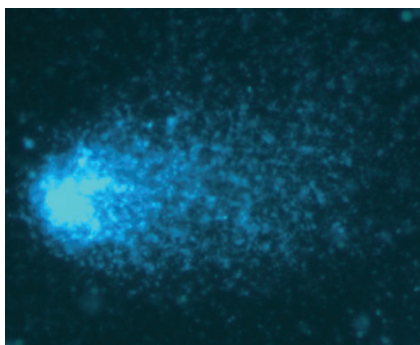

COMET ASSAY



DEFINICIÓ

Test de genotoxicitat (*in vitro/in vivo*) per a la detecció de la fragmentació de l'ADN en cèl·lules individuals, per tal d'avaluar els efectes genotòxics o l'activitat antigenotòxica (protectora) front un potencial agent clastogènic.

END-POINT

Fragmentació de l'ADN.

MOSTRA

Suspensió cel·lular (limfòcits circulants, teixit o cultiu cel·lular).

INTRODUCCIÓ

El *Comet assay* o "Electroforesi de cèl·lules individuals en gel d'agarosa (*Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE)" és un mètode estàndar de genotoxicitat *in vivo/in vitro*, que permet avaluar d'una forma simple el dany produït per un agent clastogènic, mitjançant la mesura de trencaments en la cadena d'ADN de cèl·lules animals i vegetals.

Aquest test es perfila en els darrers anys com una alternativa avantatjosa al MNT (Test de Micronuclis) i és fonamental en estudis de mesura tant del dany com reparació de l'ADN.

El nom comú "*Comet assay*" ve donat degut a l'espectacular morfologia de les figures observades, que recorden la forma d'un cometa, la cua del qual estaria formada pels fragments d'ADN.

TÈCNICA

El test consisteix en sotmetre una suspensió cel·lular de puresa i concentracions adequades (procedent de mostres animals/vegetals o cultius cel·lulars exposats a un tòxic o a una barreja de tòxics) i englobada en un gel d'agarosa aplicat sobre un portaobjectiu, a una lisi alcalina, a un tractament per desenrotllar l'ADN i a una migració electrofòretica de curta durada. L'ADN tenyit amb un fluorocrom apropiat és observat mitjançant un microscopi de fluorescència. El material genètic no danyat romandrà *in situ* en forma esfèrica, però, en cas d'haver-se produït fragmentació del mateix, els fragments de menor mida migraran una certa distància, produint-se una imatge semblant a la cua d'un cometa. El dany en l'ADN és quantificat pel percentatge de fluorescència a la cua o pel "*tail moment*" (% d'ADN a la cua per longitud de la cua).

Existeixen diferents variants per dur a terme el *Comet assay*. Les més comuns són les tres següents:

1. *Alkaline Singles-Cell Gel Electrophoresis*

La realització de l'electroforesi en condicions alcalines fa que les cues siguin més pronunciades i permet detectar un rang de dany "útil" més extens.
Trencaments d'ADN monocatenari.

2. *Neutral Single-Cell Gel Electrophoresis*

Procediment per a la detecció de nivells baixos de fragmentació de l'ADN.
Després d'un període de tractament alcalí, es restaura l'electroforesi a condicions neutrals, la qual cosa disminueix la sensibilitat i amplia el rang "útil" de l'assaig.
Trencaments d'ADN bicatenari.

3. *Use of Lesion-Specific Enzymes*

En aquesta variant, s'inclou un pas més a l'assaig: digestió dels nucleòids per enzims que reconeixen un tipus de dany particular, produint un tall. D'aquesta manera s'augmenta l'especificitat i sensibilitat de l'assaig.

Recalcar algunes de les avantatges d'aquest test:

- Permet detectar lesions diferents als "trencaments de la cadena d'ADN", tot incloent un pas més (on l'ADN és incubat amb una endonucleasa lesió-específica), com ara la inducció de dímers de pirimidina, oxidació de bases o alquilacions per raigs ultravioleta (UV).
- El fet de no ser necessari un procés d'extrusió nuclear, permet utilitzar qualsevol tipus cel·lular, la qual cosa facilita la identificació de les cèl·lules diana del xenobiòtic en qüestió.
- Des del punt de vista ecotoxicològic, és rellevant la possibilitat de treballar amb tot tipus d'organismes (fongs, vegetals, protozous i animals vertebrats o invertebrats).
- És més sensible i versàtil que altres tests amb *endpoints* similars (com ara el Test de Micronuclis o el Test d'Aberracions cromosòmiques).

En definitiva, es tracta d'un mètode sensible que proporciona respostes a qüestions importants referents als nivells basals de dany en el material genètic de cèl·lules normals, a la variació en la capacitat reparadora de l'ADN en poblacions humanes i a la regulació de la reparació de l'ADN a nivell molecular i nuclear.

APLICACIONS

- REACH (*Registration Evaluation and Authorisation for Chemicals*)
- Avaluació de medicaments
- Ecotoxicologia
- Estudis d'antimutagenicitat (efecte protector)

NORMATIVES I BIBLIOGRAFIA

- "The Comet Assay for DNA Damage and Repair" (Molecular Biotechnology - Volume 26, 2004, Andrew R.Collins).
- "Avaluació de la genotoxicitat en el medi terrestre: utilització de l'electroforesi de cèl·lules individuals en gels d'agarosa" (Comet test, o SCGE); Tesi Doctoral d'Eulàlia Delgado Sureda.
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinská, M., Kennedy, G., and Stetina, R.(1997) "The comet assay: what can it really tell us?" *Mutat.Res.*375, 183-193.
- Tice, R.r., Agurell, E.,Anderson, D., et al.(2000) "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing", *Environ.Mol.Mutagen.*35, 206-221.