

TÍTULO: Presentación didáctica de evaluaciones genotóxicas.
TITLE: Didactic presentation of genotoxic evaluation.

Autores: Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2**}, Janet Morffi Figueroa^{3**}, Yulieé López Feria^{4*}.

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, ²Licenciado en Microbiología, ³Licenciado en Microbiología, MsC, ⁴Doctor en Medicina Veterinaria.

Centro de Trabajo:

*Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad de La Habana, Cuba.

**Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Municipio Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola, darencibia@finlay.edu.cu.

Teléfono: 057072716911.

Resumen.

En nuestros días se le ha dado gran importancia a las evaluaciones genotóxicas gracias a su vinculación natural de predecir importantes fuentes de agentes carcinogénicos potenciales, por lo cual el conocimiento de esta materia es fundamental para la introducción de nuevos fármacos, insecticidas, suplementos alimenticios, vacunas, adyuvantes y otros productos. Que en la evaluación farmacotóxica de los productos se cumplan todos los requisitos establecidos es el objetivo fundamental de la mayoría de las autoridades regulatorias. El objetivo de este trabajo es realizar una actualización sobre los ensayos de genotoxicidad en las evaluaciones de nuestros productos de forma didáctica, tomando esta forma de presentación como medio de enseñanza. Tuvimos en cuenta la actualización sobre toxicología genética, batería de ensayos genotóxicos, el objetivo fundamental de cada ensayo y otras consideraciones.

Palabras claves: Genotoxicidad, toxicología genética, batería de ensayos genotóxicos, presentación didáctica.

Abstract.

In our days the genotoxic evaluations has been given great importance thanks to their natural linking of predicting important sources of carcinogenic potentials agents, reason why the knowledge of this matter is fundamental for the introduction of new drugs, insecticides, nutritious supplements, vaccine, adjuvants and others products. That in the pharmacotoxic evaluation of the products all the established requirements are completed it is the fundamental objective of most regulatory authorities. The aim of this work is to carry out a current on the genotoxicity assays in the evaluations of our products in a didactic form, taking these presentation form as means of teaching. We kept in mind about the current of genetic toxicology, battery of genotoxic assays, the fundamental objective of each assays and other considerations.

Key words: Genotoxicity, genetic toxicology, battery of genotoxic assays, didactic presentation.

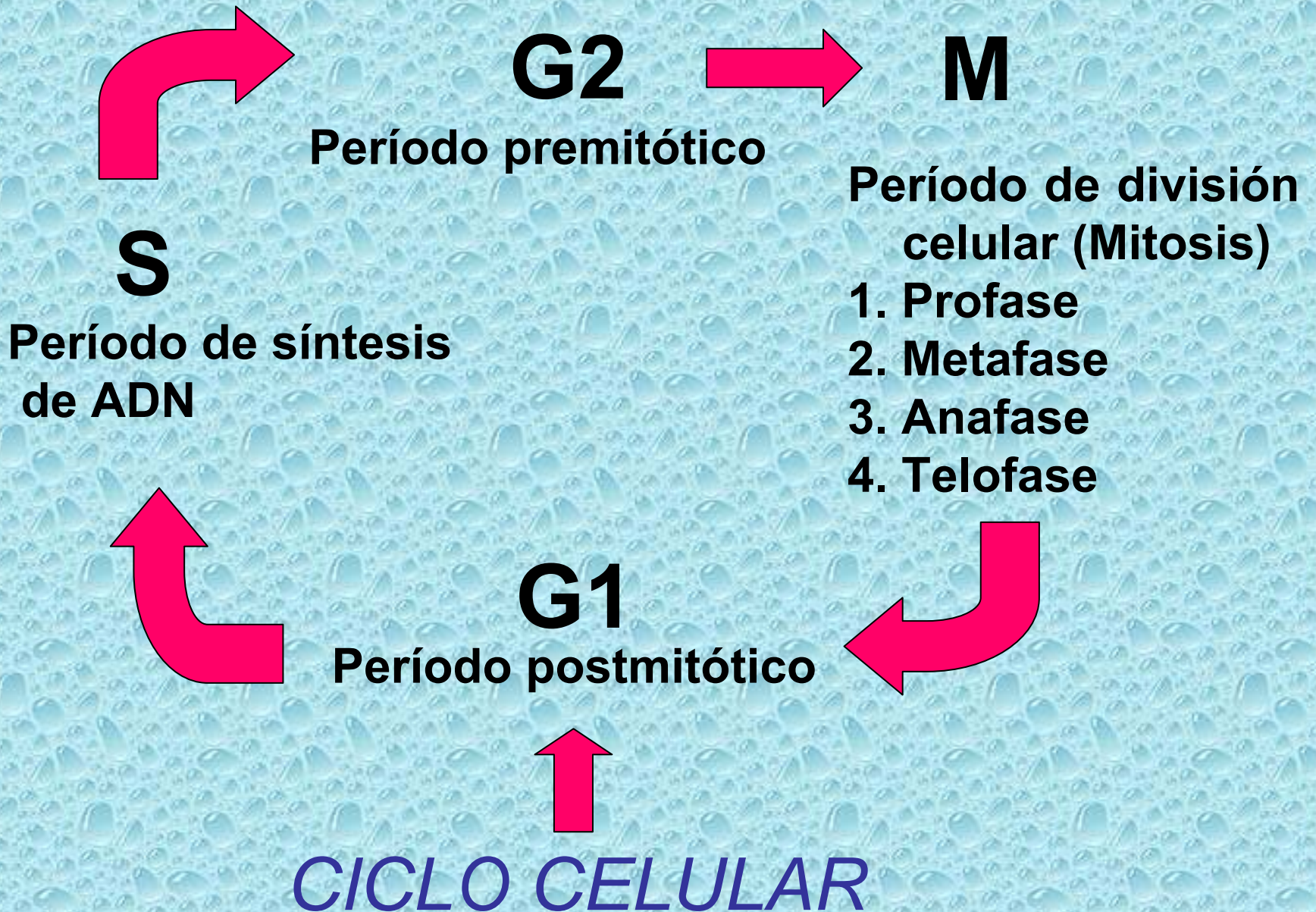
Toxicología Genética : Es la ciencia encargada de identificar y analizar los agentes con toxicidad sobre el ADN. Estudia los llamados tóxicos genéticos o genotoxinas.

Genotoxinas: Son agentes físicos o compuestos químicos que dañan la molécula de ADN.

La importancia de las genotoxinas radica en que ejercen su acción a concentraciones subletales y que las lesiones que provocan en el material genético se pueden transformar en cambios hereditarios.

Agente genotóxico: Cualquier agente capaz de dañar el ADN.

Mutágeno: Agente genotóxico que induce la aparición de mutaciones.



Mutaciones

Inducidas

Ocurren en presencia de un
Agente mutagénico

Causas

Quimioterapia
Dieta
Exposición

Espontáneas

Surgen en ausencia
agente mutagénico

Causas

Tautomería ceto-enol
Procesos oxidativos
Procesos alquilantes
Errores en la replicación

Mutaciones

**Células
Germinales**



**Células
Somáticas**

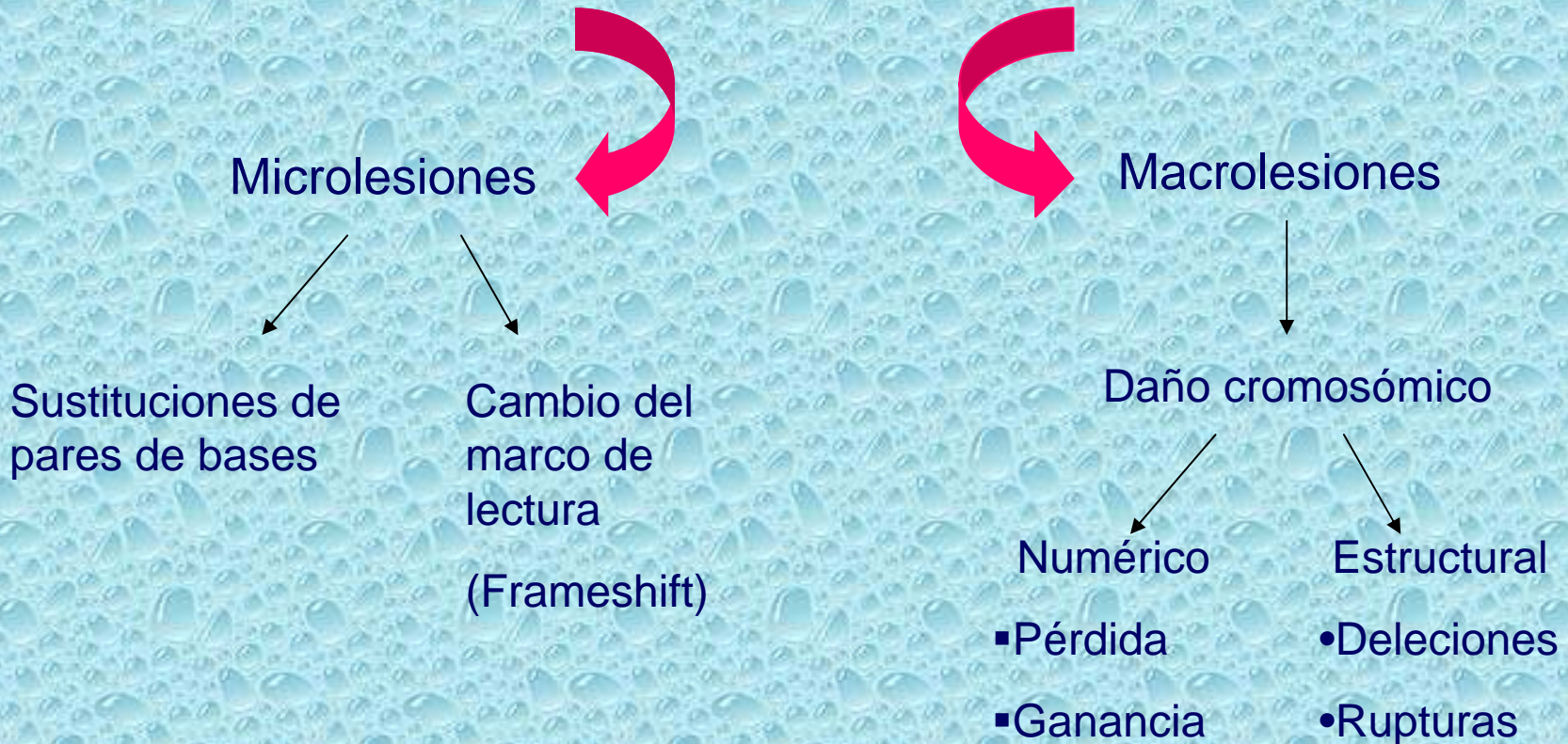


Transmitida a la descendencia y
quedar incorporada al acervo
génico de la población.



Afectan sólo al soma del individuo
Mueren con el individuo
Dañan en el sentido físico

Mutaciones



Tanto las micro como las macrolesiones son inducidas por diferentes mecanismos resultan de gran importancia para la toxicología genética y pueden ser detectados utilizando técnicas específicas

Mutágenos

Agentes físicos

- Rayos Ultravioletas (U.V)
- Radionizantes (α , β y γ)
- Rayos X

Compuestos químicos

- Agentes análogos de Bases
- Agentes modificadores de Bases
- Agentes intercalantes
- Agentes que bloquean el apareamiento entre bases

- Agentes desaminantes
- Agentes alquilantes
- Agentes hidroxilantes

Métodos de Evaluación Genotoxicológicos

Tienen como fin medir de forma directa o indirecta la actividad mutagénica, estos se realizan tanto *in vivo* como *in vitro* y deberán ser capaces de identificar el daño al ADN y su fijación.

Factores a tener en cuenta para la selección de los ensayos apropiados

- ✓ Tipo de daño genético.
- ✓ Capacidad metabólica del sistema de ensayo.
- ✓ Uso propuesto para el agente.
- ✓ Exposición y distribución en el organismo.
- ✓ Valor predictivo del ensayo en términos de mutagenicidad y carcinogenicidad.
- ✓ Requerimientos legislativos.

Batería de Ensayos Genotóxicos

1. Daño directamente al ADN.
Segmento (I). Daño en la estructura primaria del ADN.

- Ensayo cometa *in vivo* en ratones
- Ensayo cometa *in vitro* (distintas variantes)
- SOS Chromotest (*E. coli* PQ 37)

1. Mutaciones puntuales en células procariotas
Segmento (II). Daño a los genes.

- Ensayo de Ames (*S. typhimurium*)
- Ensayo en *Escherichia coli uvr*
- SOS Chromotest (*E. coli* PQ 37)

2. Estudio *in vitro* para detectar efectos cromosomales en células de mamíferos. **Segmento (III).** Daño a los cromosomas.

- Ensayo de Micronúcleos
- Ensayo en la Línea celular CHO
- Ensayo en Linfocitos de sangre periférica humana

3. Estudio *in vivo* para detectar efectos cromosomales en células hematopoyéticas y otras de roedores. **Segmento (IV).** Daño a los cromosomas.

- A.C en médula ósea
- A.C en espermatogonias
- Micronúcleos en eritrocitos de médula ósea

4. Otras alteraciones. **Segmento (V).** Daño a la célula.

- Morfología de la cabeza del espermatozoides en rata y ratón

Ensayos más utilizados para medir el daño existente o no de una sustancia a evaluar por nivel de daño:

- **Segmento 1:** Ensayo cometa *in vitro* en su variante alcalina.
- **Segmento 2:** Ensayo de Ames y de SOS Chromotest.
- **Segmento 3:** Ensayo de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica humana.
- **Segmento 4:** Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón.
- **Segmento 5:** Ensayo de la Morfología de la cabeza del espermatozoides en ratón.

En los estudios *in vitro* es necesario realizar la evaluación con Fracción Microsomal Hepática (S9).

Todas las sustancias genotóxicas no son activas por si mismas. Algunas deben ser convertidas en intermediarios reactivos capaces de interactuar con los sitios nucleofílicos de los constituyentes celulares y otras macromoléculas, valiéndose para ello de reacciones de activación, catalizadas por sistemas enzimáticos celulares.

Genotóxicos indirectos: Los compuestos genotóxicos indirectos por el metabolismo de organismos susceptibles, pueden no ser activados en aquellos sistemas biológicos que carezcan de las enzimas necesarias para convertirlos en sus formas genotóxicas. Las enzimas que intervienen en el metabolismo de estas sustancias los activan e inactivan por mecanismos de toxicación o detoxificación respectivamente.

Genotóxicos directos: Sustancias genotóxicas que poseen propiedades intrínsecas necesarias para interactuar con blancos celulares críticos e iniciar procesos genotóxicos.

Los ensayos genotóxicos *in vitro* carecen de un sistema de activación metabólica como lo constituye el hígado en los organismos superiores. Con el objetivo de mimetizar la función metabolizadora de este órgano, en los ensayos *in vitro* se utiliza una fracción microsomal hepática (S9), la cual contiene enzimas de fase I fundamentalmente, que permite predecir el posible comportamiento del compuesto a evaluar a su paso por la vía hepática.

La fracción microsomal S9 se obtiene del hígado de rata especialmente las líneas de ratas Sprague-Dawley y Wistar, ya que estas son de fácil manipulación, obtención y este órgano presenta un buen tamaño.

En la preparación de la mezcla de activación metabólica se utilizan como cofactores el NADP y la glucosa-6-fosfato, sustrato de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, además se adicionan otros cofactores como: riboflavina, NAD y el ATP, ya que estos aumentan la actividad mutagénica de algunos compuestos.

Objetivo de cada ensayo

1. Ensayo cometa *in vitro* en su variante alcalina:

En general el principio básico del ensayo, es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis. Luego, al ser observada la célula al microscopio (por fluorescencia o por tinción con plata del material nuclear), presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) por lo que este ensayo es también conocido como ensayo Cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas.

2. Ensayo de Ames:

Método en el cual se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium* manipuladas genéticamente, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por corrimiento del marco de lectura (frameshift) o por sustitución de pares de bases en el ADN.

Diferentes cepas de *S. typhimurium* auxotróficas a histidina son expuestas a una muestra con y sin activación metabólica y plaqueadas en agar medio mínimo con histidina/biotina. Dada la composición del medio de cultivo, se forman colonias con las células prototróficas a histidina (his), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por la muestra problema. Se utilizan ambas variantes con y sin S9, para ello debe conocer a la hora de utilizar una sustancia control positivo cual debe utilizar con esta mezcla y cual no, según el tipo de mutágeno.

3. Ensayo de SOS Chromotest:

Sistema de emergencia celular que consiste en la inducción de más de 20 genes no ligados (regulón) que están bajo el control del circuito RecA/LecA permitiendo la sobrevivencia celular ante la detención de la replicación del ADN que ha sido dañado por agentes genotóxicos. Permite evaluar radioprotección, genotoxicidad, antigenotoxicidad y estrés oxidativo.

El circuito RecA/LecA regula y modula importantes funciones celulares tales como:

- Reparación del ADN, recombinación homóloga y síntesis post-lesión.
- Formación del septo celular y división celular (sfiA).
- Inducción del fago lambda (recA).

¿Qué factor desencadena la respuesta SOS?

ADNsc generado por cualquier agente que dañe el cromosoma bacteriano.

4. Ensayo de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica humana:

Este ensayo tiene por objetivo detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo.

Estos cambios corresponden a roturas y reordenaciones dentro de un cromosoma o entre cromosomas diferentes. Estas reorganizaciones son producidas sobre todo por aquellas sustancias que rompen directamente la cadena de ADN (radiaciones ionizantes) o que distorsionan la doble hélice de ADN (agentes intercalantes).

Las aberraciones cromosómicas pueden ser de dos tipos atendiendo al momento del ciclo celular en el que tenga lugar la exposición: aberraciones de tipo cromatídico (afectan a una sola cromátida del cromosoma) y aberraciones de tipo cromosómico (afectan a ambas cromátidas del cromosoma). Igualmente en este estudio debe tener en cuenta el tipo de control positivo para cada tipo de tratamiento a utilizar (agudo o crónico).

5. Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón:

Es una prueba *in vivo* ampliamente validada que permite detectar agentes que causan tanto rupturas cromosómicas y cromatídicas como pérdidas de cromosomas completos, al afectar el huso mitótico.

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas acéntricos o completos que espontáneamente o por causa de determinados agentes que ocasionan lesiones citogenéticas, dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados durante la anafase.

Se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea de ratones. Debe de tenerse en cuenta y conocerse el índice espontáneo en la especie animal a utilizar

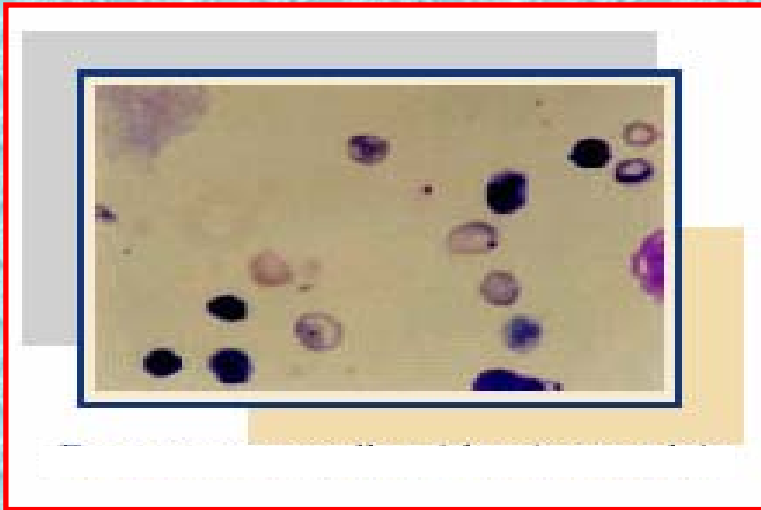
6. Ensayo de la Morfología de la cabeza del espermatozoides de ratón:

Esta herramienta permite evaluar cambios en la concentración espermática, así como el aumento de la frecuencia espontánea de cabezas de espermatozoides morfológicamente anormales ya que es capaz de detectar el daño irreversible que queda fijado por un período de tiempo relativamente largo.

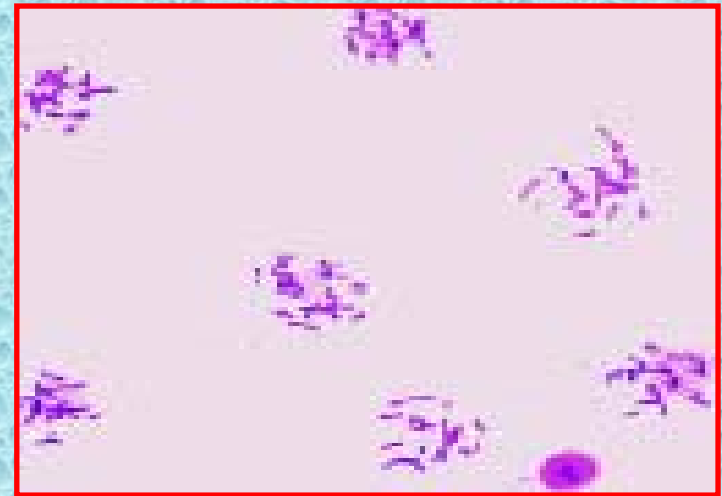
Entre los sistemas que se emplean para evaluar los daños ocurridos en las células germinales se encuentra el ensayo basado en los criterios morfológicos de Wyrobek y Bruce, lo cual permite el estudio y la clasificación de la cabeza del espermatozoides al incluir dentro de las clasificaciones, cabezas normales, anormales y dentro de este último los que tienen morfología en forma de banana, los amorfos, sin gancho y con dos colas. Conocer la duración del ciclo espermático de cada especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hecht S.S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environmental and molecular Mutagenesis* 2002; 39: 119-126.
- Fujita K, Kamataki T. Predicting the mutagenicity of tobacco-related N-nitrosamines in humans using 11 strains of *Salmonella typhimurium* YG7108, each coexpressing a form of human cytochrome P450 along with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2001; 38: 339-346.
- Edenharder R, Sager J.W, Glatt H, Muckel E, Platt K.L. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2- acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4, 5 b)pyridine (PHIP) in metabolically competent V79 cells. *Mut. Res* 2002; 421: 57-72.
- Motelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mut. Res* 2000; 455: 29-60.
- Arencibia D.F, Rosario L.A. Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 19(2):19-39.
- Rosario L.A, Rodeiro I, Almeida E, Arencibia D.F, Leyva O, Alonso A, Rodríguez Y. Evaluación del efecto radioprotector del extracto acuoso de *Mangifera indica* L (Vimang), en el ensayo de SOS-Chromotest. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 19(4):53-66.
- Arencibia D.F, Rosario L.A, Infante J.F, Curveco D. Ensayo SOS, una revisión actualizada. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 21(1):1-21.
- Soper K.A, Galloway S.M. Replicate Flasks are not Necessary for «In Vitro» Chromosome Aberration Assays. *Mutation Res* 2000; 320(2):139-149.
- Arencibia D.F, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la (*Roystonea regia*), mediante el ensayo de micronúcleos. *Rev. Cubana de Farmacia* 2009; 43:2.
- Arencibia D.F, Gámez R, Gutiérrez A, Pardo B, Noa M, Mas R, Curveco D, García H, Goicochea E. Evaluación Genotóxica del D-004 en el Ensayo de la Morfología de la Cabeza del Espermatozoide en ratones OF-1. *Rev. CENIC* 2009; 40(1):29-32.
- Arencibia D.F, Rosario L.A, Curveco D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 20(1):2-14.
- Arencibia D.F, Rosario L.A, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 23(3):23-40.
- Arencibia D.F, Rosario L.A, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *retel (revista de toxicología en línea)* 2009; 25(3):22-38.



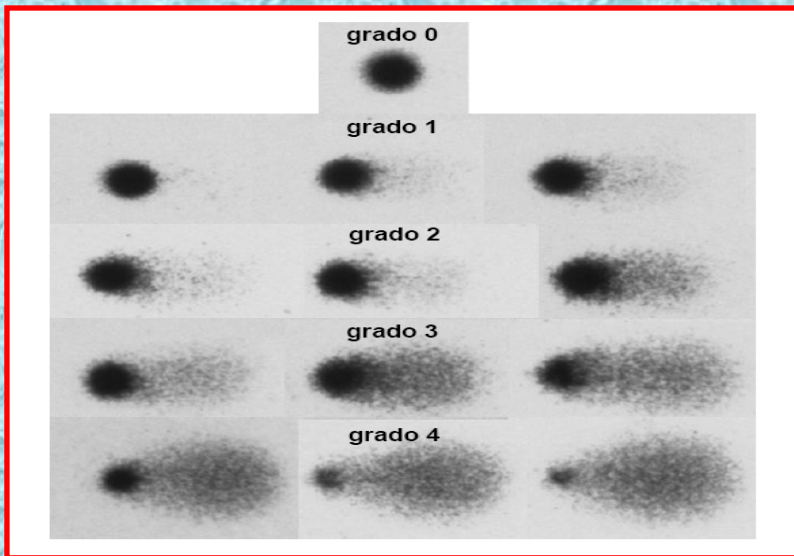
Micronúcleos de médula ósea de ratón



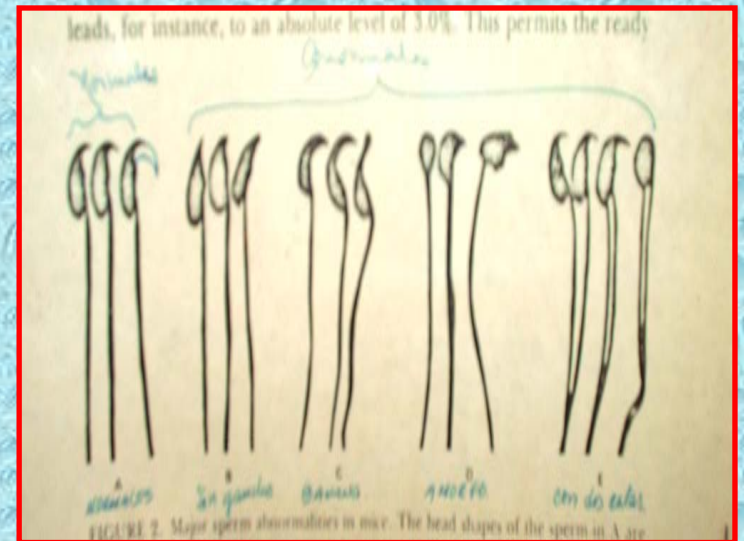
Metafases en el estudio de aberraciones Cromosómicas (10X)



Metafases en el estudio de aberraciones Cromosómicas (100X)



Esquema de niveles de daños en el
Ensayo cometa



Esquema de la morfología de la
cabeza del espermatozoide



Observación de las colonias revertantes de *Salmonella typhimurium* en el ensayo de Ames



Gracias