



Universidad
de Navarra



MINISTERIO
DE CONSUMO



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición

VIII REUNIÓN DEL GRUPO DE NANOTECNOLOGÍA EN EL ÁMBITO
ALIMENTARIO

GENOTOXICIDAD *IN VITRO*

Amaya Azqueta
Departamento Farmacología y Toxicología

04/11/2020



GENOTOXICIDAD *IN VITRO*

1.- Introducción: genotoxicidad/mutagenicidad

2.- Ensayos y estrategia *in vitro* (EFSA)

3.- Genotoxicidad *in vitro* de nanomateriales (EFSA)

1. Introducción

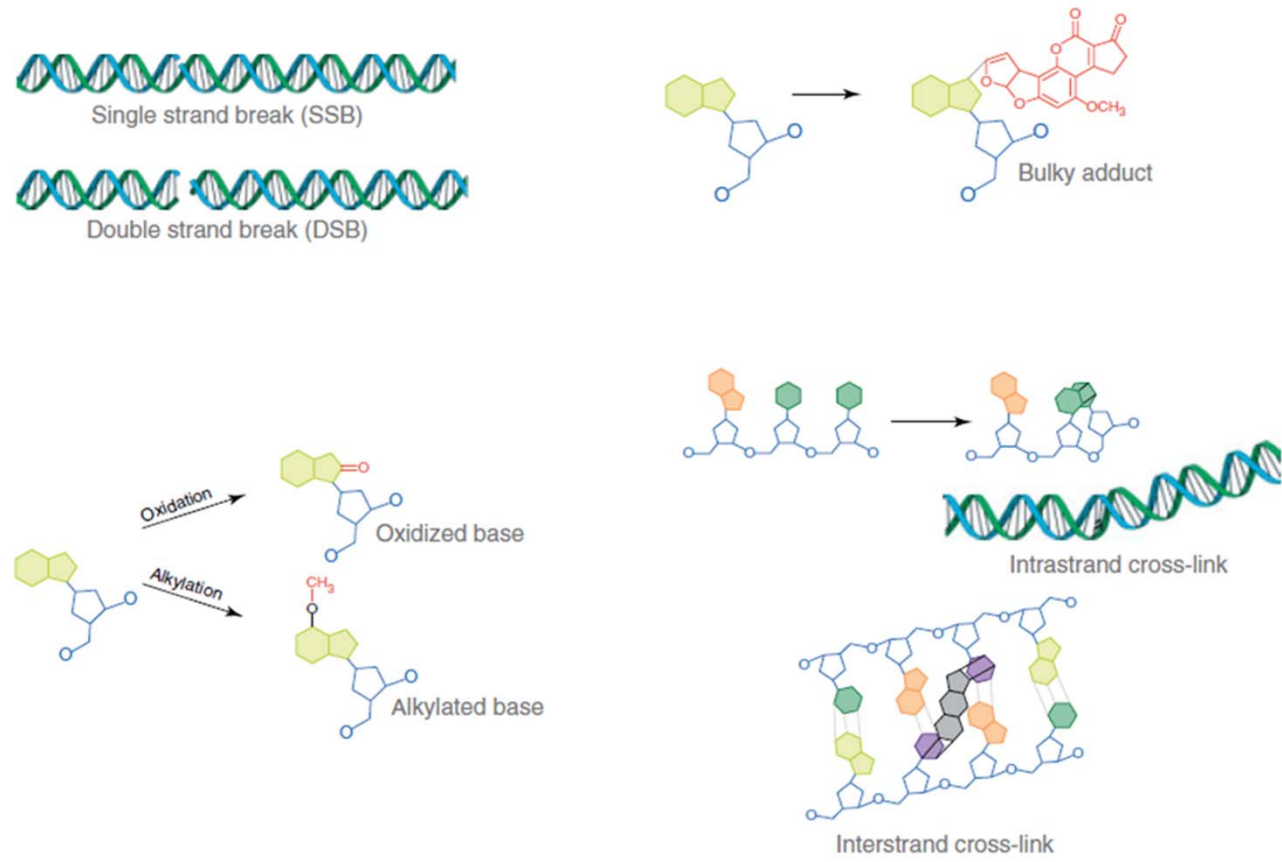


1. Introducción

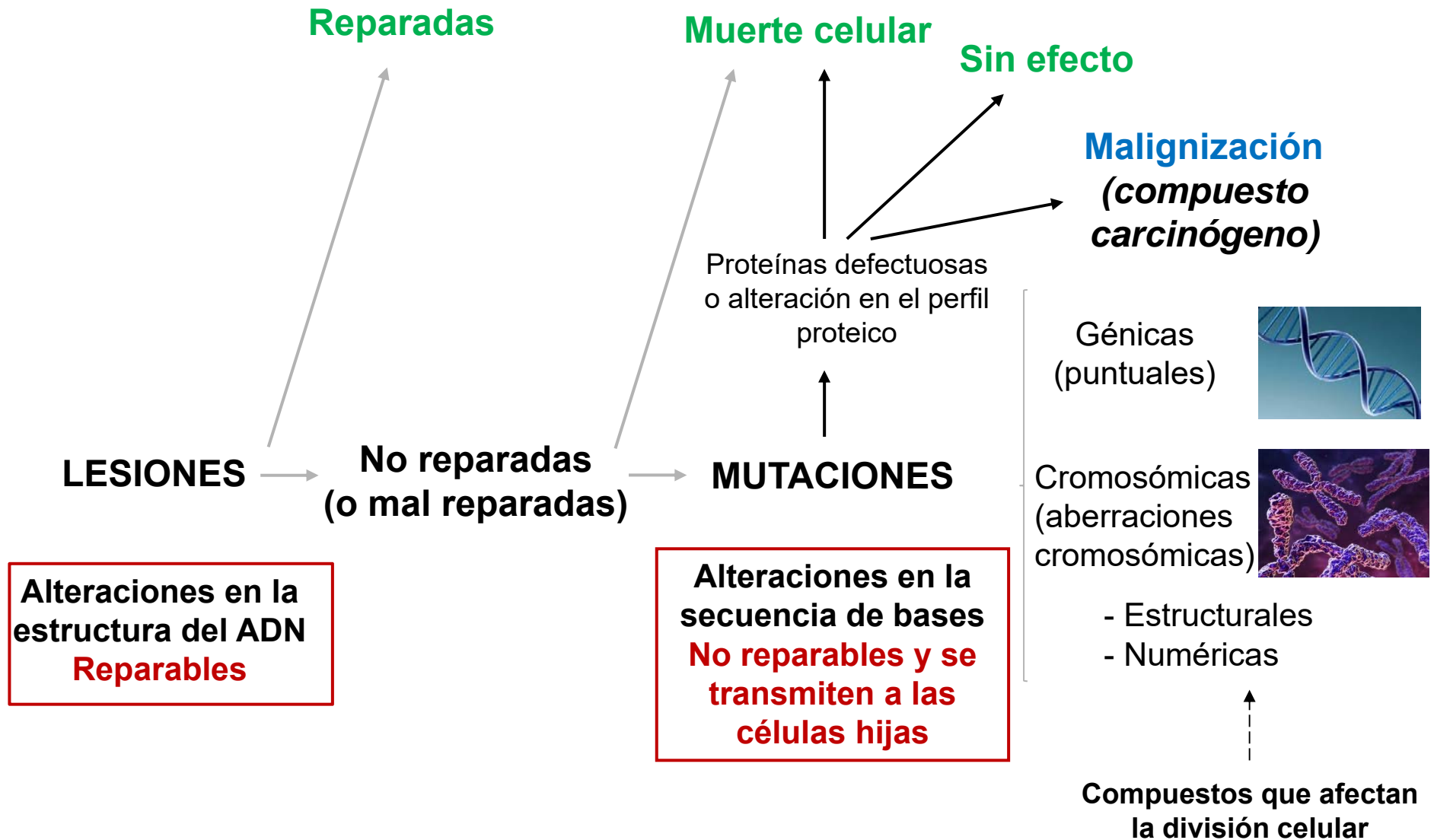


1. Introducción

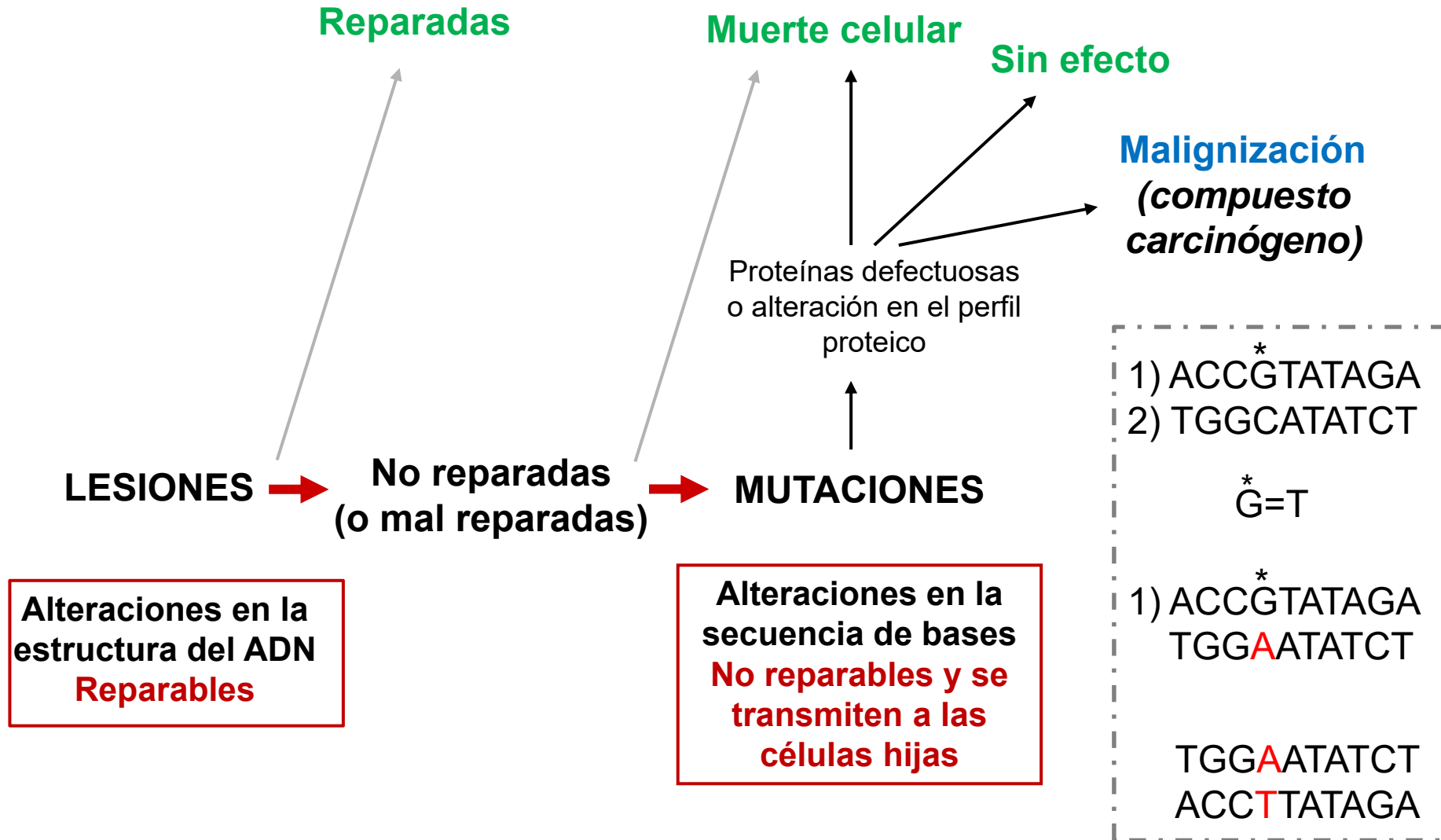
LESIONES



1. Introducción



1. Introducción



1. Introducción

- **Compuesto genotóxico:** aquel que induce lesiones o alteraciones en el ADN (incluyendo mutaciones)
- **Compuesto mutagénico:** aquel que induce mutaciones en el ADN

Todos los compuesto **mutagénicos** son **gentóxicos**, pero no todos los **genotóxicos** son **mutagénicos**

- **Compuesto carcinógeno:** aquel que induce la malignización de las células, es decir, que induce tumores

Muchos de los compuestos **mutagénicos** son **carcinógenos**, sin embargo hay compuesto **carcinógenos** que no son **mutagénicos** (disruptores endocrinos)

2. Ensayos y estrategia *in vitro*



Universidad
de Navarra

Objetivo de la evaluación de la genotoxicidad:

- Identificar sustancias que podrían causar daños hereditarios en humanos
- Predecir el potencial carcinógeno de una sustancia
- Contribuir a entender el mecanismo de acción de compuestos carcinógenos

Otras enfermedades (ejemplo: enfermedades cardiovasculares), abortos espontáneos, disminución de la fertilidad, envejecimiento

2. Ensayos y estrategia *in vitro*



Universidad de Navarra

LESIONES → → MUTACIONES

- Ensayo del cometa y sus modificaciones

In vitro e *in vivo*

OECD TG 489; *in vivo*

- Ensayo de fosforilación de la histona H2AX

In vitro e *in vivo*

- Técnicas analíticas

In vitro e *in vivo*

Génicas (puntuales)



- Test de Ames

In vitro

OECD TG 471

- Ensayos en células de mamífero: TK y HPRT/XPRT

In vitro

OECD TG 490 y 476

- Ensayo en roedores transgénicos

In vivo

OECD TG 488

Cromosómicas (aberraciones cromosómicas)



- Ensayo del micronúcleo

In vitro e *in vivo*

OECD TG 487 y 474

- Ensayo de aberraciones cromosómicas

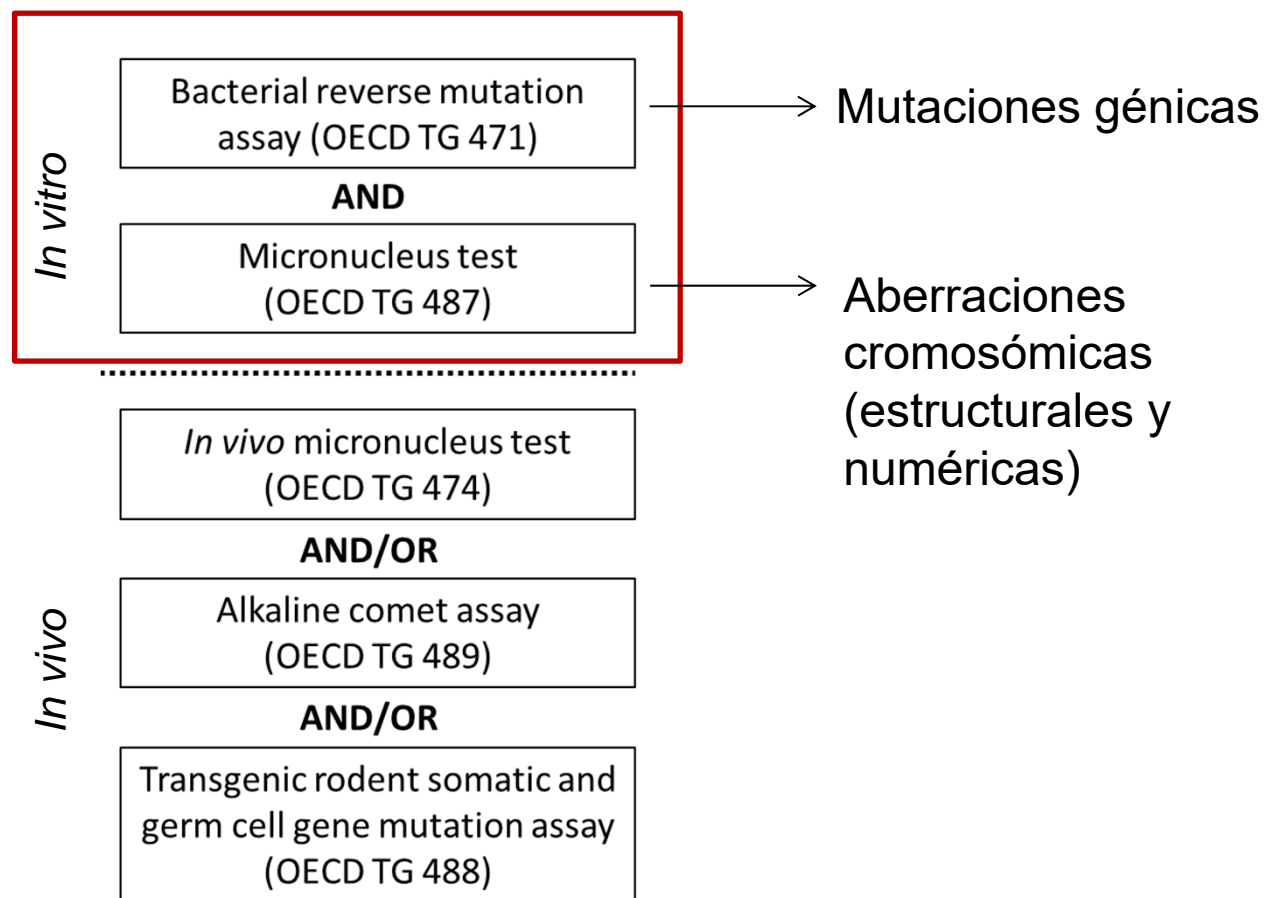
In vitro e *in vivo*

OECD TG 473 y 475

- Estructurales
- Numéricas

2. Ensayos y estrategia *in vitro*

EFSA 2011 (2012): *Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment.*



2. Ensayos y estrategia *in vitro*

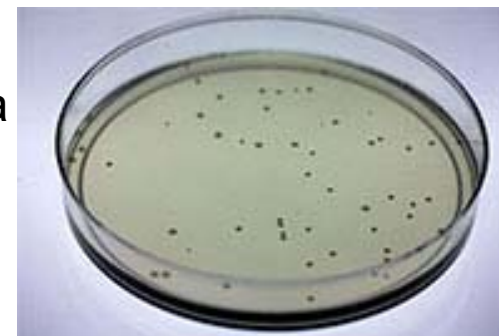


Universidad
de Navarra

EFSA 2011 (2012): Estrategia *in vitro*

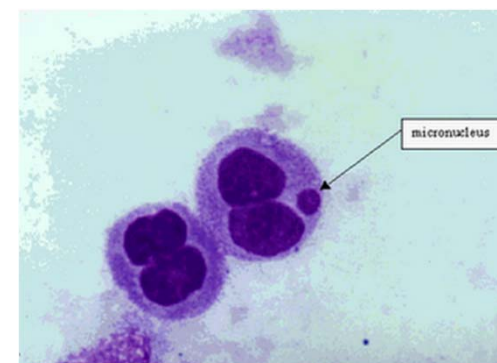
Test de Ames – OECD TG 471: mutaciones génicas

- Ensayo en bacterias
- Mutación en el gen de la histidina (His⁻); medio con histidina
- His⁻ + compuesto mutagénico = His⁺; medio sin histidina (Colonias revertientes)
- 5 estirpes bacterianas con diferente tipo de mutación (desfase, sustitución de bases...)



Ensayo del micronúcleo – OECD TG 487: mutaciones cromosómicas

- Ensayo en líneas celulares
- Formación de micronúcleos tras la división nuclear
- Aberraciones cromosómicas estructurales (compuesto clastógeno) o numéricas (compuesto aneúgeno)
- Tratamiento corto y largo



Citotoxicidad; Activación metabólica; Resultados positivos

2. Ensayos y estrategia *in vitro*



Universidad
de Navarra

EFSA 2011 (2012): *Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment.*

*‘In the event of negative in vitro results, it can be concluded that the substance has **no genotoxic potential**.*

*In case of inconclusive, contradictory or equivocal results, it may be appropriate to conduct **further testing in vitro**.*

*In case of positive in vitro results, review of the available relevant data on the test substance and, where necessary, **an appropriate in vivo study** to assess whether the genotoxic potential observed in vitro is expressed in vivo is recommended.’*

3. Genotoxicidad *in vitro* de nanomateriales

GUIDANCE

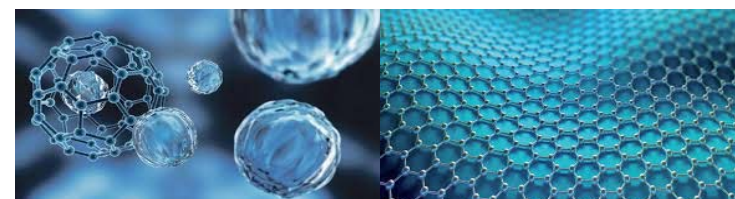
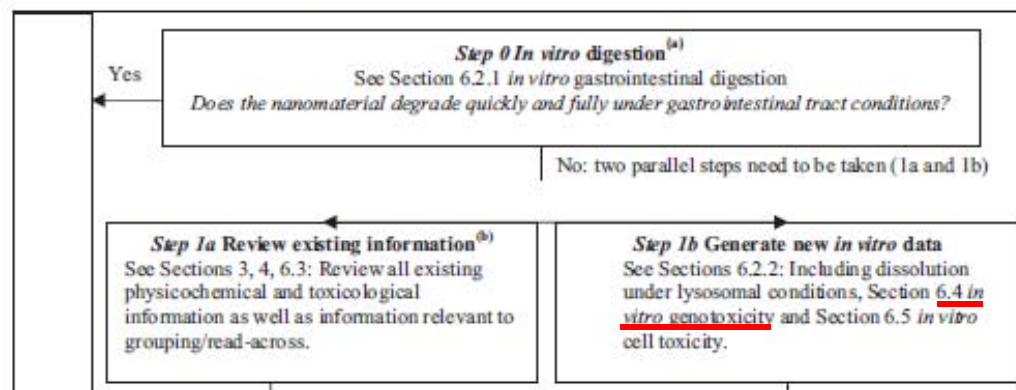
ENDORSED: 29 May 2018

doi: 10.2903/j.efsa.2018.5327

Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health

‘Materials, nano and non-nano may induce genotoxic damage by direct interaction with DNA, by disturbing the process of mitosis, or by producing reactive oxygen species’

6.1. Stepwise framework for nano-related hazard identification and characterisation in food/feed



3. Genotoxicidad *in vitro* de nanomateriales

GUIDANCE



ENDORSED: 29 May 2018

doi: 10.2903/j.efsa.2018.5327

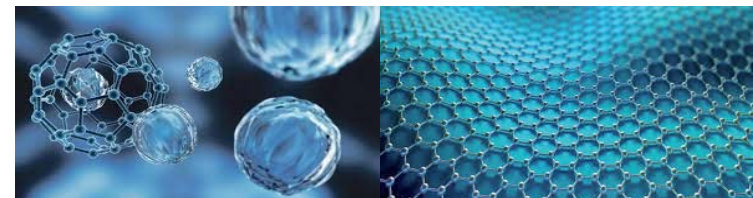
**Guidance on risk assessment of the application of
nanoscience and nanotechnologies in the food and feed
chain: Part 1, human and animal health**

- 1) Test de Ames – OECD TG 471:
mutaciones génicas
- 2) Ensayo del micronúcleo – OECD
TG 487: mutaciones cromosómicas
(estructurales y numéricas)

- Test de Ames no adecuado; problemas de penetración
- Cubrir todos los tipos de mutaciones: génicas y cromosómicas (estructurales y numéricas)

- 1) Ensayos de mutaciones génicas en células de mamífero, TK y HPRT/XPRT (OECD TG 476 y 490): Mutaciones génicas
- 2) Ensayo del micronúcleo (OECD TG 487): Mutaciones cromosómicas
**Consideraciones técnicas (revisión de la OECD TG 487)*

Información complementaria/mecanística:
ensayo del cometa *in vitro* modificado para
detectar bases oxidadas



3. Genotoxicidad *in vitro* de nanomateriales

GUIDANCE



ENDORSED: 29 May 2018

doi: 10.2903/j.efsa.2018.5327

Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health

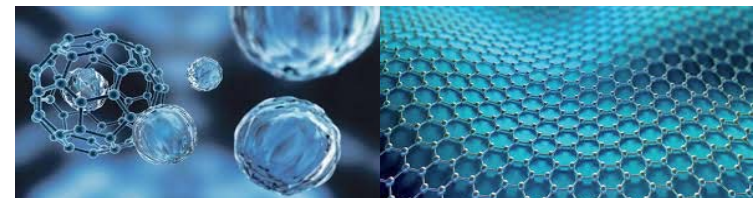
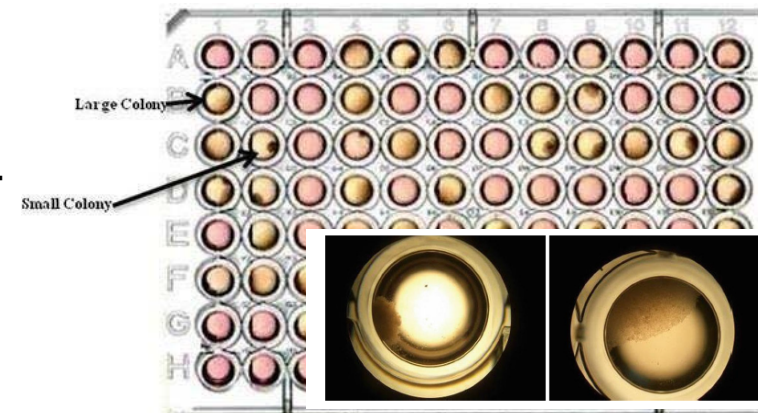
1) Ensayos de mutaciones génicas en células de mamífero, TK y HPRT/XPRT (OECD TG 476 y 490)

2) Ensayo del micronúcleo (OECD TG 487): Mutaciones cromosómicas (estructurales y numéricas)

1) Ensayo de mutaciones génicas en células de mamífero - TK (OECD TG 490):

- Ensayo en líneas celulares: L5178Y *tk*+/- 3.7.2C y TK6 *TK*+/-
- Las células que mutan de (tk)TK+/- a (tk)TK-/- son resistentes a los efectos citostáticos de trifluorotimidina (TFT) y, por tanto, son capaces de proliferar y formar colonias en su presencia.
- Tratamiento corto y largo (si corto negativo)
- Detecta aberraciones cromosómicas estructurales

Citotoxicidad; Resultados positivos



3. Genotoxicidad *in vitro* de nanomateriales

GUIDANCE



ENDORSED: 29 May 2018

doi: 10.2903/j.efsa.2018.5327

Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health

- Penetración celular (efectos directos e indirectos)
- Uso de activación metabólica, caso por caso

a) Negativo 1 y 2: NM no genotóxico

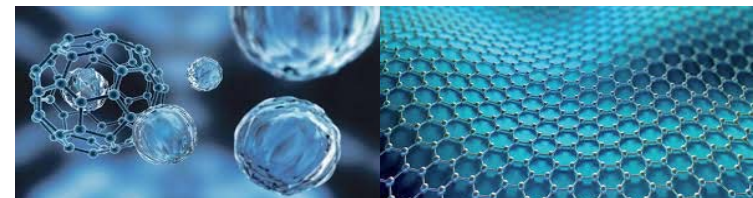
b) Positivo 1 y/o 2: ensayo/s *in vivo*

c) *In vitro* no apropiado: *in vivo*

1) Ensayos de mutaciones génicas en células de mamífero, TK y HPRT/XPRT (OECD TG 476 y 490)

2) Ensayo del micronúcleo (OECD TG 487): Mutaciones cromosómicas (estructurales y numéricas)

Desventaja sistemas *in vitro*: no detección de genotoxicidad indirecta por inflamación (ensayo del cometa *in vivo*)





Universidad
de Navarra



MINISTERIO
DE CONSUMO



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición

VIII REUNIÓN DEL GRUPO DE NANOTECNOLOGÍA EN EL ÁMBITO
ALIMENTARIO

¡GRACIAS POR VUESTRA
ATENCIÓN!

Amaya Azqueta
Departamento Farmacología y Toxicología

04/11/2020