

**MINISTERIO DE  
CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA**

CENTRO DE CIENCIAS  
MEDIOAMBIENTALES (CCMA)  
CSIC

Laboratorio de Genotoxicología y  
Mutagénesis Ambiental



# EVALUACIÓN DE MUTAGENICIDAD Y GENOTOXICIDAD

**Óscar Herrero Felipe  
Eduardo de la Peña de Torres**



TOXICOLOGÍA  
AMBIENTAL:  
SEGURIDAD  
QUÍMICA  
22-25 Marzo 04

[www.csic.es](http://www.csic.es)

## EVALUACIÓN DE LA MUTAGENICIDAD/GENOTOXICIDAD

**Óscar Herrero Felipe y Eduardo de la Peña de Torres**

Centro de Ciencias Medioambientales – CSIC. C/ Serrano 115 dpdo. 28006 Madrid

La evaluación mutagénica, como parte de la evaluación de la genotoxicidad, es uno de los requisitos fundamentales en la caracterización toxicológica de un producto químico. El estudio de cambios hereditarios (mutaciones) en el genotipo de las células se lleva a cabo actualmente mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, de complejidad variable en función del mecanismo biológico que se desee analizar.

Los ensayos de mutagénesis aparecen, de forma obligatoria, en los dos niveles más bajos de pruebas toxicológicas de los tres que el Real Decreto 363/1995 define para los productos químicos. Así, ya en el nivel básico, es preciso llevar a cabo ensayos que detecten mutaciones génicas en células procariontes (*Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*) y aberraciones cromosómicas en células de mamífero cultivadas *in vitro*. En el nivel 1 se requieren estudios adicionales de mutagénesis que aporten información sobre mutaciones puntuales en organismos más complejos que las bacterias y amplíen la ya existente sobre la capacidad de una sustancia para inducir aberraciones cromosómicas.

Los criterios de clasificación de las sustancias según su mutagenicidad aparecen especificados en el anexo VI del Real Decreto 363/1995 (ver Tabla 1), donde se establecen tres categorías. Hasta el momento no se conocen sustancias que, según los criterios de esta clasificación, sean mutagénicas para el hombre, las cuales estarían englobadas en la primera categoría. Sí hay sustancias que “pueden considerarse como mutagénicas para el hombre”, incluidas en la segunda categoría y para cuya clasificación es necesario llevar a cabo pruebas de mutagenicidad en células germinales; del mismo modo que se conocen sustancias “cuyos posibles efectos mutagénicos en el hombre son preocupantes”, pertenecientes a la tercera categoría y que requieren ensayos de mutagenicidad en células somáticas para ser clasificadas.

Los ensayos más complejos implican, por regla general, el uso de animales de laboratorio. El ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) es el organismo europeo encargado de validar dichos ensayos de forma que, en la medida de lo posible, se ajusten a la estrategia de las tres erres (3ERRES):

- reducir el número de animales empleados en los experimentos,
- refinar las técnicas a fin de disminuir el estrés y el sufrimiento de los mismos y/o
- reemplazar dichos animales por otros organismos.

## 1. DEFINICIONES

- TOXICOLOGÍA
- GENOTOXICOLOGÍA
  - MUTAGÉNESIS
  - CARCINOGENÉNESIS
  - TERATOGENÉNESIS

## 2. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- NIVEL BÁSICO
- NIVEL 1
- NIVEL 2

## 3. CLASIFICACIÓN SEGÚN MUTAGENICIDAD

## 4. ECVAM, REMA, GTEMA

## 5. ENSAYOS DE EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- ENSAYO BACTERIOLÓGICO DE MUTACIÓN REVERSA
- ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS



## 1. DEFINICIONES

- TOXICOLOGÍA
- GENOTOXICOLOGÍA
  - MUTAGÉNESIS
  - CARCINOGENÉNESIS
  - TERATOGENÉNESIS

## 2. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- NIVEL BÁSICO
- NIVEL 1
- NIVEL 2

## 3. CLASIFICACIÓN SEGÚN MUTAGENICIDAD

## 4. ECVAM, REMA, GTEMA

## 5. ENSAYOS DE EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- Ensayo bacteriológico de mutación reversa (Test de Ames)
- Ensayo de aberraciones cromosómicas (Test de *Allium cepa*)

## TOXICOLOGÍA:

Ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas en los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de dichas alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los **procedimientos para detectar, identificar y cuantificar tales agentes y evaluar su grado de toxicidad.** (*Repetto, 1981 y 1997*)



## 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 teratogénicos. (*Vamparys et al., 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).

## **CARCINOGENÉNESIS:**

Inducción por agentes químicos, físicos o biológicos, de una transformación maligna e incontrolada de células, dando como resultado la formación de un tumor.

## **TERATOGENÉNESIS:**

Inducción de malformaciones estructurales en embriones o fetos.

*(Vettorazzi, 2001)*

# DEFINICIONES (4/4)



## MUTAGÉNESIS, TERATOGENÉNESIS Y CARCINOGENÉNESIS (Modificado de *Wilson, 1972*)

	MUTAGÉNESIS	CARCINOGENÉNESIS	TERATOGENÉNESIS
<b>Tiempo entre inducción y diagnóstico</b>	Desde la siguiente generación hasta varias después o, quizás, nunca.	Desde varios meses hasta muchos años.	Desde varias semanas hasta meses. Rara vez varios años.
<b>Reversibilidad</b>	Irreversible.	Irreversible excepto en ciertos casos por cirugía o terapia.	Irreversible excepto en ciertos casos por cirugía o terapia (desórdenes metabólicos).
<b>Sensibilidad</b>	Sin diferencia aparente entre tejidos maduros e inmaduros.	Algunos tipos de cáncer afectan especialmente a jóvenes. Otros, a la inversa.	Por definición, sólo son sensibles los tejidos inmaduros. La sensibilidad disminuye con el desarrollo.
<b>Caracterización</b>	Cambios en la cantidad o calidad del material genético (nivel molecular).	Proliferación descontrolada a nivel celular.	Cambios en el patrón de desarrollo a nivel de tejidos y órganos.
<b>Diana</b>	El material genético se ve afectado normalmente de forma aleatoria.	Normalmente hay dianas específicas.	A menudo con un alto grado de especificidad entre la naturaleza del teratógeno y el tipo de malformación.





# DEFINICIONES (4/4)



## MUTAGÉNESIS, TERATOGENÉNESIS Y CARCINOGENÉNESIS (Modificado de *Wilson, 1972*)

	MUTAGÉNESIS	CARCINOGENÉNESIS	TERATOGENÉNESIS
<b>Tiempo entre inducción y diagnóstico</b>	Desde la siguiente generación hasta varias después o, quizás, nunca.	Desde varios meses hasta muchos años.	Desde varias semanas hasta meses. Rara vez varios años.
<b>Reversibilidad</b>	Irreversible.	Irreversible excepto en ciertos casos por cirugía o terapia.	Irreversible excepto en ciertos casos por cirugía o terapia (desórdenes metabólicos).
<b>Sensibilidad</b>	Sin diferencia aparente entre tejidos maduros e inmaduros.	Algunos tipos de cáncer afectan especialmente a jóvenes. Otros, a la inversa.	Por definición, sólo son sensibles los tejidos inmaduros. La sensibilidad disminuye con el desarrollo.
<b>Caracterización</b>	Cambios en la cantidad o calidad del material genético (nivel molecular).	Proliferación descontrolada a nivel celular.	Cambios en el patrón de desarrollo a nivel de tejidos y órganos.
<b>Diana</b>	El material genético se ve afectado normalmente de forma aleatoria.	Normalmente hay dianas específicas.	A menudo con un alto grado de especificidad entre la naturaleza del teratógeno y el tipo de malformación.

**TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN**



## 1. DEFINICIONES

- TOXICOLOGÍA
- GENOTOXICOLOGÍA | MUTAGÉNESIS  
| CARCINOGENÉNESIS  
| TERATOGENÉNESIS

## 2. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- NIVEL BÁSICO
- NIVEL 1
- NIVEL 2

## 3. CLASIFICACIÓN SEGÚN MUTAGENICIDAD

## 4. ECVAM, REMA, GTEMA

## 5. ENSAYOS DE EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- Ensayo bacteriológico de mutación reversa (Test de Ames)
- Ensayo de aberraciones cromosómicas (Test de *Allium cepa*)

# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (1/9)



- La estrategia de evaluación se realiza atendiendo a la cantidad de sustancia comercializada por año o en total.
- Se siguen las indicaciones descritas en la **Directiva 92/32/CEE**.
- Se establecen tres niveles de evaluación, de complejidad adicional y creciente:

**- Nivel Básico -**

**- Nivel 1 -**

**- Nivel 2 -**

*(Barrueco et al., 1999)*

# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (2/9)



## NIVEL BÁSICO

Informe de base. Requerido para todo producto químico.

Toxicidad aguda (administración oral).  
Toxicidad aguda (administración cutánea).  
Toxicidad aguda (administración por inhalación).  
Irritación de la piel.  
Irritación de los ojos.  
Sensibilización de la piel.

Toxicidad de dosis repetidas (28 días) utilizando la vía de administración más adecuada.

**Mutagénesis:**

- Ensayo bacteriológico (mutación inversa).
- Ensayo no bacteriológico, in vitro, de aberraciones cromosómicas.

Ambos ensayos se realizarán con y sin activación metabólica.

Detección de la toxicidad para la reproducción.

Valoración del comportamiento toxicocinético, cuando pueda deducirse del conjunto de los datos.



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (3/9)



## NIVEL 1

La comercialización anual es de 10-100 toneladas por fabricante o la comercialización total es de 50-500 toneladas por fabricante.

**Estudio de fertilidad (1 especie, 1 generación, ambos sexos, vía de administración más adecuada) que permita obtener información sobre el potencial teratogénico.**

**Estudio de teratogénesis (1 especie, vía de administración más adecuada), cuando no se ha examinado el potencial teratogénico en el estudio de fertilidad.**

**Estudio de toxicidad subcrónica y/o crónica (una especie, ambos sexos, vía de administración más adecuada), cuando los resultados del estudio de dosis repetidas o cualquier otra información pertinente lo aconsejen.**

**Ensayos adicionales de mutagénesis y/o estudios de detección de carcinogénesis.**

**Datos toxicocinéticos básicos.**



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (4/9)



## NIVEL 2

La comercialización anual alcanza las 1.000 toneladas por fabricante o la total alcanza las 5.000 toneladas por fabricante.

Estudio de toxicidad crónica.

Estudio de carcinogénesis.

Estudio de fertilidad (tres generaciones), sólo cuando se haya observado un efecto sobre la fertilidad en el Nivel 1.

Estudio de toxicidad relativo a los efectos sobre el desarrollo perinatal y posnatal.

Estudio del potencial teratogénico (especies no empleadas en el Nivel 1).

Estudios toxicocinéticos adicionales (biotransformación y farmacocinética).

Estudios suplementarios para investigar la toxicidad para los órganos o sistemas.



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (5/9)



- Obligatoriedad de llevar a cabo estudios de mutagenicidad en el Nivel Básico y el Nivel 1.
  
- Datos de potencial mutagénico imprescindibles en el Nivel Básico: mutación génica y aberraciones cromosómicas.
  
- Datos adicionales de potencial mutagénico en el Nivel 1 para:
  1. Confirmar resultados del Nivel Básico
  2. Investigar nuevos objetivos
  3. Iniciar o ampliar estudios in vivo

# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (6/9)



## Nivel Básico

Toxicidad aguda (administración oral).  
Toxicidad aguda (administración cutánea).  
Toxicidad aguda (administración por inhalación).  
Irritación de la piel.  
Irritación de los ojos.  
Sensibilización de la piel.

Toxicidad de dosis repetidas (28 días) utilizando la vía de administración más adecuada.

Mutagénesis:

- Ensayo bacteriológico (mutación inversa).
- Ensayo no bacteriológico, in vitro, de aberraciones cromosómicas.

Ambos ensayos se realizarán con y sin activación metabólica.

Detección de la toxicidad para la reproducción.

Valoración del comportamiento toxicocinético, cuando pueda deducirse del conjunto de los datos.

## Nivel 1

Estudio de fertilidad (1 especie, 1 generación, ambos sexos, vía de administración más adecuada) que permita obtener información sobre el potencial teratogénico.

Estudio de teratogénesis (1 especie, vía de administración más adecuada), cuando no se ha examinado el potencial teratogénico en el estudio de fertilidad.

Estudio de toxicidad subcrónica y/o crónica (una especie, ambos sexos, vía de administración más adecuada), cuando los resultados del estudio de dosis repetidas o cualquier otra información pertinente lo aconsejen.

Ensayos adicionales de mutagénesis y/o estudios de detección de carcinogénesis.

Datos toxicocinéticos básicos.

## Nivel 2

Estudio de toxicidad crónica.

Estudio de carcinogénesis.

Estudio de fertilidad (tres generaciones), sólo cuando se haya observado un efecto sobre la fertilidad en el Nivel 1.

Estudio de toxicidad relativo a los efectos sobre el desarrollo perinatal y posnatal.

Estudio del potencial teratogénico (especies no empleadas en el Nivel 1).

Estudios toxicocinéticos adicionales (biotransformación y farmacocinética).

Estudios suplementarios para investigar la toxicidad para los órganos o sistemas.





# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (6/9)



## Nivel Básico

Toxicidad aguda (administración oral).  
Toxicidad aguda (administración cutánea).  
Toxicidad aguda (administración por inhalación).  
Irritación de la piel.  
Irritación de los ojos.  
Sensibilización de la piel.

Toxicidad por dosis repetidas (28 días) utilizando la vía de administración más adecuada.

Mutagénesis:

- Ensayo bacteriológico (mutación inversa).
- Ensayo no bacteriológico, in vitro, de aberraciones cromosómicas.

Ambos ensayos se realizarán con y sin activación metabólica.

Detección de la toxicidad para la reproducción.

Valoración del comportamiento toxicocinético, cuando pueda deducirse del conjunto de los datos.

## Nivel 1

Estudio de fertilidad (1 especie, 1 generación, ambos sexos, vía de administración más adecuada) que permita obtener información sobre el potencial teratogénico.

Estudio de teratogénesis (1 especie, vía de administración más adecuada), cuando no se ha examinado el potencial teratogénico en el estudio de fertilidad.

Estudio de toxicidad subcrónica y/o crónica (una especie, ambos sexos, vía de administración más adecuada), cuando los resultados del estudio de dosis repetidas o cualquier otra información pertinente lo aconsejen.

Ensayos adicionales de mutagénesis y/o estudios de detección de carcinogénesis.

Datos toxicocinéticos básicos.

## Nivel 2

Estudio de toxicidad crónica.

Estudio de carcinogénesis.

Estudio de fertilidad (tres generaciones), sólo cuando se haya observado un efecto sobre la fertilidad en el Nivel 1.

Estudio de toxicidad relativo a los efectos sobre el desarrollo perinatal y posnatal.

Estudio del potencial teratogénico (especies no empleadas en el Nivel 1).

Estudios toxicocinéticos adicionales (biotransformación y farmacocinética).

Estudios suplementarios para investigar la toxicidad para los órganos o sistemas.



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (6/9)



## Nivel Básico

Toxicidad aguda (administración oral).  
Toxicidad aguda (administración cutánea).  
Toxicidad aguda (administración por inhalación).  
Irritación de la piel.  
Irritación de los ojos.  
Sensibilización de la piel.

Toxicidad de dosis repetidas (28 días) utilizando la vía de administración más adecuada.

Mutagénesis:

- Ensayo bacteriológico (mutación inversa).
- Ensayo no bacteriológico, in vitro, de aberraciones cromosómicas.

Ambos ensayos se realizarán con y sin activación metabólica.

Detección de la toxicidad para la reproducción.

Valoración del comportamiento toxicocinético, cuando pueda deducirse del conjunto de los datos.

## Nivel 1

Estudio de fertilidad (1 especie, 1 generación, ambos sexos, vía de administración más adecuada) que permita obtener información sobre el potencial teratogénico.

Estudio de teratogénesis (1 especie, vía de administración más adecuada), cuando no se ha examinado el potencial teratogénico en el estudio de fertilidad.

Estudio de toxicidad subcrónica y/o crónica (una especie, ambos sexos, vía de administración más adecuada), cuando los resultados del estudio de dosis repetidas o cualquier otra información pertinente lo aconsejen.

Ensayos adicionales de mutagénesis y/o estudios de detección de carcinogénesis.

Datos toxicocinéticos básicos.

## Nivel 2

Estudio de toxicidad crónica.

Estudio de carcinogénesis.

Estudio de fertilidad (tres generaciones), sólo cuando se haya observado un efecto sobre la fertilidad en el Nivel 1.

Estudio de toxicidad relativa de los efectos sobre el desarrollo perinatal y posnatal.

Estudio del potencial teratogénico (especies no empleadas en el Nivel 1).

Estudios toxicocinéticos adicionales (biotransformación y farmacocinética).

Estudios suplementarios para investigar la toxicidad para los órganos o sistemas.



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (6/9)



## Nivel Básico

Toxicidad aguda (administración oral).  
Toxicidad aguda (administración cutánea).  
Toxicidad aguda (administración por inhalación).  
Irritación de la piel.  
Irritación de los ojos.  
Sensibilización de la piel.

Toxicidad de dosis repetidas (28 días) utilizando la vía de administración más adecuada.

Mutagénesis:

- Ensayo bacteriológico (mutación inversa).
- Ensayo no bacteriológico, in vitro, de aberraciones cromosómicas.

Ambos ensayos se realizarán con y sin activación metabólica.

Detección de la toxicidad para la reproducción.

Valoración del comportamiento toxicocinético, cuando pueda deducirse del conjunto de los datos.

## Nivel 1

Estudio de fertilidad (1 especie, 1 generación, ambos sexos, vía de administración más adecuada) que permita obtener información sobre el potencial teratogénico.

Estudio de teratogénesis (1 especie, vía de administración más adecuada), cuando no se ha examinado el potencial teratogénico en el estudio de fertilidad.

Estudio de toxicidad subcrónica y/o crónica (una especie, ambos sexos, vía de administración más adecuada), cuando los resultados del estudio de dosis repetidas o cualquier otra información pertinente lo aconsejen.

Ensayos adicionales de mutagénesis y/o estudios de detección de carcinogénesis.

Datos toxicocinéticos básicos.

## Nivel 2

Estudio de toxicidad crónica.

Estudio de carcinogénesis.

Estudio de fertilidad (tres generaciones), sólo cuando se haya observado un efecto sobre la fertilidad en el Nivel 1.

Estudio de toxicidad relativa a los efectos sobre el desarrollo perinatal y posnatal.

Estudio del potencial teratogénico (especies no empleadas en el Nivel 1).

Estudios toxicocinéticos adicionales (biotransformación y farmacocinética).

Estudios suplementarios para investigar la toxicidad para los órganos o sistemas.



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (7/9)



## Ensayos de Mutagenicidad aceptados por la UE y homologados por la OCDE

Denominación del Ensayo	Código UE	Nº OCDE
Ensayo citogenético <i>in vitro</i> en mamíferos	B10	473
Ensayo citogenético <i>in vivo</i> en médula ósea de mamífero, análisis cromosómico	B11	475
Ensayo de micronúcleos <i>in vivo</i>	B12	474
Mutación reversa en <i>Escherichia coli</i>	B13	472*
Mutación reversa en <i>Salmonella typhimurium</i>	B14	471*
Mutación génica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B15	480
Recombinación mitótica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B16	481
Mutación génica de células de mamífero <i>in vitro</i>	B17	476
Síntesis no programada de DNA en células de mamífero <i>in vitro</i>	B18	482
Ensayo <i>in vitro</i> de intercambio de cromátidas hermanas	B19	479
Ensayo de letales recesivos ligados al sexo en <i>Drosophila melanogaster</i>	B20	477
Ensayo de transformación de células de mamífero <i>in vitro</i>	B21	
Ensayo de letales dominantes en roedores	B22	478
Ensayo citogenético de células embrionarias de mamífero <i>in vivo</i>	B23	483
Ensayo de la mancha en el ratón	B24	484
Ensayo de traslocación hereditaria en ratón	B25	485
Síntesis no programada de DNA en células hepáticas de mamífero <i>in vivo</i>		486*

\* Las líneas directrices 471 y 472 constituyen, desde su aprobación el 21 de julio de 1997, una única línea directriz, la 471, correspondiente al ensayo bacteriano de mutación reversa. La línea directriz 486 fue aprobada como tal en la misma fecha.



## Pruebas adicionales de mutagénesis del Nivel 1

- Si **uno** de los ensayos del Nivel Básico resultó **positivo**, los estudios complementarios deben incluir al menos un ensayo capaz de descubrir la misma alteración génica.
- Si los **dos** ensayos requeridos en el Nivel Básico resultaron **negativos**, deben realizarse normalmente, como estudios complementarios, un ensayo de mutaciones génicas y otro de aberraciones cromosómicas.

En el segundo caso, quizás sea apropiado obtener también datos complementarios de ensayos indicadores de efectos en el DNA.



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (9/9)



## Pruebas adicionales de mutagénesis del Nivel 1, agrupadas según su finalidad genética (Barrueco et al., 1999)

INVESTIGACIÓN DE MUTACIONES GÉNICAS	Mutación directa o inversa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
	Mutación directa en células de mamífero cultivadas <i>in vitro</i> .
	Letales recesivos ligados al sexo en <i>Drosophila melanogaster</i> .
	Test de la mancha en ratón.
INVESTIGACIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS	Estudios citogenéticos <i>in vivo</i> en mamíferos. Si no se incluyó en la evaluación inicial, debe considerarse el análisis <i>in vivo</i> de las metafases de células de médula ósea. Además, puede estudiarse la citogenética de las células embrionarias <i>in vivo</i> .
	Estudios citogenéticos <i>in vitro</i> de células de mamífero, si no se incluyeron en la evaluación inicial.
	Letal dominante en roedores. Traslocación hereditaria en ratón.
PRUEBAS INDICADORAS DE EFECTOS EN EL DNA	Recombinación mitótica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
	Síntesis de DNA no programada en células de mamífero <i>in vitro</i> .
	Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero <i>in vitro</i> .
PRUEBAS INDICADORAS DE POTENCIAL CARCINÓGENO	Transformación de células de mamífero.
RIESGO DE EFECTOS HEREDITARIOS EN MAMÍFEROS	Test del locus específico en ratón (mutaciones génicas).
	Translocación hereditaria en ratón (aberraciones cromosómicas).



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (9/9)



## Pruebas adicionales de mutagénesis del Nivel 1, agrupadas según su finalidad genética (Barrueco et al., 1999)

INVESTIGACIÓN DE MUTACIONES GÉNICAS	Mutación directa o inversa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
	Mutación directa en células de mamífero cultivadas <i>in vitro</i> .
	Letales recesivos ligados al sexo en <i>Drosophila melanogaster</i> .
	Test de la mancha en ratón.
INVESTIGACIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS	Estudios citogenéticos <i>in vivo</i> en mamíferos. Si no se incluyó en la evaluación inicial, debe considerarse el análisis <i>in vivo</i> de las metafases de células de médula ósea. Además, puede estudiarse la citogenética de las células embrionarias <i>in vivo</i> .
	Estudios citogenéticos <i>in vitro</i> de células de mamífero, si no se incluyeron en la evaluación inicial.
	Letal dominante en roedores.
	Traslocación hereditaria en ratón.
PRUEBAS INDICADORAS DE EFECTOS EN EL DNA	Recombinación mitótica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
	Síntesis de DNA no programada en células de mamífero <i>in vitro</i> .
	Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero <i>in vitro</i> .
PRUEBAS INDICADORAS DE POTENCIAL CARCINÓGENO	Transformación de células de mamífero.
RIESGO DE EFECTOS HEREDITARIOS EN MAMÍFEROS	Test del locus específico en ratón (mutaciones génicas).
	Translocación hereditaria en ratón (aberraciones cromosómicas).



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA (9/9)



## Pruebas adicionales de mutagénesis del Nivel 1, agrupadas según su finalidad genética (Barrueco et al., 1999)

INVESTIGACIÓN DE MUTACIONES GÉNICAS	Mutación directa o inversa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
	Mutación directa en células de mamífero cultivadas <i>in vitro</i> .
	Letales recesivos ligados al sexo en <i>Drosophila melanogaster</i> .
	Test de la mancha en ratón.
INVESTIGACIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS	Estudios citogenéticos <i>in vivo</i> en mamíferos. Si no se incluyó en la evaluación inicial, debe considerarse el análisis <i>in vivo</i> de las metafases de células de médula ósea. Además, puede estudiarse la citogenética de las células embrionarias <i>in vivo</i> .
	Estudios citogenéticos <i>in vitro</i> de células de mamífero, si no se incluyeron en la evaluación inicial.
	Letal dominante en roedores.
	<del>Translocación hereditaria en ratón.</del>
PRUEBAS INDICADORAS DE EFECTOS EN EL DNA	Recombinación mitótica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
	Síntesis de DNA no programada en células de mamífero <i>in vitro</i> .
	Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero <i>in vitro</i> .
PRUEBAS INDICADORAS DE POTENCIAL CARCINOGENO	<del>Transformación de células de mamífero.</del>
RIESGO DE EFECTOS HEREDITARIOS EN MAMÍFEROS	Test del locus específico en ratón (mutaciones génicas).
	Translocación hereditaria en ratón (aberraciones cromosómicas).





## 1. DEFINICIONES

- TOXICOLOGÍA
- GENOTOXICOLOGÍA | MUTAGÉNESIS  
| CARCINOGENÉNESIS  
| TERATOGENÉNESIS

## 2. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- NIVEL BÁSICO
- NIVEL 1
- NIVEL 2

## 3. CLASIFICACIÓN SEGÚN MUTAGENICIDAD

## 4. ECVAM, REMA, GTEMA

## 5. ENSAYOS DE EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- Ensayo bacteriológico de mutación reversa (Test de Ames)
- Ensayo de aberraciones cromosómicas (Test de *Allium cepa*)

# CLASIFICACIÓN (1/7)



Los criterios utilizados aparecen especificados en el Anexo VI del **Real Decreto 363/1995**.

Se establecen tres categorías:

- **Primera:** sustancias que, se sabe, son mutagénicas para el hombre.
- **Segunda:** sustancias que pueden considerarse como mutagénicas para el hombre.
- **Tercera:** sustancias cuyos posibles efectos mutagénicos en el hombre son preocupantes.

# CLASIFICACIÓN (2/7)



## CATEGORÍA PRIMERA (R.D. 363/1995, Anexo VI)

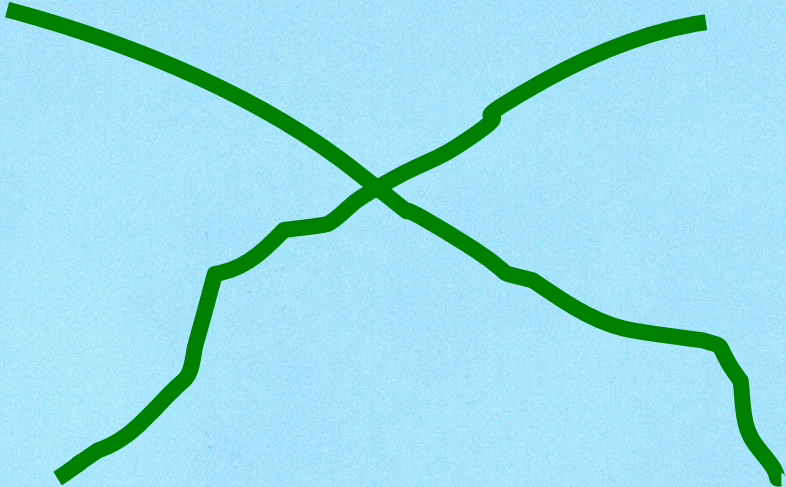
	DEFINICIÓN	CRITERIOS	ENSAYOS
PRIMERA	Sustancias que, se sabe, son mutagénicas para el hombre.	<p>Se precisa disponer de pruebas suficientes para establecer una relación causa/efecto entre la exposición del hombre a tales sustancias y la aparición de alteraciones genéticas hereditarias.</p> <p>Se necesitan pruebas positivas a partir de los estudios epidemiológicos de que se han producido mutaciones en el hombre.</p> <p>Hasta el momento no se conocen ejemplos de tales sustancias.</p> <p>Es evidente lo difícil que resulta obtener datos fiables a partir de los estudios sobre la incidencia de las mutaciones en las poblaciones humanas, o sobre un posible aumento de su frecuencia.</p>	

Se les asignará el símbolo **T**, sustancias tóxicas, y la frase de riesgo **R46**, puede causar alteraciones genéticas hereditarias.



# CLASIFICACIÓN (2/7)

## CATEGORÍA PRIMERA (R.D. 363/1995, Anexo VI)

PRIMERA	DEFINICIÓN	CRITERIOS	ENSAYOS
	<p>Sustancias que, se sabe, son mutagénicas para el hombre.</p>	<p>Se precisa disponer de pruebas suficientes para establecer una relación causa/efecto entre la exposición del hombre a tales sustancias y la aparición de alteraciones genéticas hereditarias.</p> <p>Se necesitan pruebas positivas a partir de los estudios epidemiológicos de que se han producido mutaciones en el hombre.</p> <p>Hasta el momento no se conocen ejemplos de tales sustancias.</p> <p>Es evidente lo difícil que resulta obtener datos fiables a partir de los estudios sobre la incidencia de las mutaciones en las poblaciones humanas, o sobre un posible aumento de su frecuencia.</p>	

Se les asignará el símbolo **T**, sustancias tóxicas, y la frase de riesgo **R46**,  puede causar alteraciones genéticas hereditarias.

# CLASIFICACIÓN (3/7)



## CATEGORÍA SEGUNDA (R.D. 363/1995, Anexo VI)

SEGUNDA	DEFINICIÓN	CRITERIOS	ENSAYOS
	Sustancias que pueden considerarse como mutagénicas para el hombre.	<p>Se precisa disponer de suficientes elementos de juicio para suponer que la exposición del hombre a tales sustancias puede producir alteraciones genéticas hereditarias. Dicha presunción se basa en estudios apropiados en animales o en otra información pertinente.</p> <p>Se requieren resultados positivos que indiquen:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) Efectos mutagénicos, u</li><li>b) otro tipo de interacción celular que afecte a la mutagenicidad, obtenidos en células germinales de mamíferos <i>in vivo</i>, o</li><li>c) efectos mutagénicos en células somáticas de mamíferos <i>in vivo</i>, junto con la demostración fehaciente de que la sustancia o un metabolito relevante alcanza las células germinales.</li></ul>	<p>Los métodos más adecuados son:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>2a) Estudios de mutagenicidad en células germinales <i>in vivo</i><ul style="list-style-type: none"><li>- test del locus específico</li><li>- test de traslocación hereditaria</li><li>- test del letal dominante</li></ul></li><li>2b) Estudios <i>in vivo</i> que demuestran la interacción con el DNA de las células germinales<ul style="list-style-type: none"><li>- análisis citogenético de aberraciones cromosómicas, incluida la aneuploidía</li><li>- ensayo de intercambio de cromátidas hermanas</li><li>- ensayo de síntesis de DNA no programada</li><li>- estudio de unión covalente del mutágeno al DNA</li></ul></li><li>2c) Estudios <i>in vivo</i> que demuestren los efectos mutagénicos en las células somáticas de los mamíferos (véase 3a) en combinación con métodos toxicocinéticos o de otro tipo que puedan demostrar que el compuesto o un metabolito alcanza las células germinales.</li></ul>

Se les asignará el símbolo **T**, sustancias tóxicas, y la frase de riesgo **R46**, puede causar alteraciones genéticas hereditarias.

# CLASIFICACIÓN (3/7)



## CATEGORÍA SEGUNDA (R.D. 363/1995, Anexo VI)

DEFINICIÓN	CRITERIOS	ENSAYOS
<p>Sustancias que pueden considerarse como mutagénicas para el hombre.</p>	<p>Se precisa disponer de suficientes elementos de juicio para suponer que la exposición del hombre a tales sustancias puede producir alteraciones genéticas hereditarias. Dicha presunción se basa en estudios apropiados en animales o en otra información pertinente.</p> <p>Se requieren resultados positivos que indiquen:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) Efectos mutagénicos, u</li><li>b) otro tipo de interacción celular que afecte a la mutagenicidad, obtenidos en células germinales de mamíferos <i>in vivo</i>, o</li><li>c) efectos mutagénicos en células somáticas de mamíferos <i>in vivo</i>, junto con la demostración fehaciente de que la sustancia o un metabolito relevante alcanza las células germinales.</li></ul>	<p>Los métodos más adecuados son:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>2a) Estudios de mutagenicidad en células germinales <i>in vivo</i><ul style="list-style-type: none"><li>- test del locus específico</li><li>- test de traslocación hereditaria</li><li>- test del letal dominante</li></ul></li><li>2b) Estudios <i>in vivo</i> que demuestran la interacción con el DNA de las células germinales<ul style="list-style-type: none"><li>- análisis citogenético de aberraciones cromosómicas, incluida la aneuploidía</li><li>- ensayo de intercambio de cromátidas hermanas</li><li>- ensayo de síntesis de DNA no programada</li><li>- estudio de unión covalente del mutágeno al DNA</li></ul></li><li>2c) Estudios <i>in vivo</i> que demuestren los efectos mutagénicos en las células somáticas de los mamíferos (véase 3a) en combinación con métodos toxicocinéticos o de otro tipo que puedan demostrar que el compuesto o un metabolito alcanza las células germinales.</li></ul>

Se les asignará el símbolo **T**, sustancias tóxicas, y la frase de riesgo **R46**,  puede causar alteraciones genéticas hereditarias.

# CLASIFICACIÓN (4/7)



## CATEGORÍA TERCERA (R.D. 363/1995, Anexo VI)

TERCERA	DEFINICIÓN	CRITERIOS	ENSAYOS
	<p>Sustancias cuyos posibles efectos mutagénicos en el hombre son preocupantes.</p>	<p>Los resultados obtenidos en estudios de mutagénesis apropiados son insuficientes para clasificar dichas sustancias en la segunda categoría.</p> <p>Se requieren resultados positivos en las células somáticas de mamíferos <i>in vivo</i> que indiquen la existencia de:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) Efectos mutagénicos, u</li><li>b) otro tipo de interacción celular con incidencia en la mutagenicidad.</li></ul> <p>Especialmente, el último supuesto se verá confirmado por los resultados positivos de estudios <i>in vitro</i> de mutagenicidad. Las sustancias que den resultados positivos sólo en ensayos <i>in vitro</i> no se clasificarán, pero si no se dispone de datos <i>in vivo</i> y muestran cierto parecido con carcinógenos o mutágenos conocidos, puede plantearse su clasificación en la tercera categoría.</p>	<p>Los métodos más adecuados son:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>3a) Estudios de mutagenicidad en células somáticas <i>in vivo</i><ul style="list-style-type: none"><li>- ensayo de micronúcleos en médula ósea o análisis de metafases</li><li>- análisis de los linfocitos periféricos en metafase</li><li>- ensayo de la mancha en ratón</li></ul></li><li>3b) Estudios de interacción del DNA en células somáticas <i>in vivo</i><ul style="list-style-type: none"><li>- ensayo de intercambio de cromátidas hermanas</li><li>- ensayo de síntesis de DNA no programada</li><li>- estudio de unión covalente del mutágeno al DNA</li><li>- estudio de lesiones del DNA (elución alcalina)</li></ul></li></ul>

Se les asignará el símbolo **Xn**, sustancias nocivas, y la frase de riesgo **R68**, posibilidad de efectos irreversibles.

# CLASIFICACIÓN (4/7)

## CATEGORÍA TERCERA (R.D. 363/1995, Anexo VI)

DEFINICIÓN	CRITERIOS	ENSAYOS
<p><b>TERCERA</b></p> <p>Sustancias cuyos posibles efectos mutagénicos en el hombre son preocupantes.</p>	<p>Los resultados obtenidos en estudios de mutagénesis apropiados son insuficientes para clasificar dichas sustancias en la segunda categoría.</p> <p>Se requieren resultados positivos en las células somáticas de mamíferos <i>in vivo</i> que indiquen la existencia de:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>Efectos mutagénicos, u</li><li>otro tipo de interacción celular con incidencia en la mutagenicidad.</li></ol> <p>Especialmente, el último supuesto se verá confirmado por los resultados positivos de estudios <i>in vitro</i> de mutagenicidad. Las sustancias que den resultados positivos sólo en ensayos <i>in vitro</i> no se clasificarán, pero si no se dispone de datos <i>in vivo</i> y muestran cierto parecido con carcinógenos o mutágenos conocidos, puede plantearse su clasificación en la tercera categoría.</p>	<p>Los métodos más adecuados son:</p> <p>3a) Estudios de mutagenicidad en células somáticas <i>in vivo</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- ensayo de micronúcleos en médula ósea o análisis de metafases</li><li>- análisis de los linfocitos periféricos en metafase</li><li>- ensayo de la mancha en ratón</li></ul> <p>3b) Estudios de interacción del DNA en células somáticas <i>in vivo</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- ensayo de intercambio de cromátidas hermanas</li><li>- ensayo de síntesis de DNA no programada</li><li>- estudio de unión covalente del mutágeno al DNA</li><li>- estudio de lesiones del DNA (elución alcalina)</li></ul>

Se les asignará el símbolo **Xn**, sustancias nocivas, y la frase de riesgo **R68**, posibilidad de efectos irreversibles.



# CLASIFICACIÓN (5/7)



## En resumen:

Las sustancias se clasifican como mutágenas con respecto a las malformaciones génicas heredadas. No obstante, los resultados que implican la clasificación de un producto en la tercera categoría constituyen una advertencia de la posible existencia de carcinogénesis.

De hecho, los datos de genotoxicidad son tenidos en cuenta a la hora de clasificar un producto químico como carcinógeno, considerándose como pruebas complementarias.

En caso de duda, los resultados de los ensayos de genotoxicidad *in vivo* e *in vitro* contribuirán a la inclusión de la sustancia en la segunda categoría de carcinógenos (*2A-carcinógenos probables; 2B-carcinógenos posibles*), si son positivos, o en la tercera (*sustancias posiblemente no carcinógenas*), si son negativos.



# CLASIFICACIÓN (6/7)

## CLASIFICACIÓN SEGÚN LAS PROPIEDADES TOXICOLÓGICAS

CATEGORÍA DE PELIGRO	FRASES R ASOCIADAS	INDICACIÓN DE PELIGRO	SÍMBOLO	DEFINICIÓN GENERAL
<b>Muy Tóxico</b>	R26, R27, R28 y combinaciones. R39 y combinaciones con las anteriores.	<b>Muy Tóxico</b>		<b>Muy Tóxicos:</b> las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea en muy pequeña cantidad pueden provocar la muerte o perjuicios agudos o crónicos para la salud.
<b>Tóxico</b>	R23, R24, R25 y combinaciones. R39 y combinaciones con las anteriores. R48 y combinaciones con las anteriores.	<b>Tóxico</b>		<b>Tóxicos:</b> las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea en pequeñas cantidades pueden provocar la muerte o perjuicios agudos o crónicos para la salud.
<b>Nocivo</b>	R20, R21, R22 y combinaciones. R48 y combinaciones con las anteriores. R68 y combinaciones con las anteriores. R65	<b>Nocivo</b>		<b>Nocivos:</b> las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea pueden provocar la muerte o perjuicios agudos o crónicos para la salud.
<b>Corrosivo</b>	R34, R35	<b>Corrosivo</b>		<b>Corrosivos:</b> las sustancias y preparados que, en contacto con tejidos vivos, pueden ejercer una acción destructiva de los mismos.
<b>Irritante</b>	R36, R37, R38 y combinaciones. R41	<b>Irritante</b>		<b>Irritantes:</b> las sustancias y preparados no corrosivos que, por contacto breve, prolongado o repetido con la piel o las mucosas pueden provocar una reacción inflamatoria.
<b>Sensibilizante</b>	R42, R42/43 R43	<b>Nocivo Irritante</b>		<b>Sensibilizantes:</b> las sustancias y preparados que por inhalación o penetración cutánea, pueden ocasionar una reacción de hipersensibilización, de forma que una exposición posterior a esa sustancia o preparado dé lugar a efectos nocivos característicos.

# CLASIFICACIÓN (7/7)

## CLASIFICACIÓN SEGÚN LOS EFECTOS ESPECÍFICOS SOBRE LA SALUD

CATEGORÍA DE PELIGRO	FRASES R ASOCIADAS	INDICACIÓN DE PELIGRO	SÍMBOLO	DEFINICIÓN GENERAL
----------------------	--------------------	-----------------------	---------	--------------------

### Carcinógeno

Categorías 1 y 2

R45, R49

Tóxico



**Carcinógenos:** las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea pueden producir cáncer o aumentar su frecuencia.

Categoría 3

R40

Nocivo



### Mutágeno

Categorías 1 y 2

R46

Tóxico



**Mutágenos:** las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea pueden producir defectos genéticos hereditarios o aumentar su frecuencia.

Categoría 3

R68

Nocivo



### Tóxico para la reproducción

Categorías 1 y 2

R60, R61

Tóxico



**Tóxicos para la reproducción:** las sustancias y preparados que por inhalación, ingestión o penetración cutánea pueden producir efectos nocivos no hereditarios en la descendencia, o aumentar la frecuencia de éstos, o afectar de forma negativa a la función o a la capacidad reproductora masculina o femenina.

Categoría 3

R62, R63

Nocivo



## CLASIFICACIÓN SEGÚN LOS EFECTOS SOBRE EL MEDIO AMBIENTE

**Peligroso para el medio ambiente**

Medio ambiente acuático:  
R50, R50/53, R51/53  
R52, R52/53, R53  
Medio ambiente no acuático:  
R54, R55, R56, R57, R58  
Capa de ozono:  
R59

**Peligroso para el medio ambiente**



**Peligrosos para el medio ambiente:** las sustancias y preparados que, en caso de contacto con el medio ambiente, constituirían o podrían constituir un peligro inmediato o futuro para uno o más componentes del medio ambiente.

## 1. DEFINICIONES

- TOXICOLOGÍA
- GENOTOXICOLOGÍA | MUTAGÉNESIS  
| CARCINOGENÉNESIS  
| TERATOGENÉNESIS

## 2. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- NIVEL BÁSICO
- NIVEL 1
- NIVEL 2

## 3. CLASIFICACIÓN SEGÚN MUTAGENICIDAD

## 4. ECVAM, REMA, GTEMA

## 5. ENSAYOS DE EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- Ensayo bacteriológico de mutación reversa (Test de Ames)
- Ensayo de aberraciones cromosómicas (Test de *Allium cepa*)

# ECVAM, REMA, GTEMA (1/3)



## CENTRO EUROPEO PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

### OBJETIVOS:

Promover la regulación y la aceptación científica de ensayos sin animales con importancia biomédica, a través de la investigación, el desarrollo de dichos ensayos, su validación y el establecimiento de una base de datos especializada.

Coordinar a nivel europeo la evaluación independiente de la relevancia y fiabilidad de estos ensayos con propósitos científicos, de manera que los productos químicos y de otra índole puedan ser manufacturados, transportados y utilizados de una forma más económica y segura, a la vez que reducir progresivamente la actual relevancia de las técnicas de experimentación con animales.

### EEUU:

*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM).*

*National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM).*

<http://iccvam.niehs.nih.gov/home.htm>

<http://ecvam.jrc.it/index.htm>



About ECVAM	Activities	Validated Methods	Publications	Submission of new Test Methods to ECVAM	News Events and Meetings	Downloads and E-Learning



# ECVAM, REMA, GTEMA (2/3)



## RED ESPAÑOLA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS



### OBJETIVOS:

El objetivo fundamental de la Red será servir de nexo de conexión entre personas, grupos y entidades interesados en estos métodos, independientemente del campo científico en el que habitualmente se encuentren (bioquímico, farmacológico, toxicológico, ambiental etc.). Con dichos vínculos de conexión se pretende fomentar el intercambio de ideas, facilitar la formación de profesionales, impulsar la investigación en este campo, favorecer la comunicación bidireccional con la

administración y con la industria y, en general, aumentar la masa crítica española en cuantos foros europeos e internacionales sean de interés para nuestro país. En definitiva se trata de informar, formar y desarrollar actividades sobre los métodos alternativos que se están realizando, tanto en España como en el extranjero.

### OBJETIVOS PRECISOS:

- Actividades informativas.
- Actividades formativas.

<http://tox.umh.es/rema/index.html>



### Sobre REMA

Inicios / Documentos  
Comisión / Entidades

### Actividades

Jornadas  
Congresos / etc.

### Novedades

ECVAM  
Comisión Europea / Links



# ECVAM, REMA, GTEMA (3/3)



GTEMA

## GRUPO DE TRABAJO ESPECIALIZADO EN MÉTODOS ALTERNATIVOS (Asociación Española de Toxicología)

### OBJETIVOS:

1. Fomentar la cooperación y la coordinación de las actividades científicas para contribuir al desarrollo de nuevos métodos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, que conduzcan a las tres erres (3ERRES):



- reducir el número de animales empleados,
- refinar técnicas que disminuyan el estrés y sufrimiento de éstos,
- o reemplazar el uso de animales

2. Estimular la participación de investigadores españoles en programas de prevalidación o validación de ensayos

3. Promover la aceptación reguladora de los mismos.

<http://tox.umh.es/aetox/grupos/GTEMA/index.html>



### Sobre GTEMA

Información  
Documentos

Alternativas  
Foro  
Links

Conceptos  
Inventario  
...



## 1. DEFINICIONES

- TOXICOLOGÍA
- GENOTOXICOLOGÍA | MUTAGÉNESIS  
CARCINOGENÉNESIS  
TERATOGENÉNESIS

## 2. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- NIVEL BÁSICO
- NIVEL 1
- NIVEL 2

## 3. CLASIFICACIÓN SEGÚN MUTAGENICIDAD

## 4. ECVAM, REMA, GTEMA

## 5. ENSAYOS DE EVALUACIÓN MUTAGÉNICA

- Ensayo bacteriológico de mutación reversa (Test de Ames)
- Ensayo de aberraciones cromosómicas (Test de *Allium cepa*)



- Cepas **TA98** y **TA100** de *Salmonella typhimurium*.

- Trabajar en esterilidad.

- Crecer las cepas mediante cultivos de noche:

500µl de congelado bacteriano + 50ml de medio NB



baño con agitación a 37°C durante 16 horas y en oscuridad

- Preparar diluciones de la muestra.

- Filtrar las diluciones por Millipore 0,45µm; conservar en nevera.

- Preparar agar mínimo para placas Petri.

- Preparar agar líquido.

- Añadir 100µl de diluciones y controles a tubos con agar líquido.

- Añadir esta mezcla a las placas Petri con agar mínimo.

- Incubar placas Petri a 37 °C, durante 48h. y en oscuridad.

- Contar colonias revertientes.



## Características de las cepas bacterianas:

CEPA	MUTACIÓN	SISTEMA DE REPARACIÓN	LPS	PLÁSMIDO
TA98	his D3052	$\Delta$ uvr $\beta$	rfa	pKM 101
TA100	his G46	$\Delta$ uvr $\beta$	rfa	pKM 101

**uvr $\beta$**  : delección de un gen que codifica para el sistema de reparación de la escisión del DNA, y produce un aumento de la sensibilidad en la detección de mutágenos. La delección incluye también genes de la biotina y de la nitrato reductasa.

**rfa** : mutación que causa pérdida parcial de la barrera lipopolisacárida de la pared bacteriana, aumentando la permeabilidad a grandes moléculas que no atraviesan paredes celulares normales.

**pKM 101** : Factor R. Confiere resistencia a ampicilina y aumenta la mutagénesis espontánea e inducida porque incrementa el sistema de reparación con error.

## Cepa TA98 — Mutación his D3052

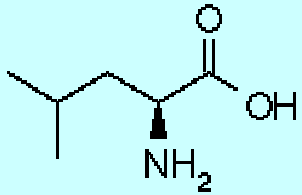
Se encuentra en el gen his D, que codifica para la histidinol deshidrogenasa.

Mutación de tipo “frameshift”, consistente en una adición de un par de bases próxima a una cadena de ocho restos de -GC- repetidos.

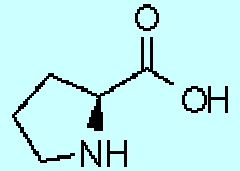
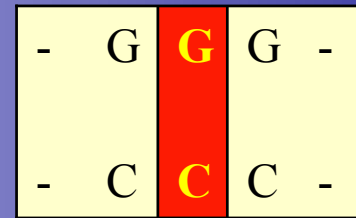
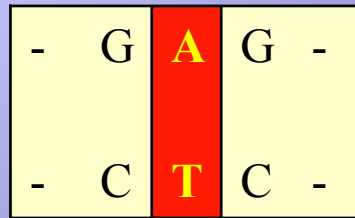
Esta cepa responde a mutágenos que originan un desplazamiento en la lectura del DNA, que ocurre preferentemente en regiones del DNA que poseen secuencias de bases repetidas en tándem.



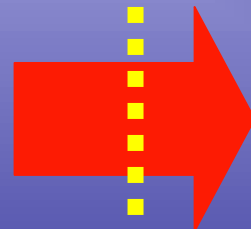
## Cepa TA100 — Mutación his G46



leu | Leucin



pro | Prolin

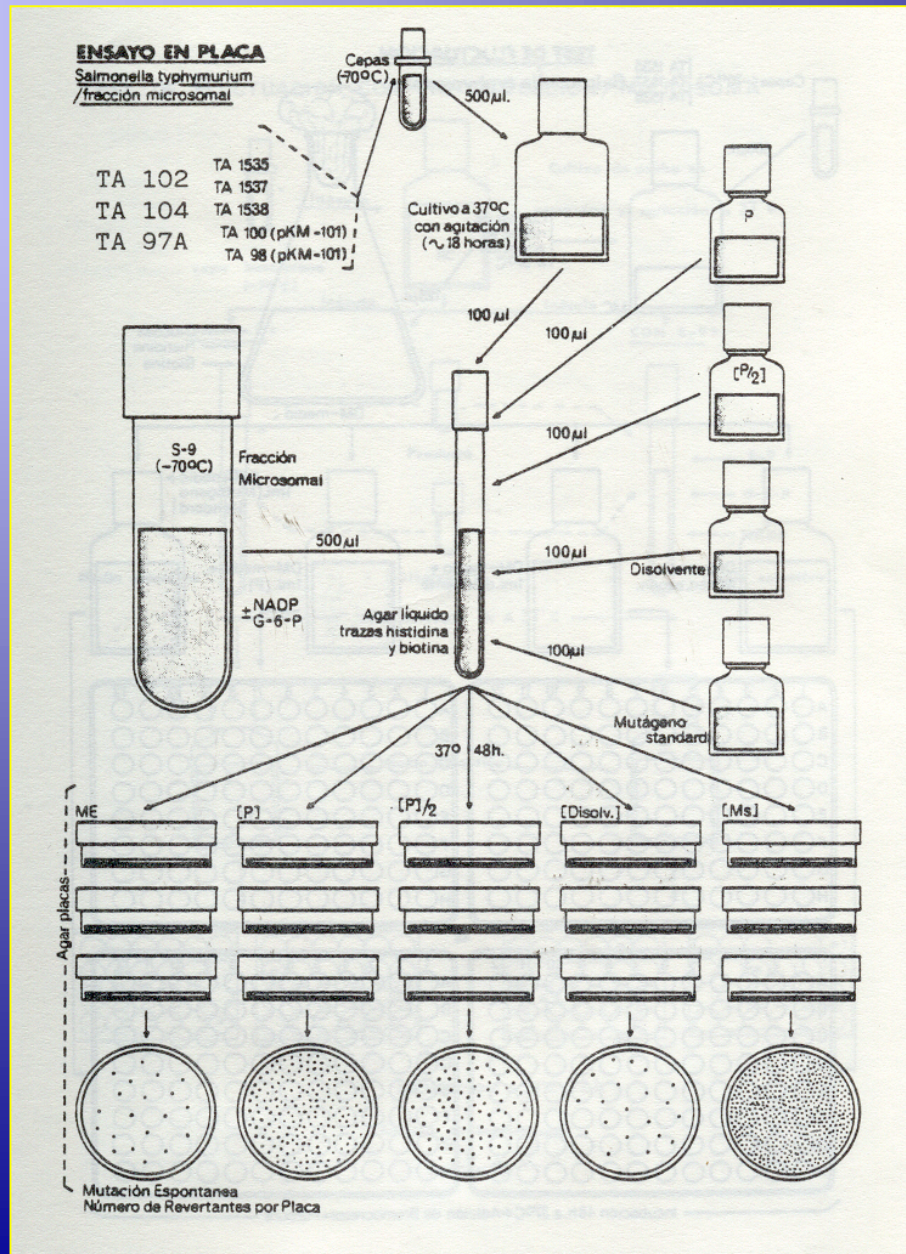


**Leucina**

**Prolina**

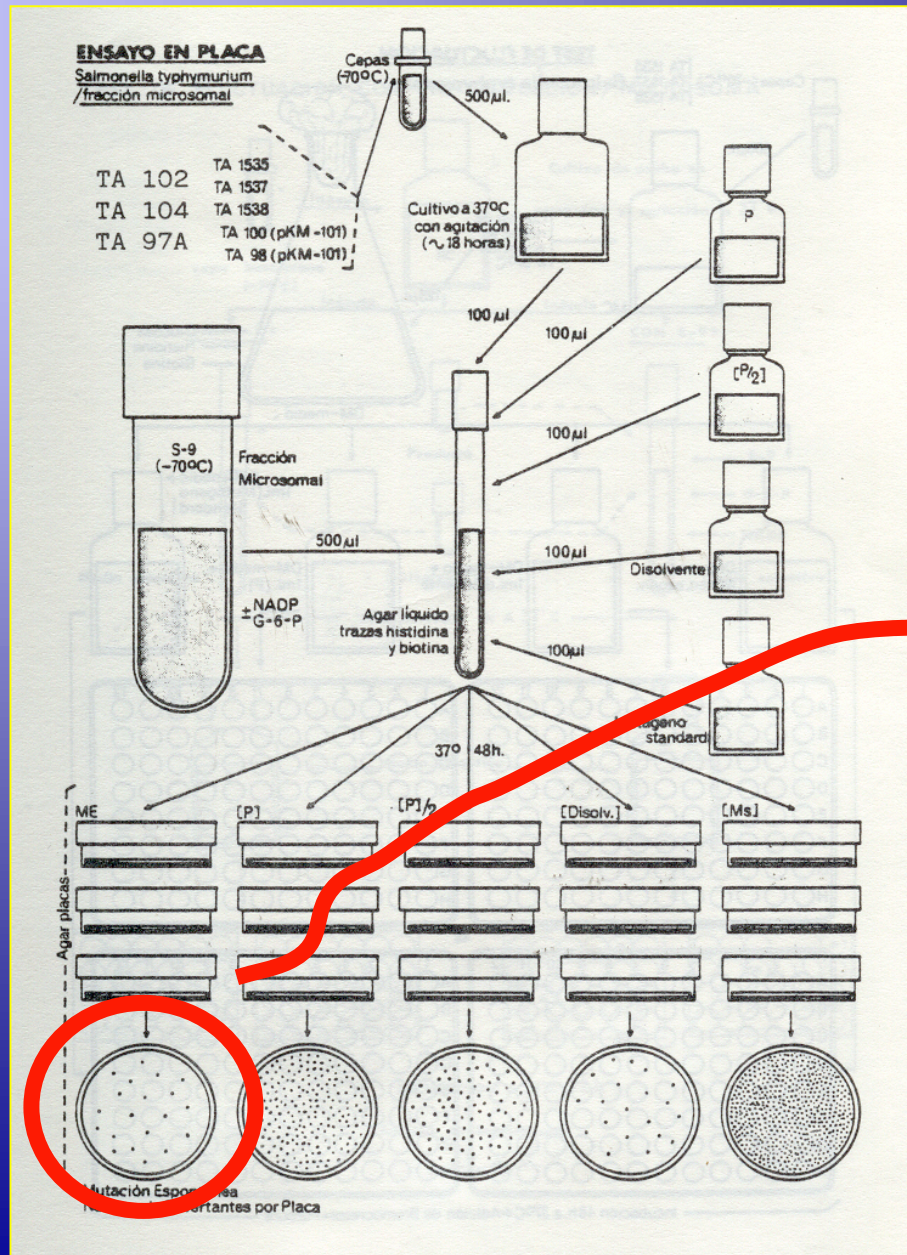
Para detectar mutágenos que causan sustitución de pares de bases G-C

## Esquema del método



(Laborda et al., 1986)

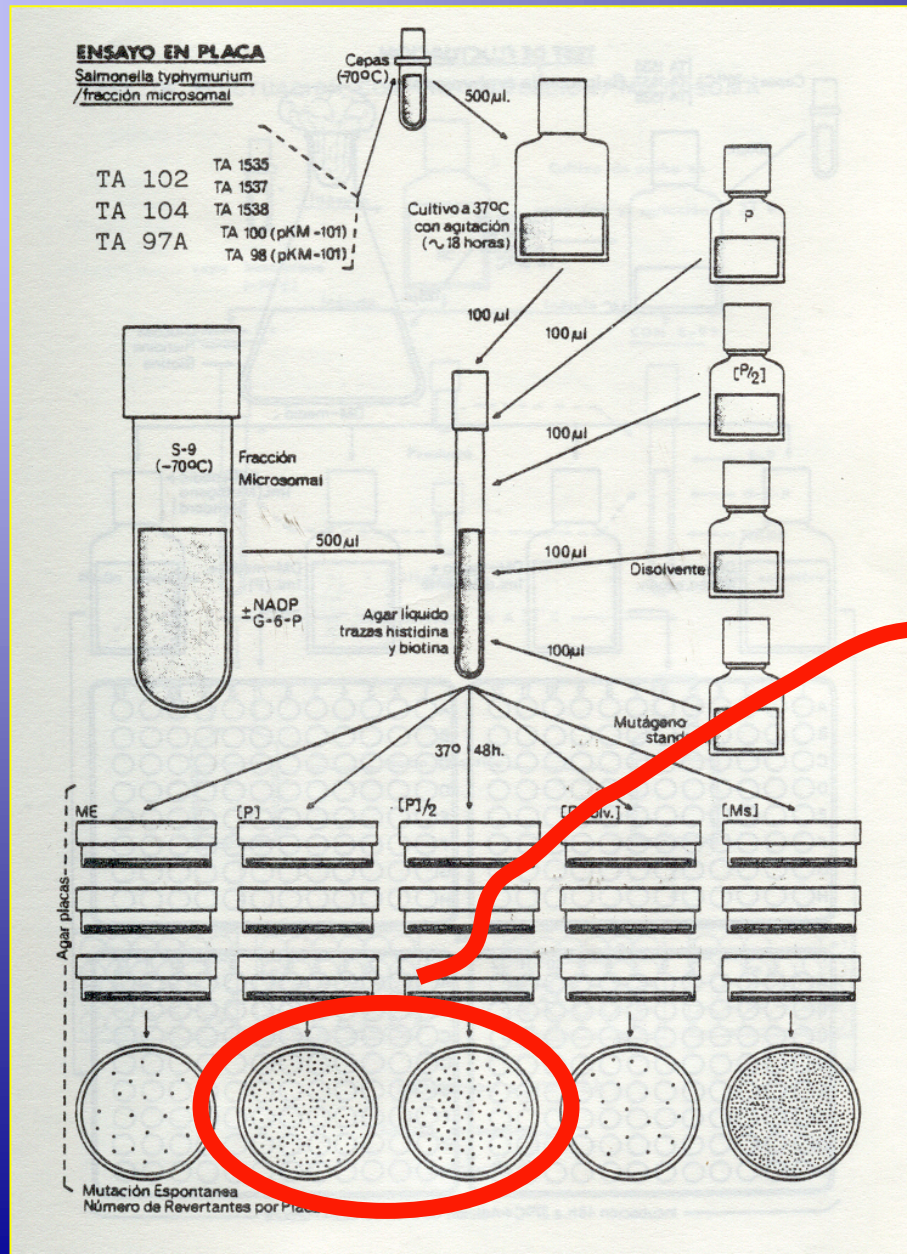
## Esquema del método



Esponánea

(Laborda et al., 1986)

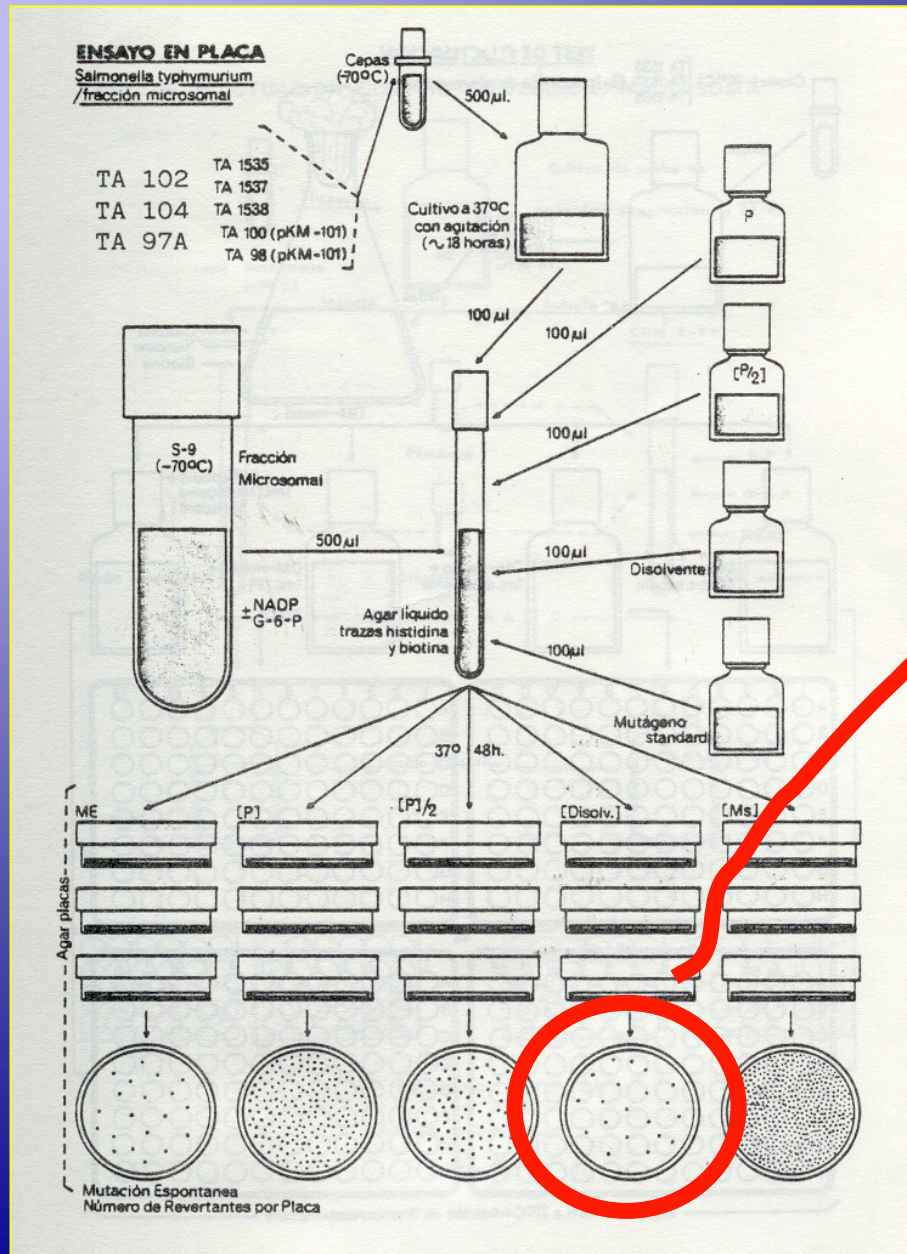
## Esquema del método



Producto

(Laborda et al., 1986)

Esquema del método

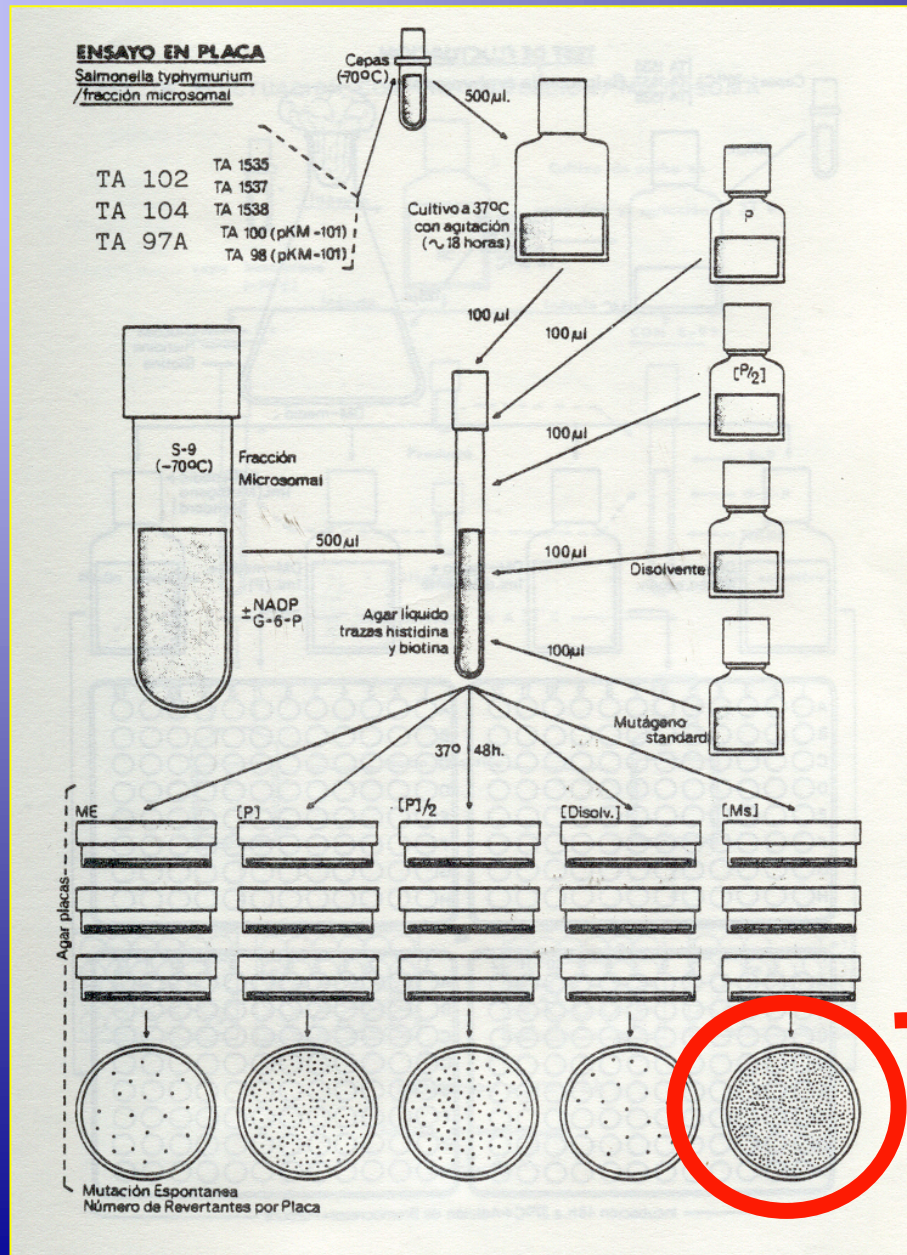


**Disolvente**

(Laborda et al., 1986)



## Esquema del método



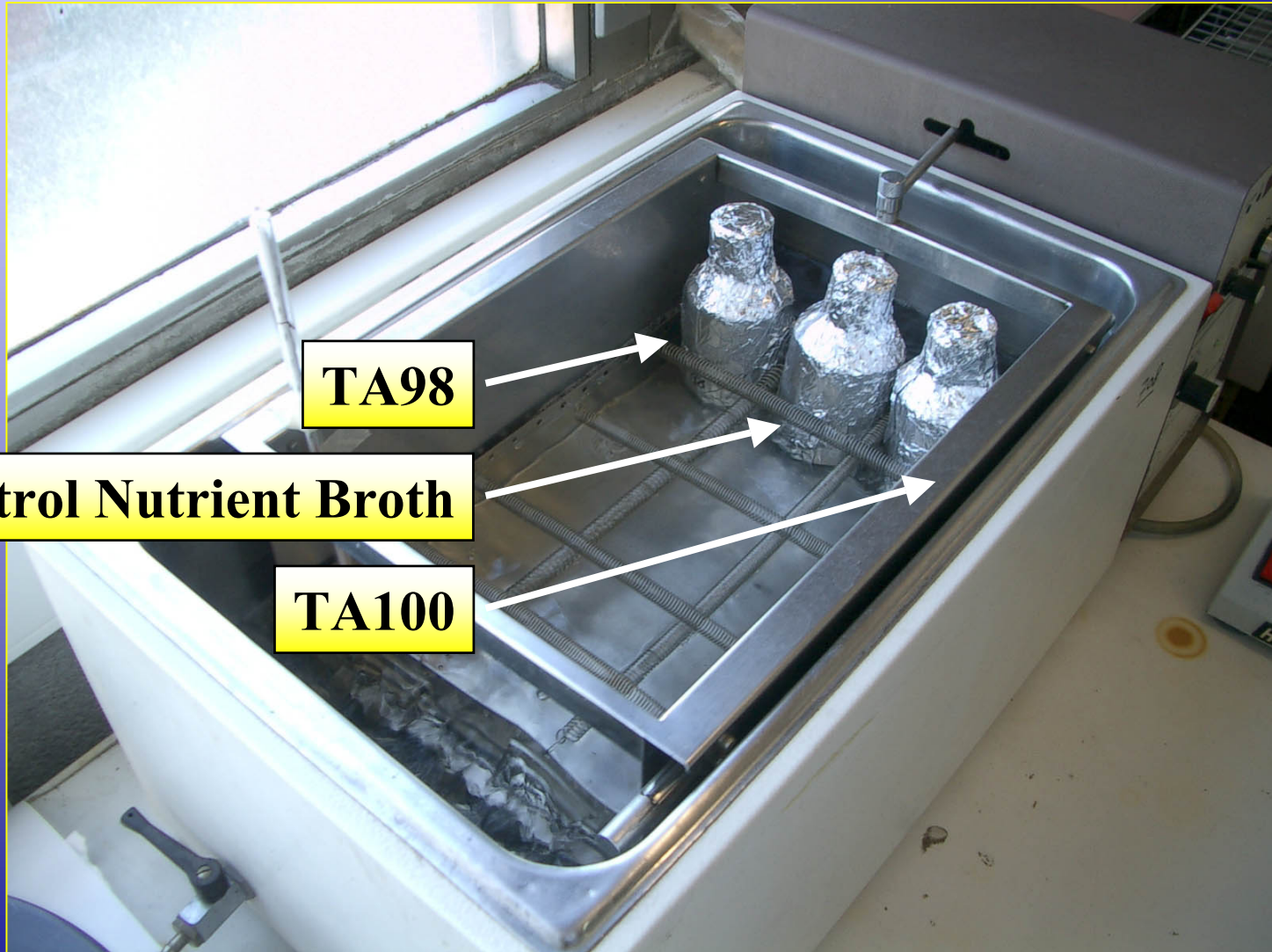
Mutágeno

(Laborda et al., 1986)

Endpoint <sup>a</sup>	Code	Definition	Endpoint <sup>a</sup>	Code	Definition
<b>NONMAMMALIAN SYSTEMS</b>					
<i>Prokaryotic systems</i>			<i>Lower eukaryotic systems</i>		
D	ECB	<i>Escherichia coli</i> (or <i>E. coli</i> DNA), DNA strand breaks, cross-links or related damage	D	SSB	<i>Saccharomyces</i> species, DNA strand breaks, cross-links or related damage
D	SAD	<i>Salmonella typhimurium</i> , DNA repair-deficient strains, differential toxicity	D	SSD	<i>Saccharomyces</i> species, DNA repair-deficient strains, differential toxicity
D	ECD	<i>Escherichia coli pol A/W3110-P3478</i> , differential toxicity (spot test)	D	SZD	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , DNA repair-deficient strains, differential toxicity
D	ECL	<i>Escherichia coli pol A/W3110-P3478</i> , differential toxicity (liquid suspension test)	R	SCG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , gene conversion
D	ERD	<i>Escherichia coli rec</i> strains, differential toxicity	R	SCH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , homozygosis by mitotic recombination or gene conversion
D	BSD	<i>Bacillus subtilis rec</i> strains, differential toxicity	R	SZG	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , gene conversion
D	BRD	Other DNA repair-deficient bacteria, differential toxicity	R	ANG	<i>Aspergillus nidulans</i> , genetic crossing-over
G	BPF	Bacteriophage, forward mutation	G	SCF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , forward mutation
G	SAF	<i>Salmonella typhimurium</i> , forward mutation	G	SCR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , reverse mutation
G	SA0	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, reverse mutation	G	SGR	<i>Streptomyces griseoflavus</i> , reverse mutation
G	SA2	<i>Salmonella typhimurium</i> TA102, reverse mutation	G	STF	<i>Streptomyces coelicolor</i> , forward mutation
G	SA3	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1530, reverse mutation	G	STR	<i>Streptomyces coelicolor</i> , reverse mutation
G	SA4	<i>Salmonella typhimurium</i> TA104, reverse mutation	G	SZF	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , forward mutation
G	SA5	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, reverse mutation	G	SZR	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , reverse mutation
G	SA7	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537, reverse mutation	G	ANF	<i>Aspergillus nidulans</i> , forward mutation
G	SA8	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538, reverse mutation	G	ANR	<i>Aspergillus nidulans</i> , reverse mutation
G	SA9	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, reverse mutation	G	NCF	<i>Neurospora crassa</i> , forward mutation
G	SAS	<i>Salmonella typhimurium</i> (other miscellaneous strains), reverse mutation	G	NCR	<i>Neurospora crassa</i> , reverse mutation
G	ECK	<i>Escherichia coli</i> K12, forward or reverse mutation	G	PSM	<i>Paramecium</i> species, mutation
G	ECW	<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> , reverse mutation	C	PSC	<i>Paramecium</i> species, chromosomal aberrations
G	EC2	<i>Escherichia coli</i> WP2, reverse mutation	A	SCN	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , aneuploidy
G	ECR	<i>Escherichia coli</i> (other miscellaneous strains), reverse mutation	A	ANN	<i>Aspergillus nidulans</i> , aneuploidy
G	BSM	<i>Bacillus subtilis</i> , multigene test	A	NCN	<i>Neurospora crassa</i> , aneuploidy
G	KPF	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , forward mutation	<i>Plant systems</i>		
G	MAF	<i>Micrococcus aureus</i> , forward mutation	D	PLU	Plants, unscheduled DNA synthesis
			G	ASM	<i>Arabidopsis</i> species, mutation
			G	HSM	<i>Hordeum</i> species, mutation
			G	TSM	<i>Tradescantia</i> species, mutation
			G	PLM	Plants (other), mutation

<sup>a</sup>Endpoints are grouped within each phylogenetic category as follows: A, aneuploidy; C, chromosomal aberrations; D, DNA damage; F, assays of body fluids; G, gene mutation; H, host-mediated assays; I, inhibition of intercellular communication; M, micronuclei; P, sperm morphology; R, mitotic recombination or gene conversion; S, sister chromatid exchange; and T, cell transformation





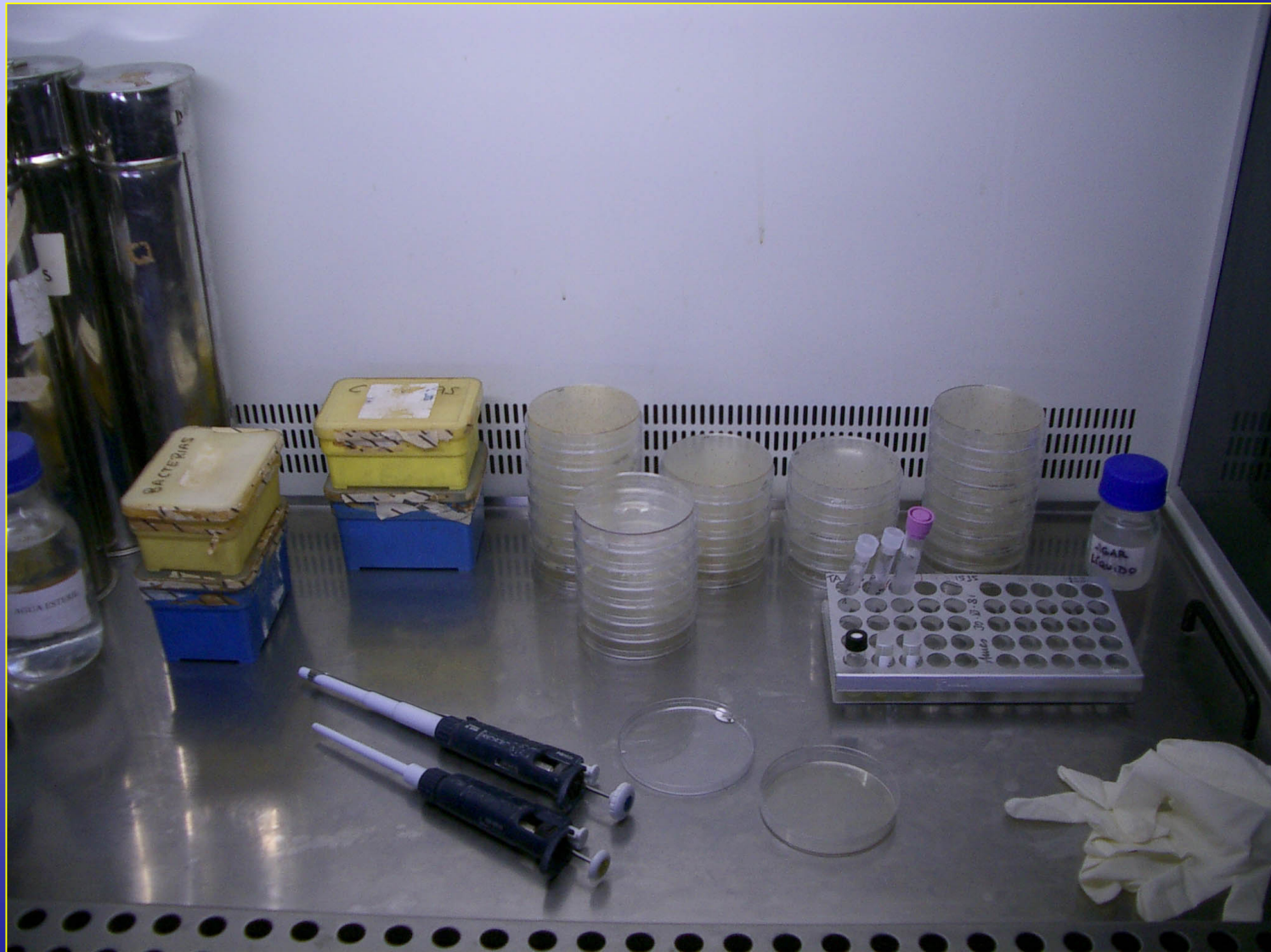
TA98

Control Nutrient Broth

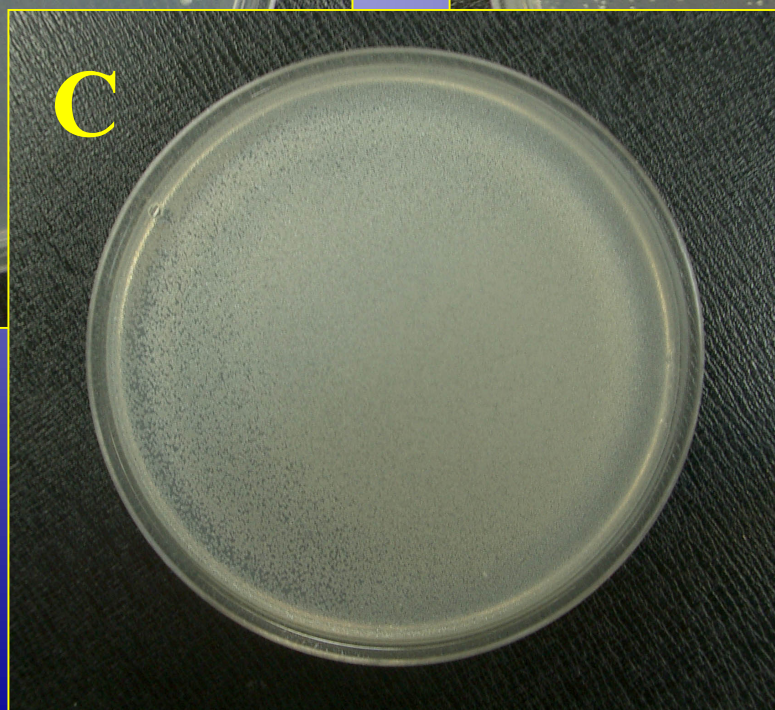
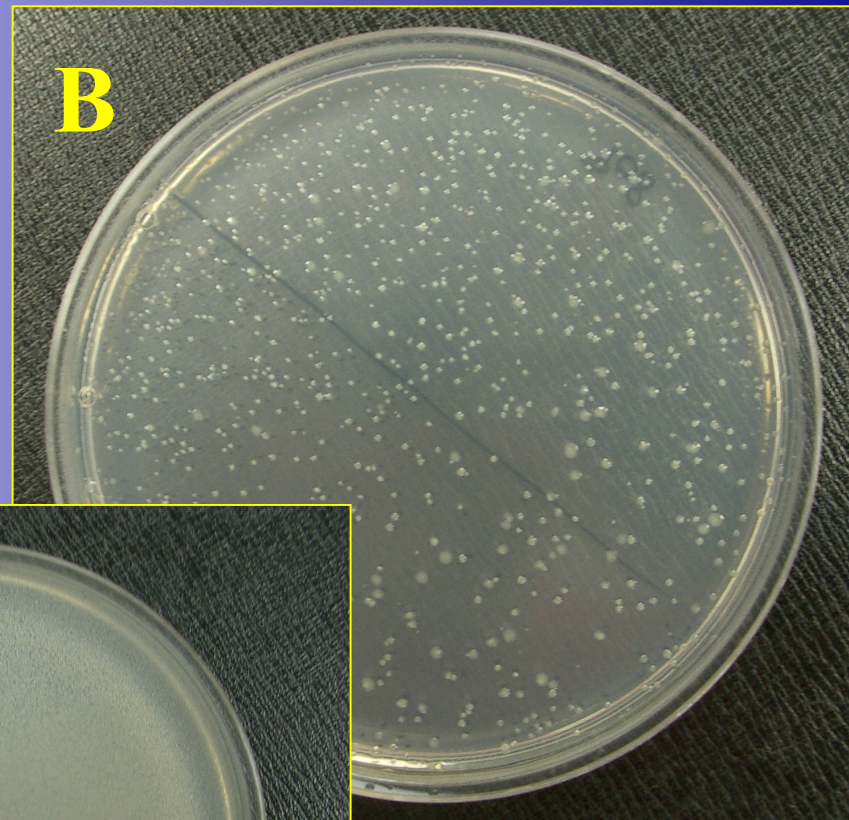
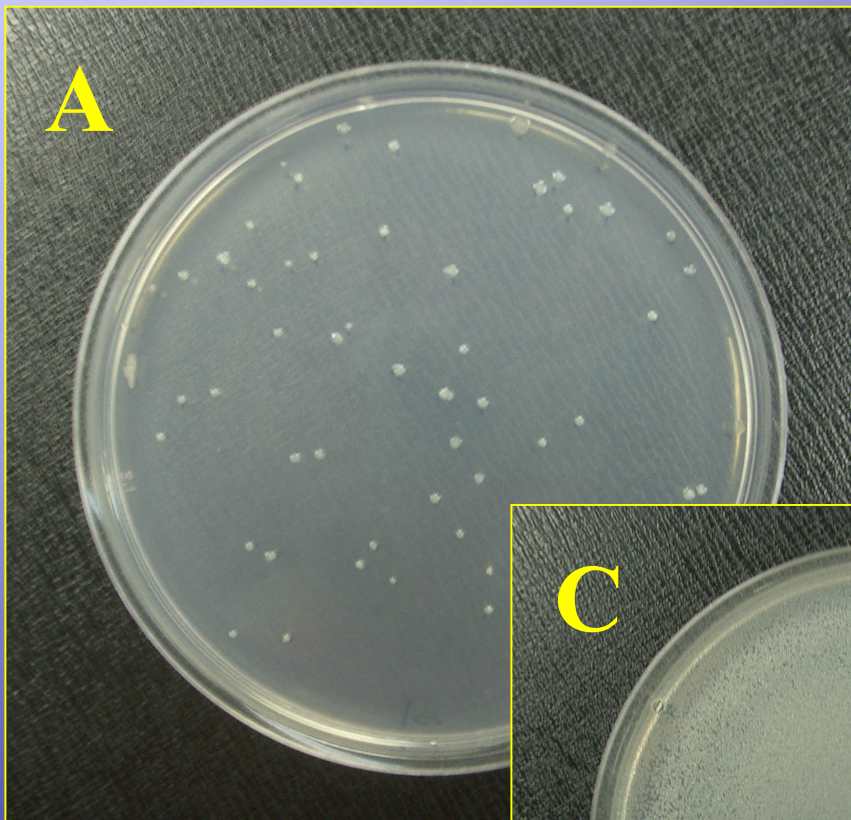
TA100

Baño con agitación a 37°C









**TA100**

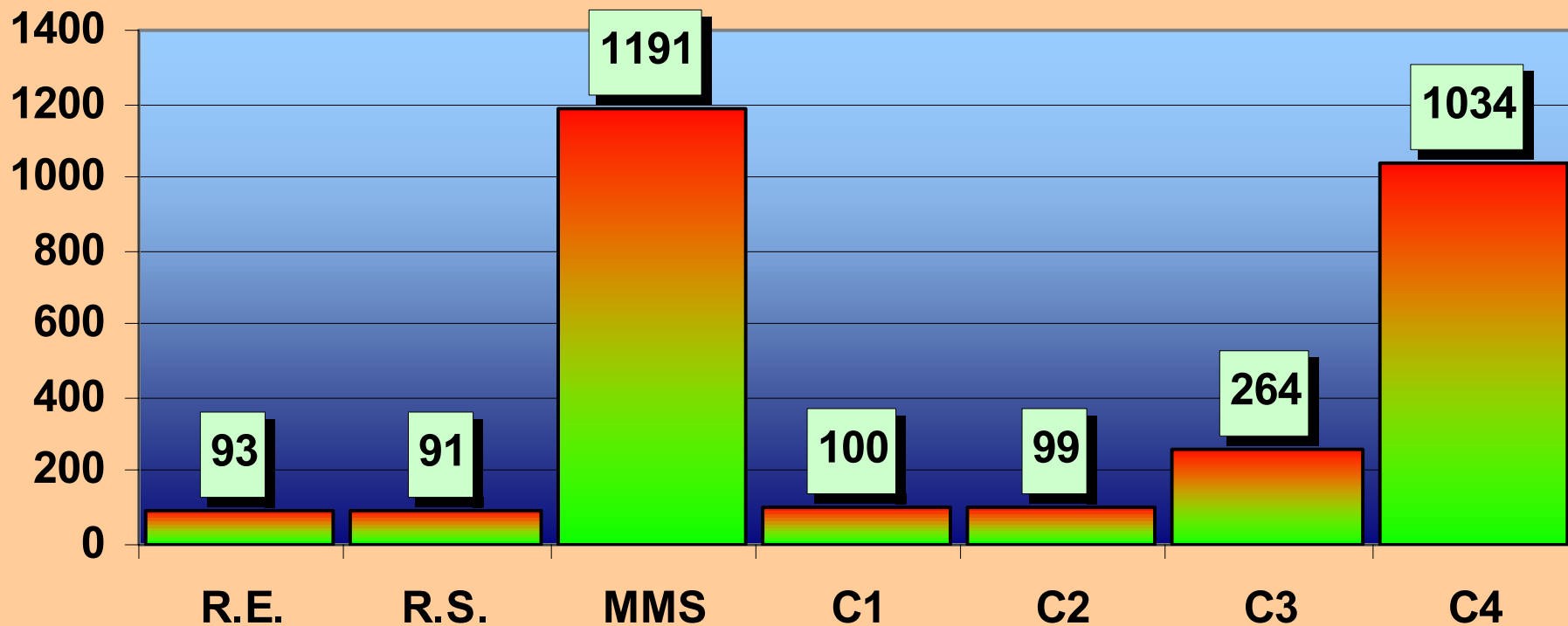
**A.- R. Esponánea**  
**B.- R. Mutágeno**  
**C.- Toxicidad**

	TA98	Media TA98	TA100	Media TA100
Reversión Espontánea	21	20	90	93
	17		90	
	22		98	
Reversión Solvente (DMSO)	21	18	102	91
	20		87	
	14		84	
Reversión Mutágeno (NQO/MMS)	117	128	1314	1191
	141		958	
	126		1301	
C1	28	29	89	100
	31		104	
	28		108	
C2	24	30	98	99
	37		115	
	28		84	
C3	72	67	281	264
	65		253	
	64		258	
C4	169	174	896	1034
	174		1248	
	179		958	

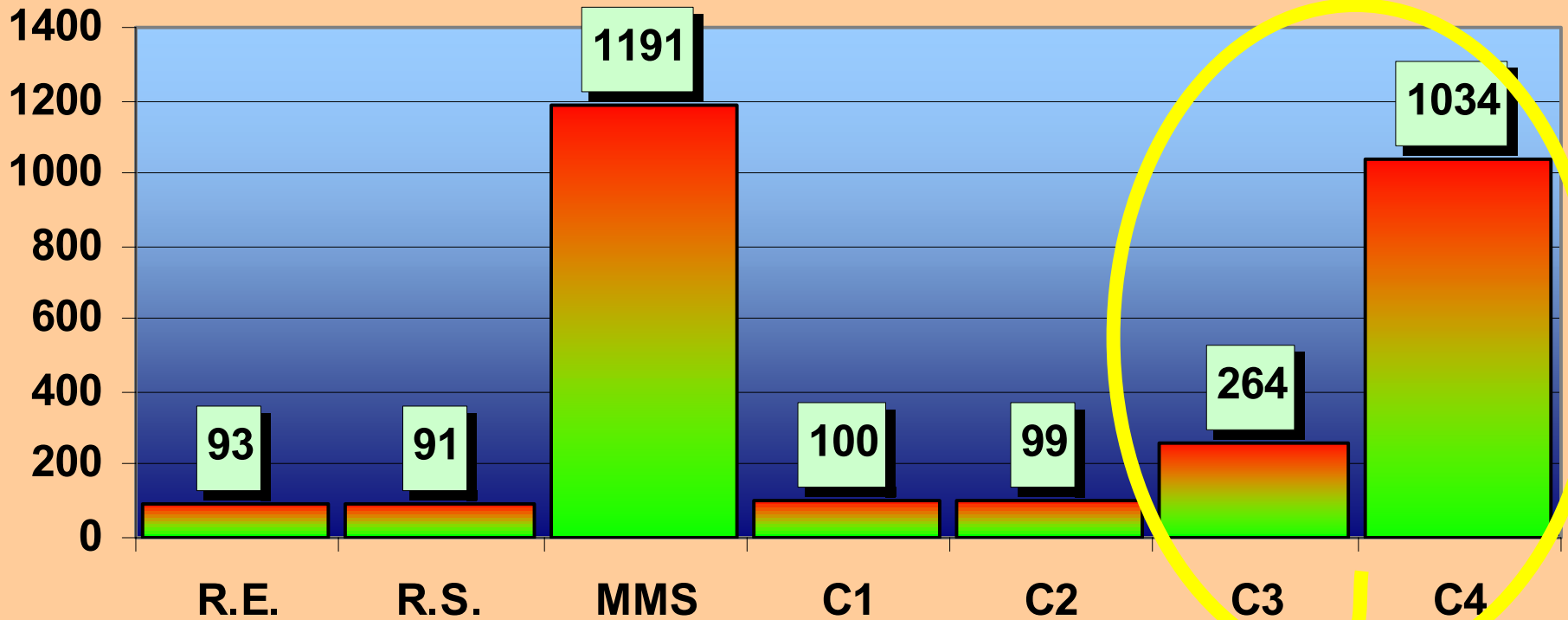




## Nº Revertientes en TA 100

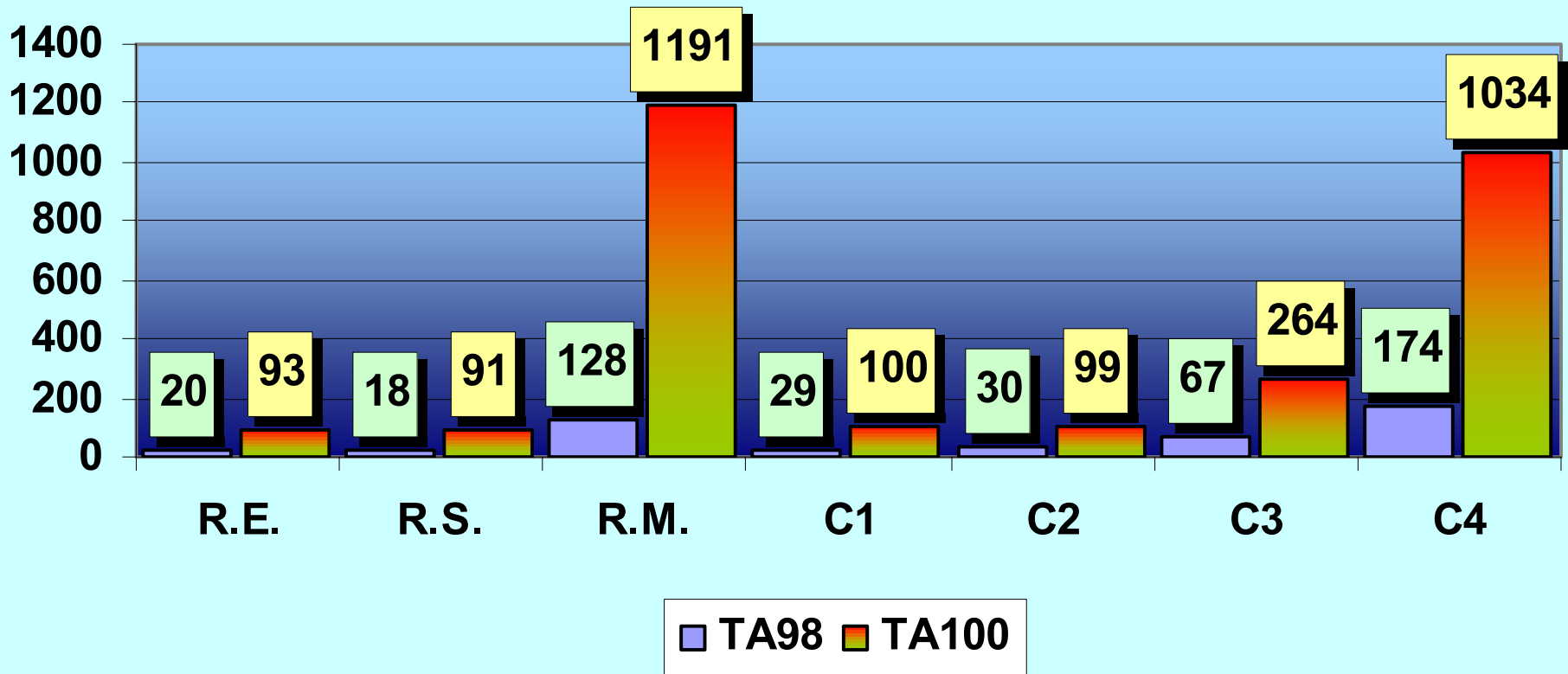


## Nº Revertientes en TA 100

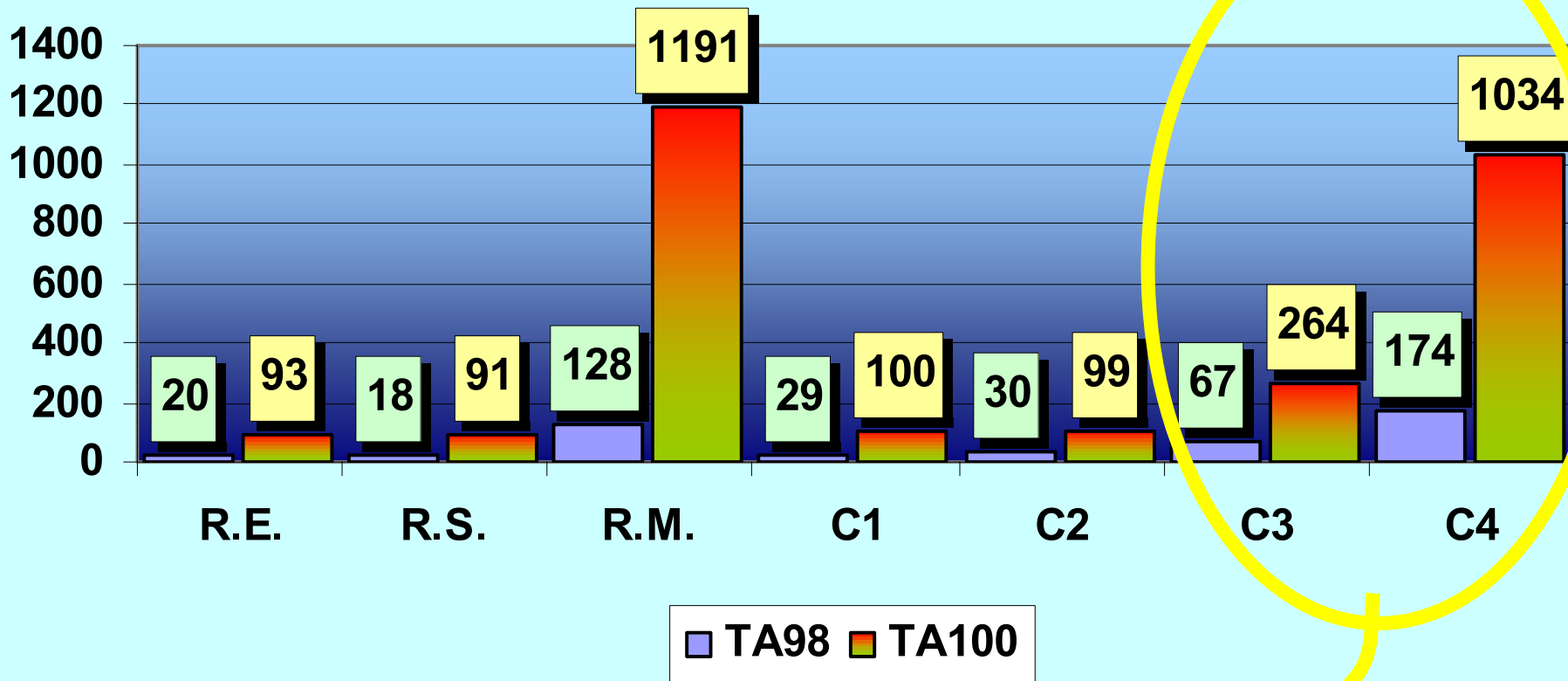


**Mutagénico**

## Nº Revertientes



## Nº Revertientes



**Mutagénico**

CEPA	Nº REVERTIENTES ESPONTÁNEOS	MUTÁGENO ESTÁNDAR	DOSIS	Nº REVERTIENTES CON MUTÁGENO
TA98	15-75	4-Nitroquinolina-N-óxido (NQNO)	0,5 µg/PP	300-500
TA100	60-220	Metil metano sulfonato (MMS)	1 µg/PP	2730

CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO MUTAGÉNICO		
ABREVIATURA	DEFINICIÓN	ÍNDICE DE MUTACIÓN
NM	No mutagénico	< 2,5
M <sup>1</sup>	Mutagénico muy débil	2,6-3,5
M <sup>2</sup>	Mutagénico débil	3,6-5,5
M <sup>3</sup>	Mutagénico	5,6-10,5
M <sup>4</sup>	Mutagénico alto	> 10,5
T	Efecto tóxico	Colonias pequeñas o ausencia de césped
T <sup>M</sup>	Toxicidad máxima	No existe crecimiento bacteriano

	TA98	Media TA98	TA100	Media TA100
Reversión Espontánea	21	20	90	93
	17		90	
	22		98	
Reversión Solvente (DMSO)	21	18	102	91
	20		87	
	14		84	
Reversión Mutágeno (NQO/MMS)	117	128	1314	1191
	141		958	
	126		1301	
C1	28	29	89	100
	31		104	
	28		108	
C2	24	30	98	99
	37		115	
	28		84	
C3	72	67	281	264
	65		253	
	64		258	
C4	169	174	896	1034
	174		1248	
	179		958	

	TA98	Media TA98	TA100	Media TA100
Reversión Espontánea	21	20	90	93
	17		90	
	22		98	
Reversión Solvente (DMSO)	21	18	102	91
	20		87	
	14		84	
Reversión Mutágeno (NQO/MMS)	117	128	1314	1191
	141		958	
	126		1301	
C1	28	29	89	100
	31		104	
	28		108	
C2	24	30	98	99
	37		115	
	26		84	
C3	72	67	281	264
	65		253	
	64		258	
C4	169	174	896	1034
	174		1248	
	179		958	

## ÍNDICES

3,35 → M<sub>1</sub>  
Mutagénico muy débil

8,7 → M<sub>3</sub>  
Mutagénico



	TA98	Media TA98	TA100	Media TA100
Reversión Espontánea	21	20	90	93
	17		90	
	22		98	
Reversión Solvente (DMSO)	21	18	102	91
	20		87	
	14		84	
Reversión Mutágeno (NQO/MMS)	117	128	1314	1191
	141		958	
	126		1301	
C1	28	29	89	100
	31		104	
	28		108	
C2	24	30	98	99
	37		115	
	26		84	
C3	72	67	281	264
	65		253	
	64		258	
C4	169	174	896	1034
	174		1248	
	179		958	

ÍNDICES

ÍNDICES

3,35 → M<sub>1</sub>  
Mutagénico muy débil

8,7 → M<sub>3</sub>  
Mutagénico

2,83 → M<sub>1</sub>  
Mutagénico muy débil

11,11 → M<sub>4</sub>  
Mutagénico alto



- Pelar, decapar y lavar bulbos para eliminación de restos químicos.
- Excitar mediante una muesca el meristemo radicular.
- Cultivar *Allium cepa* en cabina a  $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad.
- Oxigenar el agua mediante burbujeo de 10-20 ml/min.
- Controlar crecimiento radicular e índices tras 24-48 horas.
- Tinción de Feulgen.
- Calcular Índices Mitótico y de Fases a las 48h. de tratamiento (72-96 horas totales de ensayo).
- Calcular la Inhibición del Crecimiento Radicular a las 72h. de tratamiento (96-120 horas totales de ensayo).



Endpoint <sup>a</sup>	Code	Definition	Endpoint <sup>a</sup>	Code	Definition
<b>NONMAMMALIAN SYSTEMS (contd)</b>					
<i>Plant systems (contd)</i>					
S	VFS	<i>Vicia jawa</i> , sister chromatid exchange	S	SIT	Sister chromatid exchange, transformed animal cells <i>in vitro</i>
S	PLS	Plants (other), sister chromatid exchange	S	SIA	Sister chromatid exchange, other animal cells <i>in vitro</i>
M	TSI	<i>Tradescantia</i> species, micronuclei	M	MIA	Micronucleus test, animal cells <i>in vitro</i>
C	ACC	<i>Allium cepa</i> , chromosomal aberrations	C	CIC	Chromosomal aberrations, Chinese hamster cells <i>in vitro</i>
C	TSC	<i>Tradescantia</i> species, chromosomal aberrations	C	CIM	Chromosomal aberrations, mouse cells <i>in vitro</i>
C	VFC	<i>Vicia faba</i> , chromosomal aberrations	C	CIR	Chromosomal aberrations, rat cells <i>in vitro</i>
C	PLC	Plants (other), chromosomal aberrations	C	CIS	Chromosomal aberrations, Syrian hamster cells <i>in vitro</i>
<i>Insect systems</i>					
R	DMG	<i>Drosophila melanogaster</i> , genetic crossing-over or recombination	T	CIA	Chromosomal aberrations, other animal cells <i>in vitro</i>
G	DMM	<i>Drosophila melanogaster</i> , somatic mutation (and recombination)	A	AIA	Aneuploidy, animal cells <i>in vitro</i>
G	DMX	<i>Drosophila melanogaster</i> , sex-linked recessive lethal mutations	T	TBM	Cell transformation, BALB/c 3T3 mouse cells
C	DMC	<i>Drosophila melanogaster</i> , chromosomal aberrations	T	TCM	Cell transformation, C3H 10T1/2 mouse cells
C	DMH	<i>Drosophila melanogaster</i> , heritable translocation test	T	TCS	Cell transformation, Syrian hamster embryo cells, clonal assay
C	DML	<i>Drosophila melanogaster</i> , dominant lethal test	T	TFS	Cell transformation, Syrian hamster embryo cells, focus assay
A	DMN	<i>Drosophila melanogaster</i> , aneuploidy	T	TPM	Cell transformation, mouse prostate cells
<b>MAMMALIAN SYSTEMS</b>					
<i>Animal cells in vitro</i>					
D	DIA	DNA strand breaks, cross-links or related damage, animal cells <i>in vitro</i>	T	TCL	Cell transformation, other established cell lines
D	RIA	DNA repair exclusive of unscheduled DNA synthesis, animal cells <i>in vitro</i>	T	TRR	Cell transformation, RLV/Fischer rat embryo cells
D	URP	Unscheduled DNA synthesis, rat primary hepatocytes	T	T7R	Cell transformation, SA7/rat cells
D	UIA	Unscheduled DNA synthesis, other animal cells <i>in vitro</i>	T	T7S	Cell transformation, SA7/Syrian hamster embryo cells
G	GCL	Gene mutation, Chinese hamster lung cells exclusive of V79 <i>in vitro</i>	T	TEV	Cell transformation, other viral enhancement systems
G	GCO	Gene mutation, Chinese hamster ovary cells <i>in vitro</i>	T	TVI	Cell transformation, treated <i>in vivo</i> , scored <i>in vitro</i>
G	G9H	Gene mutation, Chinese hamster lung V79 cells, <i>hprt</i> locus	<i>Human cells in vitro</i>		
G	G9O	Gene mutation, Chinese hamster lung V79 cells, ouabain resistance	D	DIH	DNA strand breaks, cross-links or related damage, human cells <i>in vitro</i>
G	GML	Gene mutation, mouse lymphoma cells exclusive of L5178Y <i>in vitro</i>	D	RIH	DNA repair exclusive of unscheduled DNA synthesis, human cells <i>in vitro</i>
G	G5T	Gene mutation, mouse lymphoma L5178Y cells, TK locus	D	UHF	Unscheduled DNA synthesis, human fibroblasts <i>in vitro</i>
G	G5I	Gene mutation, mouse lymphoma L5178Y cells, all other loci	D	UHL	Unscheduled DNA synthesis, human lymphocytes <i>in vitro</i>
G	GIA	Gene mutation, other animal cells <i>in vitro</i>	D	UHT	Unscheduled DNA synthesis, transformed human cells <i>in vitro</i>
S	SIC	Sister chromatid exchange, Chinese hamster cells <i>in vitro</i>	D	UIH	Unscheduled DNA synthesis, other human cells <i>in vitro</i>
S	SIM	Sister chromatid exchange, mouse cells <i>in vitro</i>	G	GIH	Gene mutation, human cells <i>in vitro</i>
S	SIR	Sister chromatid exchange, rat cells <i>in vitro</i>	S	SHF	Sister chromatid exchange, human fibroblasts <i>in vitro</i>
S	SIS	Sister chromatid exchange, Syrian hamster cells <i>in vitro</i>	S	SHL	Sister chromatid exchange, human lymphocytes <i>in vitro</i>
			S	SHT	Sister chromatid exchange, transformed human cells <i>in vitro</i>
			S	SIH	Sister chromatid exchange, other human cells <i>in vitro</i>
			M	MIH	Micronucleus test, human cells <i>in vitro</i>
			C	CHF	Chromosomal aberrations, human fibroblasts <i>in vitro</i>
			C	CHL	Chromosomal aberrations, human lymphocytes <i>in vitro</i>
			C	CHT	Chromosomal aberrations, transformed human cells <i>in vitro</i>
			C	CIH	Chromosomal aberrations, other human cells <i>in vitro</i>





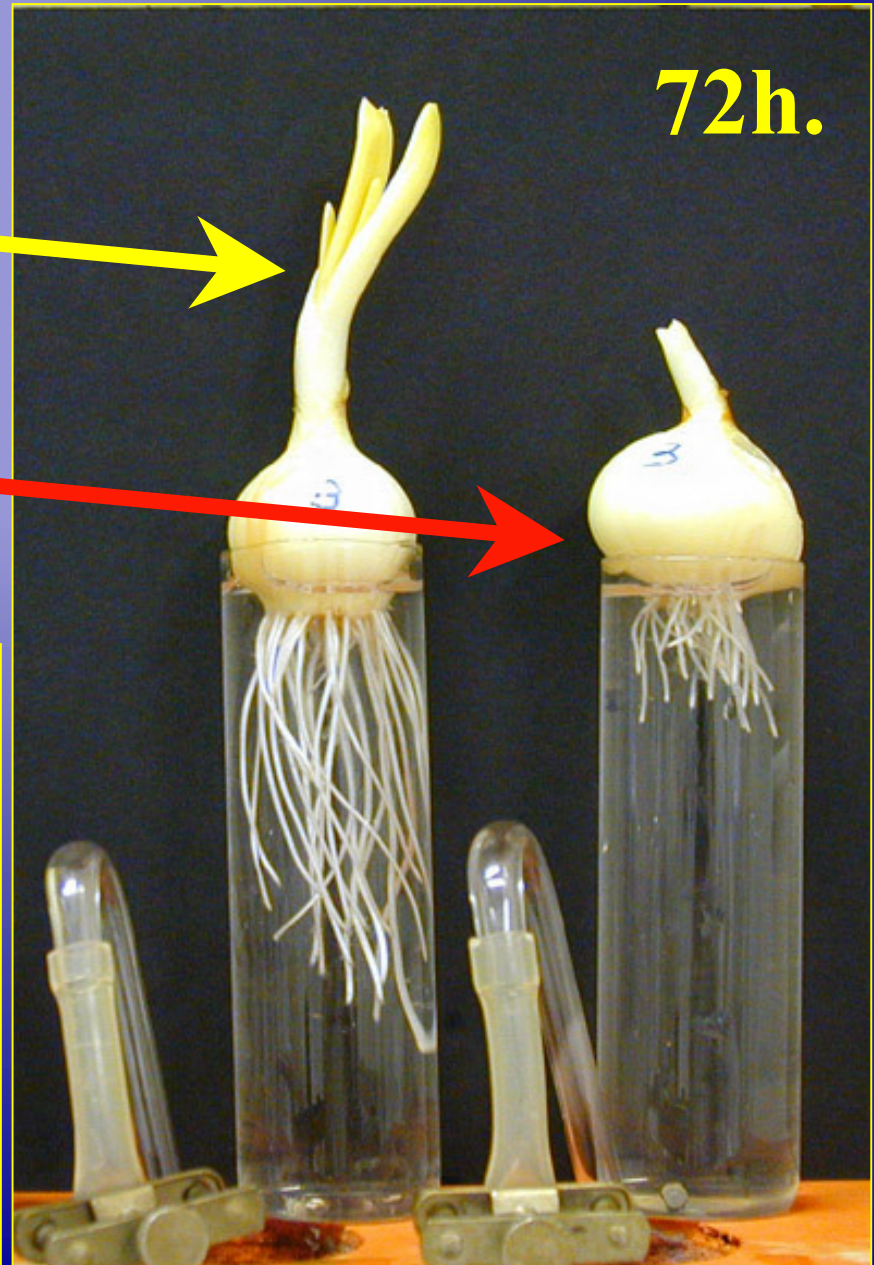
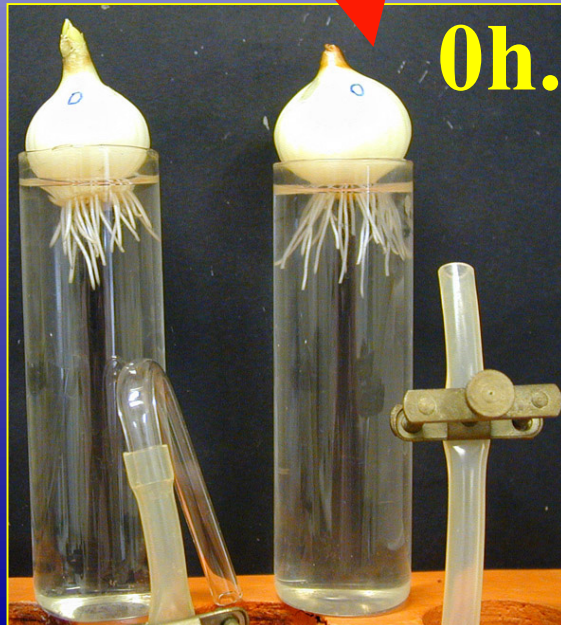
**Cámara de incubación a 25°C**



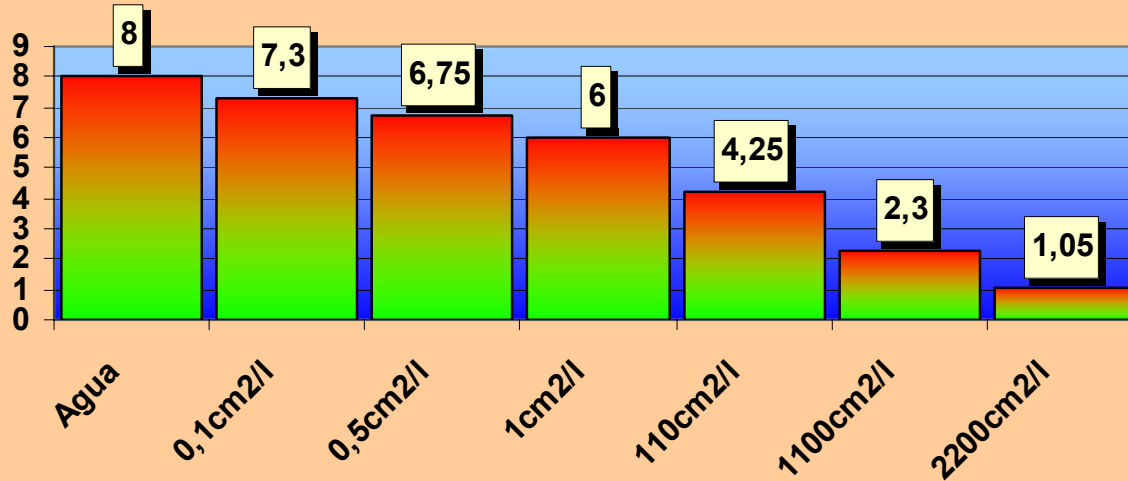
Fotografías cedidas por la Dra. M.J. Hazen  
(Lab A-110) Dpto. de Biología de la U.A.M.

Control

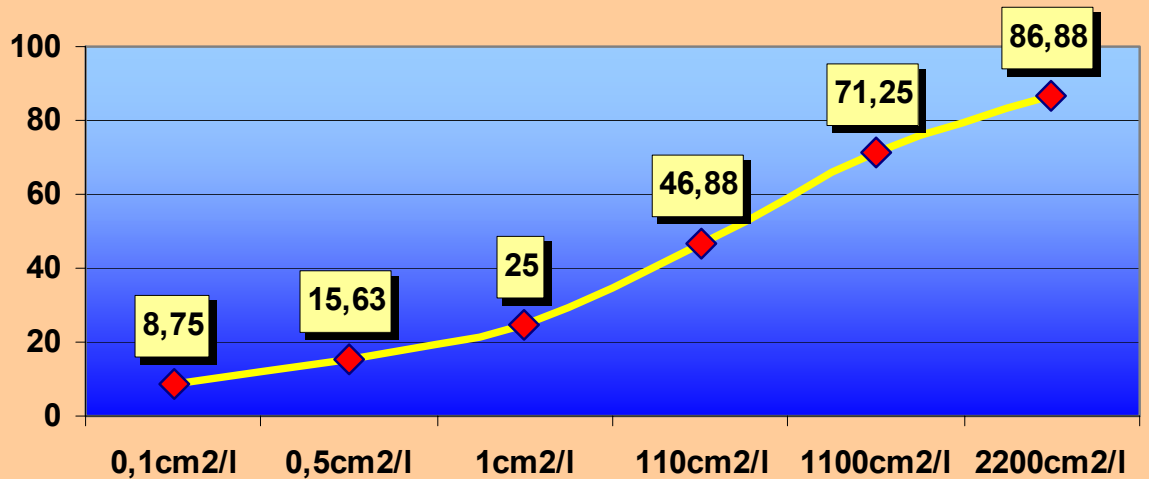
Muestra



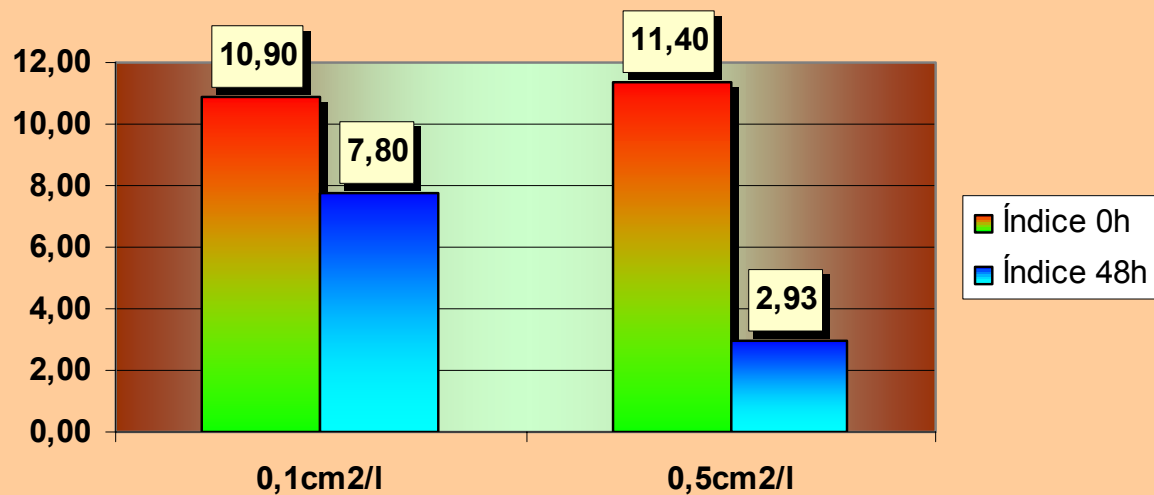
### Longitud de Raíces (cm) tras 72h



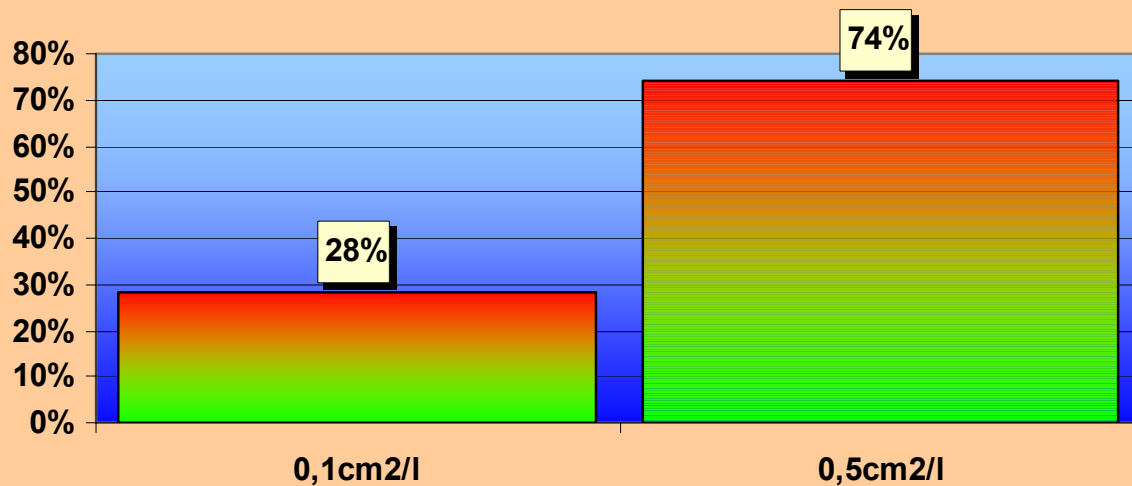
### % Inhibición del Crecimiento Radicular



### Índices Mitóticos



### % Inhibición de Índice Mitótico



Fotografía cedida por la Dra. M.J. Hazen (Lab A-110) Dpto. de Biología de la U.A.M.

**Control**  
Células tras 24h.  
de crecimiento  
en agua filtrada



Fotografías cedidas por la Dra. M.J. Hazen (Lab A-110) Dpto. de Biología de la U.A.M.

Tinción con orceína



Tinción de Feulgen

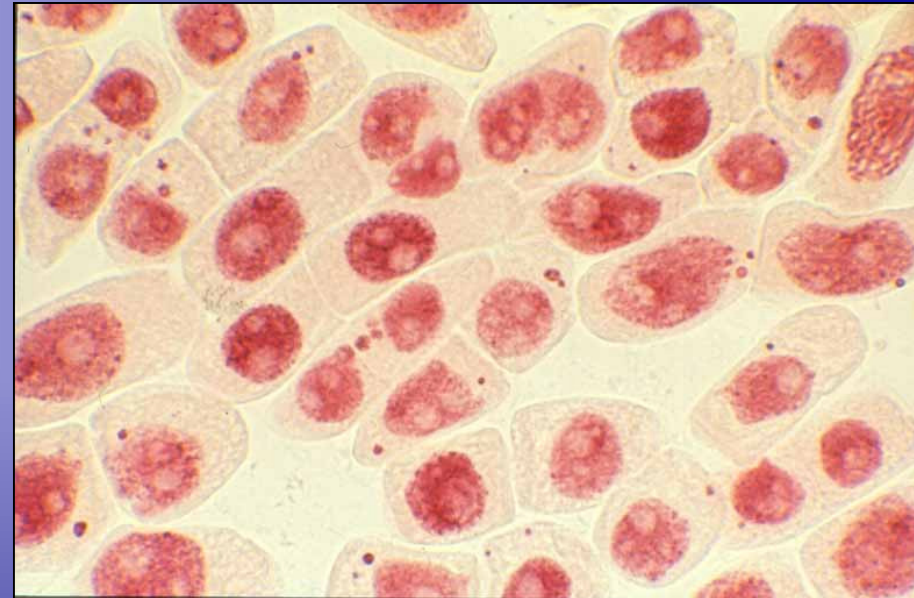


**C-Metafases**

Indican riesgo de aneuploidía y pueden ser reversibles



Fotografías cedidas por la Dra. M.J. Hazen (Lab A-110) Dpto. de Biología de la U.A.M.



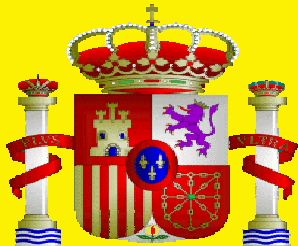
## Rotura y Micronúcleos

La rotura indica efecto clastogénico y  
los micronúcleos efecto clastogénico y/o aneuploidía

Fotografía cedida por la Dra. M.J. Hazen (Lab A-110) Dpto. de Biología de la U.A.M.

**Rotura y Puente con  
cromosomas rezagados**  
La rotura indica efecto  
clastogénico y  
los cromosomas rezagados  
indican riesgo de aneuploidía





**MINISTERIO DE  
CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA**

CENTRO DE CIENCIAS  
MEDIOAMBIENTALES (CCMA)  
CSIC

Laboratorio de Genotoxicología y  
Mutagénesis Ambiental



# EVALUACIÓN DE MUTAGENICIDAD Y GENOTOXICIDAD

**Óscar Herrero Felipe**

**Eduardo de la Peña de Torres**



TOXICOLOGÍA  
AMBIENTAL:  
SEGURIDAD  
QUÍMICA  
22-25 Marzo 04

[oscar.herrero@ccma.csic.es](mailto:oscar.herrero@ccma.csic.es)