos expresión de este gen al día 5 mediante la técnica de RT-PCR, de igual manera en otros experimentos realizados por RT-PCR también se presentó la expresión del gen *Afp* en el citado día 5 (Mauritz et al., 2008; Pamies et al., 2010b). Ahora bien, al ser expuesto al compuesto 5FU se observó que este compuesto causó una disminución considerable del nivel de expresión (95%) a la máxima concentración ensayada (100 ng/ml) (Figura 4.8). Estos resultados son apoyados por otros informes de años anteriores en los que la expresión de este gen ha sido estudiada en presencia de una amplia gama de concentraciones de 5FU; así, a concentraciones bajas (0,01 y 10 nM) el compuesto produjo una disminución en la expresión de *Afp* en los cuerpos embrionarios, sin embargo algunos genes de mesodermo también probados en este estudio a estas mismas concentraciones no sufrieron alteraciones significativas, lo cual sugiere que *Afp* podría tener una alta sensibilidad como indicador de diferenciación a endodermo visceral (Pamies et al., 2010a). Por otra parte, *Afp* sufrió alteraciones en su nivel de expresión al ser expuesta a compuestos de diferente potencial de embriotoxicidad, así, el compuesto RA (embriotóxico fuerte) causó aumento significativo para este gen, mientras que su comportamiento de expresión frente a los compuestos embriotóxicos débiles DPH y VA fue una disminución importante.

Flk1 es considerado un biomarcador de mesodermo temprano y uno de los dos receptores del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF receptor-2 (Narazaki et al., 2008). VEGF es de vital importancia en el desarrollo del sistema vascular y uno de los principales factores angiogénicos. Los receptores para VEGF son Flt-1 y Flk1 (Kdr), estos receptores están implicados en la formación y

desarrollo de los vasos sanguíneos durante la embriogénesis (Muche et al., 2015), este último (*Flk1*) es el primer marcador para la diferenciación de células endoteliales y es crucial para el desarrollo vascular, además está comprometido en procesos como la vasculogénesis e influye en otras etapas del desarrollo embrionario temprano y en la hematopoyesis temprana (Yamaguchi et al 1993; Kabrun et al., 1997; Puri et al., 1995; Sakurai et al., 2005). En nuestras condiciones de ensayo se encontró que de los compuestos embriotóxicos fuertes, el 5FU causó alteraciones en el nivel de expresión para el gen *Flk1*, sobre-expresándose unas 13 veces con respecto a las células control no expuestas (Figura 4.8). De igual manera, el efecto observado en la expresión de este gen al ser expuesto a las distintas concentraciones de los compuestos RA, DPH, LiCl y sacarina fue en todos los casos incremento en su nivel de expresión (Figuras 4.9, 4.10, 4.12 y 4.14). Otros estudios describieron cambios expresión temprana de este gen durante la diferenciación celular, así, la expresión ya es detectable en el día 1 de la diferenciación en EBs (Pamies et al., 2010b), alcanzando un máximo en el día 4.5 de diferenciación (Narazaki et al., 2008). Esta expresión temprana de *Flk1* sugiere que es un buen candidato a ser utilizado para la detección de agentes embriotóxicos que alteren la formación temprana de endodermo.

5.1.2 Efecto sobre la expresión de genes marcadores de mesodermo

Los genes biomarcadores del linaje mesodermo que fueron ensayados a diferentes concentraciones de compuestos embriotóxicos pertenecientes a las distintas categorías de embriotoxicidad también presentaron distintos comportamientos en sus niveles de expresión. La expresión del gen *Mesp1* se vio afectada luego de la exposición a compuestos embriotóxicos fuertes y no embriotóxicos, los cuales causaron disminución en la expresión de dicho gen en aproximadamente un 50% para ambos casos, mientras que los compuestos embriotóxicos débiles causaron incremento máximo de 3 veces. Este gen ha sido elegido como marcador de mesodermo debido a que se expresa muy temprano al inicio de la aparición de este linaje, además, se ha observado su expresión en células ES junto con otros marcadores cardíacos (Mauritz et al., 2008), dicha expresión es solo transitoria en el embrión en desarrollo, pues empieza a expresarse al inicio de la formación del mesodermo y luego desaparece casi completamente, lo que sugiere que *Mesp1* no es necesario para etapas del desarrollo cardíaco tardías (Liu et al., 2013). Así pues, *Mesp1* se considera como el marcador más temprano de los linajes cardiovasculares durante la gastrulación, promoviendo la migración celular y polaridad durante el desarrollo cardíaco (Chiapparato et al., 2016).

El factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, promueve la condensación de células endoteliales en redes de vasos sanguíneos proceso denominado como vasculogénesis. Según algunos estudios VEGF también promueve la neurogénesis y crecimiento células gliares y es esencial para la neuroprotección en adultos (Rosentein et al., 2010). Los subtipos de VEGF como *Vegfa* tienen un importante papel en la vasculogénesis, al inicio de la gastrulación se expresa el gen *Vegfa* en el endodermo visceral (saco vitelino), dicha expresión es necesaria para la expansión y organización normal tanto de las células endoteliales y hematopoyéticas en los primeros sitios de formación de

vasos sanguíneos. De igual manera el proceso de la vasculogénesis es el principal mecanismo de formación vascular en el desarrollo temprano y este proceso tiene lugar primero en el saco vitelino (Damert et al., 2002).

El gen *Vegfa* presentó variaciones en su comportamiento de expresión de la siguiente manera: redujo su expresión al ser expuesto a 5 FU, DPH y VA (Figuras 4.8, 4.10 y 4.11), sin embargo, presentó incremento con RA, LiCl y sacarina (Figuras 4.9, 4.12 y 4.14), por el contrario para PG no se observó ningún efecto (Figura 4.13). Al comparar nuestros resultados con un estudio similar en el cual evaluaron los mismos compuestos embriotóxicos en el método EST, resultó que todos los compuestos evaluados causaron alteraciones en la expresión de otro de los genes importantes en el proceso de la vasculogénesis, en este caso el gen utilizado como “*end-point*” molecular fue VE-Cadherin un marcador apropiado de diferenciación de células ES en células endoteliales (Festag et al., 2007a; Festag et al., 2007b), que junto con *Vegfa* y otros genes, son calificados como genes críticos implicados en la vasculogénesis y en procesos de la vía de señalización de VEGF (Argraves et al., 2005). Aunque en nuestro caso se redujo el tiempo de exposición a la mitad, demostramos que nuestro biomarcador elegido *Vegfa* también mantiene su buen desempeño, lo cual sugiere que este gen puede ser utilizado para nuestros propósitos.

En el riñón, la expresión del gen *Myo1e* es particularmente alta en células epiteliales viscerales glomerulares conocidas como podocitos, que juegan un papel clave en la filtración selectiva de proteínas en el glomérulo (Bi et al., 2013; Randles et al., 2016). Además, este gen también está implicado en la formación de vasos sanguíneos, lo que sugiere que *Myo1e* puede estar comprometido en estas dos funciones (Schmahl et al., 2006). La expresión del gen *Myo1e* únicamente se vio alterada al exponerse a los compuestos *DPH*, *LiCl* y *sacarina*, que causaron incremento en su expresión en todos los casos, mientras que para cuatro de los siete compuestos probados (*5FU*, *RA*, *VA*, *PG*) no fue posible establecer un efecto en la expresión de este gen, lo que nos puede estar sugiriendo que no es un buen candidato a biomarcador temprano para el método EST.

El gen histona desacetilasa 7 (*Hdac7*) es expresado específicamente en el endotelio vascular durante la embriogénesis temprana manteniendo la integridad vascular, lo cual tiene importantes implicaciones para la comprensión de procesos como angiogénesis y remodelación vascular durante el desarrollo cardiovascular y enfermedades asociadas, también ha sido sugerido como diana terapéutica para trastornos vasculares, incluyendo insuficiencia cardíaca, aortica, aneurismas y tumorigénesis (Chang et al., 2006). Además, a *Hdac7* se le atribuye ser un factor importante en la migración de células endoteliales y por lo tanto en la angiogénesis (Mottet et al., 2007; Turtoi et al., 2012). El comportamiento de expresión del gen *Hdac7* al ser expuesto a los diferentes compuestos probados en este estudio fue una disminución con 5FU, VA, LiCl, PG y sacarina, mientras que aumentó su expresión al ser expuesto a DPH. Estas alteraciones en el nivel de expresión de *Hdac7* con diferentes agentes embriotóxicos indican que también puede ser muy prometedor a la hora de elegirlo como biomarcador con fines de ser aplicado en el método EST.

5.1.3 Efecto sobre la expresión de genes marcadores de ectodermo

El gen *Nrcam* promueve la señalización direccional durante el cono de crecimiento axónico (Kaprielian et al., 2000), regula el crecimiento del axón y el desarrollo sináptico en neuronas piramidales corticales (Demyanenko et al., 2014). Estas importantes funciones sugieren que podría ser un buen candidato a ser utilizado como biomarcador de alteraciones en la diferenciación como consecuencia de exposición a agentes embriotóxicos, de hecho, la expresión se redujo en un 75% al ser expuesto a los compuestos RA y LiCl, mientras que DPH y VA también causaron disminuciones estadísticamente significativas en su expresión.

Nes codifica para las proteínas de filamentos intermedios que comprende uno de los tres principales sistemas del citoesqueleto, importante para el soporte interno de las células y otras funciones de mantenimiento de la estructura celular. También está relacionado con la neurogénesis o generación de nuevas neuronas (Von Bohlen et al., 2007), por lo que *Nes* es considerado habitualmente como marcador de formación de ectodermo. Además, es fuertemente expresado en células progenitoras neurales, desempeñando un papel crítico en el mantenimiento de la integridad celular (Sunabori et al., 2008; Stummann et al., 2009). La nestina juega un papel importante en la diferenciación y en el desarrollo del sistema nervioso, sin embargo estudios previos han sugerido que *Nes* también puede estar implicado en la migración celular y angiogénesis vía VEGF, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual actúa. Todo ello sugiere que podría ser un buen candidato como biomarcador para monitorizar la actividad anti-angiogénica de compuestos químicos (Liang et al 2015). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una reducción estadísticamente significativa en la expresión de *Nes* como resultado de la exposición a 5FU, RA, DPH y VA (Figuras 4.8, 4.9, 4.10 y 4.11), así como una sobreexpresión con compuestos como LiCl y sacarina (Figuras 4.12 y 4.14).

Procesos como la formación del tubo neural así como su desarrollo y organización dorso ventral, son funciones de *Shh* (Cho et al., 2008). De igual manera, está implicado en el desarrollo de vasos sanguíneos y el crecimiento de vasos sanguíneos angiogénicos (Pola et al., 2001; Lawson et al., 2002). El papel de *Shh* en la vasculogénesis ha sido documentado en una variedad de contextos. *Shh* promueve la neovascularización en los adultos mediante inducción de pro-angiogénicos y factores de crecimiento como VEGF, lo cual sugiere que el efecto de *Shh* sobre las células vasculares es indirecto. Sin embargo, los efectos directos de *Shh* sobre la función de las células endoteliales durante la angiogénesis es desconocida (Renault et al., 2010). El mayor efecto causado por los compuestos embriotóxicos 5 FU, RA, DPH, VA, PG fue incremento en la expresión para *Shh* (Figuras 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 y 4.13), mientras que con LiCl y sacarina su expresión se vio reducida (Figuras 4.12 y 4.14). Esto sugiere que en las células tratadas posiblemente se estén viendo comprometidos los procesos descritos anteriormente que ocurren en etapas tempranas del desarrollo embrionario, lo cual desembocaría en embriotoxicidad.

Pnpla6 es el gen que codifica para una proteína llamada Esterasa Diana de Neuropatía (NTE). Se determinó que esta proteína es la diana de iniciación de un síndrome neurodegenerativo ocasionado por determinados compuestos organofosforados (Moser et al., 2004). NTE es altamente expresada en el sistema nervioso y se ha demostrado que está implicada en el mantenimiento de la integridad del sistema nervioso en adultos (Lush et al., 1998), de igual manera, estudios *in vivo* que demuestran que la supresión del gen codificante de NTE detiene el desarrollo embrionario en el ratón entre los días 8 y 9 (Moser et al., 2004; Winrow et al., 2003) debido a que NTE juega un papel vital en la formación de la capa celular laberíntica y en la vasculogénesis (Moser et al., 2004), aunque embriones heterocigotos NTE^{+/-} fueron viables, mostraron alteraciones en el sistema nervioso, lo que sugiere que NTE es importante tanto en el desarrollo como para regular la actividad motora (Winrow et al., 2003). Estudios realizados por parte del grupo de trabajo donde se realizó la presente tesis de Doctorado sugieren que NTE está implicada en procesos como el transporte de vesículas, adhesión y migración, todos ellos necesarios para explicar la vasculogénesis y neurogénesis durante el desarrollo embrionario (Pamies et al., 2014a; Pamies et al., 2014b; Sogorb et al., 2016).

La expresión del gen *Pnpla6* se alteró únicamente al ser expuesto a los compuestos 5FU y sacarina, alcanzando un máximo de inhibición del 50 y 80% respectivamente (Figuras 4.8, 4.9). Cinco de los compuestos que se probaron restantes no causaron ningún efecto. En el presente estudio no fue posible dilucidar el efecto causado por determinados compuestos en la expresión del gen, sin embargo otros trabajos demuestran que es un buen candidato a biomarcador de diferenciación temprana, según Pamies y colaboradores (2010b), *Pnpla6* mostró un aumento de expresión durante los primeros días de diferenciación (30h en cultivos de monocapa y 5 días en EBs) que volvió a niveles basales manteniéndose constante hasta el día 35 de la diferenciación. Dicho aumento de expresión génica no se pudo correlacionar con la expresión en el EBs de ningún gen representativo de algún linaje celular específico. Una de las ventajas de la utilización del gen *Pnpla6* como indicador de embriotoxicidad es que es un gen con una expresión constitutiva, es decir, que el gen se expresa desde etapas muy tempranas del desarrollo (de hecho también se expresa en células indiferenciadas) (Pamies et al., 2010b).

5.1.4 Efecto sobre la expresión de genes marcadores de procesos básicos para la supervivencia celular

Los genes biomarcadores de procesos básicos para la supervivencia celular que fueron ensayados a diferentes concentraciones de compuestos embriotóxicos pertenecientes a las distintas categorías de embriotoxicidad presentaron distintos comportamientos en sus niveles de expresión, uno de los genes representantes es el gen *Myc*. Las proteínas de la familia *Myc* están involucradas en procesos celulares fundamentales incluyendo la proliferación, crecimiento, apoptosis y diferenciación, posiblemente a través de la activación y represión de conjuntos específicos de genes diana, lo que implica que *Myc* es necesario para el desarrollo normal en el inicio de la organogénesis (Knoepfler et al., 2002). Otros estudios también han sugerido que este gen podría estar implicado en el

mantenimiento de factores de pluripotencialidad (Sridharan et al., 2009; Dang et al., 2012). Estudios recientes también han propuesto que este gen tiene un impacto significativo en la longevidad y múltiples aspectos de la salud de los mamíferos, no es sorprendente que este gen sea necesario durante el desarrollo embrionario, y su expresión des-regulada promueva fuertemente el cáncer (Hofmann et al., 2015). *Myc* pudo verse afectado en alguno de los procesos anteriormente descritos, pues su expresión se alteró al ser expuesto a los compuestos embriotóxicos 5FU y DPH, los cuales causaron descensos en la expresión de este gen, sin embargo, al ser expuesto a RA, LiCl, PG y sacarina se observó aumento en su nivel de expresión. Todo ello indica que también puede ser un buen candidato como biomarcador de diferenciación en el método EST.

Las actividades de las quinasas dependientes de ciclina (*Cdks*) controlan aspectos de la división celular, incluida la entrada en el ciclo quiescencia (G0), la transición de fase G1/S, la replicación del ADN en fase S, descomposición nuclear, condensación y segregación cromosómica, y citocinesis. El genoma de los mamíferos contiene al menos 20 *Cdks* diferentes. *Cdk1* fue el primer *Cdk* identificado y se conserva en todos los organismos. Además, juega un papel importante en la mitosis y es esencial para la proliferación celular y el desarrollo embrionario temprano. Según estudios, la deficiencia de *Cdk1* conduce a la detención del desarrollo embrionario alrededor del blastocisto (Diril et al., 2012). *Cdk1* está muy sobre-expresado en células madre pluripotentes cuando se compara con células somáticas, esto indica la participación de *Cdk1* en la regulación de la diferenciación celular, que se ha confirmado por estudios recientes, en donde observaron que este gen inhibe la diferenciación en células ES en el trofoectodermo para mantener el estado indiferenciado de las células ES, mediante una interacción directa de los genes *Cdk1* y *Oct4* (Li et al., 2012). Otros trabajos han propuesto que la regulación del ciclo celular en la meiosis en ovocitos de mamíferos es controlada por cambios en la actividad de *Cdk1* y *MAPK* (proteína quinasa activada por mitógeno), la actividad de *Cdk1* impulsa los oocitos a través de la meiosis I, mientras que *MAPK* promueve la detención en metafase II, actuando de manera complementaria para completar la meiosis I (Nabti et al., 2014). La implicación de *Cdk1* en todos estos importantes procesos celulares sugieren que podría ser un buen biomarcador de embriotoxicidad.

Cer1 es una proteína secretada, expresada primero en el endodermo visceral anterior y luego en el endodermo definitivo, que se ha utilizado como marcador para la cuantificación de la diferenciación de endodermo definitivo de células ES de ratón y células pluripotentes humanas (Iwashita et al., 2013). Se ha sugerido que *Cer1* juega un papel fundamental durante la embriogénesis temprana, como inhibidor de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta secretada durante la fase de gastrulación de la embriogénesis (Kato et al., 2006). En estudios anteriores, *Cer1* también ha sido relacionado con la etapa de organogénesis del riñón en embriones en desarrollo (Chi et al., 2011). El comportamiento de expresión observado en este gen, luego de ser expuesto a 5FU, RA, DPH, LiCl, PG y sacarina fue de incremento (Figuras 4.8, 4.9, 4.10, 4.12, 4.13 y 4.14), no obstante únicamente disminuyó su expresión con VA (Figura 4.11), viéndose afectada su expresión

para todos los compuestos probados en el presente estudio, esto indica que podría ser un excelente biomarcador de diferenciación y podría ser usado en el método EST.

Las *Wnts* regulan, en general, el crecimiento del axón (guía axón). En el caso de *Wnt3*, reduce rápidamente la tasa de extensión axonal (dentro de los primeros 20 minutos) y posteriormente aumenta el tamaño del cono de crecimiento (Purro et al., 2008). Se ha sugerido que otra de las funciones de *Wnt3*, es regular el destino celular y los patrones durante la embriogénesis, siendo esencial para el mantenimiento de la gastrulación. Así, la señalización de *Wnt* en la gastrulación se conserva en la mayoría, si no en todos los vertebrados (Tortelote et al., 2013; Yoon et al., 2015). Este gen presenta cambios importantes en su comportamiento de expresión luego de ser expuesto a los diferentes compuestos ensayados, en donde se observó aumento en la expresión tras su exposición a los compuestos 5FU, PG y sacarina, mientras que con RA, DPH, VA, LiCl la expresión resultó inhibida. Estos resultados sugieren que este gen es un buen modelo de biomarcador y puede ser utilizado en el método EST.

Para cuatro de los compuestos probados, no se observó ningún efecto en la expresión de *Jun*. Sin embargo, al exponerse a RA y PG se observó un incremento en su expresión, únicamente LiCl causó disminución en la expresión del 80%. Ya se ha estudiado la expresión de *Jun* junto con otros genes en trabajos de toxicidad del desarrollo neurológico (Pamies et al., 2014a; Sogorb et al., 2016), se ha demostrado que *Jun* es crítico para múltiples procesos biológicos, incluyendo la proliferación celular, apoptosis, progresión del ciclo celular y diferenciación, todas estas funciones también son cruciales para el desarrollo embrionario. Además, se ha propuesto que *Jun* se expresa en varias poblaciones de células importantes para el desarrollo cardiovascular (Zhang et al., 2013). Otros estudios también han sugerido su papel en la regulación en la angiogénesis mediante la activación de la proliferación, migración y proteólisis de las células endoteliales (Uchida et al., 2008). Por otra parte, *Jun* se ha relacionado con un papel crucial en diferentes tipos de modelos de daño neuronal. Sin embargo, en el sistema nervioso adulto, *Jun* también podría estar involucrado en procesos como neuroprotección y regeneración. Además, en varios tipos de células, c-Jun ha mostrado participar en la regulación del ciclo celular, diferenciación, organogénesis, transformación tumoral y apoptosis (Herdegen et al., 1997) y regulación de neurotransmisores (Marek et al., 2010). Sin embargo, para la mayoría de compuestos probados en este estudio, la expresión de este gen no se vio alterada por lo tanto no es factible para nuestros propósitos de ser incluido como biomarcador de diferenciación en el método EST.

Por último, *Mixl1* es un factor de transcripción necesario en la formación de mesodermo y endodermo durante la embriogénesis en los mamíferos (Lim et al., 2009; Zhang et al., 2009; Pereira et al., 2011). En nuestras condiciones de estudio, la expresión de este gen no se vio alterada al ser expuesto a cinco de los compuestos ensayados, pues no se observó ningún efecto. Sin embargo al exponerse a RA se observó disminución estadísticamente significativa, por el contrario con LiCl aumentó su

expresión, estos resultados nos indican que para nuestros propósitos no sería interesante evaluar la expresión de este gen como biomarcador con fines de utilizarlo en el método EST.



5.2 MEJORAS IMPLEMENTADAS EN ESTE TRABAJO EN EL METODO EST

En el presente estudio, se ha probado la introducción de genes biomarcadores de diferenciación celular como criterio de medida (*end-point*) de las alteraciones en la diferenciación temprana causadas por exposición a agentes embriotóxicos. También se ha verificado la idoneidad de los genes seleccionados mediante la evaluación de las alteraciones en su nivel de expresión, y, aplicando los criterios de clasificación del EST convencional sobre una base molecular cuantitativa se ha podido asignar el potencial embriotóxico de los compuestos modelo de forma más precisa (de hecho se obtuvo una concordancia entre predicción *in vitro* y potencial *in vivo* del 100%) que a través del abordaje del EST convencional. La implementación de los cambios propuestos en este trabajo permitiría perfeccionar la capacidad de predicción del EST, aumentar sus posibilidades de utilización en procesos de escrutinio masivo de librerías de sustancias químicas e incrementar sus posibilidades de uso futuras a efectos de regulación, lo que sería muy útil en la evaluación del riesgo de toxicidad embrionaria y posteriormente para la toxicidad de la reproducción.

Además de la utilización de genes biomarcadores tempranos de embriotoxicidad también se ha propuesto: a) una reducción de la duración total del ensayo a la mitad (desde los 10 días del EST convencional hasta los 5 días de exposición empleados en este trabajo); b) la simplificación del proceso técnico de los cultivos celulares (al utilizar cultivos en monocapa en lugar de EBs en "gotas colgantes").

Estas modificaciones surgieron para dar cumplimiento a los peticiones del EURL-ECVAM, que requirió la introducción de "*end-points*" moleculares para mejorar la cuantificación de los procesos de diferenciación celular hacia los tres principales linajes embrionarios (Spielmann et al., 2006). Una ventaja adicional del planteamiento general empleado en este trabajo es que se analizó la expresión de genes biomarcadores de diferenciación de los tres linajes embrionarios, y no solo del mesodermo del cual derivan los cardiomiocitos latentes que se utilizan en el EST convencional.

5.3 TRANSCRIPTÓMICA PARA LA DETECCIÓN *IN VITRO* DE COMPUESTOS EMBRIOTÓXICOS

La transcriptómica brinda información de algunos mecanismos que conducen a la embriotoxicidad. En un estudio anterior se demostró que el uso de la alteración en las concentraciones de RNAs mensajeros codificantes de los marcadores neurales neurofilamento 68, neurofilamento 200, receptor de N-metil D-aspartato glutamato y receptor de ácido gamma amino butírico también es útil para la identificación de agentes neurotóxicos al desarrollo tales como cloruro de metilmercurio, cloruro de plomo, VA y cloruro de tri-metil-estaño (Hogberg et al., 2010).

De igual manera otros trabajos con cultivos mixtos neuronales derivados de células precursoras NT2 humanas también han resultado ser un modelo adecuado para estudios de neurotoxicidad al desarrollo. Así, se demostró como la medida de alteraciones en la expresión génica durante el proceso de diferenciación de estas células también era capaz de detectar la presencia de agentes embriotóxicos como el cloruro de metilmercurio, cloruro de plomo y nitrato de aluminio (Laurenza et al., 2013).

Otros estudios también consideran las herramientas de transcriptómica para detectar tóxicos del desarrollo y del neurodesarrollo. Este es el caso de Krug y colaboradores (Krug et al., 2013), que fueron capaces de clasificar el metilmercurio y VA como tóxicos del desarrollo neurológico humano sobre la base de alteraciones en el transcriptoma de las células madre embrionarias humanas H9. Además, estas herramientas transcriptómicas han probado que los efectos tóxicos más generales de VA pueden detectarse a través de análisis de ontología de genes incluso con modelos no considerados aptos para estudiar el desarrollo embrionario, como MCF7, HL60 y PC3, aunque ello implica la pérdida de los efectos específicos de desarrollo que pueden ser mejor analizados con modelos de desarrollo como células D3 (Tonk et al., 2013).

En nuestro laboratorio también hemos utilizado un enfoque similar al propuesto en esta Tesis Doctoral basado en alteraciones en la diferenciación analizadas a través de cambios en la expresión de genes biomarcadores para describir que el insecticida *chlorpyrifos* y sus principales metabolitos se alteran la diferenciación celular *in vitro* a concentraciones fuertemente inhibitorias de acetilcolinesterasa y que dicha alteraciones de la diferenciación se comportan de manera similar a las registradas con el agente embriotóxico modelo débil VA, lo cual podría explicar las discrepancias entre los estudios epidemiológicos *in vivo* sobre la capacidad de este compuesto de inducir alteraciones en el neurodesarrollo y los estudios con animales (Estevan et al., 2013; Estevan et al., 2014).

5.4 OTROS INTENTOS DE MEJORA DEL EST PROPUESTOS POR OTROS AUTORES

Para optimizar el funcionamiento del método EST, varios autores han propuesto algunas modificaciones, tales como: la utilización de datos *in vitro* vinculados a estudios farmacocinéticos, que al parecer es una alternativa prometedora como método de ensayo para la evaluación del riesgo de los compuestos embriotóxicos (Verwei et al., 2006); la optimización de procedimientos de cultivo de células D3 (De Smedt et al., 2008); la utilización de sistemas automatizados de procesamiento de imágenes para monitorizar el área realmente contráctil del cardiomiocito generado (Paparella et al., 2002; Peters et al., 2008); la discriminación entre los efectos sobre la diferenciación celular y la proliferación celular (van Dartel et al., 2009); el ensayo de diferenciación de células D3 del método EST combinado con el modelo de células de placenta humana BeWo *in vitro*, que es capaz de predecir correctamente la potencia para la toxicidad al desarrollo de varios compuestos antifúngicos (Li et al., 2015); la incorporación de aspectos de morfogénesis, que podría mejorar la versatilidad de los ensayos *in vitro* y permitiría la identificación de una serie de sustancias tóxicas para el desarrollo (Warkus et al., 2016); el empleo de diferenciación inducida hacia las células endoteliales y la cuantificación de esta diferenciación empleando biomarcadores específicos de este linaje (Festag et al., 2007a; Festag et al., 2007b); y, la cuantificación de la diferenciación celular utilizando la expresión de la cadena pesada de miosina y actinina (Buesen et al., 2009). Los dos últimos trabajos mencionados al igual que el presente escrito utilizaron el mismo parámetro de mejora al método EST como fue el uso de modelos de predicción bioestadísticas con el método EST clásico pero cambiando el “*end-point*” morfológico por la medida de las alteraciones en el nivel de expresión de los biomarcadores con el fin de analizar los cambios en la diferenciación. El éxito de estos dos estudios, donde se emplearon un número de agentes embriotóxicos modelo y de biomarcadores mucho menor que en esta Tesis Doctoral, apoyan el hecho de que nuestra aproximación metodológica es válida.

Otras mejoras significativas en el EST se encuentran en la aplicación de transcriptómica a través de micromatrices de DNA (*microarrays*), que ha ayudado a establecer varios conjuntos de genes biomarcadores cuyas alteraciones se han utilizado como predictores de la embriotoxicidad. Esta técnica proporciona una evaluación específica de la expresión génica, ampliando la escala y la profundidad de la comprensión de los procesos biológicos. Además, estos estudios sugieren que la monitorización de diferenciación *in vitro* mediante transcriptómica puede imitar eficazmente la expresión génica en el desarrollo embrionario y puede ser un modelo útil para estudiar la toxicidad del desarrollo (van Dartel 2011a; 2011b). Entre las principales ventajas de estos enfoques podemos destacar que proporcionan información sobre los mecanismos de embriotoxicidad y, al mismo tiempo, reduce la duración total de la prueba, además, evita el uso de células 3T3. Sin embargo, tiene sus inconvenientes como el costo del análisis, y que no proporciona registros numéricos para ser aplicado a la EST porque la discriminación se basa en un análisis de componentes principales (PCA) (usado para visualizar y cuantificar el estado de diferenciación de las células e identificar alteraciones debido a tóxicos del desarrollo) y no en modelos de predicción bioestadística (PM).

Se han realizado varios esfuerzos para detectar neurotóxicos de desarrollo siguiendo enfoques basados en el EST. Theunissen y sus colaboradores (2010) propusieron un protocolo abreviado de solamente 13 días para promover la diferenciación neural, y el estudio de la diferenciación multilínea (ectodérmica, mesodérmica y endodérmica) de los protocolos combinados utilizando los cuerpos embrionarios D3 expuestos a RA. Estos modelos parecen acercarse a la situación *in vivo* en términos de su patrón de diferenciación neural. Además, el modelo demostró tener sensibilidad diferencial al neurotóxico metilmercurio. Este modelo ha demostrado ser útil para estudiar la neurotoxicidad del desarrollo de varios químicos como el metilmercurio y demostró que éste afecta al desarrollo neurológico y la diferenciación neural, observándose un aumento de la expresión de genes implicados en la diferenciación neural (Theunissen et al., 2011). Otros compuestos también han sido analizados como: VA, ciproconazol, hexaconazol, en donde se evaluaron los efectos dependientes de la concentración del compuesto sobre la expresión génica durante la diferenciación neural (Theunissen et al., 2012a); De igual manera otros compuestos como: acetaldehído, carbamazepina, flusilazol, ftalato de monoetilhexilo, PG y fenitoína también han sido evaluados a través de transcriptómica y PCA (Theunissen et al., 2012b). También se ha demostrado que un enfoque combinado que incorpora un EST clásico con el enfoque EST neural puede mejorar la detección del tóxico de desarrollo en comparación con ensayos individuales (Theunissen et al., 2013). Otros trabajos de neurotoxicidad al desarrollo con algunos compuestos como: acetato de plomo (II), Aroclor-1254 y penicilina G sugieren que el método EST modificado puede distinguir correctamente neurotóxicos del desarrollo con una gran capacidad de transferencia entre laboratorios (Baek et al., 2012).

Se ha desarrollado un nuevo ensayo *in vitro* denominado DNT-EST, utilizando ESC para predecir los efectos adversos de los productos químicos y otros compuestos en el desarrollo neural mediante células D3 diferenciadas con medio de diferenciación neural N2B27 y usando como parámetros de monitorización de la embriotoxicidad cambios en la diferenciación neural, en la viabilidad y en la proliferación celular. Esta metodología proporcionó el 100% de predictibilidad y precisión para el conjunto dado de nueve sustancias (6 de neurotoxicidad al desarrollo conocida y 3 sin neurotoxicidad al desarrollo), el método de ensayo descrito puede realizarse dentro de dos semanas, incluyendo el análisis de datos, proporcionando una predicción de la potencia de neurotoxicidad al desarrollo de una sustancia (Hayess et al., 2013).

Se ha desarrollado también una nueva variación de EST que utiliza como “*end point*” la diferenciación de las células D3 hacia osteoblastos. Esta diferenciación se monitoriza a través de la expresión diferencial de tres genes relacionados con la osteogénesis (*Runx2*, *SPARC* y *colágeno tipo I*). Esta metodología derivada de EST se ensayó con 14 productos químicos diferentes con alta correlación con el EST clásico y la potencia de toxicidad de desarrollo *in vivo* (de Jong et al., 2014). Este ensayo de diferenciación de osteoblastos fue incluso capaz de detectar la embriotoxicidad de 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina (TCDD), que se puede explicar en función de su mecanismo de acción y su efecto inhibitor conocido sobre la osteogénesis. TCDD dio resultados negativos con EST clásico, lo

que sugiere que la incorporación de una ruta de diferenciación osteogénica en el método EST puede también mejorar su valor predictivo, lo cual demuestra que es importante diseñar una estrategia de pruebas que incorpore múltiples “*end-points*” de desarrollo, debido a la complejidad de los mecanismos involucrados en el desarrollo embrionario (de Jong et al., 2014). De igual manera, en un estudio posterior se sugiere que la diferenciación de las células D3 hacia los osteoblastos puede proporcionar información acertada en la predicción de la embriotoxicidad, utilizando un método de cultivo que genera de forma eficiente y reproducible los osteoblastos en 14 días y mediante el uso de marcadores específicos de linaje de osteoblasto (Chen et al., 2015).

También se ha propuesto la evaluación en los cambios de expresión de los genes *Hand1* (factor de transcripción esencial para el desarrollo del corazón de los mamíferos) y *Cmya1* (proteína implicada en la morfogénesis cardíaca), con el objetivo de evaluar la capacidad predictiva de ambos genes para la prueba de embriotoxicidad EST. Este procedimiento basaba la medida de la expresión de estos genes no en PCR como es nuestro caso, sino en procedimientos quimioluminiscentes al incorporar el gen de la luciferasa delate del promotor de los genes empleados como biomarcadores de cardiomiocitos (*Hand1* y *Cmya1*) (Suzuki et al., 2011). A pesar de su mayor simplicidad técnica, este trabajo presenta como desventaja que continúa registrando solamente alteraciones en la diferenciación de mesodermo cardíaco, mientras que en nuestro trabajo se podrían detectar compuestos capaces de alterar la diferenciación de cualquiera de los tres linajes embrionarios.

Otros intentos de superar las limitaciones EST se han propuesto utilizar células J1, otra línea de célula madre embrionaria de ratón pluripotente, en un ensayo denominado ACDC. Esta metodología se basó en la cuantificación de la proteína de la cadena pesada de la miosina como marcador de diferenciación cardiomiocítica. Se evaluó la embriotoxicidad del ácido acético, el 5-fluorouracilo y el ácido bromocloroacético utilizando la prueba del EST y el ensayo de ACDC, ambos sistemas distinguieron la potencia de los compuestos evaluados (Barrier et al., 2011). La principal ventaja de este sistema ACDC es que permite ambas determinaciones (diferenciación y viabilidad) en un solo ensayo. Esta metodología ha demostrado su idoneidad para un alto rendimiento en una evaluación de 309 sustancias químicas y 500 ensayos diferentes, lo que permitió una caracterización inicial de las vías metabólicas y regulatorias con las cuales algunos químicos ambientales pueden actuar para alterar el crecimiento y diferenciación de células ES (Chandler et al., 2011).

Panzika-Kelly y colaboradores (2013), propusieron un ensayo más simplificado que el EST, en donde se observó que la citotoxicidad en células D3 cultivadas durante 3 días pueden determinar la concentración óptima necesaria para el ensayo de expresión génica y proporcionan una (IC_{50}), contribuyendo a la clasificación de los teratógenos. Esto representa una simplificación significativa del ensayo porque sólo se requiere una línea celular tanto para la citotoxicidad como para las mediciones de expresión génica. De igual manera, este ensayo describe dos fases de desarrollo: primero, un “*end-point*” de identificación y optimización del ensayo; y, segundo, un proceso de clasificación basado en un árbol de decisión que identifica mejor los teratógenos y no teratógenos (Panzika-Kelly

et al., 2013), sin embargo, su principal limitación es que restringe la identificación de peligros a sólo dos categorías (sí / no), mientras que el procedimiento descrito en el presente trabajo mantiene las tres categorías clásicas de EST (fuerte, débil, no).

Finalmente, otra modificación al método EST clásico, se propuso clasificando los fármacos en 4 clases de acuerdo a su mecanismo y efecto ensayado, se logró detectar no sólo los efectos inhibitorios de un fármaco en la célula en diferenciación y cardiomiogénesis, sino también la inducción de muerte celular o neurogénesis (Yu et al., 2015).



5.5 ANALISIS DEL DESEMPEÑO DE LOS CAMBIOS PROPUESTOS EN RELACIÓN CON EL EST CLÁSICO Y OTRAS MEJORAS PROPUESTAS

La principal ventaja del procedimiento propuesto en este trabajo es que la clasificación de los productos químicos evaluados se basa en parámetros multi-paramétricos (un parámetro por cada gen desregulado) en lugar de un único criterio de observación de cardiomiocitos (si presentan o no latido). En nuestro caso, incluso cuando un solo gen ofrece una predicción errónea, todo el conjunto de genes siempre ofrece una predicción correcta (al menos con el conjunto de productos químicos empleados en este trabajo) y la concordancia alcanzada con los resultados *in vivo* es del 100%. Otros autores también han postulado y demostrado que la respuesta de un pequeño subconjunto de 5 genes de entre los alrededor de 2500 sondas contenidas en una micromatriz es suficiente para diferenciar entre los análogos relacionados con VA, un inductor de los defectos del tubo neural ampliamente utilizado en tratamientos de epilepsia (Jergil et al., 2011).

En el estudio de validación se estableció que la precisión del método EST clásico para detectar embriotóxicos fuertes, débiles y no embriotóxicos y la precisión total del mismo es del 83%, 64%, 68% y 78%, respectivamente (Genschow et al., 2004). Estos mismos parámetros para el método EST basado en medidas de alteración génica a través de procedimientos quimioluminiscentes fueron del 91%, 82%, 70% y 81%, respectivamente (Suzuki et al., 2011). Las concordancias entre los resultados *in vivo* e *in vitro* establecidos por dos conjuntos diferentes de productos químicos utilizando el método EST basado en valores de IC_{50} y la expresión génica fueron del 72,5% y 83% (Panzica-Kelly et al., 2013). Sin embargo, debemos recordar que este procedimiento considera solamente dos categorías de peligro y no las tres del EST convencional. La metodología utilizada en la presente Tesis de Doctorado, es basada en la expresión génica y presentó mayores registros de exactitud que en este caso fueron del 100% de concordancia entre la embriotoxicidad *in vitro* e *in vivo*. La predicción para compuestos embriotóxicos fuertes y débiles fue del 100% y 81%, respectivamente, y registros similares o ligeramente superiores para la predicción de los compuestos no embriotóxicos (73-75%) (Tabla 4.6). La validación oficial del protocolo EST establece cinco diferentes categorías predictivas: excelente (superior al 85%); bueno (superior al 75%); suficiente (superior al 65%); insuficiente (inferior al 65%) y debido al azar (inferior al 33%) (Genschow et al., 2004). Cuando se aplicó esta clasificación a nuestro conjunto de genes, encontramos que el 56% de ellos logró excelente predictibilidad (9 de 16), 19% una buena predictibilidad (3 de 16), y el 25% suficiente predictibilidad (4 de 16) (Tabla 4.6).

Como ya se dijo anteriormente EURL-ECVAM recomendó la adición de *end-points* moleculares para registrar alteraciones en la diferenciación hacia los linajes de mesodermo, endodermo y ectodermo (Spielmann et al., 2006). Nuestro conjunto inicial de genes incluyó genes biomarcadores de estos tres linajes y genes codificantes de proteínas implicadas en el control del ciclo celular y otras funciones celulares básicas. Esta última categoría no estaba incluida entre las recomendadas por EURL-ECVAM y podría parecer poco apropiada para registrar alteraciones en la diferenciación celular, sin embargo, nuestros resultados sugieren que no es así y concuerdan con los de otros autores que

describen como ciertos agentes embriotóxicos modulan la expresión del ciclo celular y la apoptosis (Jung et al., 2015).

Además, incluso si consideráramos solamente aquellos genes con predictibilidad excelente mantendríamos en nuestro conjunto de biomarcadores 2 genes de endodermo (*Flk1* y *Afp*), dos genes de mesodermo (*Vegfa* y *Myo1e*) y dos genes de ectodermo (*Nrcam* y *Nes*), así como tres genes biomarcadores de procesos celulares básicos (*Wnt3*, *Myc* y *Cer1*). Así pues, nuestro paquete de genes biomarcadores todavía incluiría representatividad de todas las categorías necesarias.



6 CONCLUSIONES



- 1 Se ha desarrollado un modelo de ensayo celular de embriotoxicidad con una base molecular científicamente robusta que mejora las prestaciones del ensayo validado de embriotoxicidad con células madre embrionarias de ratón, también conocido como EST.
- 2 Los cambios en la expresión de los dieciséis genes biomarcadores ensayados son un buen indicador de alteraciones en la diferenciación espontánea de células madre embrionarias de ratón de la línea D3 inducidas por exposición a los siete agentes embriotóxicos modelo empleados en este estudio. Estos dieciséis genes evaluados están relacionados con la diferenciación de los tres principales linajes embrionarios y con funciones básicas de regulación y mantenimiento celular.
- 3 La alteración en la expresión de los genes propuestos puede ser aplicada a los modelos matemáticos de predicción de potencia embriotóxica del EST validado en sustitución de las alteraciones en la diferenciación de cuerpos embrionarios hasta cardiomiocitos latentes.
- 4 La evaluación objetiva, cuantitativa y combinada de la expresión de varios genes indicadores de la diferenciación convierte el ensayo EST en un ensayo robusto con un criterio de predicción multiparamétrico, lo que contribuye a disminuir la tasa de predicciones erróneas del ensayo convencional que toma como único criterio de predicción la observación cualitativa subjetiva de alteraciones en la diferenciación de los cuerpos embrionarios en cardiomiocitos latentes.
- 5 Se ha conseguido reducir la duración del ensayo de 10 a 5 días manteniendo una alta tasa de predictibilidad.
- 6 La utilización de cultivos en monocapa simplificó notablemente la dificultad técnica del ensayo EST sin disminuir la predictibilidad de la embriotoxicidad de los siete compuestos modelo empleados en este estudio.
- 7 Las mejoras propuestas en el ensayo de EST (utilización exclusiva de cultivos en monocapa, reducción a 5 días de la duración del ensayo y utilización de expresión génica para monitorizar alteraciones en la diferenciación) han mejorado notablemente la capacidad del ensayo convencional de diferenciar entre agentes no embriotóxicos y agentes embriotóxicos débiles, consiguiendo una predictibilidad global del 100% con los tres compuestos embriotóxicos débiles y los dos compuestos no embriotóxicos empleados en este estudio.
- 8 Las mejoras propuestas facilitarán en el futuro ensayos de cribado de embriotoxicidad de librerías de moléculas durante el desarrollo de nuevos medicamentos, biocidas, aditivos alimentarios o productos cosméticos y de higiene personal.

9 Las mejoras propuestas permitirán al EST formar parte de baterías de ensayos que ayuden a identificar el peligro de embriotoxicidad con una drástica reducción, refinamiento y reemplazo de la experimentación animal a la vez que aportan una mejor base científica molecular y celular a la investigación de mecanismos moleculares de embriotoxicidad.





7 BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja Y.R, Vijayalakshmi V, Polasa K. (2007) Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics. *Toxicology*. 231(1):1-10.
- Anderson D.J, Gage F.H, Weissman I.L. (2001) Can stem cells cross lineage boundaries? *Nature Medicine*. 7(4): 393-395.
- Anichtchik O.V, Kaslin J, Peitsaro N, Scheinin M, Panula P. (2004) Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine. *Journal of Neurochemistry*. 88: 443-53.
- Argraves W.S, Drake C.J. (2005) Genes critical to vasculogenesis as defined by systematic analysis of vascular defects in knockout mice. *Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 286(2): 875-884.
- Azarin S.M, Palecek S.P. (2010) Development of Scalable Culture Systems for Human Embryonic Stem Cells. *Biochemical Engineering Journal*. 48(3): 378.
- Bacchetta R, Mantecca P, Andrioletti M, Vismara C, Vailati G. (2008) Axialskeletal defects caused by Carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment*. 392: 110-18.
- Baek D.H, An S, Park J.H, Choi Y, Park K.D, Kang J.W, Choi K.S, Park S.H, Whang M.Y, Han J, Kim J, Kim H.S, Geum D, Yoo T.M. (2012) Transferability of a modified embryonic stem cell test using a new endpoint for developmental neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 22(2): 118-130.
- Balls M. (2002) The Use of Scientifically-Validated In Vitro Tests for Embryotoxicity. ESAC (European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee).
- Bantle J.A, Fort D.J, Rayburn J.R, DeYoung D.J, Bush S.J. (1990) Further validation of FETAX: Evaluation of the developmental toxicity of five known mammalian teratogens and non-teratogens. *Drug and Chemical Toxicology*. 13(4): 267-82.
- Bantle J.A, Finch R.A, Burton D.T, Fort D.J, Dawson D.A, Linder G, Rayburn J.R, Hull M, Kumsher-King M, Gaudet-Hull A.M, Turley S.D. (1996) FETAX interlaboratory validation study: phase III – Part 1 testing. *Journal of Applied Toxicology*. 16: 517-28.
- Bantle J.A, Dumont J.N, Finch R.A, Linder G, Fort D.J (1998) Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX. 2nd ed. Oklahoma State University Press, Stillwater, OK, 68 pp.

Barrier M, Jeffay S, Nichols H.P, Chandler K.J, Hoopes M.R, Slentz-kesler K, Hunter E.S. (2011) Mouse embryonic stem cell adherent cell differentiation and cytotoxicity (ACDC) assay. *Reproductive Toxicology*. 31(4): 383-391.

Beker van Woudenberg A, Snel C, Rijkmans E, De Groot D, Bouma M, Hermsen S, Piersma A, Menke A, Wolterbeek A. (2014) Zebrafish embryotoxicity test for developmental (neuro) toxicity: Demo case of an integrated screening approach system using anti-epileptic drugs. *Reproductive Toxicology*. 49: 101-116.

Bernstein B.E, Meissner A, Lander E.S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell*. 128(4): 669-681.

Bi J, Chase S.E, Pellenz C.D, Kurihara H, Fanning A.S, Krendel M. (2013) Myosin 1e is a component of the glomerular slit diaphragm complex that regulates actin reorganization during cell-cell contact formation in podocytes. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 305: F532–F544.

Borenfreund E, Babich H, Martin-Aguacil N. (1988) Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays- the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro*. 2(1): 1-6.

Bosisio S, Fortaner S, Bellineto S, Farina M, Del Torchio R, Prati M, Gornati R, Bernardini G, Sabbioni E. (2009) Developmental toxicity, uptake and distribution of sodium chromate assayed by frog embryo teratogenesis assay- Xenopus (FETAX). *Science of the Total Environment*. 407: 5039-45.

Bretaud S, Lee S, Guo S. (2004) Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicology and Teratology*. 26: 857-64.

Brown N.A. (2002) Selection of Test Chemicals for the ECVAM International Validation Study on In Vitro Embryotoxicity Tests. *Alternatives to Laboratory Animals*. 30: 177-198.

Buesen R, Genschow E, Slawik B, Visan A, Spielmann H, Luch A, Seiler A. (2009) Embryonic stem cell test remastered: Comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro. *Toxicological Sciences*. 108(2): 389-400.

Busquet F, Nagel R, von Landenberg F, Mueller S.O, Huebler N, Broschard T.H. (2008) Development of a new screening assay to identify proteratogenic substances using zebrafish *Danio rerio* embryo combined with an exogenous mammalian metabolic activation system (mDarT). *Toxicological Sciences*. 104: 177-188.

Chandler K.J, Barrier M, Jeffay S, Nichols H.P, Kleinstreuer N.C, Singh A.V, Reif D.M, Sipes N.S, Judson R.S, Dix D.J, Kavlock R, Hunter E.S, Knudsen T.B. (2011) Evaluation of 309 Environmental Chemicals Using a Mouse Embryonic Stem Cell Adherent Cell Differentiation and Cytotoxicity Assay. *PLoS One*. 6:e18540.

Chang S, Young B.D, Li S, Qi X, Richardson J.A, Olson E.N. (2006) Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell*. 126(2): 321-334.

Chen X, Hansen D, Gwenn M, DeJarnetteb C, Nolen G, Slopera D, Fisher E, Harrouk W, Tassinari M, Inselman A. (2015) Developing osteoblasts as an endpoint for the mouse embryonic stem cell test. *Reproductive Toxicology*. 53: 131-140.

Chi L, Saarela U, Railo A, Prunskaitė-Hyrylainen R, Skovorodkin I, Anthony S, Katsu K, Liu Y, Shan J, Salgueiro A.M, Belo J.A, Davies J, Yokouchi Y, Vainio S.J. (2011) A secreted BMP antagonist, Cer1, fine tunes the spatial organization of the ureteric bud tree during mouse kidney development. *PLoS One*. 6:11 e27676.

Chiapparo G, Lin X, Lescroart F, Chabab S, Paulissen C, Pitisci L, Bondue A, Blanpain C. (2016) *Mesp1* controls the speed, polarity, and directionality of cardiovascular progenitor migration. *The Journal of Cell Biology*. 213(4): 463-77.

Cho A, Ko H.W, Eggenschwiler J.T. (2008) FKBP8 cell-autonomously controls neural tube patterning through a Gli2- and Kif3a-dependent mechanism. *Developmental Biology*. 321(1): 27-39.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162(1): 156-159.

Chomczynski P, Sacchi N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*. 1(2): 581-585.

Cross M.A, Enver T. (1997) The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Current Opinion in Genetics and Development*. 7(5): 609-613.

Damert A, Miquerol L, Gertsenstein M, Risau W, Nagy A. (2002) Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development*. 129(8): 1881-1892.

Dang C.V. (2012) MYC on the path to cancer. *Cell*. 149: 22-35.

Davila J.C, Cezar G.G, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. (2004) Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicological Sciences*. 79(2): 214-223.

De Jong E, Van Beek L, Piersma A.H. (2014) Comparison of osteoblast and cardiomyocyte differentiation in the embryonic stem cell test for predicting embryotoxicity in vivo. *Reproductive Toxicology*. 48: 62-71.

De Smedt A, Steemans M, De Boeck M, Peters A.K, van der Leede B.J, Van Goethem F, Lampo A, Vanparys P. (2008) Optimisation of the cell cultivation methods in the embryonic stem cell test results in an increased differentiation potential of the cells into strong beating myocard cells. *Toxicology in Vitro*. 22(7):1789-1796.

Demyanenko G.P, Mohan V, Zhang X, Brennaman L.H, Dharbal K.E.S, Tran T.S, Manis P.B, Maness P.F. (2014) Neural cell adhesion molecule NrCAM regulates Semaphorin 3F-induced dendritic spine remodeling. *The Journal of Neuroscience*. 34(34): 11274-11287.

Di Guglielmo C, López D.R, De Lapuente J, Mallafre J.M.L, Suárez M. B. (2010) Embryotoxicity of ferrite and gold nanoparticles cobalt: A first in vitro approach. *Reproductive Toxicology*. 30(2): 271–276.

Diril M.K, Ratnacaram C.K, Padmakumar V.C, Du T, Wasser M, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. (2012) Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(10): 3826-31.

Doetschman T.C, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of embryology and experimental morphology*. 87: 27-45.

Dvash T, Benvenisty N. (2004) Human embryonic stem cells as a model for early human development. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 18(6): 929–940.

Ebert A.D, Svendsen C.N. (2010) Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9(5): 367-372.

European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) (2006a) The Micromass Test - Method of Brown. Disponible en: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocol/249/the-micromass-test-method-of-brown/datasheet>

European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) (2006b). Embryotoxicity Testing in Post-Implantation Embryo Culture - Method of Piersma. Disponible en: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/method-summary/241/method-summary-\(1\)/datasheet](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/method-summary/241/method-summary-(1)/datasheet)

European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) (2006c) Embryonic Stem Cell Test (EST) Disponible en: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocol/268/embryonic-stem-cell-test-\(est\)/datasheet](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocol/268/embryonic-stem-cell-test-(est)/datasheet)

Ek M, Söderdahl T, Küppers-Munther B, Edsbagge J, Andersson T.B, Björquist P, Cotgreave I, Jernström B, Ingelman-Sundberg M, Johansson I. (2007) Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biochemical Pharmacology*. 74(3): 496-503.

Enver T, Heyworth C.M, Dexter T.M. (1998) Do stem cells play dice? *Blood*. 92(2): 348-351.

Estevan C, Pamies D, Sogorb M.A, Vilanova E. (2011a) OECD guidelines and validated methods for in vivo testing of reproductive toxicity. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*. pp: 123-133. Editor: Ramesh G Gupta (Academic Press). ISBN: 978-0-12-382032-7.

Estevan C, Romero A.C, Pamies D, Vilanova E, Sogorb M.A. (2011b) Embryonic Stem Cells in Toxicological Studies. *Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering*. Michael S. Kallos (Ed.), ISBN: 978-953-307-278-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/embryonic-stem-cells-in-toxicological-studies>

Estevan C, Vilanova E, Sogorb M.A. (2013) Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: considerations for embryotoxic risk assessment. *Toxicology Letters*. 217: 14-22.

Estevan C, Fuster E, del Río E, Pamies D, Vilanova E, Sogorb M.A. (2014) Organophosphorus pesticide chlorpyrifos and its metabolites alter the expression of biomarker genes of differentiation in D3 mouse embryonic stem cells in a comparable way to other model neurodevelopmental toxicants. *Chemical Research in Toxicology*. 27(9): 1487-1495.

Estevan C, Pamies D, Vilanova E, Sogorb M.A. (2017) OECD Guidelines for In Vivo Testing of Reproductive Toxicity. In: *Reproductive and Developmental Toxicity (2nd edition)*. pp: 163-178. Editor: Ramesh G Gupta (Academic Press). ISBN: 978-0-12-8042-39-7.

Evans M.J, Kaufman M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292(5819): 154-156.

Evans T.J. (2007) Reproductive toxicity and endocrine disruption. En *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles* (Gupta, RC, ed.). Academic Press/ Elsevier, Inc., New York. 206–244.

Festag M, Viertel B, Steinberg P, Sehner C. (2007a) An in vitro embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells. II. Testing of compounds. *Toxicology in Vitro*. 21(8): 1631-1640.

Festag M, Sehner C, Steinberg P, Viertel B. (2007b) An in vitro embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells. I. Establishment of the differentiation protocol. *Toxicology in Vitro*. 21: 1619-1630.

Fleischer M. (2007) Testing costs and testing capacity according to the REACH requirements-results of a survey of independent and corporate GLP laboratories in the EU and Switzerland. *Journal of Business Chemistry*. 4: 96–114.

Fort D.J, Bantle J.A. (1990) Analysis of the mechanism of isoniazid-induced developmental toxicity with frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 10: 463-476.

Fort D.J, Stover E.L, Bantle J.A, Rayburn J.R, Hull M.A, Finch R.A, Burton D.T, Turley S.D, Dawson D.A, Linder G, Buchwalter D, Dumont J.N, Kumsher- King M, Gaudet-Hull A.M. (1998) Phase III interlaboratory study of FETAX, Part 2: interlaboratory validation of an exogenous metabolic activation system for frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX). *Drug and Chemical Toxicology*. 21: 1-14.

Fort D.J, Stover E.L, Farmer D.R, Lemen J.K. (2000) Assessing the predictive validity of frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX). *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 20: 87-98.

Fort D.J, Rogers R.L, Thomas J.H, Buzzard B.O, Noll A.M, Spaulding C.D. (2004) Comparative sensitivity of *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* as test species for the FETAX model. *Journal of Applied Toxicology*. 24: 443-57.

Froehlicher M, Liedtke A, Groh K.J, Neuhauss S.C, Segner H, Eggen R.I. (2009) Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquatic Toxicology*. 95: 307-19.

Genschow E, Scholz G, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K, Spielmann H. (2000) Development of prediction models for three in vitro embryotoxicity tests in an ECVAM validation study. *In Vitro and Molecular Toxicology*. 13(1): 51-65.

Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K. (2002) The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Alternatives to Laboratory Animals*. 30(2): 151-176.

Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Pohl I, Seiler A, Clemann N, Bremer S, Becker K. (2004) Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Alternatives to Laboratory Animals*. 32(3): 209-244.

Haines T.R, Rodenhiser D.I, Ainsworth P.J. (2001) Allele-specific non-CpG methylation of the Nf1 gene during early mouse development. *Developmental Biology*. 240(2): 585-598.

Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst P.J, Meacham A.M, Zon L.I, Terada N. (2001) Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Letters*. 497: 15-19.

Hayess K, Riebeling C, Pirow R, Steinfath M, Sittner D, Slawik B, Luch A, Seiler A.E.M. (2013) The DNT-EST: a predictive embryonic stem cell-based assay for developmental neurotoxicity testing in vitro. *Toxicology*. 314(1): 135-147.

Hayflick L. (2003) Living forever and dying in the attempt. *Experimental Gerontology*. 38(11-12): 1231-1241.

Henderson J.K, Draper J.S, Baillie H.S, Fishel S, Thomson J.A, Moore H, Andrews P.W. (2002) Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*. 20(4):329-337.

Herdegen T, Skene P, Bähr M. (1997) The c-Jun transcription factor—bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends in Neurosciences*. 20(5): 227-231.

Hodgson E, Mailman R.B, Chambers J.E, Dow R.E. (2000) *Dictionary of Toxicology*, 2nd edition. Grove's Dictionaries Inc. (eds.), New York.

Höfer T, Gerner I, Gundert-Remy U, Liebsch M, Schulte A, Spielmann H, Vogel R, Wettig K. (2004) Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Archives of Toxicology*. 78: 549-564.

Hofmann J.W, Zhao X, De Cecco M, Peterson A.L, Pagliaroli L, Manivannan J, Hubbard G.B, Ikeno Y, Zhang Y, Feng B, Li X, Serre T, Qi W, Remmen H.V, Miller R.A, Bath K.G, de Cabo R, Xu H, Neretti N, Sedivy J.M. (2015) Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan. *Cell*. 160: 477-488.

Hogberg H.T, Kinsner-Ovaskainen A, Coecke S, Hartung T, Bal-Price A.K. (2010) mRNA expression is a relevant tool to identify developmental neurotoxicants using an in vitro approach. *Toxicological Sciences*. 113: 95-115.

Iwashita H, Shiraki N, Sakano D, Ikegami T, Shiga M, Kume K, Kume S. (2013) Secreted cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of the pluripotent stem cells. *PLoS ONE*. 8:5 e64291.

Jeffay S, Nichols H, Barrier M, Hunter S. (2010) Effects of haloacetic acids and their major metabolites in a mouse embryonic stem cell adherent cell differentiation and cytotoxicity (ACDC) assay. *The Toxicologist*. 114: 359.

Jergil M, Forsberg M, Salter H, Stockling K, Gustafson A.L, Dencker L, Stigson M. (2011) Short-time gene expression response to valproic acid and valproic acid analogs in mouse embryonic stem cells. *Toxicological Sciences*. 121(2): 328-342.

Jiang Y, Jahagirdar B.N, Reinhardt R.L, Schwartz R.E, Keene C.D, Ortiz-Gonzalez X.R, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W.C, Largaespada D.A, Verfaillie C.M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418(6893): 41-49.

Jiménez M.R, Kuhn G.R. (2009). *Toxicología fundamental* (4^a. Ed.) Ediciones Díaz de Santos. Libro Electrónico.

Jin L, Long L, Green M.A, Spear B.T. (2009) The alpha-fetoprotein enhancer region activates the albumin and alpha-fetoprotein promoters during liver development. *Developmental Biology*. 336(2): 294-300.

Jung E.M, Choi Y.U, Kang H.S, Yang H, Hong E.J, An B.S, Yang J.Y, Choi K.H, Jeung E.B. (2015) Evaluation of developmental toxicity using undifferentiated human embryonic stem cells. *Journal of Applied Toxicology*. 35(2): 205-218.

Kabrun N, Bühring H.J, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. (1997) Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. 124(10): 2039-2048.

Kaprielian Z, Imondi R, Runko E. (2000) Axon guidance at the midline of the developing CNS. *The Anatomical Record*. 261(5): 176-197.

Katoh M, Katoh M. (2006) CER1 is a common target of WNT and NODAL signaling pathways in human embryonic stem cells. *International Journal of molecular medicine*. 17: 795-799.

Kleinsmith L.J, Pierce G.B, (1964) Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Research*. 24: 1544-1551.

Knoepfler P.S, Cheng P.F, Eisenman R.N. (2002) N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes & Development*. 16(20): 2699-2712.

Krtolica A, Ilic D, Genbacev O, Miller R.K. (2009) Human embryonic stem cells as a model for embryotoxicity screening. *Regenerative Medicine*. 4: 449-459.

Krug A.K, Kolde R, Gaspar J.A, Rempel E, Balmer N.V, Meganathan K, Vojnits K, Baquie M, Waldmann T, Ensenat-Waser R, Jagtap S, Evans R.M, Julien S, Peterson H, Zagoura D, Kadereit S, Gerhard D, Sotiriadou I, Heke M, Natarajan K, Henry M, Winkler J, Marchan R, Stoppini L, Bosgra S, Westerhout J, Verwei M, Vilo J, Kortenkamp A, Hescheler J, Hothorn L, Bremer S, van Thriel C, Krause K.H, Hengstler J.G, Rahnenfuhrer J, Leist M, Sachinidis A. (2013) Human embryonic stem cell-derived test systems for developmental neurotoxicity: a transcriptomics approach. *Archives of Toxicology*. 87: 123-143.

Kwon G.S, Fraser S.T, Eakin G.S, Mangano M, Isern J, Sahr K.E, Hadjantonakis A.K, Baron M.H (2006) Tg(Afp- GFP) expression marks primitive and definitive endoderm lineages during mouse development. *Developmental Dynamics*. 235(9): 2549-2558.

Laale H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, brachydanio-rerio in fisheries research. *Journal of Fish Biology*. 10: 121-73.

Laschinski G, Vogel R, Spielmann H. (1991) Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: a new approach to in vitro teratogenesis screening. *Reproductive Toxicology*. 5: 57-64.

Laurenza I, Pallocca G, Mennecozzi M, Scelfo B, Pamies D, Bal-Price A. (2013) A human pluripotent carcinoma stem cell-based model for in vitro developmental neurotoxicity testing: Effects of methylmercury, lead and aluminum evaluated by gene expression studies. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 31: 679-961.

Lavon N, Benvenisty N. (2003) Differentiation and genetic manipulation of human embryonic stem cells and the analysis of the cardiovascular system. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 13(2): 47-52.

Lawson N.D, Vogel A.M, Weinstein B.M. (2002) sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Developmental Cell*. 3(1): 127-136.

Li H, Kloosterman W, Fekete D.M. (2010) MicroRNA-183 family members regulate sensorineural fates in the inner ear. *The Journal of Neuroscience*. 30: 3254-63.

Li H, Rietjens I.M, Louisse J, Blok M, Wang X, Snijders L, van Ravenzwaay B. (2015) Use of the ES-D3 cell differentiation assay, combined with the BeWo transport model, to predict relative in vivo developmental toxicity of antifungal compounds. *Toxicology in Vitro*. 29: 320-328.

Li L, Wang J, Hou J, Wu Z, Zhuang Y, Lu M, Zhang Y, Zhou X, Li Z, Xiao W, Zhang W. (2012) Cdk1 interplays with Oct4 to repress differentiation of embryonic stem cells into trophectoderm. *FEBS Letters*. 586(23): 4100-7.

Liang Z.W, Wang Z, Chen H, Li C, Zhou T, Yang Z, Yang X, Yang Y, Gao G, Cai W. (2015) Nestin-mediated cytoskeletal remodeling in endothelial cells: novel mechanistic insight into VEGF-induced cell migration in angiogenesis. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 308: C349-C358.

Lim S.M, Pereira L, Wong M.S, Hirst C.E, Van Vranken B.E, Pick M, Trounson A, Elefanty A.G, Stanley E.G. (2009) Enforced expression of Mixl1 during mouse ES cell differentiation suppresses hematopoietic mesoderm and promotes endoderm formation. *Stem Cells*. 27(2): 363-74.

Linney E, Upchurch L, Donerly S. (2004) Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicol Teratol* 26: 709–18. Erratum in: *Neurotoxicology and Teratology*. 2005 27: 175.

Liu Y, Schwartz R.J. (2013) Transient Mesp1 expression. A driver of cardiac cell fate determination. *Landes Bioscience*. 4(3): 92-96.

Livak K.J, Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4): 402-408.

Longo M, Zanoncelli S, Della Torre P, Rosa F, Giusti A, Colombo P, Brughera M, Mazué G, Olliaro P. (2008) Investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) using the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX). *Reproductive Toxicology*. 25: 433-41.

Lush M.J, Li Y, Read D.J, Willis A.C, Glynn P. (1998) Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila* neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man. *Biochemical Journal*. 332 (Pt 1):1-4.

Marek K.W, Kurtz L.M, Spitzer N.C. (2010) cJun integrates calcium activity and *tlx3* expression to regulate neurotransmitter specification. *Nature Neuroscience*. 13(8): 944-950.

Marx-Stoelting P, Adriaens E, Ahr H.J, Bremer S, Garthoff B, Gelbke H.P, Piersma A, Pellizzer C, Reuter U, Rogiers V, Schenk B, Schwengberg S, Seiler A, Spielmann H, Steemans M, Stedman D.B, Vanparys P, Vericat J.A, Verwei M, van der Water F, Weimer M, Schwarz M.A. (2009) A review of the implementation of the embryonic stem cell test (EST). The report and recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop. *Alternatives to Laboratory Animals*. 37(3): 313-328.

Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier L.S, Nguemo F, Menke S, Haustein M, Hescheler J, Hasenfuss G, Martin U. (2008) Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 118(5): 507-517.

Mohn F, Schübeler D. (2009) Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends in Genetics*. 25(3): 129-136.

Moser M, Li Y, Vaupel K, Kretzschmar D, Kluge R, Glynn P, Buettner R. (2004) Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*. 24(4): 1667-1679.

Mottet D, Bellahcène A, Pirotte S, Waltregny D, Deroanne C, Lamour V, Lidereau R, Castronovo V. (2007) Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circulation Research*. 101(12): 1237-1246.

Muche A, Bigl M, Arendt T, Schliebs R. (2015) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA, VEGF receptor 2 (Flk-1) mRNA, and of VEGF co-receptor neuropilin (Nrp)-1 mRNA in brain tissue of aging Tg2576 mice by in situ hybridization. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 43: 25-34.

Nabti I, Marangos P, Bormann J, Kudo N.R, Carroll J. (2014) Dual-mode regulation of the APC/C by CDK1 and MAPK controls meiosis I progression and fidelity. *The Journal of Cell Biology*. 204(6): 891-900.

Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita J.K. (2008) Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 118(5): 498-506.

NICEATM (National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) (2000). Background Review Document Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX). Disponible en: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/fetax2000/brd/fetax-brd-all.pdf>

O'Shea K.S. (1999) Embryonic Stem Cell Models of Development. *The anatomical record (New Anat.)*. 257: 32-41.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (1983) Test No. 415: One-Generation Reproduction Toxicity Study. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741501e.pdf?expires=1493571680&id=id&accname=guest&checksum=3A639E59C5A548E32A3CFD53ACCB4FF4>

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2001a) Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741401e.pdf?expires=1493571445&id=id&accname=guest&checksum=AE2E42ACEB00C3E88BBDCFB3319A12F8>

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2001b) Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741601e.pdf?expires=1493571639&id=id&accname=guest&checksum=83EC55841EFEE67E7300556DBDCE7CB5>

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2007) Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742601e.pdf?expires=1493572270&id=id&accname=guest&checksum=7B05DDDA8ED01E5E39A994EEF7284D4A>

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2012) Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712211e.pdf?expires=1493572329&id=id&accname=guest&checksum=6B46C06B32976A9F65BA636F82475B6E>

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2016a) Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9716141e.pdf?expires=1493572065&id=id&accname=guest&checksum=08BF617298DCB690E736B22CACF8A907>

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2016b) Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9716151e.pdf?expires=1493572174&id=id&accname=guest&checksum=1DEB562ECE9CD6798B7ED09B8B995B0A>

Osman A.M, van Dartel D.A, Zwart E, Blokland M, Pennings J.L, Piersma A.H. (2010) Proteome profiling of mouse embryonic stem cells to define markers for cell differentiation and embryotoxicity. *Reproductive Toxicology*. 30(2): 322-332.

Pamies D. (2009). Caracterización parcial de la Esterasa Diana de Neuropatía en células madre embrionarias de ratón. Trabajo fin de máster. Instituto de Bioingeniería. Unidad de Toxicología y Seguridad Química. Universidad Miguel Hernández de Elche.

Pamies D, Vicente-Salar N, Sogorb M.A, Roche E, Reig J.A. (2010a) Specific effect of 5-fluorouracil on alphafetoprotein gene expression during the in vitro mouse embryonic stem cell differentiation. *International Journal of Toxicology*. 29(3): 297-304.

Pamies D, Reig J.A, Vilanova E, Sogorb M.A. (2010b) Expression of Neuropathy Target Esterase (NTE) in mouse embryonic stem cells during differentiation. *Archives of Toxicology*. 84(6): 481- 491.

Pamies D, Estevan C, Sogorb M.A, Vilanova E. (2011) Mechanism-based models in reproductive and developmental toxicology. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*. pp: 135-146. Editor: Ramesh G Gupta (Academic Press). ISBN: 978-0-12-382032-7.

Pamies D (2012) Papel de la Esterasa Diana de Neuropatía (NTE) y su gen codificante (Pnpla6) en el desarrollo y la diferenciación celular in vitro. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.

Pamies D, Bal-Price A, Fabbri M, Gribaldo L, Scelfo B, Harris G, Sogorb M.A. (2014a) Silencing of PNPLA6, the neuropathy target esterase (NTE) codifying gene, alters neurodifferentiation of human embryonal carcinoma stem cells (NT2). *Neuroscience*. 281: 54-67.

Pamies D, Vilanova E, Sogorb M.A. (2014b) Functional pathways altered after silencing Pnpla6 (the codifying gene of neuropathy target esterase) in mouse embryonic stem cells under differentiation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 50: 261-273.

Pamies D, Estevan C, Vilanova E, Sogorb M.A. (2017) Validated and Nonvalidated Mechanism-Based Methods for Testing Developmental Toxicity. In: *Reproductive and Developmental Toxicity* (2nd edition). pp: 193-209. Editor: Ramesh G Gupta (Academic Press). ISBN: 978-0-12-8042-39-7.

Panzica-Kelly J.M, Brannen K.C, Ma Y, Zhang C.X, Flint O.P, Lehman-McKeeman L.D, Augustine-Rauch K.A. (2013) Establishment of a molecular embryonic stem cell developmental toxicity assay. *Toxicological Sciences*. 131: 447-457.

Paparella M, Kolossov E, Fleischmann B.K, Hescheler J, Bremer S. (2002) The use of quantitative image analysis in the assessment of in vitro embryotoxicity endpoints based on a novel embryonic stem cell clone with endoderm-related GFP expression. *Toxicology in Vitro*. 16(5): 589-597.

Pereira L.A, Wong M.S, Lim S.M, Sides A, Stanley E.G, Elefanty A.G. (2011) Brachyury and related Tbx proteins interact with the Mixl1 homeodomain protein and negatively regulate Mixl1 transcriptional activity. PLoS ONE. 6(12) e28394.

Peters A.K, Wouwer G.V, Weyn B, Verheyen G.R, Vanparys P, Gompel J.V. (2008) Automated analysis of contractility in the embryonic stem cell test, a novel approach to assess embryotoxicity. Toxicology in Vitro. 22(8): 1948-1956.

Piersma A.H. (2006) Alternative methods for developmental toxicity testing. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 98(5): 427-431.

Pola R, Ling L.E, Silver M, Corbley M.J, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor F.R, Baker D.P, Asahara T, Isner J.M. (2001) The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. Nature Medicine. 7(6): 706-711.

Puri M.C, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J (1995). The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. The EMBO Journal. 14(23): 5884-5891.

Purro S.A, Ciani L, Hoyos-Flight M, Stamatakou E, Siomou E, Salinas P.C. (2008) Wnt regulates axón behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. The Journal of Neuroscience. 28(34): 8644-8654.

Randles M.J, Collinson S, Starborg T, Mironov A, Krendel M, Königshausen E, Sellin L, Roberts I.S.D, Kadler K.E, Miner J.H, Lennon R. (2016) Three-dimensional electron microscopy reveals the evolution of glomerular barrier injury. Scientific Reports. 6: 35068. DOI:10.1038/srep35068.

Renault M.A, Roncalli J, Tongers J, Thorne T, Klyachko E, Misener S, Volpert O.V, Mehta S, Burg A, Luedemann C, Qin G, Kishore R, Losordo D.W. (2010) Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 49: 490-498.

Repetto G, Del Peso A, Zurita J.L. (2005) Métodos alternativos a la experimentación animal en la evaluación de la seguridad. De la PEÑA, E y GÓMEZ, E. Toxicología Ambiental: Seguridad Química. Asociación Española de Toxicología CD-ROM. Madrid. ISBN: 84-609-4429-8.

Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus A.M. (2001) Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. Toxicology in Vitro. 15: 741-753.

Rosenstein J.M, Krum J.M, Ruhrberg C. (2010) VEGF in the nervous system. *Organogenesis*. 6(2): 107-114.

Ruch R.J, Trosko J.E. (1999) The role of oval cells and gap junctional intercellular communication in hepatocarcinogenesis. *Anticancer Research*. 19(6A): 4831-4838.

Rudnicki M.A, Reuhl K.R, McBurney M.W. (1989) Cell lines with developmental potential restricted to mesodermal lineages isolated from differentiating cultures of pluripotential P19 embryonal carcinoma cells. *Development*. 107(2): 361-372.

Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. (2005) Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(4): 1076-1081.

Schmahl J, Raymond C.S, Soriano P. (2006) PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nature Genetics*. 39(1): 52-60.

Seiler A, Visan A, Pohl I, Genschow E, Buesen R, Spielmann H. (2002) Improving the embryonic stem cell test (EST) by establishing molecular endpoints of tissue specific development using murine embryonic stem cells (D3 cells). *Alternatives to Animal Experimentation*. Suppl 1: 55-63.

Seiler A, Visan A, Buesen R, Genschow E, Spielmann H. (2004) Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. *Reproductive Toxicology*. 18(2): 231-240.

Sell S. (2004) Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 51: 1-28.

Sogorb M.A, Pamies D, De Lapuente J, Estevan C, Estevez J, Vilanova E. (2014) An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. *Toxicology Letters*. 230: 356–367.

Sogorb M.A, Pamies D, Estevan C, Estévez J, Vilanova E. (2016) Roles of NTE protein and encoding gene in development and neurodevelopmental toxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 259: 352-357.

Spielmann H, Pohl I, Doring B, Liebsch M, Moldenhauer F. (1997) The Embryonic Stem Cell Test, an In Vitro Embryotoxicity Test Using Two Permanent Mouse Cell Lines: 3T3 Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *In vitro Toxicology*. 10(1): 119-127.

Spielmann H, Liebsch M. (2001) Lessons learned from validation of in vitro toxicity test : from failure to acceptance into regulatory practice. *Toxicology in Vitro*. 15: 585-590.

Spielmann H. (2005) Predicting the risk of developmental toxicity from in vitro assays. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 207(2 Suppl): 375-380.

Spielmann H, Seiler A, Bremer S, Hareng L, Hartung T, Ahr H, Faustman E, Haas U, Moffat G.J, Nau H, Vanparys P, Piersma A, Sintes J.R, Stuart J. (2006) The practical application of three validated in vitro embryotoxicity tests. The report and recommendations of an ECVAM/ZEBET workshop (ECVAM workshop 57). *Alternatives to Laboratory Animals*. 34(5):527-538.

Sridharan R, Tchieu J, Mason M.J, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, Zhou Q, Plath K. (2009) Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell*. 136(2): 364-377.

Stevens L.C, Little C.C. (1954) Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 40(11): 1080-1087.

Stummann T.C, Hareng L, Bremer S. (2009) Hazard assessment of methylmercury toxicity to neuronal induction in embryogenesis using human embryonic stem cells. *Toxicology*. 257(3): 117–126.

Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, Matsuzaki Y, Miyata T, Okano H. (2008) Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *Journal of Cell Science*. 121(8): 1204-1212.

Suzuki N, Ando S, Yamashita N, Horie N, Saito K. (2011) Evaluation of novel high-throughput embryonic stem cell tests with new molecular markers for screening embryotoxic chemicals in vitro. *Toxicological Sciences*. 124(2): 460-471.

Tani Y, Murata S, Maeda N, Fukushige J, Hosokawa T. (1997) A spontaneous testicular teratoma in an ICR mouse. *Toxicologic Pathology*. 25(3): 317-320.

Theunissen P.T, Schulpen S.H, van Dartel D.A, Hermsen S.A, van Schooten F.J, Piersma A.H. (2010) An abbreviated protocol for multilineage neural differentiation of murine embryonic stem cells and its perturbation by methyl mercury. *Reproductive Toxicology*. 29: 383-392.

Theunissen P.T, Pennings J.L, Robinson J.F, Claessen S.M, Kleinjans J.C, Piersma A.H. (2011) Time-response evaluation by transcriptomics of methylmercury effects on neural differentiation of murine embryonic stem cells. *Toxicological Sciences*. 122(2): 437-447.

Theunissen P.T, Robinson J.F, Pennings J.L, De jong E, Claessen S. M, Kleinjans J.C, Piersma A.H. (2012a) Transcriptomic concentration-response evaluation of valproic acid, cyproconazole, and hexaconazole in the neural Embryonic Stem Cell Test (ESTn). *Toxicological Sciences*. 125(2): 430-438.

Theunissen P.T, Robinson J.F, Pennings J.L, van Herwijnen M.H, Kleinjans J.C, Piersma A.H. (2012b) Compound-specific effects of diverse neurodevelopmental toxicants on global gene expression in the neural embryonic stem cell test (ESTn). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 262(3): 330-340.

Theunissen P.T, Pennings J.L, van Dartel D.A, Robinson J.F, Kleinjans J.C, Piersma A.H (2013) Complementary detection of embryotoxic properties of substances in the neural and cardiac embryonic stem cell tests. *Toxicological Sciences*. 132(1): 118-130.

Thomson J.A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S.S, Waknitz M.A, Swiergiel J.J, Marshall V.S, Jones J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282(5391): 1145-1147.

Ticho B.S, Stainier D.Y, Fishman M.C, Breitbart R.E. (1996) Three zebrafish MEF2 genes delineate somitic and cardiac muscle development in wild-type and mutant embryos. *Mechanisms of Development*. 59: 205-18.

Tonk E.C, Robinson J.F, Verhoef A, Theunissen P.T, Pennings J.L, Piersma A.H. (2013) Valproic acid-induced gene expression responses in rat whole embryo culture and comparison across in vitro developmental and non-developmental models. *Reproductive Toxicology*. 41: 57-66.

Tortelote G.G, Hernandez-Hernandez J.M, Quaresma A.J, Nickerson J.A, Imbalzano A.N, Rivera-Pérez J.A. (2013) Wnt3 function in the epiblast is required for the maintenance but not the initiation of gastrulation in mice. *Developmental Biology*. 374: 164-173.

Trosko J.E, Chang C.C, Wilson M.R, Upham B, Hayashi T, Wade M. (2000) Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. *Methods*. 20(2): 245-264.

Turtoi A, Mottet D, Matheus N, Dumont B, Peixoto P, Hennequiere V, Deroanne C, Colige A, De Pauw E, Bellahcene A, Castronovo V. (2012) The angiogenesis suppressor gene AKAP12 is under the epigenetic control of HDAC7 in endothelial cells. *Angiogenesis*. 15: 543-554.

Uchida C, Gee E, Ispanovic E, Haas T.L. (2008) JNK as a positive regulator of angiogenic potential in endothelial cells. *Cell Biology International*. 32(7): 769-776.

Ulloa-Montoya F, Verfaillie C.M, Hu W.S. (2005) Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100(1): 12-27.

van Dartel D.A, Zeijen N.J.L, de la Fonteyne L.J.J, van Schooten F.J, Piersma A.H. (2009) Disentangling cellular proliferation and differentiation in the embryonic stem cell test, and its impact on the experimental protocol. *Reproductive Toxicology*. 28(2): 254-261.

van Dartel D.A, Pennings J.L, van Schooten F.J, Piersma A.H. (2010a) Transcriptomics-based identification of developmental toxicants through their interference with cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 243(3): 420-428.

van Dartel D.A, Pennings J.L, de la Fonteyne L.J, van Herwijnen M.H, van Delft J.H, van Schooten F.J, Piersma A.H. (2010b) Monitoring developmental toxicity in the embryonic stem cell test using differential gene expression of differentiation-related genes. *Toxicological Sciences*. 116(1): 130–139.

van Dartel D.A, Piersma A.H. (2011a) The embryonic stem cell test combined with toxicogenomics as an alternative testing model for the assessment of developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*. 32: 235-244.

van Dartel D.A, Pennings J.L, de la Fonteyne L.J, Brauers K.J, Claessen S, van Delft J.H, Kleinjans J.C, Piersma A.H. (2011b) Evaluation of developmental toxicant identification using gene expression profiling in embryonic stem cell differentiation cultures. *Toxicological Sciences*. 119: 126-134.

Verwei M, van Burgsteden J.A, Krul C.A, van de Sandt J.J, Freidig A.P. (2006) Prediction of in vivo embryotoxic effect levels with a combination of in vitro studies and PBPK modelling. *Toxicology Letters*. 165(1): 79-87.

Von Bohlen U.H.O. (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*. 329(3): 409-420.

Warkus E.L, Yuen A.A, Lau C.G, Marikawa Y. (2016) Use of In Vitro Morphogenesis of Mouse Embryoid Bodies to Assess Developmental Toxicity of Therapeutic Drugs Contraindicated in Pregnancy. *Toxicological Sciences*. 149(1): 15-30.

Wiese C, Kania G, Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus A.M. (2006) Pluripotency: capacity for in vitro differentiation of undifferentiated embryonic stem cells. *Methods in Molecular Biology*. 325: 181-205.

Winrow C.J, Hemming M.L, Allen D.M, Quistad G.B, Casida J.E, Barlow C. (2003) Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. *Nature Genetics*. 33(4): 477-485.

Wobus A.M, Rohwedel J, Maltsev V, Hescheler J. (1994) In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. *Roux's Archives of Developmental Biology*. 204: 36-45.

Yamaguchi T, Dumont D, Conlon R, Breitman M, Rossant J. (1993) Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*. 118: 489-498.

Ying Q.L, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. (2003) Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology*. 21(2): 183-186.

Yoon Y, Huang T, Tortelote G.G, Wakamiya M, Hadjantonakis A.K, Behringer R.R, Rivera-Perez J.A. (2015) Extra-embryonic Wnt3 regulates the establishment of the primitive streak in mice. *Developmental Biology*. 403:80-88.

Yu J, Thomson J.A. (2008) Pluripotent stem cell lines. *Genes & Development*. 22: 1987-1997.

Yu R, Miyamura N, Okamoto-Uchida Y, Arima N, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nishina H. (2015) A Modified Murine Embryonic Stem Cell Test for Evaluating the Teratogenic Effects of Drugs on Early Embryogenesis. *PLoS One*. 10: e0145286.

Zhang H, Fraser S.T, Papazoglu C, Hoatlin M.E, Baron M.H. (2009) Transcriptional activation by the Mixl1 homeodomain protein in differentiating mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 27: 2884-2895.

Zhang T, Liu J, Zhang J, Thekkethottiyil E.B, Macatee T.L, Ismat F.A, Wang F, Stoller J.Z (2013). Jun is required in Isl1-expressing progenitor cells for cardiovascular development. *PLoS ONE*. 8 (2) e57032.