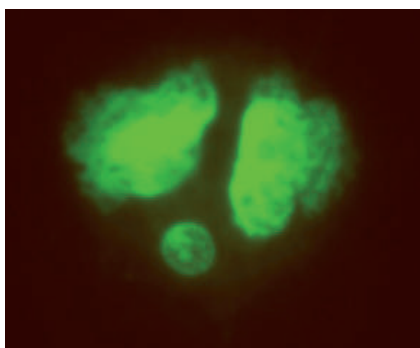


# TEST MICRONUCLIS (MNT) - *In vitro*



## DEFINICIÓ

Test de genotoxicitat *in vitro* per l'avaluació de l'activitat clastogènica i aneugènica d'un agent per mitjà de la formació de micronuclis (MN) durant la divisió cel·lular.

## END-POINT

Observació de la formació de MN durant l'anafase, en presència de citocalasina-B.

## MOSTRA

Cultiu primari o línia cel·lular.

## INTRODUCCIÓ

El Test de Micronuclis (MNT) és un test de mutagenicitat utilitzat per a la detecció del dany citogenètic induït per un agent als cromosomes o a l'aparell mitòtic durant la divisió cel·lular.

La finalitat del test és identificar els agents amb activitat tant clastogènica com aneugènica per mitjà de la detecció de la formació de micronuclis (MN).

Els micronuclis són fragments de DNA que de manera natural es poden observar esporàdicament (en proporció inferior al 3 per mil) en els eritròcits després de l'extrusió del nucli, degut a una lesió en el DNA o en el mecanisme de segregació cromosòmica durant la mitosi.

Aquests poden ser fragments acèntrics (fragments de cromosoma sense centròmer) o cromosomes sencers incapaçs de migrar amb la resta de cromosomes durant l'anafase de la divisió cel·lular.

## TÈCNICA

### MNT *In vitro*

L'assaig implica el bloqueig de la citoquinesis a la primera ronda de la divisió cel·lular gràcies a l'addició de l'inhibidor citocalasina-B.

La mostra és exposada a la substància a testar amb i sense una font exògena d'activació metabòlica (fracció S9). Es bloqueja la separació entre les cèl·lules filles amb citocalasina B (de manera que s'obtenen cèl·lules binucleades) i es permet créixer el cultiu durant un període suficient perquè es produeixi el dany i la conseqüent aparició de MN en la Interfase cel·lular. És important verificar la proliferació cel·lular tant en les cèl·lules tractades com en les control, així com realitzar una avaluació prèvia de la citotoxicitat en les cèl·lules tractades.

S'analitzen al microscopi òptic només les cèl·lules interfàsiques binucleades que hagin completat la divisió cel·lular després de l'exposició a l'agent a testar i es duu a terme un comptatge de la quantitat de MN.

Els resultats positius indiquen que l'agent produeix MN, que són el resultat de fragmentació dels cromosomes o de dany a l'aparell de divisió cel·lular. Els resultats negatius indiquen que, sota les condicions del test, l'agent testat no resulta clastogènic ni tòxic per a l'aparell mitòtic.

En el test *in vitro* poden ser utilitzades tant línies cel·lulars com cultius primaris de limfòcits humans.

Cal recalcar que aquest test no substitueix en tots els casos al test *in vivo* descrit a la *Guideline OECD 474* "Test de micronuclis d'eritròcits de mamífer", sinó que s'ha d'entendre com una tècnica de *screening*.

L'assaig de MN *in vitro* ofereix una sèrie d'avantatges front al mètode "Anàlisi d'aberracions cromosòmiques durant la metafase" (mètode descrit en les *Guidelines OECD 473 i 475*):

- Els MN en cèl·lules interfàsiques es poden avaluar d'una forma més objectiva que no pas les aberracions cromosòmiques en cèl·lules metafàsiques.
- Més senzill i pràctic, ja que no requereix del comptatge de cromosomes en una preparació metafàsica, tan sols cal determinar si la cèl·lula conté o no un MN. Per tant, es poden observar més preparacions en menys temps (milers en comptes de centenars de cèl·lules per tractament).
- Capacitat de detecció d'agents inductors d'aneuploidies, ja que els MN poden contenir cromosomes sencers.

#### APLICACIONS

Test de Genotoxicitat *in vitro*, el qual pot ser aplicat en diferents àmbits:

- Avaluació del potencial genotòxic de candidats a medicaments.
- Avaluació del potencial genotòxic d'altres productes químics (REACH).
- Avaluació de la capacitat protectora (antigenotòxica).
- Ecotoxicologia.

#### NORMATIVES I BIBLIOGRAFIA

- *In Vitro* Micronucleus test, OECD 487.
- *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, OECD 473.
- Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD 474.
- Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test, OECD 475.
- M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutant Research* 455 (2000) 81-95.
- B. Miller, S. Albertini, V. Thybaud, E. Lorge, Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro aberration test: industrial experience, *Mutation Research* 392 (1997) 45-59.
- M. L. Garriot, J. B. Phelps, W. P. Hoffman, A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action at different levels of activity, *Mutation Research* 517 (2002) 123-134.
- M. L. Garriot, J. B. Phelps, W. P. Hoffman, A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action at different levels of activity, *Mutation Research* 521 (2002) 103-112.
- K. Matsumoto, T. Ohta, Phases of the cell cycle sensitive to endoreduplication induction in CHO-K1 cells, *Mutation Research* 326 (1995) 93-98.