

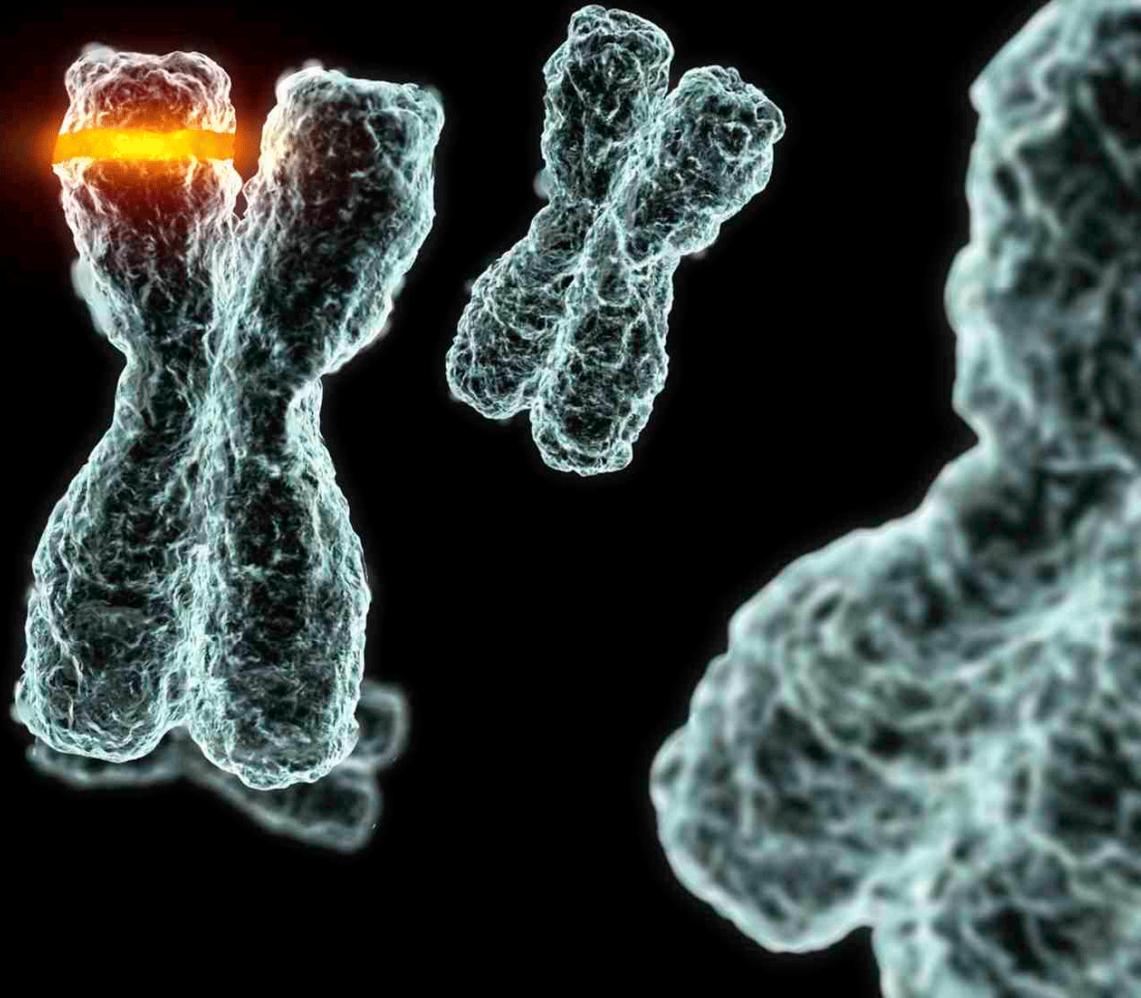
Valoración de la MUTAGENICIDAD

Óscar Herrero Felipe

Universidad Autónoma de Madrid

Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC)

oscar.herrero@gmail.com



Genotoxicología

Disciplina de la investigación toxicológica cuyo objetivo principal es salvaguardar lo máximo posible la reserva genética humana de la acción de las distintas sustancias genotóxicas, incluyéndose en esta categoría todas aquellas que tengan efectos mutagénicos, carcinogénicos y/o tóxicos para la reproducción. (Modificado de Vamparys y col., 1996)

Mutagénesis

Inducción de cambios hereditarios (mutaciones) en el genotipo de una célula como consecuencia de alteraciones o pérdida de genes o cromosomas (o parte de ellos). (Vettorazzi, 2001)



Genotoxicología

	MUTAGÉNESIS	CARCINOGÉNESIS	TOXICIDAD PARA REPRODUCCIÓN
Tiempo entre inducción y diagnóstico	Desde la siguiente generación hasta varias después, quizás nunca	Desde varios meses hasta muchos años	Desde varias semanas hasta meses, rara vez años
Reversibilidad	Irreversible	Irreversible excepto en ciertos casos por cirugía o terapia	Irreversible excepto en ciertos casos por cirugía o terapia (desórdenes metabólicos)
Sensibilidad	Sin diferencia aparente entre tejidos maduros e inmaduros	Algunos tipos de cáncer afectan fundamentalmente a jóvenes, otros a la inversa	Son sensibles los tejidos inmaduros, disminuyendo la sensibilidad con el desarrollo
Caracterización	Cambios en la cantidad o calidad del material genético (nivel molecular)	Proliferación descontrolada (nivel celular)	Cambios en el patrón de desarrollo (nivel de tejidos y órganos)
Diana	Aleatoria	Normalmente hay dianas específicas	A menudo con un alto grado de especificidad entre la naturaleza del tóxico y el tipo de malformación

(Modificado de Wilson, 1972)



Mutagénesis

- Las alteraciones pueden afectar a un solo gen, a un conjunto de genes o a un cromosoma entero.
- En un solo gen, los efectos pueden producirse a consecuencia de los efectos sobre las bases simples de ADN (mutaciones puntuales) o de grandes cambios en el gen (incluso pérdidas).
- Los efectos en cromosomas enteros pueden implicar cambios estructurales o numéricos.
- Si la mutación se produce en células germinales de organismos con reproducción sexual, puede transmitirse a la descendencia.
- Un mutágeno es un agente que provoca un aumento de mutaciones.



Clasificación UE (de las sustancias mutagénicas según sus efectos específicos sobre la salud humana)

Primera Categoría

Sustancias que, se sabe, son mutagénicas para el hombre.

Se dispone de elementos suficientes para establecer la existencia de una relación de causa-efecto entre la exposición del hombre a tales sustancias y la aparición de alteraciones genéticas hereditarias.

Segunda Categoría

Sustancias que pueden considerarse como mutagénicas para el hombre.

Se dispone de suficientes elementos para suponer que la exposición del hombre a tales sustancias puede producir alteraciones genéticas hereditarias. Dicha presunción se fundamenta generalmente en:

- . estudios apropiados en animales,
- . otro tipo de información pertinente.

Tercera Categoría

Sustancias cuyos posibles efectos mutagénicos en el hombre son preocupantes.

Los resultados obtenidos en estudios de mutagénesis apropiados son insuficientes para clasificar dichas sustancias en la segunda categoría.



Clasificación UE

(de las sustancias mutagénicas según sus efectos específicos sobre la salud humana)

Primera Categoría

Segunda Categoría

TÓXICO

FRASE R46:

Puede causar alteraciones genéticas hereditarias.



Tercera Categoría

NOCIVO

FRASE R68:

Posibilidad de efectos irreversibles.



Clasificación UE (de las sustancias mutagénicas según sus efectos específicos sobre la salud humana)

Cabe señalar que las sustancias se clasifican como mutágenas con referencia específica a las malformaciones genéticas heredadas. No obstante, se considera que, por regla general, los resultados que implican la clasificación de los productos químicos en la tercera categoría («inducción de cambios con incidencia genética en células somáticas») constituyen una advertencia de la posible existencia de carcinogénesis.

La elaboración de métodos de ensayo sobre mutagenicidad es un proceso continuo. En muchos de los nuevos ensayos se emplean protocolos y criterios de evaluación no normalizados. A la hora de evaluar los datos sobre mutagenicidad han de tenerse en cuenta la calidad de los ensayos y el grado de validación del método de ensayo.



SGA



Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (ONU, 2005)

PROPÓSITOS

- Mejorar la protección de la salud humana y del medio ambiente al facilitar un sistema de comunicación de peligros inteligible internacionalmente.
- Proporcionar un marco reconocido a los países que carecen de sistema.
- Reducir la necesidad de efectuar ensayos y evaluaciones de los productos químicos.
- Facilitar el comercio internacional de los productos químicos cuyos peligros se hayan evaluado e identificado debidamente a nivel internacional.
- Crear criterios armonizados para clasificar sustancias y mezclas con arreglo a sus peligros ambientales, físicos y para la salud.
- Crear elementos armonizados de comunicación de peligros, con requisitos sobre etiquetas y fichas de datos de seguridad.



Clasificación SGA (para los mutágenos de las células germinales)

Categoría 1A

Productos químicos de los que se sabe que inducen mutaciones hereditarias en las células germinales de seres humanos.

Categoría 1B

Productos químicos que se consideran como si indujeran mutaciones hereditarias en las células germinales de los seres humanos.

Categoría 2

Productos químicos que son motivo de preocupación por la posibilidad de que puedan inducir mutaciones hereditarias en las células germinales de los seres humanos.



Clasificación SGA (para los mutágenos de las células germinales)

Categoría 1A

Productos químicos de los que se sabe que inducen mutaciones hereditarias en las células germinales de seres humanos.

Criterios:

Datos positivos procedentes de estudios epidemiológicos en humanos.



Clasificación SGA (para los mutágenos de las células germinales)

Categoría 1B

Productos químicos que se consideran como si indujeran mutaciones hereditarias en las células germinales de los seres humanos.

Criterios:

Resultado(s) positivo(s) de ensayos *in vivo* de mutaciones hereditarias en células germinales de mamíferos; o

Resultado(s) positivo(s) de ensayos *in vivo* de mutaciones en células somáticas en mamíferos, junto con algún indicio que haga suponer que la sustancia puede provocar mutaciones en células germinales. Esta información complementaria puede, por ejemplo, proceder de ensayos *in vivo* que demuestran bien la capacidad mutágena/genotóxica de la sustancia para las células germinales, o bien que la sustancia o su(s) metabolito(s) son capaces de interactuar con el material genético de células germinales; o

Resultados positivos de ensayos que muestran efectos mutagénicos en células germinales de seres humanos, sin que esté demostrada la transmisión a los descendientes; por ejemplo, un incremento de la frecuencia de aneuploidía en los espermatozoides de los varones expuestos.



Clasificación SGA (para los mutágenos de las células germinales)

Categoría 2

Productos químicos que son motivo de preocupación por la posibilidad de que puedan inducir mutaciones hereditarias en las células germinales de los seres humanos.

Criterios:

Resultados positivos de experimentos llevados a cabo con mamíferos y/o en algunos casos de experimentos *in vitro*, obtenidos a partir de:

- Ensayos *in vivo* de mutaciones en células somáticas de mamíferos; o
- Otros ensayos *in vivo* para efectos genotóxicos en células somáticas de mamíferos siempre que estén corroborados por resultados positivos de ensayos de mutagenicidad *in vitro*.

NOTA:

Los productos químicos que resultan positivos en los ensayos in vitro de mutagenicidad en mamíferos, y que también muestran una analogía en cuanto a la relación actividad-estructura con mutágenos conocidos de células germinales deberían clasificarse como mutágenos de la Categoría 2.



Clasificación SGA (para los mutágenos de las células germinales)

Categoría 1A

Categoría 1B

PELIGRO

Puede provocar defectos genéticos (indíquese la vía de exposición si se ha demostrado concluyentemente que ninguna otra vía es peligrosa).



Categoría 2

ATENCIÓN

Susceptible de provocar defectos genéticos (indíquese la vía de exposición si se ha demostrado concluyentemente que ninguna otra vía es peligrosa).



Clasificación SGA (para los mutágenos de las células germinales)

Esta clase de peligro se refiere fundamentalmente a los productos químicos capaces de inducir mutaciones en las células germinales humanas transmisibles a los descendientes. No obstante, para clasificar sustancias y mezclas en esta clase de peligro, también pueden considerarse los ensayos de mutagenicidad/genotoxicidad *in vitro* y los realizados con las células somáticas de mamíferos *in vivo*.

La clasificación de las sustancias para efectos hereditarios en células germinales humanas se hace sobre la base de ensayos bien hechos y suficientemente validados, considerándose de preferencia los que siguen las Directrices de la OCDE.



Criterios UE vs SGA

UE CATEGORÍA 1 CATEGORÍA 2 CATEGORÍA 3

Criterios	Datos positivos de estudios epidemiológicos en humanos	Datos positivos de ensayos con animales que demuestren la existencia de: 1. Mutaciones germinales hereditarias. 2. Interacción con el ADN de células germinales. 3. Mutaciones somáticas si, también, se demuestra que la sustancia o un metabolito es capaz de alcanzar las células germinales.	Datos positivos de ensayos con animales que demuestren la existencia de: 1. Mutaciones somáticas. 2. Interacción con el ADN de células somáticas.
------------------	--	---	---

SGA CATEGORÍA 1A CATEGORÍA 1B CATEGORÍA 2

Criterios	Datos positivos de estudios epidemiológicos en humanos	Datos positivos de ensayos con animales que demuestren la existencia de: 1. Mutaciones germinales hereditarias. 2. Mutaciones somáticas si, también, se demuestra la capacidad mutagénica/genotóxica de la sustancia para células germinales o la capacidad de la sustancia o un metabolito de interactuar con el ADN de las células germinales. <div style="border: 1px solid yellow; padding: 5px;">Datos positivos en humanos que demuestren la existencia de efectos mutagénicos en células germinales no transmisibles a los descendientes.</div>	Datos positivos de ensayos con animales que demuestren la existencia de: 1. Mutaciones somáticas. 2. Efectos genotóxicos en células somáticas si existen datos positivos de ensayos de mutagenicidad <i>in vitro</i> . <div style="border: 1px solid yellow; padding: 5px;">Datos positivos de ensayos <i>in vitro</i> y analogía en cuanto a la relación estructura-actividad con mutágenos conocidos de células germinales.</div>
------------------	--	---	--



Ensayos



Ensayos *in vivo* de mutaciones hereditarias en células germinales:

Ensayo de mutación letal dominante en roedores (OCDE 478).

Ensayo de traslocación hereditaria en ratones (OCDE 485).

Ensayo de mutación local específica en ratones.

Ensayos *in vivo* de mutaciones en células somáticas:

Ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea de mamíferos (OCDE 475).

Ensayo de la mancha en ratones (OCDE 484).

Ensayo de micronúcleos de eritrocitos en mamíferos (OCDE 474).



Ensayos



Ensayos de mutagenicidad / genotoxicidad en células germinales:

Mutagenicidad:

Ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonios de mamíferos (OCDE 483).
Ensayo de micronúcleos en espermátidas.

Genotoxicidad:

Análisis de intercambio de cromátidas hermanas en espermatogonias.
Ensayo de síntesis no programada de ADN en células testiculares.

Ensayos de genotoxicidad en células somáticas:

Ensayo *in vivo* de síntesis no programada de ADN en hígados de mamífero (OCDE 486).
Intercambio de cromátidas hermanas de médula ósea de mamífero.



Ensayos

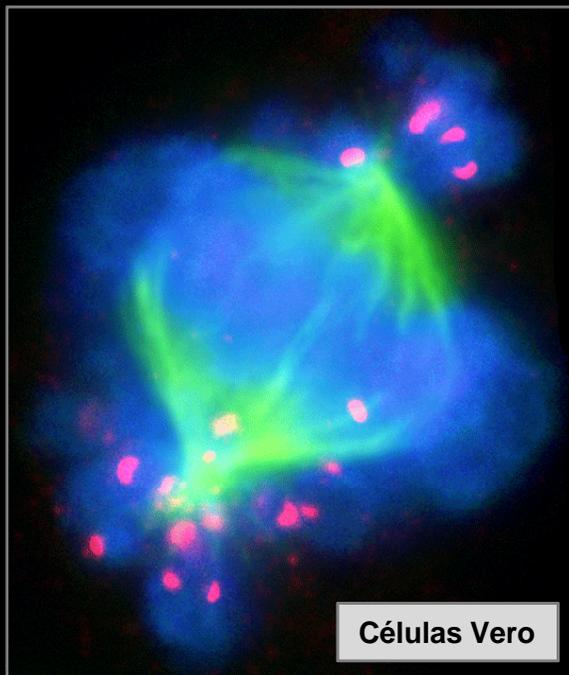


Ensayos *in vitro* de mutagenicidad:

Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en mamífero (OCDE 473).

Ensayo *in vitro* de mutación génica en células de mamífero (OCDE 476).

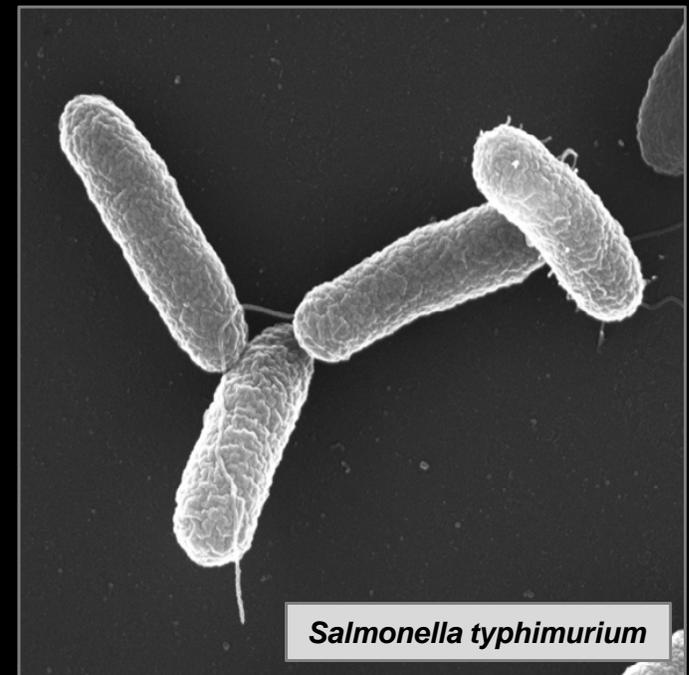
Ensayo de retromutación en bacterias (OCDE 471).



Células Vero



Vicia faba

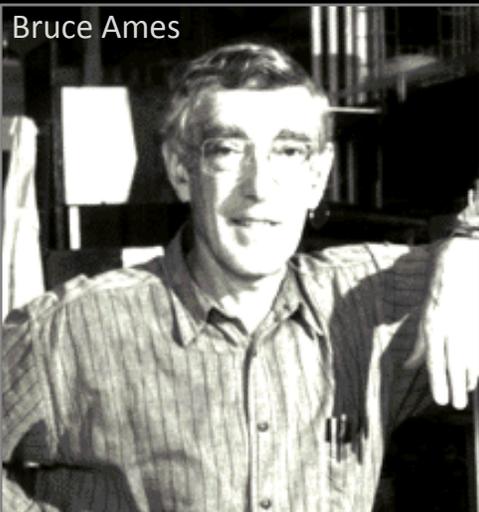


Salmonella typhimurium



OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias
(*Salmonella typhimurium*)



Test de Ames (1973)

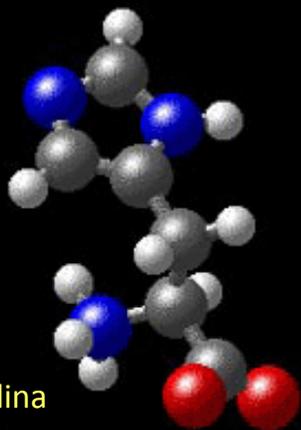
Primer ensayo de corta duración desarrollado para detectar la mutagenicidad de los agentes químicos.

Gracias a este ensayo, en 1975 se demostró que el 60-90 % de las sustancias químicas carcinogénicas eran a su vez mutagénicas.

Principio:

Utiliza cepas mutantes, deficientes para la histidina, para detectar mutaciones puntuales (sustitución, adición o supresión) de una o unas pocas pares de bases del ADN.

Detecta mutaciones que revierten las mutaciones originales de las cepas y restauran la capacidad de las bacterias de sintetizar el aminoácido esencial histidina.



Histidina



OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias
(*Salmonella typhimurium*)

CEPA	MUTACIÓN	SISTEMA DE REPARACIÓN	LPS	REQUIERE BIOTINA	PLÁSMIDOS
TA98	<u>hisD3052</u>	uvrB	rfa 1004	bio-	pKM101
TA100	<u>hisG46</u>	uvrB	rfa 1001	bio-	pKM101
TA102	<u>hisG8476</u> <u>hisG428</u>	Intacto	rfa 1027	bio-	pKM101 pAQ1

hisD3052

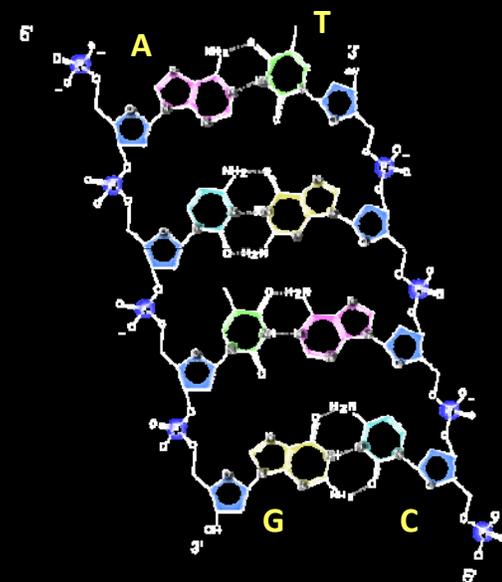
Mutación de tipo *frameshift* que detecta inserciones o supresiones de pares de bases G-C.

hisG46

Mutación puntual que detecta sustituciones de pares de bases G-C.

hisG428

Mutación puntual en el plásmido pAQ1 que detecta sustituciones de pares de bases A-T.



OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias
(*Salmonella typhimurium*)

CEPA	MUTACIÓN	SISTEMA DE REPARACIÓN	LPS	REQUIERE BIOTINA	PLÁSMIDOS
TA98	hisD3052	uvrB	rfa 1004	bio-	pKM101
TA100	hisG46	uvrB	rfa 1001	bio-	pKM101
TA102	hisG428	Intacto	rfa 1027	bio-	pKM101 pAQ1

uvrB

Supresión de un gen que codifica para el sistema de reparación por escisión del ADN, característico en daños por luz ultravioleta. Produce un aumento de la sensibilidad en la detección de mutágenos.

Incluye al gen que codifica para la síntesis de biotina.



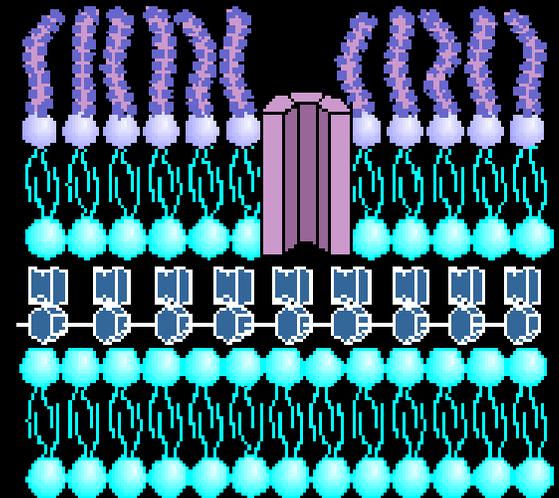
OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias
(*Salmonella typhimurium*)

CEPA	MUTACIÓN	SISTEMA DE REPARACIÓN	LPS	REQUIERE BIOTINA	PLÁSMIDOS
TA98	hisD3052	uvrB	rfa 1004	bio-	pKM101
TA100	hisG46	uvrB	rfa 1001	bio-	pKM101
TA102	hisG428	Intacto	rfa 1027	bio-	pKM101 pAQ1

rfa

Mutación que causa la pérdida parcial de la barrera lipopolisacárida de la pared bacteriana, aumentando la permeabilidad a grandes moléculas.
Aumenta la sensibilidad al cristal violeta.



OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias
(*Salmonella typhimurium*)

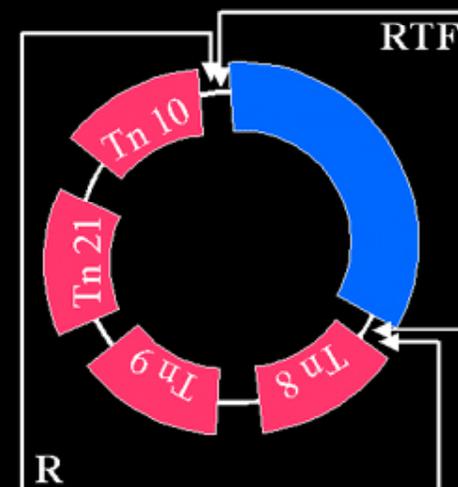
CEPA	MUTACIÓN	SISTEMA DE REPARACIÓN	LPS	REQUIERE BIOTINA	PLÁSMIDOS
TA98	hisD3052	uvrB	rfa 1004	bio-	<u>pKM101</u>
TA100	hisG46	uvrB	rfa 1001	bio-	<u>pKM101</u>
TA102	hisG428	Intacto	rfa 1027	bio-	<u>pKM101</u> <u>pAQ1</u>

pKM101

Confiere resistencia a ampicilina y aumenta la mutagénesis espontánea e inducida porque incrementa el sistema de reparación con error.

pAQ1

Confiere resistencia a tetraciclina.



OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias (*Salmonella typhimurium*)

Para su conservación, las cepas se mantienen en criotubos a -80°C y disueltas en DMSO. Se controla de forma rutinaria que mantengan sus características.

Los cultivos se crecen en medio líquido a 37°C , en oscuridad y con agitación, hasta que las bacterias alcanzan la fase exponencial de crecimiento (aprox. 10^9 células/ml).

Se siembran las bacterias en triplicados de placas Petri con agar mínimo, que incluye trazas de histidina y biotina, para el análisis de los controles negativos y positivo y de cada concentración de la sustancia de estudio, todo ello con y sin activación metabólica.

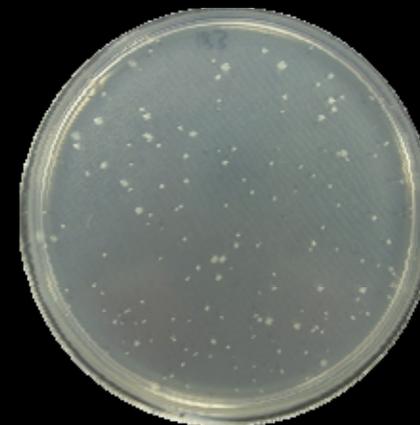
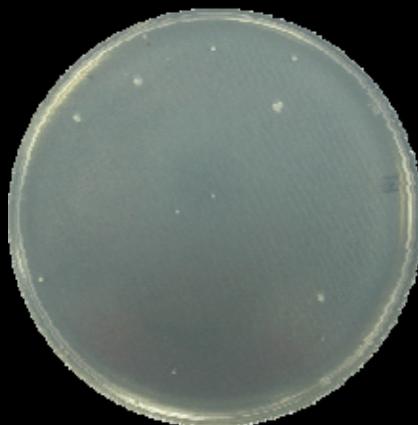


OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias
(*Salmonella typhimurium*)

Controles Negativos / Control Positivo

CEPA	Nº REVERTIENES ESPONTÁNEOS	MUTÁGENO ESTÁNDAR	Nº REVERTIENTES CON MUTÁGENO
TA98	15-75	4-NQO	300-500
TA100	60-220	MMS	2730
TA102	240-320	MMS	6585



OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias
(*Salmonella typhimurium*)

Activación Metabólica

El sistema más usado consta de una fracción postmitocondrial (S9) obtenida a partir de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como Aroclor 1254 o fenobarbital.

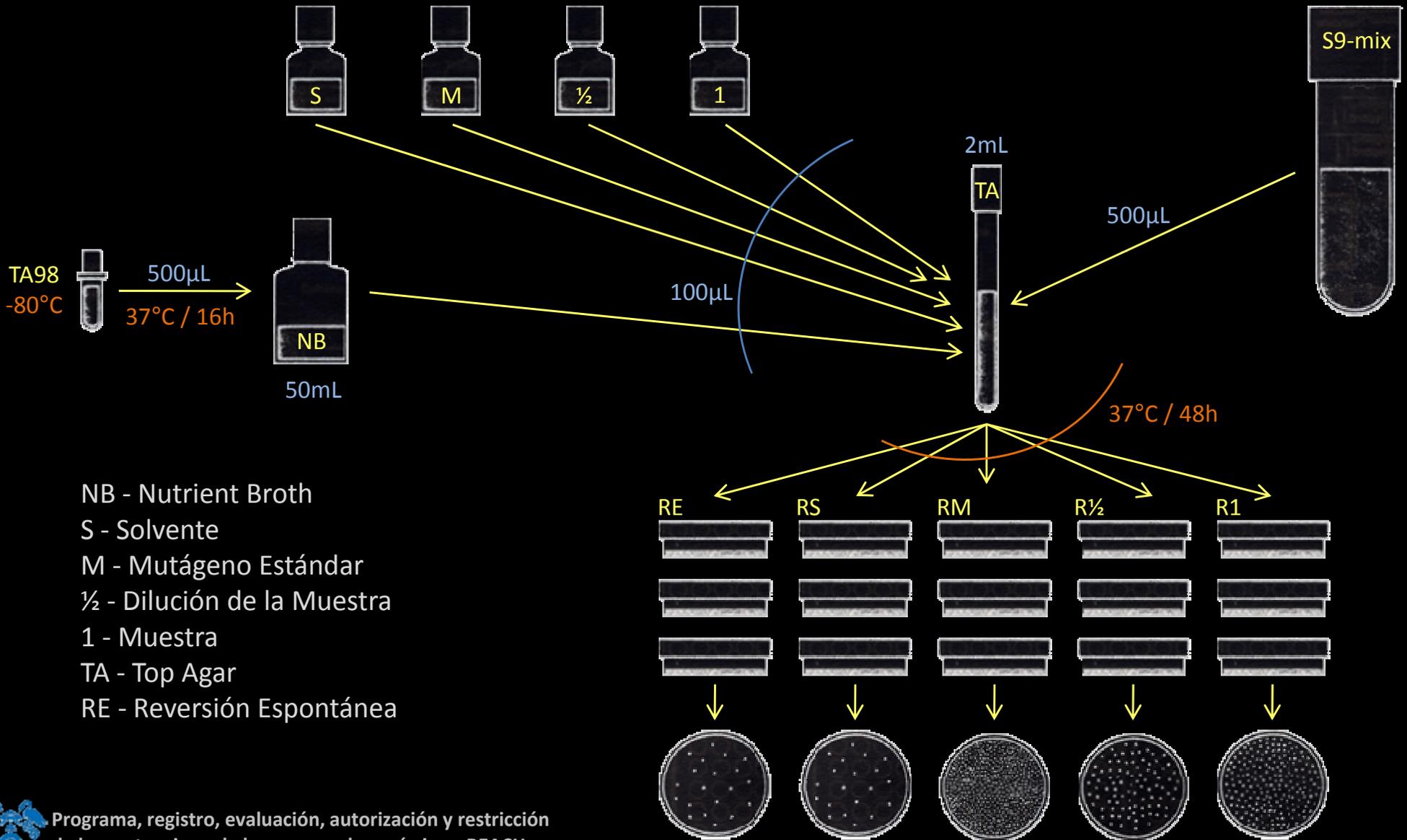
A esta fracción se le añaden los cofactores NADP Y G6P para obtener la S9-mix.

La concentración de S9 en la S9-mix varía entre el 5% y el 30%. Puede ser apropiado utilizar más de una.



OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias (*Salmonella typhimurium*)



- NB - Nutrient Broth
- S - Solvente
- M - Mutágeno Estándar
- 1/2 - Dilución de la Muestra
- 1 - Muestra
- TA - Top Agar
- RE - Reversión Espontánea

OCDE 471

Ensayo de retromutación en bacterias (*Salmonella typhimurium*)

- El empleo de una activación metabólica exógena en sistemas procariotas no emula con exactitud las condiciones *in vivo* de mamíferos, por lo que este ensayo no proporciona información directa de la potencia mutagénica y/o carcinogénica de una sustancia en humanos.
- Una extensa base de datos demuestra que muchas sustancias positivas para este ensayo tienen también actividad mutagénica en otros. En otras ocasiones, encontramos agentes mutagénicos que no son detectados por este método. Cuidado con la sobreestimación de la actividad mutagénica a causa de los factores que aumentan la sensibilidad de las bacterias a las sustancias de análisis.
- Aunque muchas sustancias que son positivas para este ensayo son carcinógenos en mamíferos, la correlación no es absoluta. Existen carcinógenos no detectados por este ensayo a causa de que sus mecanismos de acción no son genotóxicos o no se encuentran presentes en bacterias.



OCDE 473

Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en mamífero

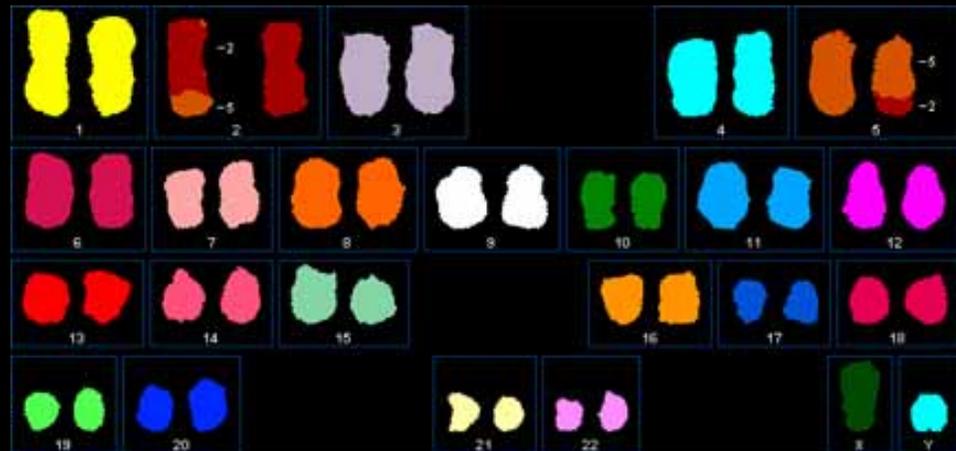
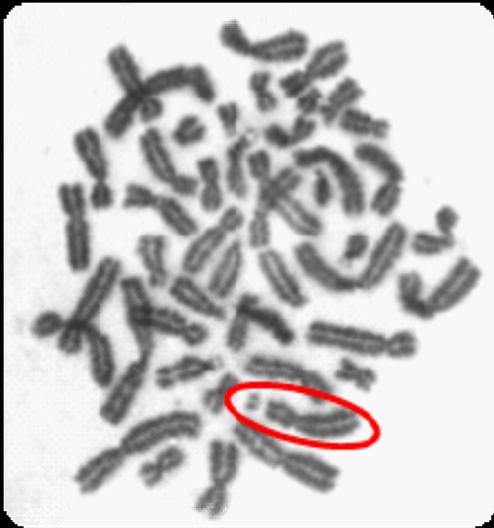
- El propósito de este ensayo es identificar agentes que causan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo.
- Las mutaciones cromosómicas son causa de muchas enfermedades genéticas en humanos y existen evidencias de que mutaciones cromosómicas que causan alteraciones en oncogenes y en genes supresores de tumores de células somáticas están involucradas en la inducción de cáncer en humanos y animales de experimentación.
- Este ensayo emplea cultivos de líneas celulares establecidas o cultivos primarios. Las células usadas se seleccionan en base a su capacidad de crecimiento en cultivo, la estabilidad de su cariotipo, su número cromosómico, su diversidad cromosómica y la frecuencia con la que sufren aberraciones cromosómicas espontáneas.



OCDE 473

Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en mamífero

- Los cultivos son expuestos a la sustancia a analizar, tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica, y las células en división son analizadas microscópicamente.



OCDE 476

Ensayo *in vitro* de mutación génica
en células de mamífero

- El propósito de este ensayo es identificar agentes que causan mutaciones génicas.
- Entre las líneas celulares empleadas se encuentran:
 - Células de linfoma de ratón L5178Y
 - Células de hámster chino (CHO, AS52, V79)
 - Células linfoblastoides humanas TK6
- Los parámetros genéticos más usados miden mutaciones en los genes de la timidina kinasa (TK), hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) y un transgen de xantina-guanina fosforribosil transferasa (XGPRT).
- Las células usadas se seleccionan en base a su capacidad de crecimiento en cultivo y su estabilidad en la frecuencia de mutaciones espontáneas.
- Generalmente se requiere el uso de una activación metabólica exógena.



OCDE 476

Ensayo *in vitro* de mutación génica en células de mamífero

- Este ensayo se emplea para detectar posibles mutágenos y carcinógenos en humanos, aunque la correlación entre el mismo y la carcinogenicidad no es perfecta.
- Células deficientes en TK son resistentes a los efectos citotóxicos de la trifluorotimidina (TFT). Células con TK sin mutar son sensibles a TFT, que causa la inhibición del metabolismo celular y la parada en el ciclo de división. De forma similar, células deficientes en HGPRT o XGPRT son seleccionadas por su resistencia a 6-tioguanina (TG) u 8-azaguanina (AG).
- Tras una incubación apropiada con la sustancia a analizar, se calcula la frecuencia de mutación a partir del número de colonias mutantes en un medio selectivo y el número de colonias en un medio no selectivo.



OXDE

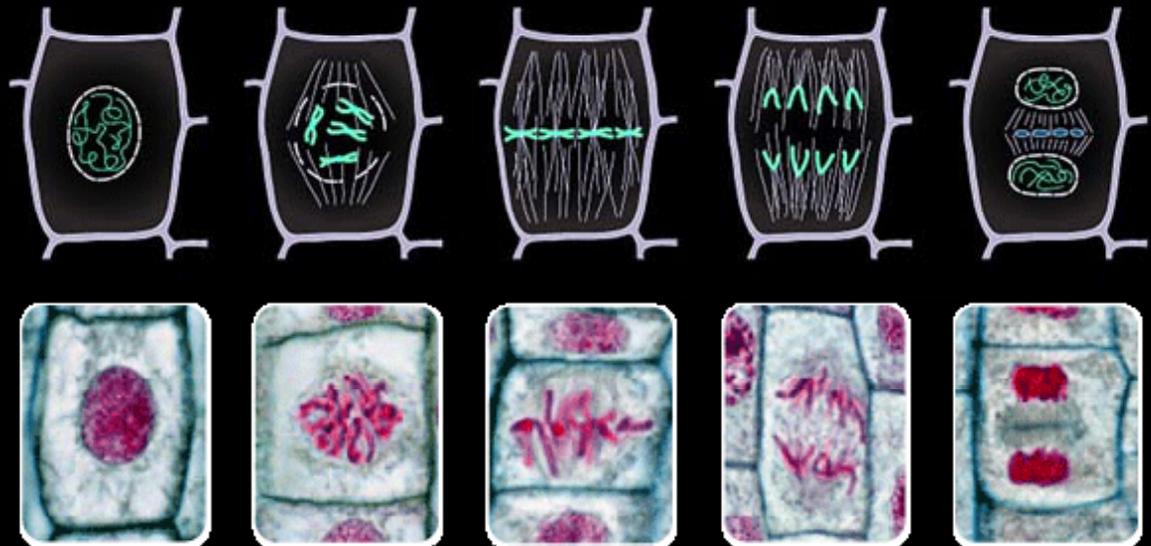
Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*

Fiskesjö G (1985) The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring. *Hereditas* 102:99-12

- Pelar, decapar y lavar los bulbos.



- Excitar el meristemo radicular mediante una muesca.

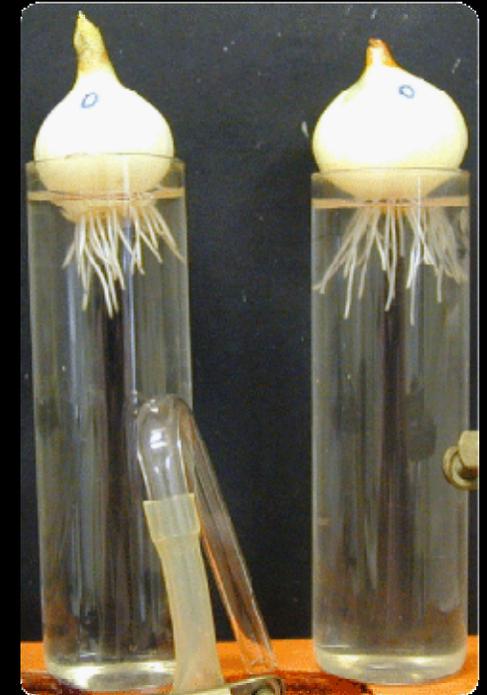


O~~OX~~E

Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*

Fiskesjö G (1985) The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring. *Hereditas* 102:99-12

- Cultivar los bulbos en oscuridad a 25 ± 0.5 °C.
- Oxigenar el agua (burbujeo constante de 10-20 ml/min).
- Controlar crecimiento radicular tras 24-48 horas (2 cm).

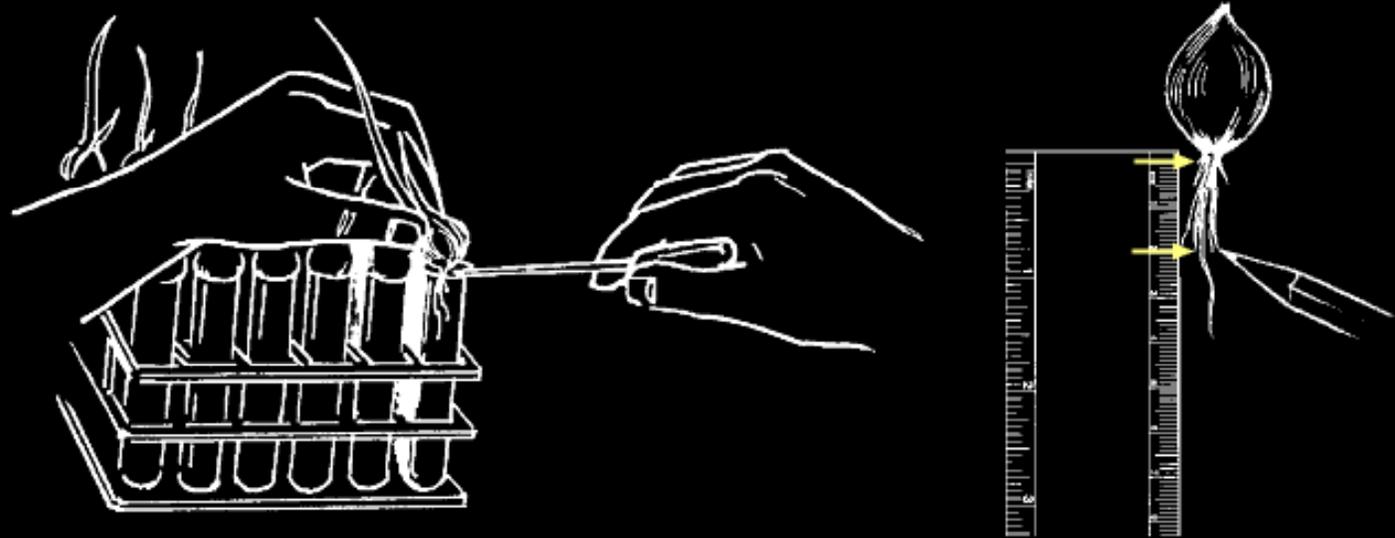
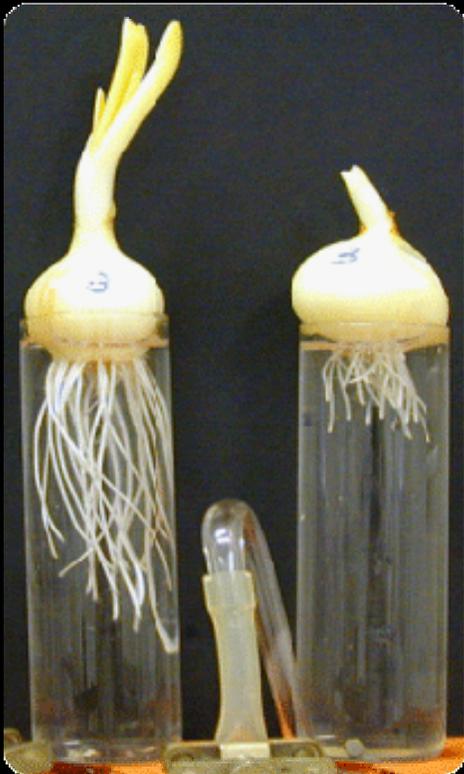


OXDE

Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*

Fiskesjö G (1985) The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring. *Hereditas* 102:99-12

- Iniciar el tratamiento de las cebollas.



- Calcular Índice Mitótico e Índice de Fases a las 48 horas.
- Calcular la Inhibición del Crecimiento Radicular a las 72 horas.



~~OOOE~~

Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*

Fiskesjö G (1985) The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring. *Hereditas* 102:99-12



Roturas: efecto clastogénico

Micronúcleos: efecto clastogénico y/o aneuploidía

Puentes con cromosomas rezagados: riesgo de aneuploidía



Valoración de la MUTAGENICIDAD

Óscar Herrero Felipe

Universidad Autónoma de Madrid

Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC)

oscar.herrero@gmail.com

