

# **AVALTOX**

**Avaluació experimental de la toxicitat. Estudis de carcinogènesi i genotoxicitat.**

**Guió de l'activitat**

***Jesús Gómez Catalán***

***Joan M Llobet Mallafré***

**Grup d'Innovació Docent ORFILA**

**Universitat de Barcelona**

# Avaluació experimental de la toxicitat. Estudis de carcinogènesi i genotoxicitat.

**Atenció: abans de posar-te davant l'ordinador has de haver llegit:**

- 1) aquest guió.
- 2) el resum de l'estudi de toxicitat subcrònica, carcinogènesi i mutagènesi de l'acrilonitril que figura en el fitxer "ACN\_resum.pdf" (o a la web [NTP-ACN-resum](#) ). No és necessari que entenguis els detalls de la histopatologia.
- 3) repassar els temes corresponents a avaluació de la toxicitat de la assignatura de Toxicologia

## **Objectius docents**

- a) *Analitzar uns estudis experimentals d'avaluació de genotoxicitat i de la carcinogènesi, incidint en el seus dissenys i en les línies directrius que els regulen*
- b) *Entendre i aplicar els mètodes estadístics adequats als resultats experimentals*
- c) *Aprendre a fer una valoració crítica dels resultats, treure unes conclusions i proposar possibles estudis alternatius o complementaris.*

## ***Feina davant l'ordinador (4-6 hores treball no presencial)***

- a) *Fer un repàs, amb l'ajut d'un programa d'ordinador, dels aspectes fonamentals del disseny dels estudis de carcinogènesi i de genotoxicitat*
  - b) *Aplicació de mètodes estadístics per l'anàlisi de resultats.*
  - c) *Respondre uns qüestionaris.*
- 

## **1.- Introducció general**

La toxicitat es pot avaluar experimentalment en dues fases ben diferenciades del desenvolupament d'un nou fàrmac:

1- Durant la **fase de "screening" (cribratge)**: tenim un gran nombre de candidats i es vol descartar els (potencialment) més tòxics. En aquesta fase es pot emprar qualsevol metodologia que mereixi la confiança de l'experimentador (mètodes "in vitro", HTS, genòmica, proteòmica, relacions estructura-activitat, ...).

2- Durant la **fase preclínica**: s'han d'aplicar mètodes acceptats per la legislació (europea), i complir BPL's (Bones Pràctiques de Laboratori). A més, es tenen que seguir unes directius "d'harmonització" (pactades entre USA, Japó i Europa) respecte número, tipus, i calendari dels assaigs:

Els mètodes acceptats per la legislació europea es basen en les "guidelines" de l'OCDE ( [OECD Guidelines](#) ). Per seguir aquesta activitat és necessari que et llegeixis les [guidelines corresponents a l'assaig de carcinogènesi](#) i [l'assaig de mutagènesi en bacteris](#) .

No hi ha prou amb saber quins son els mètodes acceptats. Han de haver-hi línies directrius / criteris que indiquin quins mètodes son els més adients en cada cas, amb quines/quantas espècies es te que fer, .... Informació al respecte es pot trobar a la web de la [Agència Europea del Medicament \(EMA\)](#). Especialment, és interessant que llegeixis els documents:

[Avaluació de carcinogènesi de medicaments \(2013\)](#)

[Bateria mínima d'assaigs de genotoxicitat](#)

Aquestes línies directrius s'han establert en el sí d'un organisme tripartit format per representants de USA, Japó i Europa: International Conference on Harmonization (ICH). La seva web: <http://www.ich.org/home.html>

A Europa hi ha un organisme ("European Centre for the Validation of Alternative Methods", ECVAM) encarregat d'avaluar i validar possibles mètodes alternatius d'assaig de la toxicitat ([ECVAM](#)).


## **2.- El nostre cas concret**

El document "[ACN\\_resum.pdf](#)" resumeix un estudi de toxicitat subcrònica (14 setmanes) i un estudi de carcinogènesi (2 anys) i uns estudis de genotoxicitat de l'**acrilonitril** realitzat pel National Toxicology Program (NTP). El mateix document el pots baixar de [NTP-ACN-resum](#) .

L'acrilonitril no és un medicament, però degut a les seves aplicacions hi ha un risc d'exposició crònica en humans i per tant és important avaluar el seu potencial carcinogènic i mutagènic.

Per mitjà el "programa" **AVALTOX-6** (en realitat És un arxiu Excel® una mica enrevessat) repassarem el diferents aspectes del disseny dels estudis de carcinogènesi i del test d'Ames i analitzarem alguns dels resultats corresponents a l'estudi de l'acrilonitril. La part una mica "complexa" d'aquesta activitat serà l'anàlisi estadística dels resultats.

## **3.- Com fem la pràctica?**

Obre l'arxiu **AVALTOX-6.xlsx**. Aquest és l'arxiu que et guiarà durant tota la pràctica. Segueix pas per pas, ordenadament, les preguntes i els enllaços (*links*, indicats per una fletxa  , o [text subratllat](#)) que apareixen en cada fulla. Les fletxes de color vermell indiquen les "vies principals". Les de color verd indiquen vies secundàries o de tornada enrere. Les de color blau indiquen enllaços de Internet. Les de color negre indiquen enllaços amb arxius complementaris.

L'arxiu està protegit i només pots escriure les respostes en les caselles de color groc clar. Quan escriguis la resposta (+ return), altres caselles es modificaran automàticament (OK!,

error, resultat del càlcul, ...). **Atenció!** en molts casos quan encertis una resposta apareixeran **enllaços nous**: segueix-los (les preguntes estan numerades, pots comprovar fàcilment si t'has saltat alguna).

Algunes caselles incorporen un quadre de comentari explicatiu (indicat per un petit triangle vermell en la **cantonada superior dreta** ) que s'obre quan el cursor està a sobre.

A lo llarg d'aquesta pràctica:

- Respondràs una sèrie de preguntes, la majoria amb 4 opcions, autocorrecció i text o figures explicatives relatives al disseny d'aquests tipus d'estudis
- Faràs una **anàlisi estadística** de part dels resultats de l'**estudi de carcinogènesi** i del **test d'Ames**. Els resultats els pots copiar-pegar a un arxiu *word* o *excel* però també els pot apuntar a les taules d'aquest guió de pràctiques.
- Respondràs uns qüestionaris relatius a la interpretació dels resultats.

#### **4.- Respecte a l'anàlisi estadística dels resultats de l'estudi de carcinogènesi**

Arribarem a un punt del programa en que trobarem les dades corresponents a cinc tipus de tumor en els ratolins mascles tractats amb tres nivells de dosi d'acrilonitril (més un control negatiu). Es tracta de determinar si l'acrilonitril produeix o no aquests tipus de tumor. El programa permet aplicar fàcilment els tests de Chi-quadrat i el test exacte de Fischer.

identif	dias	dosis (mg/kg)	intestino delgado		estómago			t* (t/tmax)*3	Σ	Σ
			carcinoma	limfoma maligno	carcinoma cel. Escamosas	papiloma cel. Escamosas	papiloma múltiple			
1	731	0	0	0	0	0	0	0.996		
2	732	0	0	0	0	0	0			
3	528	0	0	0	0	0	0			
4	723	0	0	0	0	0	0			
5	732	0	0	0	0	0	0			
6	731	0	0	0	0	0	0			
7	730	0	0	0	0	0	0			

tipo de tumor	correcció poly-3 (supervivència)		SI / NO	posit/total
	POSITIVOS	NEGATIVOS		
CONTROL		0		
DOSIS 1		0		
DOSIS 2		0		
DOSIS 3		0		
TOTAL		0		0

**datos de los animales** (arrow pointing to animal data table)

**celdas disponibles para cálculos con Excel** (arrow pointing to t\* column)

**tabla de frecuencias** (arrow pointing to frequency table)

**CONTINUAR** (arrow pointing right)

#### **4.1. Anàlisi de Freqüències**

En els estudis de carcinogènesi, com en alguns altres assaigs de toxicitat, els resultats son freqüències d'aparició d'un efecte (incidència de un tipus de tumor) a diferents nivells de dosi. Per tant hem d'aplicar mètodes estadístics d'anàlisi de freqüències per determinar si aquestes són significativament superiors en els grups tractats.

El mètode més senzill es el test de Chi-quadrat ( $\chi^2$ ). Es té que construir una taula FxC (F files: grups de dosi; C= 2 columnes: positius / negatius) amb el nombre animals en cada cas:

	positiu	negatiu	total
control	Po	No	To
dosi 1	P1	N1	T1
dosi 2	P2	N2	T2
dosi 3	P3	N3	T3
total	Pt	Nt	Tt

Es calcula  $\chi^2$  (*el programa ho calcula automàticament*):

$$\chi^2 = (Tt^2/PtNt)(Po^2/To + P1^2/T1 + P2^2/T2 + P3^2/T3 - Pt^2/Tt)$$

El valor de  $\chi^2$  obtingut es compara amb la taula. **Si es superior al tabulat per (F-1)\*(C-1) graus de llibertat** [ (4-1)\*(2-1) = 3 ] i  $p < 0.05$ , es considera que hi ha associació significativa entre els nivells de dosi i la incidència de tumors.

El mateix anàlisi es pot fer considerant només comparacions entre el grup control i cadascú dels nivells de dosi. Per exemple:

	positiu	negatiu	total
control	Po	No	To
dosi 2	P2	N2	T2
total	Po + P2 = Pt	No + N2 = Nt	To + T2 = Tt

Es calcula  $\chi^2$  i es compara amb el valor tabulat per **a un grau de llibertat** [ (2-1)\*(2-1)].

$$\chi^2 = (Tt^2/PtNt)(Po^2/To + P2^2/T2 - Pt^2/Tt)$$

Això permet determinar si hi ha diferència significativa entre les freqüències del grup control i el segon nivell de dosi. **Per poder utilitzar aquest test, cap freqüència ha de ser menor de 5**. Si hi ha alguna freqüència inferior a 5 es tindria que fer servir el **test exacte de Fischer (implementat al programa; dona directament el valor de p)**.

#### Taula de $\chi^2$ (està implementada al programa)

GL	p = 0.05	P = 0.01	P = 0.001
1	3.84	6.64	10.83
2	5.99	9.21	13.82
3	7.82	11.35	16.27
4	9.49	13.28	18.47
5	11.07	15.09	20.52
6	12.59	16.81	22.46
7	14.07	18.48	24.32
8	15.51	20.09	26.13

#### 4.2. Correcció de la supervivència

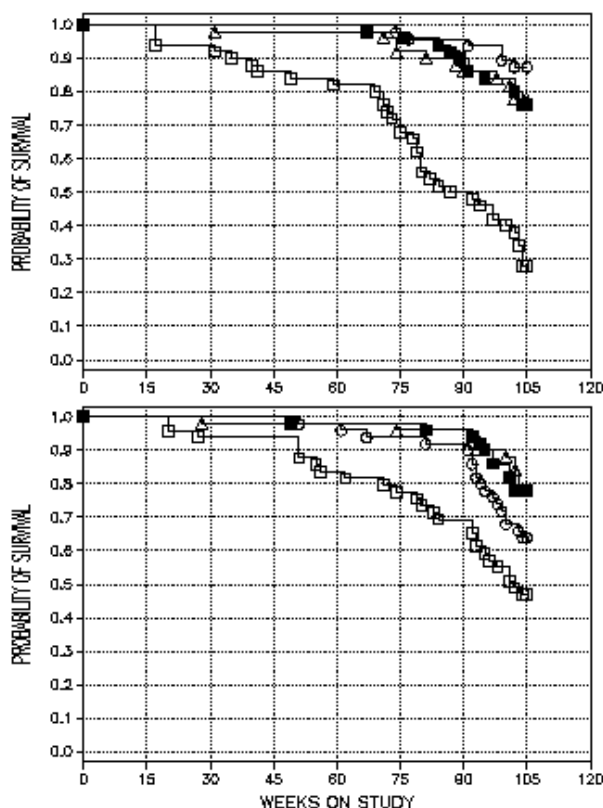
El test de  $\chi^2$  compara les freqüències de tumors respecte al nombre total d'individus en cada grup de dosi. Però això no és totalment vàlid en el cas d'estudis crònics en que una part dels animals moren a lo llarg de l'estudi i amb patologies com les tumorals que són més probables a mesura que augmenta l'edat. En el cas que ens ocupa, es evident que la supervivència del grup de dosi elevada (20 mg/kg) es menor que la resta (**veure figura**); per tant, una incidència de **x** tumors d'un determinat tipus sobre 50 animals (**x/50**) està

infravalorada perquè part dels animals han mort prèviament per altra patologia (**N final < 50**) i no han tingut oportunitat de desenvolupar el tumor corresponent.

ACRYLONITRILE  
ROUTE: GAVAGE  
EXPT: 50215  
TEST: 03

MALE MICE  
■ 0 MG/KG  
○ 2.5 MG/KG  
△ 10 MG/KG  
□ 20 MG/KG

FEMALE MICE  
■ 0 MG/KG  
○ 2.5 MG/KG  
△ 10 MG/KG  
□ 20 MG/KG



Produced on 03NOV00 at 8:18:32

Aquest fet es pot corregir aplicant diferents mètodes. Un dels més simples és el conegut com "**poly-3**" que consisteix en calcular un "nombre" ajustat d'animals per grup en funció de la supervivència:

$$Ti^* = \sum_k (t_k/t_{max})^3$$

$t_k$  = supervivència del animal  $k$ , si no desenvolupa la patologia en estudi  
 $t_k = t_{max}$ , si desenvolupa la patologia en estudi

Es a dir, el "nombre ajustat" d'animals en el grup de dosi  $i$  es calcula com la suma del quocients entre la durada de cada animal  $k$  del grup i la durada màxima, elevats al cub (és evident que si tots els animals viuen fins al final del experiment  $Ti^* = Ti$ ). Aquest valor  $Ti^*$  substituirà al corresponent  $Ti$  en la taula de freqüències i en càlcul de  $\chi^2$ . Amb el full de càlcul es molt fàcil calcular els valors  $(t_k/t_{max})^3$  i la seva suma per cada grup de dosi.

**Molt Important!!**. Aquesta correcció estadística de la supervivència **no** permet corregir un possible defecte de disseny de l'estudi: en un estudi de carcinogènesi les dosis assajades no poden ser massa tòxiques perquè llavors el possible increment de tumors pot ser conseqüència de la mala salut dels animals i no de l'efecte cancerigen del producte. Una mortalitat elevada pot ser indicativa d'una toxicitat excessiva.

### 4.3. Relació dosi-resposta

Les freqüències també es poden representar vs la dosi per obtenir una corba Dosi-Resposta. La demostració d'una relació dosi-resposta significativa és un argument important per a caracteritzar el potencial cancerigen d'una substància. Existeixen mètodes estadístics més o menys sofisticats per analitzar l'existència d'una "tendència" significativa en els resultats del estudis de carcinogènesi. Nosaltres aplicarem una simple anàlisi de correlació. Prèviament aplicarem una transformació a les freqüències per expressar-les en unitats "pròbit" (**en el programa hi ha un enllaç que porta a una explicació de la transformació pròbit**). Això té l'avantatge de que, normalment, linealitzza apreciablement la corba dosi-resposta, i pot ser ajustada amb una recta. Comparant el coeficient de correlació amb el tabulat per N-2 graus de llibertat, podrem determinar si la correlació és significativa. (Atenció!: quan es fa l'anàlisi en unitats pròbit, els punts amb probabilitat 0 i 100% no es poden incloure perquè donen  $\pm$ infinit. Hi ha una "solució": considerar que han donat positiu 0.25 o T-0.25 animals, respectivament; aquesta aproximació ja la fa el programa automàticament).

### 4.4. Exercici

Comprova, aplicant el full de càlcul del programa, que pel **carcinoma de cèl·lules escatoses d'estómac** (sense i amb correcció de supervivència) obtens els resultats que apareixen en la **taula 1**. Després aplica-ho a **un altre** dels restants quatre tipus de tumor recollits en el full de càlcul. Anota els resultats a la **taula 2**:

**Taula 1**

tumor:	carcinoma cel. escatoses	correcc. poly-3	NO
Po/P1/P2/P3:	0 / 1 / 8 / 10	No/N1/N2/N3:	50 / 49 / 42 / 40
$\chi^2$ total	NO APLICABLE	signif.:	---
$\chi^2$ dosi1/control	NO AP	signif.:	0.50 (Fischer)
$\chi^2$ dosi2/control	NO AP	signif.:	0.0029 (Fisher)
$\chi^2$ dosi3/control	NO AP	signif.:	0.0006 (Fisher)
coeficient corr.	0.915	signif.:	NO
tumor:	carcinoma cel. escatoses	correcc. poly-3	SI
Po/P1/P2/P3:	0 / 1 / 8 / 10	No/N1/N2/N3:	46.0 / 44.9 / 38.4 / 23.7
$\chi^2$ total	NO APLICABLE	signif.:	--
$\chi^2$ dosi1/control	NO AP	signif.:	0.499 (Fisher)
$\chi^2$ dosi2/control	NO AP	signif.:	0.0029 (Fisher)
$\chi^2$ dosi3/control	NO AP	signif.:	0.0001 (Fischer)
coeficient corr.	0.953	signif.:	< 0.05

**Taula 2**

tumor:		correcc. poly-3	NO
Po/P1/P2/P3:		No/N1/N2/N3:	
$\chi^2$ total		signif.:	
$\chi^2$ dosi1/control		signif.:	
$\chi^2$ dosi2/control		signif.:	
$\chi^2$ dosi3/control		signif.:	
coeficient corr.		signif.:	
tumor:		correcc. poly-3	SI
Po/P1/P2/P3:		No/N1/N2/N3:	
$\chi^2$ total		signif.:	
$\chi^2$ dosi1/control		signif.:	
$\chi^2$ dosi2/control		signif.:	
$\chi^2$ dosi3/control		signif.:	
Coeficient corr.		signif.:	

## **5.- Estudi de Genotoxicitat**

Al document "**ACN\_resum.pdf**" es presenta el resum de diversos assaigs de genotoxicitat de l'acrilonitril. Entre d'altres es realitza un test d'Ames (mutacions gèniques en *Salmonella typhimurium*) Aquest últim té un disseny compatible amb la normativa europea.

Nosaltres analitzarem únicament alguns dels resultats del test d'Ames, però cal recordar que **per avaluar el risc genotòxic/mutagènic d'una substància és necessari realitzar una bateria d'assaigs, que cobreixi diferents tipus de resposta (mutacions gèniques i clastogènesi) en diferents tipus d'organismes o dissenys (eucariota/procariota; in vivo/in vitro; taula 3).** L'Agència Europea del Medicament ha establert directrius per la confecció d'una bateria mínima pel registre de nous medicaments.



**Taula 3. Alguns assaigs de genotoxicitat**

Resposta	Organismo / Cèl·lula	Assaig (exemple)
<b>a) Lesió / Reparació ADN</b>		
Adductes	bacteris	1.- Detecció de adductes o nucleòtids modificats
Reparació	bacteris	2.- Inducció de Resposta SOS
	cèl·lules "in vitro"	3.- Síntesi d'ADN no programada (UDS)
	mamífer "in vivo"	
<b>b) Mutació de seqüència (Gènica)</b>		
mutacions puntuals o multilocus	bacteris	4.- Test de Ames
	cèl·lules "in vitro"	5.- Mutants HGPRT / TK / ATPases (també respon a mecanismes clastogènics)
	mamífer "in vivo"	6.- Ratolins transgènics lacZ
<b>c) Alteracions dels cromosomes</b>		
Aberracions cromosòmiques (clastogènesi)	cèl·lules "in vitro"	7.- Anàlisi del cariotip
	mamífer "in vivo"	
	cèl·lules "in vitro"	8.- Assaig de micronuclis
	mamífer "in vivo"	
translocacions entre cromàtides	cèl·lules "in vitro"	9.- Intercanvi de cromàtides germanes
	mamífer "in vivo"	

### 5.1. Anàlisi estadística dels resultats del Test d'Ames

El test d'Ames ha estat realitzat amb diverses soques de *Salmonella typhimurium*, amb cinc nivells de dosi (més dos controls, positiu i negatiu) i per triplicat.

L'anàlisi estadística dels resultats pretén determinar si existeixen diferències significatives entre el nombre de colònies desenvolupades amb diferents nivells de dosi. Nosaltres aplicarem la prova de la t de Student per determinar si hi ha diferències entre les mitjanes obtingudes en els triplicats, a diferents dosis.

També es pot fer una anàlisi de la corba dosi-resposta i comprovar si es troba una correlació significativa. Degut a l'ampli marge de valors de dosi, aquesta es representa transformada en logaritme de la dosi.

El programa permet fer aquests tests fàcilment.

Vamos a analizar unos resultados parciales del Test de Ames aplicados al acrilonitrilo. Uno por uno, analizaremos los resultados correspondientes al ensayo con la cepa TA-100 sin bioactivación, TA-100 con bioactivación y TA-1535 con bioactivación. Los resultados están disponible en el guión de la práctica

Introduce los datos que figuran en el guión de prácticas

Cepa												
activación		si / no /%					P (prueba de t-Student)					
DOSIS	logDosis	COLONIAS					dosis					Δ COLONIES
μg/placa		PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3	mitjana	S.D.	0	0	0	0	0	
0												#DIV/0!
												#DIV/0!
												#DIV/0!
												#DIV/0!
												#DIV/0!
control +												

A continuació figuren els resultats obtinguts al aplicar el test d'Ames a l'acrilonitril amb la soca TA100 amb i sense activació i amb la soca TA1535 amb activació (taules 4.1, 4.2 i 4.3). **Introdueix-los successivament en el full de càlcul i anota els resultats.**

Taula 4.1.

Soca: TA100		activació: NO			Mitjana±SD	coef. corr: signif:
dosi (ug/placa)	placa 1	placa 2	placa 3			
0	95	99	102		P (prova t-Student) respecte al control negatiu	
100	92	98	101			
333	89	99	98			
1000	92	97	103			
3333	99	105	106			
6666	88	91	99			
control positiu	1110	1190	1185			

Taula 4.2.

Soca: TA100		activació: SI 30% hámster S9			Mitjana±SD	coef. corre: signif:
dosi (ug/placa)	placa 1	placa 2	placa 3			
0	115	120	110		P (prova t-Student) respecte al control negatiu	
100	120	130	125			
333	150	160	171			
1000	251	262	271			
3333	359	370	379			
6666	435	428	441			
control positiu	1115	1129	1103			

Taula 4.3.

Soca: TA1535		activació: S1 10% rata S9		Mitjana±SD	coef. corr: signif:
dosi (ug/placa)	placa 1	placa 2	placa 3		
0	10	11	13		P (prova t-Student) respecte al control negatiu
100	14	13	16		
333	24	21	19		
1000	29	35	22		
3333	38	42	41		
6666	5	6	3		
control positiu	121	117	125		

## 6.- PREGUNTES ADDICIONALS

L'enllaç 3 et portarà a tres pàgines amb preguntes addicionals que et permetran comprovar i autoavaluar els teus coneixements.

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA TOXICIDAD  
CARCINOGENESIS Y GENOTOXICIDAD  
Diseño Experimental y Análisis de Resultados

Esta es la "página índice principal". Sigue ordenadamente los enlaces.  
En primer lugar analizaremos el estudio de carcinogénesis (1); después el estudio de mutagénesis mediante el test de Ames (2). Posteriormente se responden unas preguntas sobre la valoración de los resultados obtenidos (3).

[1: ENSAYO DE CARCINOGENESIS](#) →

[2: ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD: TEST de AMES](#) →

[3: MAS PREGUNTAS](#) →

Finalmente habria que elaborar un informe. Puedes ver como es el informe "real" completo del estudio original de NTP en el enlace inferior.

Nosotros responderemos un cuestionario-test con respuestas múltiples que sigue el esquema de contenidos de un informe (4).

[4: TEST - INFORME FINAL](#) →

[Informe NTP "REAL" completo](#) →

Per acabar, ves al punt 4 i respon el qüestionari (arxiu excel "AVALTOX-6-QUEST"). Una vegada complimentat el pugues (només el qüestionari "AVALTOX-6-QUEST" ) al campus virtual.

Aquesta activitat d'autoaprenentatge ha estat dissenyada i realitzada pels professors del **Grup d'Innovació Docent ORFILA (UB)**.

Preguntes i suggeriments: [jesusgomez@ub.edu](mailto:jesusgomez@ub.edu)