

INTRODUZIONE

Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 487 (2016) e rientra in una serie di metodi di prova intesi a saggiare la tossicità genetica. È stato elaborato un documento OCSE contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida (1).

Il test del micronucleo in vitro (MNvit) è una prova di genotossicità effettuata per rilevare la presenza di micronuclei (MN) nel citoplasma delle cellule durante l'interfase. I micronuclei possono formarsi a partire da frammenti cromosomici acentrici (ossia privi di centromero) o da cromosomi interi che non sono in grado di migrare verso i poli durante l'anafase (una fase della divisione cellulare). Pertanto, il test MNvit è un metodo in vitro che, grazie alla sua capacità di rilevare agenti sia aneugeni sia clastogeni, costituisce una base completa per studiare il potenziale di danno cromosomico in vitro (2) (3) nelle cellule che hanno iniziato la divisione cellulare durante o dopo l'esposizione alla sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 13 per ulteriori dettagli). I micronuclei rappresentano danni che sono stati trasmessi alle cellule figlie, mentre le aberrazioni cromosomiche conteggiate nelle cellule in metafase potrebbero non essere trasmesse. In entrambi i casi, le modifiche potrebbero essere incompatibili con la sopravvivenza delle cellule

Il presente metodo di prova permette il ricorso a protocolli sperimentali con e senza citocalasina B (citoB), un inibitore della polimerizzazione dell'actina. L'aggiunta di citoB prima della mitosi produce cellule binucleate e consente pertanto l'individuazione e l'analisi dei micronuclei solo nelle cellule che hanno completato una mitosi (3) (4). Il presente metodo di prova permette altresì di ricorrere a protocolli senza inibitore della citocinesi, purché si possa dimostrare che la popolazione cellulare analizzata abbia già intrapreso la mitosi.

Oltre al test MNvit per individuare le sostanze chimiche che inducono la formazione di micronuclei, anche il ricorso alla marcatura immunochimica dei cinetocori o all'ibridazione con sonde centromeriche o telomeriche [ibridazione fluorescente in situ (FISH)] può fornire informazioni aggiuntive sui meccanismi che inducono danno cromosomico e formazione di micronuclei (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Tali procedure di marcatura e ibridazione possono essere impiegate quando si osserva un incremento della formazione di micronuclei e lo sperimentatore intende stabilire se esso sia la conseguenza di eventi clastogeni e/o aneugeni.

Poiché i micronuclei nelle cellule in interfase possono essere valutati in maniera relativamente obiettiva, è sufficiente che il personale del laboratorio determini il numero di cellule binucleate nei trattamenti con citoB nonché l'incidenza delle cellule con micronuclei in tutti i casi. Di conseguenza, i vetrini possono essere analizzati con relativa rapidità e l'analisi può essere automatizzata, il che permetterebbe di analizzare migliaia anziché centinaia di cellule per trattamento, rafforzando la significatività della prova. Infine, poiché i micronuclei possono formarsi anche da cromosomi ritardatari, ciò consentirebbe di individuare agenti che inducono aneuploidia che sono difficili da studiare tramite prove tradizionali sulle aberrazioni cromosomiche (cfr. capitolo B.10 del presente allegato) (18). Tuttavia, il test MNvit come descritto nel presente metodo di prova non permette di distinguere le sostanze chimiche che inducono alterazioni del numero di cromosomi e/o ploidia da quelle che causano clastogenicità senza il ricorso a tecniche speciali come la FISH, menzionata al paragrafo 4.

Il test MNvit è una prova affidabile e può essere condotta per vari tipi cellulari, con o senza ricorso a citoB. Sono numerosi i dati a sostegno della validità del test MNvit con diversi tipi di cellule (culture di linee cellulari o culture di cellule primarie) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Tra questi si annoverano, in particolare, gli studi internazionali di convalida coordinati dalla *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) e le relazioni dell'*International Workshop on Genotoxicity Testing* (5) (17). Le informazioni disponibili sono anche state riesaminate nell'ambito di uno studio di convalida retrospettivo basato sul peso delle evidenze condotto dal Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (ECVAM) della Commissione europea, mentre la validità scientifica del metodo di prova è stata riconosciuta dal comitato scientifico consultivo dell'ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

Il test MNvit su cellule di mammifero può impiegare colture di linee cellulari o colture cellulari primarie di origine umana o di roditori. Poiché la frequenza di fondo dei micronuclei influenzerà la sensibilità della prova, si raccomanda di utilizzare tipi cellulari con una frequenza stabile e definita di formazione di micronuclei. Le cellule sono scelte in funzione della loro capacità di crescita correttamente in coltura, della stabilità del cariotipo (compreso il numero dei cromosomi) e della frequenza di aberrazioni cromosomiche spontanee (40). I dati attualmente disponibili non consentono di formulare delle raccomandazioni rigorose ma suggeriscono che è importante tener conto, nel valutare i rischi chimici, dello stato del gene p53, della stabilità genetica (cariotipo), della capacità di riparazione del DNA e dell'origine (roditori o umani) delle cellule utilizzate nella prova. Gli utilizzatori del presente metodo di prova sono pertanto invitati a prendere in considerazione l'influenza di queste e altre caratteristiche cellulari sulle prestazioni di una linea cellulare per individuare l'induzione di micronuclei, poiché le conoscenze evolvono in questo settore.

Le definizioni usate sono riportate nell'appendice 1.

#### CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

Le prove in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno che le cellule non siano metabolicamente competenti per quanto riguarda le sostanze chimiche in esame. Il sistema esogeno di attivazione metabolica non simula perfettamente le condizioni in vivo. Si deve inoltre prestare attenzione al fine di evitare condizioni che porterebbero a risultati positivi artefatti, che non riflettono la genotossicità delle sostanze chimiche in esame. Tali condizioni possono includere modifiche del pH (41) (42) (43) o dell'osmolalità, un'interazione con il terreno di coltura cellulare (44) (45) o una eccessiva citotossicità (cfr. paragrafo 29).

Per esaminare l'induzione di micronuclei è fondamentale che sia avvenuta la mitosi sia nelle colture trattate che in quelle non trattate. Lo stadio più informativo per il conteggio dei micronuclei è quello che si riscontra nelle cellule che hanno completato una mitosi durante o dopo il trattamento con la sostanza chimica in esame. Per i nanomateriali di sintesi, è necessario apportare alcuni adattamenti specifici al presente metodo di prova, che tuttavia non sono descritti nel presente documento.

Prima di utilizzarlo su una miscela per generare dati per una determinata finalità regolamentare, occorre valutare se il metodo di prova possa fornire risultati adeguati a tale finalità, e in caso affermativo indicarne i motivi. Tali considerazioni non sono necessarie quando esiste un obbligo regolamentare di testare la miscela.

#### PRINCIPIO DELLA PROVA

Le colture di cellule umane o di altro mammifero sono esposte alla sostanza chimica in esame con e senza una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno che non si utilizzino cellule con un'adeguata capacità metabolizzante (cfr. paragrafo 19).

Durante o dopo l'esposizione alla sostanza chimica in esame, le cellule sono coltivate per un periodo sufficiente a consentire che il danno cromosomico o altro effetto sul ciclo della cellula/divisione cellulare porti alla formazione di micronuclei nelle cellule in interfase. Per l'induzione di aneuploidia, la sostanza chimica in esame dovrebbe solitamente essere presente durante la mitosi. Le cellule in interfase coltivate e colorate sono analizzate per rilevare la presenza di micronuclei. Idealmente, si dovrebbero conteggiare micronuclei soltanto nelle cellule che hanno completato la mitosi durante l'esposizione alla sostanza chimica in esame o nell'eventuale periodo successivo al trattamento. Nelle colture trattate con un inibitore della citocinesi questo risultato si ottiene prendendo in considerazione soltanto le cellule binucleate. In assenza di un inibitore della citocinesi è importante dimostrare che le cellule analizzate hanno molto probabilmente avviato la divisione cellulare, sulla base dell'incremento della popolazione cellulare durante o dopo l'esposizione alla sostanza chimica in esame. Per tutti i protocolli è essenziale dimostrare che la proliferazione cellulare è avvenuta sia nelle colture trattate che nei controlli; inoltre, nelle colture in cui si è riscontrata la presenza di micronuclei dev'essere valutata l'entità della citotossicità o della citostasi indotta dalla sostanza chimica in esame.

## DESCRIZIONE DEL METODO

**Cellule**

Possono essere usati linfociti del sangue periferico primario coltivato di esseri umani o di altri mammiferi (7) (20) (46) (47) e una serie di linee cellulari di roditori quali CHO, V79, CHL/IU e L5178Y e di linee cellulari quali TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (cfr. paragrafo 6). Altre linee cellulari quali cellule HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 (52) (53), A549 e le cellule embrionali primarie di criceto siriano (54) sono state utilizzate per la sperimentazione sul micronucleo, ma non sono ancora state pienamente convalidate. Pertanto, l'uso di tali linee cellulari e di altri tipi di cellule deve essere giustificato in base alla loro prestazione accertata nella prova, così come descritta nella sezione relativa ai criteri di accettabilità. È stato riportato che la citocalasina B influenza la crescita delle cellule L5178Y e non è pertanto raccomandata con questa linea cellulare (23). In caso di utilizzo di cellule primarie, per il benessere degli animali, occorrerà considerare, ove possibile, il ricorso a cellule di origine umana prelevate nel rispetto dei principi etici e della regolamentazione in materia.

I linfociti del sangue periferico umano devono essere prelevati da individui giovani (circa 18-35 anni di età), non fumatori, che non siano stati esposti di recente ad agenti genotossici (ad es. sostanze chimiche, radiazioni ionizzanti) a livelli che farebbero aumentare l'incidenza di fondo delle cellule micronucleate, al fine di garantire che tale incidenza sia modesta e omogenea. L'incidenza di fondo delle cellule micronucleate aumenta con l'età e questa tendenza è più marcata nelle donne rispetto agli uomini (55). Se si prelevano cellule da più donatori, va indicato il numero dei donatori. Occorre dimostrare che le cellule si sono divise dall'inizio del trattamento con la sostanza chimica in esame fino al campionamento delle cellule. Le colture di cellule vengono mantenute in una fase di crescita esponenziale (linee cellulari) o stimolate a dividersi (colture primarie di linfociti) per esporre le cellule a diversi stadi del ciclo cellulare, dato che la sensibilità delle fasi cellulari alle sostanze chimiche in esame può essere sconosciuta. In genere le cellule primarie la cui divisione deve essere stimolata con agenti mitogeni non sono più sincronizzate durante l'esposizione alla sostanza chimica in esame (ad es. i linfociti umani dopo la stimolazione di 48 ore con agenti mitogeni). L'uso di cellule sincronizzate per il trattamento con la sostanza chimica in esame non è raccomandato, ma può essere accettabile se giustificato.

*Terreni e condizioni di coltura*

Per mantenere le colture devono essere garantiti terreni e condizioni di incubazione adeguati (recipienti per coltura, atmosfera umidificata con il 5 % di concentrazione di CO<sub>2</sub>, se del caso, temperatura di 37°C). Occorre controllare periodicamente la stabilità del numero modale dei cromosomi e l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle linee cellulari; non si dovrebbero utilizzare cellule contaminate o che presentano modifiche del numero modale dei cromosomi. La durata normale del ciclo cellulare delle linee o colture primarie utilizzate nel laboratorio di prova deve essere stabilita e deve corrispondere alle caratteristiche cellulari pubblicate.

*Preparazione delle colture*

Linee cellulari: le cellule provenienti da colture primarie vengono inoculate in un terreno di coltura ad una densità tale che le cellule in sospensione o in monostrato proseguiranno la loro crescita esponenziale fino al momento della raccolta (occorre ad esempio evitare la confluenza delle cellule che si stanno moltiplicando in monostrato).

Linfociti: sangue intero trattato con un anticoagulante (ad esempio, eparina) o linfociti isolati sono posti in un terreno di coltura (ad es. per 48 ore per i linfociti umani) contenente un mitogeno (ad esempio, fitoemoagglutinina, PHA, per i linfociti umani) per indurre la divisione cellulare prima dell'esposizione alla sostanza chimica in esame e alla citocalina B (detta anche citoB).

#### *Attivazione metabolica*

Se si utilizzano cellule prive di un'adeguata capacità di attivazione metabolica endogena si deve ricorrere a sistemi di attivazione metabolica esogeni. Il sistema più comunemente usato, che è generalmente raccomandato in assenza di un altro sistema giustificato, è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattori (S9) ricavata dal fegato di roditori trattati con induttori enzimatici, come Aroclor 1254 (56) (57) o una combinazione di fenobarbitone e  $\beta$ -naftoflavone (58) (59) (60). Quest'ultima combinazione è conforme alla Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (61), e ha dimostrato di essere altrettanto efficace dell'Aroclor 1254 nell'indurre ossidasi a funzione mista (58) (59) (60). La frazione S9 viene di solito usata a concentrazioni comprese tra 1-2 % (v/v) ma può aumentare fino al 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. Durante il trattamento, si dovrà evitare l'impiego di prodotti che riducono l'indice mitotico, in particolare gli agenti complessanti del calcio (62). La scelta del tipo e della concentrazione del sistema di attivazione metabolica esogena o dell'induttore metabolico usato può dipendere dalla classe delle sostanze chimiche in esame.

#### *Preparazione della sostanza chimica in esame*

Le sostanze chimiche solide in esame vanno preparate in adeguati solventi e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule. Le sostanze chimiche liquide in esame possono essere aggiunte direttamente alla coltura e/ o diluite prima del trattamento del sistema di prova. Le sostanze chimiche gassose o volatili vanno testate modificando adeguatamente i protocolli standard (trattamento in contenitori sigillati) (63) (64) (65). Si usino preparati della sostanza chimica approntati immediatamente prima del trattamento, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

### **Condizioni di prova**

#### *Solventi*

Il solvente va scelto in modo da massimizzare la solubilità delle sostanze chimiche in esame, senza determinare effetti negativi sulla conduzione della sperimentazione, in particolare senza modificare la crescita cellulare, compromettere l'integrità della sostanza chimica in esame, reagire con i recipienti di coltura o ostacolare il sistema di attivazione metabolica. Si raccomanda di prendere in considerazione in primo luogo, se possibile, l'uso di un solvente acquoso (o terreno di coltura). Solventi il cui uso è consolidato sono l'acqua e il dimetilsolfossido (DMSO). Di norma, i solventi organici non devono superare l'1 % v/v. Se la citoB è sciolta nel DMSO, il quantitativo totale di solventi organici utilizzato per la sostanza chimica in esame e la citoB non deve superare l'1 % (v/v); in caso contrario, si farà ricorso a controlli non trattati al fine di verificare che la percentuale di solvente organico non abbia effetti dannosi. I solventi acquosi (soluzione salina o acqua) non devono superare 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. L'uso di solventi poco noti (ad esempio, etanolo o acetone) è ammesso purché suffragato da dati che ne provino la compatibilità con la sostanza chimica in esame e l'assenza di tossicità genetica alla concentrazione utilizzata. In mancanza di tali dati, è importante includere nella prova controlli non trattati (cfr. allegato 1) così come controlli con solvente per dimostrare che il solvente scelto non comporta effetti deleteri o cromosomici (aneuploidia o clastogenicità).

*Uso della citoB come inibitore della citocinesi*

Una delle considerazioni più importanti riguardo alla prestazione del test MNvit è garantire che le cellule analizzate abbiano completato la micosi durante il trattamento o nell'eventuale periodo di incubazione successiva al trattamento. L'analisi dei micronuclei, pertanto, va limitata alle cellule che hanno subito la mitosi durante o dopo il trattamento. La citoB è l'agente più diffusamente usato per bloccare la citocinesi, poiché inibisce l'aggregazione dell'actina e, di conseguenza, impedisce la separazione delle cellule figlie dopo la mitosi, portando alla formazione di cellule binucleate (6) (66) (67). L'effetto della sostanza chimica in esame sulla proliferazione cellulare può essere misurato simultaneamente, quando viene utilizzata la citoB. La citoB deve essere usata come inibitore della citocinesi quando si impiegano linfociti umani, perché la durata del ciclo cellulare può variare tra donatori e perché non tutti i linfociti rispondono alla simulazione con PHA. La citoB non è obbligatoria per altri tipi di cellule se si può dimostrare che queste cellule hanno subito una divisione come descritto al paragrafo 27. Inoltre, la citoB non è generalmente utilizzata quando si valuta la formazione di micronuclei nei campioni usando metodi di citometria a flusso.

Per ciascun tipo cellulare il laboratorio determina la concentrazione adeguata di citoB per ottenere la frequenza ottimale di cellule binucleate nelle colture di controllo con solvente e si deve dimostrare di pervenire a una buona produzione di cellule binucleate ai fini dell'analisi. La concentrazione adeguata di citoB è solitamente compresa tra 3 e 6 µg/ml (19).

*Misurazione della proliferazione cellulare e della citotossicità e scelta delle concentrazioni di trattamento*

Nel determinare la concentrazione massima della sostanza chimica in esame si devono evitare concentrazioni che hanno la capacità di produrre false risposte positive, ad esempio le concentrazioni che causano eccessiva citotossicità (cfr. paragrafo 29), precipitazione nel terreno di coltura (cfr. paragrafo 30) e variazioni marcate di pH o osmolalità (cfr. paragrafo 9). Se la sostanza chimica in esame provoca un'alterazione marcata del pH del terreno al momento della sua aggiunta, è possibile adeguare il pH mediante l'azione tampone del terreno di trattamento finale in modo da evitare falsi risultati positivi e da mantenere condizioni di coltura appropriate.

La proliferazione cellulare deve essere misurata per assicurarsi che un numero sufficiente di cellule trattate hanno subito la mitosi durante la prova e che i trattamenti sono condotti ad adeguati livelli di citotossicità (cfr. il paragrafo 29). La citotossicità va determinata nell'esperimento principale con e senza attivazione metabolica mediante un indicatore appropriato di morte e crescita cellulari (cfr. paragrafi 26 e 27). Una prova preliminare per valutare la citotossicità può essere utile per definire meglio le concentrazioni da impiegare nella prova principale, ma non è obbligatoria. Se effettuata, essa non dovrebbe sostituire la misurazione della citotossicità effettuata nell'ambito della prova principale.

Il trattamento di colture con la citoB e la misurazione delle frequenze relative di cellule mononucleate, binucleate e multinucleate nella coltura rappresentano un metodo accurato per la quantificazione dell'effetto sulla proliferazione cellulare e dell'attività citotossica o citostatica di un trattamento (6), e garantisce che siano analizzate mediante microscopio soltanto le cellule che hanno iniziato la divisione durante o dopo il trattamento. Si raccomanda di misurare l'indice di proliferazione cellulare (CBPI) (6) (27) (68) o l'indice di replicazione (RI) a partire da almeno 500 cellule per coltura (cfr. le formule nell'allegato 2) per stimare l'attività citotossica e citostatica di un trattamento confrontando i valori nelle colture trattate e nei controlli. La valutazione di altri indicatori di citotossicità (ad es. integrità cellulare, apoptosi, necrosi, conteggio in metafase, ciclo cellulare) può fornire informazioni utili, ma non dovrebbe sostituire il CBPI o l'RI.

Negli studi condotti senza citoB occorre dimostrare che le cellule nella coltura si sono divise, ossia che una proporzione significativa delle cellule analizzate abbiano avviato il processo di divisione durante o in seguito al trattamento con la sostanza chimica in esame, per evitare che si producano falsi negativi. Si raccomanda la misurazione del raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) o dell'aumento relativo della conta cellulare (RICC) per valutare l'attività citotossica e citostatica di un trattamento (17) (68) (69) (70) (71) (cfr. le formule nell'allegato 2). Quando il prelievo dei campioni è distribuito su un lungo periodo (ad es. quando la durata del trattamento equivale a 1,5-2 volte la durata del ciclo cellulare e la raccolta avviene dopo un periodo pari a 1,5-2 cicli cellulari successivamente al trattamento, il che comporta tempi di campionamento totali più lunghi di 3-4 volte la durata del ciclo cellulare, come descritto nei paragrafi 38 e 39), è possibile che il valore RPD sottovaluti la citotossicità (71). In tali circostanze, il RICC potrebbe costituire una migliore misurazione, ma anche la valutazione della citotossicità dopo un periodo equivalente a 1,5-2 volte la durata del ciclo cellulare fornisce una stima valida. La valutazione di altri marcatori della citotossicità o citostasi (ad es. integrità cellulare, apoptosi, necrosi, conteggio in metafase, indice di proliferazione, ciclo cellulare, ponti nucleoplasmatici o vescicole nucleari) può fornire informazioni utili, ma non dovrebbe sostituire l'RPD o il RICC.

Si usino almeno tre concentrazioni di prova (senza contare i controlli positivi e i controlli con solvente) che soddisfano i criteri di accettabilità (citotossicità adeguata, numero di cellule, ecc.). Indipendentemente dal tipo di cellule (linee cellulari o colture primarie di linfociti), ciascuna delle colture trattate, uniche o replicate, può essere utilizzata per ciascuna concentrazione di prova. Mentre l'uso di colture duplicate è raccomandato, l'uso di colture uniche è accettato a condizione che il numero totale di cellule analizzate sia lo stesso tanto per le colture uniche quanto per le colture duplicate. L'uso di colture uniche è particolarmente pertinente quando si valutano più di 3 concentrazioni (cfr. paragrafi 44 e 45). I risultati ottenuti per ciascuna delle colture realizzate in più copie indipendenti a una data concentrazione possono essere riuniti per l'analisi dei dati. Per le sostanze chimiche in esame la cui citotossicità è bassa o nulla, sono generalmente adeguati intervalli di concentrazione di un fattore di circa 2 a 3. In caso di citotossicità, le concentrazioni di prova selezionate dovrebbero rientrare in un intervallo di concentrazione a partire dai valori che producono citotossicità come descritto al paragrafo 29 e che include le concentrazioni alle quali si riscontra una citotossicità modesta o nulla. Molte sostanze chimiche in esame presentano curve di concentrazione-risposta a forte pendenza e, per ottenere dati nel quadro di una tossicità bassa e media o per valutare il rapporto dose-risposta in dettaglio, si dovranno pertanto utilizzare concentrazioni più ravvicinate e/o più di tre concentrazioni (colture uniche o repliche), in particolare nei casi in cui è necessario ripetere l'esperimento (v. paragrafo 60).

Se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, la concentrazione più elevata dovrebbe raggiungere una citotossicità di  $55 \pm 5\%$  in base ai parametri di citotossicità raccomandati (cioè riduzione di RICC e RPD per le linee cellulari senza citoB e una riduzione di CBPI o RI quando è usata la citoB a  $45 \pm 5\%$  del controllo negativo parallelo) (72). Si devono interpretare con cautela i risultati positivi presenti soltanto nella fascia più alta dell'intervallo di citotossicità  $55 \pm 5\%$  (71).

Per le sostanze chimiche in esame scarsamente solubili che non sono citotossiche a concentrazioni inferiori alla concentrazione insolubile più bassa, la concentrazione più elevata analizzata dovrebbe presentare una torbidità o un precipitato visibile ad occhio nudo o con un microscopio invertito alla fine del trattamento con la sostanza chimica in esame. Anche se la citotossicità interviene al di sopra della concentrazione insolubile più bassa, è consigliabile saggiare una sola concentrazione che induce torbidità o un precipitato visibile, in quanto dal precipitato potrebbero derivare false risposte. Alla concentrazione che produce un precipitato, occorre assicurarsi che quest'ultimo non interferisca con la conduzione della sperimentazione (ad es. colorazione o conteggio). Può essere utile valutare la solubilità nel terreno di coltura prima della prova.

Se non si osserva una citotossicità limitante o si rileva la presenza di un precipitato, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml, (si scelga il valore più basso) (73) (74) (75). Quando la composizione della sostanza chimica in esame non è definita, ad esempio nel caso di sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici (UVCB) (76), prodotti estratti dall'ambiente, ecc., può essere necessario aumentare la concentrazione massima (5 mg/ml) in assenza di citotossicità sufficiente, per aumentare la concentrazione di ciascun componente. Va tuttavia osservato che le prescrizioni possono essere diverse per i prodotti farmaceutici per uso umano (93).

### Controlli

Al momento di ciascuna raccolta, si effettuino anche controlli negativi paralleli (cfr. paragrafo 21), consistenti in solo solvente nel terreno di coltura; i controlli vanno trattati come le colture di trattamento.

I controlli positivi paralleli sono necessari per dimostrare la capacità del laboratorio di individuare clastogeni e aneugeni alle condizioni del protocollo di prova, nonché l'efficacia del sistema di attivazione metabolica esogena, se del caso. Esempi di controlli positivi sono riportati nella tabella 1. Sostanze chimiche alternative possono essere usate per i controlli positivi, se necessario.

Attualmente, non sono noti aneugeni che richiedono l'attivazione metabolica per la loro attività genotossica (17). Poiché le prove di genotossicità in vitro su cellule di mammifero sono sufficientemente standardizzate per i trattamenti paralleli di breve durata effettuati con e senza attivazione metabolica per la stessa durata di trattamento, l'uso dei controlli positivi può essere limitato a un clastogeno che richiede attivazione metabolica. In questo caso, una sola risposta clastogena in un controllo positivo dimostrerà sia l'attività del sistema di attivazione metabolica che la capacità di risposta del sistema di prova. Tuttavia, un trattamento di lunga durata (senza S9) dovrebbe disporre di un proprio controllo positivo, poiché la durata del trattamento è diversa da quella della prova con attivazione metabolica. Se un clastogeno è selezionato come controllo positivo unico per il trattamento di breve durata con e senza attivazione metabolica, per il trattamento di lunga durata senza attivazione metabolica occorre scegliere un aneugeno. Nelle cellule metabolicamente competenti che non necessitano di S9 si dovrebbero usare controlli positivi sia per la clastogenicità che per l'aneugenicità.

Ciascun controllo positivo va utilizzato con una o più concentrazioni che generalmente danno luogo ad un aumento riproducibile e individuabile rispetto al valore di fondo per dimostrare la sensibilità del sistema sperimentale (vale a dire che gli effetti sono chiari ma che non rivelano immediatamente all'esaminatore l'identità dei vetrini codificati), e la risposta non può essere compromessa da una citotossicità superiore ai limiti stabiliti nel presente metodo di prova.

Tabella 1

### Sostanze chimiche di riferimento raccomandate per la verifica delle competenze del laboratorio e per la selezione dei controlli positivi.

Categoria	Sostanza chimica	CASRN
<b>1. Clastogeni attivi senza attivazione metabolica</b>		
	Metansolfonato di metile	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	4-Nitrochinolina-N-ossido	56-57-5
	Citosina arabinoside	147-94-4
<b>2. Clastogeni che richiedono attivazione metabolica</b>		
	Benzo(a)pirene	50-32-8
	Ciclofosfamida	50-18-0

Categoria	Sostanza chimica	CASRN
<b>3. Aneugeni</b>		
	Colchicina	64-86-8
	Vinblastina	143-67-9

## PROCEDURA

**Calendario del trattamento**

Per massimizzare la probabilità di individuare un aneugeno o un clastogeno in azione in una determinata fase del ciclo cellulare è importante che quantitativi sufficienti di cellule che rappresentano tutte le varie fasi del loro ciclo cellulare siano trattati con la sostanza chimica in esame. Tutti i trattamenti devono iniziare e terminare nel momento di crescita esponenziale delle cellule e le cellule devono continuare a crescere fino al momento del campionamento. Il calendario di trattamento per le linee cellulari e per le colture cellulari primarie, pertanto, può differire in parte da quello previsto per i linfociti, i quali necessitano di una stimolazione mitogena per avviare il ciclo cellulare (17). Per i linfociti, l'approccio più efficiente è iniziare il trattamento con la sostanza chimica in esame a distanza di 44-48 ore dopo la stimolazione con PHA, quando le cellule si dividono in modo asincrono (6).

I dati pubblicati (19) indicano che la maggior parte degli aneugeni e dei clastogeni sarà rilevata entro un periodo di trattamento breve di 3 — 6 ore, con o senza S9, cui seguirà la rimozione della sostanza chimica in esame e un campionamento al momento equivalente a un periodo di crescita di circa 1,5-2,0 cicli cellulari dall'inizio del trattamento (7).

Tuttavia, per una valutazione completa, che sarebbe necessaria per giungere alla conclusione di un risultato negativo, tutte e tre le condizioni sperimentali dovrebbero essere saggiate utilizzando un trattamento di breve durata con e senza attivazione metabolica e un trattamento di lunga durata senza attivazione metabolica (cfr. paragrafi 56, 57 e 58):

- Le cellule vanno esposte alla sostanza chimica in esame senza attivazione metabolica per 3-6 ore, cui segue il campionamento al momento equivalente a un periodo di crescita di circa 1,5-2,0 cicli cellulari dall'inizio del trattamento (19).
- Le cellule vanno esposte alla sostanza chimica in esame con attivazione metabolica per 3-6 ore, cui segue il campionamento al momento equivalente a un periodo di crescita di circa 1,5-2,0 cicli cellulari dall'inizio del trattamento (19).
- Le cellule vanno esposte in modo continuato senza attivazione metabolica fino al campionamento al momento equivalente a un periodo di crescita di circa 1,5-2,0 cicli cellulari (19).

Se una di queste condizioni sperimentali porta a una risposta positiva, può non essere necessario esaminare gli altri regimi di trattamento.

Se è noto o si sospetta che la sostanza chimica in esame incide sulla durata del ciclo cellulare (ad es., quando si saggiano analoghi nucleosidici), in particolare per quanto riguarda le cellule competenti per il gene p53 (35) (36) (77), i tempi di campionamento e di recupero possono essere prolungati di un periodo equivalente a 1,5-2,0 volte la durata del ciclo cellulare (per un totale di 3,0-4,0 cicli cellulari dopo l'inizio dei trattamenti di breve durata e di lunga durata). Queste alternative permettono di gestire situazioni in cui si temano potenziali interazioni tra la sostanza chimica in esame e la citoB. In caso di ricorso a periodi di campionamento prolungati (ossia un periodo di coltura totale equivalente a 3,0-4,0 cicli cellulari), occorre garantire che le cellule si dividano ancora attivamente. Per i linfociti, ad esempio, la crescita esponenziale può diminuire a partire da 96 ore dopo la stimolazione e le colture cellulari monostrati possono diventare confluenti.

I protocolli di trattamento suggeriti sono riassunti nella tabella 2. Si tratta di calendari generici che possono essere modificati (e debitamente giustificati) in base alla stabilità o alla reattività della sostanza chimica in esame ovvero alle particolari caratteristiche di crescita delle cellule utilizzate.

Tabella 2

**Trattamento delle cellule e fasi di raccolta per i test MNvit**

Linfociti, cellule primarie e linee cellulari trattate con citoB	+ S9 trattamento di breve durata	Trattare per 3-6 ore in presenza di S9; rimuovere S9 e terreno di coltura; aggiungere terreno di coltura fresco e citoB; raccolta a un periodo di crescita di circa 1,5-2,0 cicli cellulari dall'inizio del trattamento.
	- S9 trattamento di breve durata	Trattare per 3-6 ore; rimuovere il terreno di coltura; aggiungere terreno di coltura fresco e citoB; raccolta a un periodo di crescita di circa 1,5-2,0 cicli cellulari dall'inizio del trattamento.
	- S9 trattamento avanzato	Trattare per 1,5-2,0 cicli cellulari normali in pre- senza di citoB; raccogliere alla fine del periodo di trattamento.

Linee cellulari trattate senza citoB  
(medesimo calendario di trattamento descritto sopra, a eccezione dell'aggiunta di citoB)

Nelle colture monostrati possono essere presenti cellule mitotiche (identificabili perché di forma tonda e in fase di distacco dalla superficie) al termine del trattamento di 3-6 ore. Poiché tali cellule mitotiche si staccano facilmente, potrebbero andare perdute al momento della rimozione del terreno di coltura che contiene la sostanza chimica in esame. Se si constata un aumento sostanziale del numero di cellule mitotiche rispetto ai controlli (il che indicherebbe il probabile arresto della mitosi), le cellule vanno raccolte mediante centrifugazione e successivamente reintrodotte nelle colture per evitare di perdere le cellule che sono in fase di mitosi e presentano un rischio di aberrazione dei micronuclei/cromosomica, al momento della raccolta.

**Raccolta delle colture e preparazione dei vetrini**

Per ogni coltura si procede a una raccolta e a un trattamento separati. Per la preparazione delle cellule può essere necessario un trattamento ipotonico, che tuttavia si può evitare se, con altri mezzi, è possibile ottenere un'adeguata diffusione delle cellule. Possono essere usate tecniche diverse per la preparazione dei vetrini, purché siano garantiti preparati cellulari di elevata qualità ai fini dell'analisi. Le cellule con la membrana cellulare e il citoplasma cellulare intatti vanno conservati per consentire il rilevamento dei micronuclei e (con il metodo di inibizione della citocinesi) l'individuazione affidabile di cellule binucleate.

I vetrini possono essere colorati con tecniche diverse, per esempio con il metodo Giemsa o tinture fluorescenti che si legano al DNA. L'uso di coloranti fluorescenti appropriati [ad esempio, arancio di acridina (78) o Hoechst 33258 più pironina-Y (79)] può eliminare alcuni dei falsi risultati dovuti all'uso di un colorante non specifico per il DNA. Per individuare i contenuti (cromosomi interi saranno colorati mentre i frammenti cromosomici acentrici non lo saranno) dei micronuclei si possono utilizzare anche anticorpi anticinetocore, FISH con sonde di DNA pancentromerico o marcatura in situ mediante primer specifici per DNA pancentromerico, unitamente a un'adeguata colorazione del DNA, se interessa acquisire informazioni sui meccanismi di formazione dei micronuclei (16) (17). Possono infine essere usati altri metodi per distinguere i clastogeni dagli aneugeni, purché sia stata dimostrata la loro efficacia e siano validati. Ad esempio, per determinate linee cellulari, la misurazione dei nuclei sub-2N come eventi ipodiploidi utilizzando tecniche quali l'analisi di immagini, la citometria a scansione laser o la citometria a flusso potrebbe anche fornire informazioni utili (80) (81) (82). Le osservazioni morfologiche dei nuclei potrebbero inoltre fornire indicazioni su un'eventuale aneuploidia. Inoltre, potrebbe anche essere utile una prova di aberrazione cromosomica nelle cellule in metafase, di preferenza nello stesso tipo di cellule e secondo un protocollo di sensibilità comparabile, per stabilire se i micronuclei sono dovuti a una rottura cromosomica (sapendo che la perdita di cromosomi non sarebbe rilevata durante la prova di aberrazione cromosomica).

## Analisi

Tutti i vetrini, compresi quelli del solvente e quelli non trattati (se utilizzati) e dei controlli positivi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio delle frequenze micronucleari. È opportuno utilizzare tecniche adeguate per controllare le distorsioni o le derive in caso di utilizzazione di un sistema di analisi automatica come la citometria a flusso, la citometria a scansione laser o l'analisi di immagini. Indipendentemente dalla piattaforma automatizzata utilizzata per valutare i micronuclei, il CBPI, il RI, l'RPD o il RICC dovrebbero essere valutati contestualmente.

Nelle colture trattate con citoB, le frequenze dei micronuclei dovrebbero essere analizzate in almeno 2 000 cellule binucleate per concentrazione e controllo (83), ripartite in ugual misura tra le repliche, se sono utilizzate le repliche. Se si utilizza un'unica coltura per ciascuna concentrazione (cfr. paragrafo 28), si valutino almeno 2 000 cellule binucleate per coltura (83). Se per il conteggio è disponibile un numero sostanzialmente inferiore a 1 000 cellule binucleate per coltura (per colture doppie), o a 2 000 cellule (per una coltura singola), per ogni concentrazione, e se non si rileva un aumento significativo dei micronuclei, la prova dev'essere ripetuta con più cellule o con una concentrazione meno tossica, a seconda di quale opzione sia più appropriata. Si deve prestare attenzione a non prendere in considerazione cellule binucleate con forme irregolari o che evidenzino due nuclei di dimensioni marcatamente diverse. Inoltre, le cellule binucleate non vanno confuse con cellule multinucleate a scarsa diffusione. Le cellule contenenti più di due nuclei principali non devono essere considerate ai fini della ricerca di micronuclei, poiché la frequenza di riferimento dei micronuclei può essere superiore in queste cellule (84). Il conteggio delle cellule mononucleate è ammissibile se è dimostrato che la sostanza chimica in esame interferisce con l'attività della citoB. In tal caso, può essere opportuno ripetere la prova senza citoB. Il conteggio delle cellule mononucleate oltre a quello di cellule binucleate potrebbe fornire informazioni pertinenti (85) (86), ma non è obbligatorio.

Per quanto riguarda le linee cellulari, se il test è condotto senza l'impiego di citoB, i micronuclei vanno conteggiati in almeno 2 000 cellule per concentrazione di prova (83) e controllo, distribuite equamente tra le repliche, se si usano le repliche. Se si utilizza un'unica coltura per ciascuna concentrazione (cfr. paragrafo 28), si devono valutare almeno 2 000 cellule binucleate per coltura. Se per il conteggio è disponibile un numero notevolmente inferiore a 1 000 cellule per coltura, o a 2 000 cellule se si usa un'unica coltura, per ogni concentrazione, e se non si rileva un aumento significativo dei micronuclei, la prova dev'essere ripetuta con più cellule o con una concentrazione meno tossica, a seconda di quale opzione sia più appropriata.

Nei trattamenti con citoB dev'essere determinato un CBPI o un RI per valutare la proliferazione cellulare (cfr. l'appendice 2) a partire da almeno 500 cellule per coltura. Al contrario, nei trattamenti effettuati senza citoB, è fondamentale dimostrare che le cellule nella coltura sono in fase di proliferazione, come si è detto ai paragrafi 24-28.

## Competenza del laboratorio

Al fine di acquisire una sufficiente esperienza con una prova prima di utilizzarla regolarmente, il laboratorio deve aver effettuato una serie di esperienze con sostanze chimiche di riferimento positive che agiscono mediante meccanismi differenti (almeno una con attivazione metabolica e una senza attivazione metabolica, e una secondo un meccanismo aneugeno, con sostanze selezionate dalle sostanze chimiche elencate nella tabella 1) e con vari controlli negativi (comprese le colture non trattate e vari solventi/mezzi disperdenti). Le risposte dei controlli positivi e negativi devono essere coerenti con la letteratura. Questo requisito non si applica ai laboratori con esperienza, ossia che dispongono di una base di dati storici quale definita ai paragrafi da 49 a 52.

Una selezione di sostanze chimiche utilizzate come sostanze di controllo positivo (cfr. tabella 1) deve essere verificata nell'ambito di trattamenti di breve e di lungo periodo in assenza di attivazione metabolica, nonché nell'ambito di un trattamento di breve durata in presenza di attivazione metabolica, allo scopo di dimostrare che il laboratorio dispone della competenza necessaria per individuare le sostanze clastogene e aneugene, determinare l'efficacia del sistema di attivazione metabolica e dimostrare l'adeguatezza dei metodi di conteggio (analisi visiva al microscopio, citometria a flusso, citometria a scansione laser o analisi di immagini). Occorrerà definire un intervallo di concentrazione delle sostanze chimiche selezionate che consenta di ottenere aumenti riproducibili e correlati alla concentrazione rispetto ai valori di fondo allo scopo di dimostrare la sensibilità e l'intervallo dinamico del sistema di prova.

## Dati storici di controllo

Il laboratorio deve stabilire:

- un intervallo e una distribuzione dei controlli positivi storici;
- un intervallo e una distribuzione dei controlli negativi (non trattati, con solvente).

Al momento della prima acquisizione di dati per stabilire la distribuzione dei controlli negativi storici, i dati dei controlli negativi paralleli devono essere coerenti con i dati pubblicati, se disponibili. Successivamente, man mano che nuovi dati sperimentali ampliano la distribuzione dei controlli, i dati dei controlli negativi paralleli dovrebbero, idealmente, rientrare nei limiti di controllo al 95 % di tale distribuzione (87) (88). La base di dati dei precedenti controlli negativi del laboratorio deve inizialmente essere costituita da almeno 10 esperimenti, ma preferibilmente ne dovrebbe contare almeno 20, realizzati in condizioni di prova comparabili. I laboratori devono applicare metodi di controllo della qualità quali grafici di controllo (ad es. C-chart o X-bar-chart (88)) per stabilire la variabilità dei propri dati di controllo positivi e negativi e dimostrare che il laboratorio "domina" la metodologia (83). Altre raccomandazioni sul modo di costituire e di utilizzare dati storici (criteri di inclusione e di esclusione dei dati nella base e criteri di accettabilità per un esperimento) sono reperibili nella bibliografia (87).

Qualsiasi modifica del protocollo sperimentale deve essere valutata in termini di coerenza dei dati con le banche dati storiche esistenti del laboratorio. Qualsiasi incoerenza significativa dovrebbe portare alla creazione di una nuova banca dati di controlli storici.

I dati dei controlli negativi dovrebbero consistere nell'incidenza delle cellule con micronuclei da un'unica coltura o dalla somma delle colture replicate, come descritto al paragrafo 28. I controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente collocarsi entro limiti di controllo al 95 % della distribuzione dei dati storici dei controlli negativi contenuti nella banca dati del laboratorio (87) (88). Se i dati dei controlli negativi paralleli si situano al di fuori dei limiti di controllo al 95 %, la loro inclusione nella distribuzione dei controlli storici può essere accettata a condizione che tali dati non siano valori erratici estremi e che sia provato che il sistema di prova è «sotto controllo» (cfr. paragrafo 50) e che non vi sono stati problemi tecnici o errori umani.

## DATI E RELAZIONE

**Presentazione dei risultati**

Se si ricorre alla tecnica dell'inibizione della citocinesi, per valutare l'induzione di micronuclei si usano soltanto le frequenze di cellule binucleate con micronuclei (indipendentemente dal numero di micronuclei per cellula). Il conteggio del numero di cellule con uno, due o più micronuclei può essere registrato separatamente e potrebbe fornire informazioni utili, ma non è obbligatorio.

Per tutte le colture di controllo trattate, le colture di controllo positive e negative si determini in parallelo la citotossicità e/o la citostasi (16). Nell'eventualità in cui si ricorra al metodo dell'inibizione della citocinesi, per tutte le colture trattate e per i controlli deve essere calcolato il CBPI o l'RI quale misurazione del ritardo del ciclo cellulare. Nei trattamenti senza citoB si utilizza l'RPD o il RICC (cfr. l'appendice 2).

Devono essere forniti dati sulle singole colture. Tutti i dati vanno riportati sinteticamente in una tabella.

**Criteri di accettabilità**

L'accettazione delle prove si basa sui seguenti criteri:

- I dati sui controlli negativi paralleli possono essere inseriti nella banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio (cfr. paragrafo 50).
- I controlli positivi paralleli (cfr. paragrafo 50) rappresentano le risposte compatibili con quelle generate nella banca dati dei controlli positivi storici e producono un aumento statisticamente significativo rispetto ai controlli negativi paralleli.
- I criteri di proliferazione cellulare nel controllo con solvente sono soddisfatti (cfr. paragrafi 25-27)
- Tutte le condizioni di prova sono state testate, a meno che una di esse abbia dato risultati positivi (cfr. paragrafi 36-40).
- Un adeguato numero di cellule e di concentrazioni sono analizzabili (cfr. paragrafi 28 e 44-46).
- I criteri di selezione della concentrazione massima sono coerenti con quelli descritti ai paragrafi 24-31.

**Analisi e interpretazione dei risultati**

A condizione che tutti i criteri di ammissibilità siano soddisfatti, una sostanza chimica in esame si intende chiaramente positiva se, nelle condizioni sperimentali esaminate (cfr. paragrafi 36-39):

- almeno una delle concentrazioni di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo (89);
- un test di tendenza appropriato mostra che l'aumento è correlato alla dose in almeno una condizione sperimentale (cfr. paragrafo 28);
- i risultati si trovano all'esterno della superficie di distribuzione dei dati dei controlli negativi storici (limiti di controllo al 95 % della distribuzione di Poisson; cfr. paragrafo 52).

La sostanza chimica in esame è in grado di indurre rotture cromosomiche e/o acquisizione o perdita di materiale cromosomico in questo sistema di prova. Raccomandazioni sui metodi statistici più adeguati sono disponibili anche in letteratura (90) (91) (92).

A condizione che tutti i criteri di ammissibilità siano soddisfatti, una sostanza chimica in esame si intende chiaramente negativa se, in tutte le condizioni sperimentali esaminate (cfr. paragrafi 36-39):

- nessuna delle concentrazioni di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo;
- un test di tendenza appropriato dimostra che non vi è aumento correlato alla concentrazione;
- tutti i risultati si situano all'interno della distribuzione dei dati dei controlli negativi storici (limiti di controllo al 95 % della distribuzione Poisson; cfr. paragrafo 52).

Si considera allora che sostanza chimica in esame non sia in grado di indurre rotture cromosomiche e/o acquisizione o perdita di materiale cromosomico in questo sistema di prova. Raccomandazioni sui metodi statistici più adeguati sono disponibili anche in letteratura (90) (91) (92).

Non è necessario verificare una risposta chiaramente positiva o negativa.

Se la risposta non è chiaramente negativa o positiva, come descritto in precedenza, e/o al fine di contribuire a stabilire la rilevanza biologica di un risultato, i dati devono venire sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite. Può essere utile esaminare cellule supplementari (se del caso) o ripetere l'esperienza, eventualmente in condizioni sperimentali modificate [ad es. intervallazione delle concentrazioni, altre condizioni di attivazione metabolica (concentrazione o origine di S9)].

In rari casi, anche dopo ulteriori indagini, l'insieme dei dati non consente stabilire se si abbia un risultato positivo o negativo; il risultato dovrà pertanto essere dichiarato equivoco.

Le sostanze chimiche che inducono formazione di micronuclei nel test MNvit possono avere questo effetto come conseguenza dell'induzione della rottura cromosomica, della perdita di cromosomi o di entrambi tali eventi. Si può ricorrere a un'ulteriore analisi con anticorpi anticinetocore, sonde centromero-specifiche in situ o altri metodi per stabilire se il meccanismo di induzione di micronuclei è dovuto a un'attività clastogena e/o aneugena.

### **Relazione sulla prova**

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

*Sostanza chimica in esame:*

- origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;
- stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.
- reattività della sostanza chimica in esame al solvente/disperdente o al terreno di coltura cellulare;
- solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;
- misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura al quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

*Sostanza monocomponente:*

- natura fisica, idrosolubilità, e altre proprietà fisico-chimiche rilevanti;
- identificazione chimica: nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula di struttura, purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e realizzabile in pratica, ecc.

*Sostanza multicomponente, sostanze UVCB e miscele:*

- caratterizzate, nella misura del possibile, tramite l'identità chimica (cfr. supra), le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche rilevanti dei componenti.

*Solvente:*

- giustificazione della scelta del solvente;
- percentuale di solvente nel terreno di coltura finale.

*Cellule*

- tipo e origine delle cellule usate;
- adeguatezza del tipo cellulare usato;
- assenza di micoplasmi, per le linee cellulari;
- per le linee cellulari, informazioni sulla durata del ciclo cellulare o sull'indice di proliferazione;
- se si utilizzano linfociti, sesso, età e qualsiasi altra informazione utile riguardante i donatori di sangue, sangue intero o linfociti isolati, mitogeno utilizzati;
- durata del normale ciclo cellulare (controlli negativi);
- numero di passaggi, se del caso, per le linee cellulari;
- metodi usati per la conservazione delle colture cellulari, per le linee cellulari;
- numero modale dei cromosomi, per le linee cellulari;

*Condizioni sperimentali:*

- identità dell'inibitore della citocinesi (ad esempio, citoB), se impiegato, e la sua concentrazione oltre che la durata di esposizione delle cellule;
- concentrazione della sostanza chimica in esame espressa come la concentrazione finale nel terreno di coltura (ad es. in µg o mg/ml o mM del terreno di coltura);
- giustificazione della selezione delle concentrazioni e del numero di colture, compresi i dati sulla citotossicità e sui limiti di solubilità;
- composizione del terreno di coltura, concentrazione di CO<sub>2</sub>, se del caso, livello di umidità;
- concentrazione (e/o volume) di solvente e sostanza chimica in esame aggiunta al terreno di coltura;
- temperatura e tempo di incubazione;
- durata del trattamento;
- momento della raccolta dopo il trattamento;
- densità delle cellule al momento dell'inoculazione, se del caso;
- tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica (fonte di S9, metodo di preparazione della miscela S9, concentrazione o volume della miscela S9 e di S9 nel terreno di coltura finale, controlli della qualità di S9 (attività enzimatica, sterilità, capacità metabolica));
- sostanze chimiche dei controlli positivi e negativi, concentrazioni finali, condizioni e durata dei periodi di trattamento e di recupero;
- metodi di preparazione dei vetrini e tecniche di colorazione utilizzati;
- criteri di analisi delle cellule con micronuclei (selezione delle cellule analizzabili e identificazione del micronucleo);
- numeri di cellule analizzate;

- metodi di misurazione della citotossicità;
- eventuali informazioni supplementari pertinenti per la citotossicità e metodo utilizzato;
- criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;
- metodo o metodi di analisi statistica usati;
- metodi, quali l'uso di anticorpi anticinetocore o sonde specifiche pancentromeriche, per stabilire se i micronuclei contengono cromosomi interi o frammenti, se del caso;
- metodi utilizzati per determinare il pH, l'osmolalità e la precipitazione.

#### *Risultati:*

- definizione delle cellule accettabili per l'analisi;
- nei trattamenti senza citoB, numero di cellule esposte e numero di cellule raccolte per ciascuna coltura nel caso delle linee cellulari;
- metodo di misurazione della citotossicità impiegato, ad esempio CBPI o RI, se si ricorre al metodo dell'inibizione della citocinesi; RICC o RPD, se non si ricorre a metodi di inibizione della citocinesi; eventuali altre osservazioni (ad esempio confluenza cellulare, apoptosi, necrosi, conta in metafase, frequenza di cellule binucleate);
- segni di precipitazione e momento della determinazione;
- dati sul pH e sull'osmolalità del terreno di trattamento, se determinati;
- distribuzione delle cellule mononucleate, binucleate e multinucleate, se si utilizza un metodo di inibizione della citocinesi;
- numero di cellule con micronuclei, indicato separatamente per ciascuna coltura trattata e di controllo, e indicazione relativa alla loro origine (se da cellule binucleate o mononucleate), se del caso;
- relazione concentrazione-risposta, se possibile;
- dati sui controlli negativi (solvente) e positivi (concentrazioni e solventi) paralleli;
- dati sui controlli negativi (solvente) e positivi, con intervalli, medie e deviazioni standard, limiti di controllo al 95 % per la distribuzione e numero di dati;
- analisi statistica; eventuali valori p.

#### *Discussione dei risultati.*

#### *Conclusioni.*

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.
- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329-334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochores staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 211-219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.
- (18) Capitolo B.10 del presente allegato, Mutagenicità — test *in vitro* di aberrazione cromosomica nei mammiferi.
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.

- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.
- (24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.
- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81-116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). 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 and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on in vitro micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the in vitro micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the in vitro micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28-36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25<sup>th</sup> meeting, 16-17 November 2006, Available at: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the In Vitro Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Available at: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of in vitro Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 271-283.

- (40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the in vitro micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B<sub>1</sub> is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51-59.
- (61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (70) Surralles, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.
- (72) Pfuhrer, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.
- (73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponibile su richiesta.
- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.
- (75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an in vitro micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280-286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). in vitro micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355-362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.
- (85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). "In vitro micronucleus test", in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467".
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from in vitro Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.
-

## Appendice 1

## DEFINIZIONI

**Aneugeno:** detto di qualsiasi sostanza chimica o processo che, interagendo con le componenti del ciclo mitotico e meiotico di divisione cellulare, determina aneuploidia nelle cellule o negli organismi.

**Aneuploidia:** qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dell'intero corredo di cromosomi (poliploidia).

**Apoptosi:** morte cellulare programmata caratterizzata da una serie di fasi che portano alla disintegrazione delle cellule in piccole vescicole chiuse da membrana, le quali vengono poi eliminate mediante fagocitosi o «shedding» (clivaggio dei ricettori di membrana).

**Proliferazione cellulare:** aumento del numero di cellule dovuto alla divisione mitotica delle cellule.

**Centromero:** regione del DNA di un cromosoma in cui i cromatidi appaiati sono mantenuti uniti e nella quale sono localizzati fianco a fianco i due cinetocori.

**Sostanza chimica:** una sostanza o una miscela.

**Concentrazioni:** concentrazioni finali della sostanza chimica in esame nel terreno di coltura.

**Clastogeno:** qualsiasi sostanza chimica o processo in grado di provocare aberrazioni cromosomiche strutturali in popolazioni di cellule o organismi eucarioti.

**Citocinesi:** il processo di divisione cellulare immediatamente successivo alla mitosi e che porta alla formazione di due cellule figlie, ciascuna contenente un unico nucleo.

**Indice della cinetica di proliferazione cellulare (CBPI):** la proporzione di cellule nella fase della seconda divisione cellulare nella popolazione trattata rispetto al controllo (cfr. l'appendice 2 per la formula).

**Citostasi:** inibizione della crescita cellulare (cfr. l'appendice 2 per la formula).

**Citotossicità:** per le prove contemplate nel presente metodo di prova effettuate in presenza di citocalasina B, la citotossicità corrisponde ad una diminuzione dell'indice della cinetica della proliferazione cellulare (CBPI) o dell'indice di replicazione (RI) delle cellule trattate rispetto al controllo negativo (cfr. paragrafo 26 e appendice 2).

Per le prove contemplate nel presente metodo di prova effettuate in assenza di citocalasina B, la citotossicità corrisponde ad una diminuzione del raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) o dell'aumento relativo della conta cellulare (RICC) delle cellule trattate rispetto al controllo negativo (cfr. paragrafo 27 e allegato 2).

**Genotossico:** termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rotture, cancellazioni, alterazioni e collegamenti nucleotidi, riarrangiamenti, mutazioni genetiche, aberrazioni cromosomiche e aneuploidia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

**Cellule in interfase:** cellule non ancora approdate alla fase mitotica.

**Cinetocore:** struttura proteica che si forma nel centromero di un cromosoma e alla quale si agganciano i microtubuli del fuso durante la divisione cellulare, consentendo un movimento ordinato dei cromosomi delle cellule figlie verso i poli di queste ultime.

**Micronuclei:** piccoli nuclei, distinti e soprannumerari rispetto al principale nucleo delle cellule, prodotti durante la telofase della mitosi o della meiosi da frammenti residui di cromosomi o da cromosomi interi.

**Mitosi:** divisione del nucleo cellulare, solitamente suddivisa in profase, prometafase, metafase, anafase e telofase.

**Indice mitotico:** il rapporto tra cellule in metafase e il numero totale di cellule osservate in una popolazione cellulare; un'indicazione del grado di proliferazione cellulare di una popolazione.

**Mutageno:** un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomiche).

**Non disgiunzione:** incapacità della coppia di cromatidi di separarsi e di migrare in due cellule figlie distinte in fase di divisione, con la conseguenza che una cellula figlia presenterà un numero anomalo di cromosomi.

**Stato della p53:** la proteina p53 partecipa alla regolazione del ciclo cellulare, all'apoptosi e alla riparazione del DNA. Le cellule carenti di proteine p53 funzionali, che non sono in grado di arrestare il ciclo cellulare o di eliminare cellule danneggiate tramite apoptosi o altri meccanismi (ad esempio induzione di riparazione del DNA) relativi alle funzioni della p53 in risposta ad alterazioni del DNA, sarebbero in teoria più soggette a mutazioni genetiche o aberrazioni cromosomiche.

**Poliploidia:** aberrazioni numeriche dei cromosomi che interessano l'intero corredo cromosomico di cellule o organismi, a differenza dall'aneuploidia, che invece interessa un solo cromosoma o più cromosomi.

**Indice di proliferazione (PI):** metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

**Aumento relativo della conta cellulare (*Relative Increase in Cell Count, RICC*):** metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

**Raddoppiamento relativo della popolazione (*Relative Population Doubling, RPD*):** metodo per la misurazione della citotossicità nel caso in cui non si utilizzi citoB (cfr. l'appendice 2 per la formula).

**Indice di replicazione (RI):** la proporzione dei cicli di divisione cellulare completati in una coltura trattata rispetto al controllo non trattato, durante il periodo di esposizione e il recupero (cfr. l'appendice 2 per la formula).

**Frazione S9 di fegato:** supernatante dell'omogenato di fegato centrifugato a 9 000 g (estratto di fegato crudo).

**Miscela di frazione S9:** miscela di frazione S9 di fegato e dei cofattori necessari all'attività degli enzimi metabolici.

**Controllo con solvente:** termine generico che designa le colture di controllo che ricevono unicamente il solvente utilizzato per dissolvere la sostanza chimica in esame.

**Sostanza chimica in esame:** qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

**Controllo non trattato:** colture non sottoposte a trattamento (che non ricevono alcuna sostanza chimica in esame né solvente) ma preparate in parallelo e in modo identico alle colture esposte alla sostanza chimica in esame.

---

## Appendice 2

## FORMULE PER LA VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ

**Nei trattamenti con citoB**, la valutazione della tossicità deve basarsi sull'**indice della cinetica di proliferazione cellulare (CBPI)** o sull'**indice di replicazione (RI)** (17) (69). Il CBPI indica il numero medio di nuclei per singola cellula durante il periodo di esposizione alla citoB e può essere usato per calcolare la proliferazione cellulare. L'RI indica il numero relativo di cicli cellulari per singola cellula durante il periodo di esposizione alla citoB nelle colture trattate rispetto alle colture di controllo e può essere usato per calcolare la percentuale di citostasi:

$$\% \text{ Citostasi} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

e:

T = coltura di trattamento con la sostanza chimica in esame

C = coltura di controllo

dove:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{n.di cellule mononucleate}) + (2 \times \text{n.di cellule binucleate}) + (3 \times \text{n.di cellule multinucleate}))}{(\text{numero totale di cellule})}$$

Quindi, un CBPI pari a 1 (tutte le cellule sono mononucleate) equivale a una percentuale di citostasi del 100 %.

$$\text{Citostasi} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{n.di cellule binucleate}) + (2 \times \text{n.di cellule multinucleate})) / (\text{numero totale di cellule})_T}{((\text{n.di cellule binucleate}) + (2 \times \text{n.di cellule multinucleate})) / (\text{numero totale di cellule})_C} \times 100$$

T = colture trattate

C = colture di controllo

Quindi, un RI del 53 % significa che, rispetto al numero di cellule che si sono divise per formare cellule binucleate e multinucleate nella coltura di controllo, nella coltura trattata soltanto il 53 % di tale numero si è diviso nella coltura trattata, ossia si ha una percentuale di citostasi pari al 47 %.

**Nei trattamenti senza citoB**, si raccomanda di valutare la citotossicità sulla base **dell'aumento relativo delle conte cellulari (RICC)** o del **raddoppiamento relativo della popolazione (RPD)** (69), poiché entrambi i metodi tengono conto della proporzione di popolazione cellulare che è andata incontro a divisione.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture trattate(finale-iniziale)})}{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture di controllo(finale-iniziale)})} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{n.di raddoppiamenti della popolazione nelle colture trattate})}{(\text{n.di raddoppiamenti della popolazione nelle colture di controllo})} \times 100$$

dove:

**Raddoppiamento della popolazione** =  $[\log(\text{numero di cellule dopo il trattamento} \div \text{numero di cellule iniziale})] \div \log 2$

Quindi, un RICC o un RPD del 53 % indica una citotossicità/citostasi del 47 %.

Con un **indice di proliferazione (PI)** è possibile valutare la citotossicità contando il numero di cloni consistenti in 1 cellula (cl1), 2 cellule (cl2), da 3 a 4 cellule (cl4) e da 5 a 8 cellule (cl8)

$$\text{PI} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

Il PI è stato usato come parametro di citotossicità valido e affidabile anche per le linee cellulari coltivate in vitro in assenza di citoB (35) (36) (37) (38) e può essere considerato un utile parametro supplementare.

In ogni caso, occorre misurare il numero di cellule prima del trattamento, che deve essere identico per le colture trattate e per le colture di controllo negativo.

Benché l'RCC (cioè il numero di cellule nelle colture trattate/numero di cellule nelle colture di controllo) fosse utilizzato come parametro di citotossicità in passato, esso non è più raccomandato in quanto può indurre una sottostima della citotossicità.

Se si utilizzano sistemi di analisi automatica, come ad esempio la citometria a flusso, la citometria a scansione laser o l'analisi di immagini, il numero di cellule nella formula può essere sostituito dal numero di nuclei.

Nelle colture di controllo negativo, il raddoppiamento della popolazione o l'indice di replicazione devono essere compatibili con l'obbligo di campionare le cellule dopo il trattamento al termine di un periodo equivalente a circa 1,5-2 volte la durata del ciclo cellulare normale.»