

MEMORIA DEL PROYECTO DE TESIS

APARTADO A

A1. Título completo de la tesis

Desarrollo de una nueva estrategia de evaluación de genotoxicidad *in vitro* y su aplicación a ingredientes funcionales.

A2. Estado de la cuestión

El ser humano está expuesto a una gran cantidad de compuestos químicos, siendo la alimentación una de las principales vías de exposición. La mayoría de los alimentos pueden contener compuestos de origen intencionado, como los aditivos alimentarios, o no intencionado, como los contaminantes. Hoy en día, la seguridad de estos compuestos químicos es evaluada de forma exhaustiva por organizaciones como la *European Food Safety Authority* (EFSA), el *Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos y Contaminantes Alimentarios* (JECFA) y la *Food and Drug Administration* (FDA).

Recientemente, a la lista de compuestos añadidos de forma intencionada a los alimentos, se unen los ingredientes funcionales. Estos son compuestos químicos, muchos de origen natural, que se añaden a los alimentos porque presentan alguna actividad biológica, en principio beneficiosa para el consumidor. La legislación actual obliga a los productores de dichos productos a probar su eficacia, mientras que la evaluación de su seguridad no está regulada. Durante los últimos años la comunidad científica ha mostrado su preocupación al respecto y se han publicado muchos trabajos en los que se evalúa la genotoxicidad de estos compuestos (1-5), mostrándose en algunos casos resultados positivos (3, 5). Por todo ello, la evaluación toxicológica debe formar parte del proceso de desarrollo de ingredientes funcionales, no solo para demostrar la ausencia de efectos tóxicos tras el consumo de las dosis recomendadas, sino tras el consumo de dosis superiores. La exposición de la población a estos compuestos no está tan controlada como en el caso de los medicamentos; toda la población tiene acceso a ellos y muchos consumidores no son capaces de interpretar correctamente la información relacionada.

Entre los posibles efectos tóxicos, la genotoxicidad es un aspecto clave; indica el daño causado sobre el ADN, el cual puede ser irreversible y acumulable. Dichas lesiones pueden derivar en mutaciones génicas o alteraciones cromosómicas, que a su vez pueden dar lugar a defectos hereditarios o procesos cancerígenos. Existen diferentes ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* que detectan y miden diferentes tipos de efectos en el ADN, desde lesiones premutagénicas hasta mutaciones puntuales o cromosómicas, estas últimas tanto estructurales como numéricas.

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) publica guías para la realización de estudios *in vitro* e *in vivo* validados. En general, estos estudios detectan mutaciones, las cuales son el balance entre el daño inducido por el compuesto y la reparación del ADN. Esto implica que un resultado negativo puede ser debido a que la lesión producida en el ADN ha sido reparada. Además, de acuerdo con la OECD, la EFSA y la Agencia Europea Química (ECHA), conocer el mecanismo de acción de un compuesto es crucial para la realización de una evaluación de riesgo relevante. El único ensayo de genotoxicidad validado capaz de aportar algo de información mecanística es el ensayo del cometa (6), cuya guía ha sido aprobada reciente para la versión *in vivo* (7), estando en proceso de validación la versión *in vitro*.

El ensayo del cometa *in vitro* es un ensayo que detecta roturas en el ADN de células eucariotas (6); es sencillo y aplicable a cualquier tipo celular del cual se pueda obtener una suspensión celular o nuclear. En su versión estándar, la que cubre la guía OECD, detecta de forma muy sensible roturas en el ADN y lugares abásicos; desde pocos cientos (condiciones fisiológicas normales) hasta varios miles de pares de bases (roturas inducidas por un compuesto tóxico sin llegar a matar a la célula). La combinación del ensayo del cometa estándar con determinadas enzimas del sistema de reparación del ADN, específicas para la detección de diferentes lesiones, permite que se puedan detectar otras lesiones además de las roturas. La enzima formamidopirimina ADN glicosilasa (FPG), de origen bacteriano, ha sido utilizada con éxito en combinación con el ensayo del cometa. Esta enzima detecta bases púricas oxidadas (entre ellas las 8-oxoguaninas, una de las lesiones más importantes en el ADN) y algunas bases alquiladas. La utilización de esta enzima aumenta de manera drástica la sensibilidad del ensayo sin reducir su especificidad (8). De igual forma, se podrían utilizar enzimas de los sistemas de reparación de ADN para reconocer diferentes lesiones. Por otro lado, también se ha utilizado el ensayo del cometa en combinación con compuestos inhibidores del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER). Por ejemplo, la afidilcolina fue utilizada para medir los dímeros de pirimidina producidos por la luz UV(C) (9).

Por otro lado, la “toxicogenómica”, mediante el empleo de diferentes técnicas moleculares y de la transcriptómica, se ha popularizado en los últimos años en el campo de la toxicología, permitiendo el estudio de la expresión génica de las células ante la exposición de un compuesto químico. Así, se estima que los análisis de expresión génica *in vitro* se convertirán en el primer filtro durante la evaluación de los potenciales efectos adversos y determinación del mecanismo de acción de los compuestos químicos (10).

La Comisión Europea y los estados miembros, apoyados por muchas organizaciones e investigadores, están llevando a cabo una política de restricción de la utilización de animales de experimentación. A este respecto, se está haciendo mucho esfuerzo en el desarrollo y la validación de las llamadas técnicas *in vitro*.

A3. Hipótesis de partida y objetivo general

Actualmente, la parte *in vitro* de la estrategia para evaluar la genotoxicidad de medicamentos de uso humano de la *Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano* (ICH) (11) o la estrategia para evaluar aditivos alimentarios de la EFSA (12) incluyen diferentes ensayos. Sin embargo, estos no proporcionan información sobre la lesión primaria en el ADN (mecanismo de acción del xenobiótico), ya que son ensayos que miden mutaciones que son consecuencia de lesiones en el ADN no reparadas o mal reparadas. Además, no existe ninguna estrategia específica para evaluar la seguridad de ingredientes alimentarios funcionales.

Una nueva estrategia *in vitro* que combine ensayos capaces de detectar diferentes lesiones en el ADN, además de mutaciones génicas y cromosómicas, facilitaría la elucidación del mecanismo de acción del compuesto de estudio. Con ello, se aportarían datos mecanísticos integrados dentro de la actual evaluación de riesgo para la salud humana. El objetivo principal de esta tesis doctoral es desarrollar una nueva estrategia de evaluación de genotoxicidad *in vitro* que integre ensayos actualmente validados que detectan mutaciones puntuales y cromosómicas con el ensayo del cometa, que será modificado para detectar diferentes lesiones premutagénicas en el ADN (roturas, bases oxidadas, bases alquiladas, “cross-links” y aductos). Dicha estrategia se aplicará en este proyecto a ingredientes funcionales.

A4. Objetivos específicos

1. Selección de los compuestos de referencia para la puesta a punto y validación del ensayo del cometa y de la nueva estrategia de evaluación; y selección de los genes involucrados en diferentes procesos de respuesta al daño en el material genético.
2. Puesta a punto de las modificaciones del ensayo del cometa utilizando enzimas capaces de detectar diferentes lesiones en el ADN e inhibidores de la síntesis de ADN.
3. Relación de las lesiones detectadas en el ADN (objetivo 2) con cambios en la expresión de genes involucrados en la respuesta al daño genotóxico.
4. Integrar dichas modificaciones (objetivo 2) en un solo ensayo que será validado con productos de referencia. En función de los resultados de expresión obtenidos en el objetivo 3, se comprobarán los cambios de expresión de aquellos genes que se consideren de interés.
5. Diseñar una nueva estrategia para evaluar la genotoxicidad *in vitro* teniendo en cuenta el ensayo del cometa integrado (objetivo 4), el ensayo del micronúcleo y el test de mini-Ames (ambos según guías OECD).
6. Aplicar la nueva estrategia (objetivo 5) para evaluar la genotoxicidad *in vitro* de ingredientes funcionales.

A.5 Bibliografía

- 1) Sabini y col., Food Chem. Toxicol. 2013, 60:463-670.
- 2) Farsi y col., Clinics (Sao Paulo) 2013, 68(6):865-875.
- 3) Zan y col., J. Food Sci. 2013, 78(2):T367-371.
- 4) Nunes y col., Phytother. Res. 2013, 27(10):1495-1501.
- 5) Demma y col., Phytother. Res. 2013, 27(4):507-514.
- 6) Azqueta y Collins, Arch. Toxicol. 2013, 87: 949-968.
- 7) OECD Test Guideline 489. In vivo mammalian alkaline comet assay, 2016. In: OECD Guidelines for testing of chemicals (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>)
- 8) Azqueta y col., Mutagenesis 2013, 28: 271-277.
- 9) Gedik y col., Int. J. Radiat. Biol. 1992, 62: 313-320.
- 10) Yauk y col., Environ. Mol. Mutagenesis. 2016, 57: 243-260.
- 11) ICH Publishing 2011, Guideline S2 (R1).
- 12) EFSA Journal 2012; 10(7):2760.