

Este documento foi parcialmente atualizado em abril de 2018.

As alterações se referem à nova denominação da sociedade científica (antiga SBMCTA, hoje MutaGen-Brasil) e uma adequação do texto do Teste do Micronúcleo. Nenhuma modificação foi realizada no texto do Teste de Ames, pois estamos aguardando as revisões da OECD.

APRESENTAÇÃO:

Os autores deste documento permitem a sua reprodução desde que seja preservada a sua autoria e citada esta fonte. Orientações básicas de execução de TESTES DE MUTAGENICIDADE para proteção da saúde humana e do meio ambiente.

A Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental (Mutagen – Brasil), preocupada em harmonizar os testes de mutagenicidade utilizados para detecção de mutação gênica (Teste de Ames) e de mutação cromossômica (Teste do Micronúcleo) de produtos que possam causar danos à saúde humana, sejam químicos, naturais, sintéticos, fitoterápicos, amostras ambientais ou quaisquer outros, estabeleceu orientações básicas que norteiam sua realização adequada.

O objetivo destas orientações é minimizar as variações nos procedimentos metodológicos e nas interpretações de dados obtidas pelos diferentes laboratórios especializados em testes de mutagenicidade, visando uma melhor qualidade nos resultados.

As orientações propostas descrevem os requisitos mínimos que devem ser seguidos desde a preparação da amostra, as doses máximas a serem testadas, a metodologia empregada, os critérios de positividade e a elaboração do relatório técnico.

De acordo com as especificidades e características das amostras a serem testadas e com os objetivos do estudo, as orientações descritas devem ser modificadas sempre que necessário. Tais alterações devem vir acompanhadas de justificativa técnica.

O responsável técnico, que assina o relatório, deve ter especialização comprovada na área e, preferencialmente, o título de doutor.

TESTE DE MUTAÇÃO REVERSA COM *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma)

Gisela de Aragão Umbuzeiro, CETESB-SP; Vera Ma. Ferrão Vargas, FEPAM-RS; Israel Felzenszwalb, UERJ; João Antonio Pegas Henriques-UFRGS e Eliana Varanda, UNESP.

Introdução

Muitas evidências indicam que as mutações de ponto causam doenças genéticas humanas. Mutações em células somáticas e/ou células germinativas estão envolvidas em casos de câncer e doenças hereditárias e, conforme descoberto mais recentemente, em outras moléstias, como a anemia, e em distúrbios cardiovasculares, neurocomportamentais e de desenvolvimento, além de interferirem no processo de envelhecimento. O teste de mutação reversa que utiliza bactérias (teste de Ames, ensaio *Salmonella*/microsoma) é eficiente para detectar uma grande variedade de compostos mutagênicos. A maioria das linhagens bacterianas utilizadas no teste apresentam características que as tornam mais sensíveis para detecção de mutações, incluindo seqüências sítio-específicas no DNA que respondem positivamente para reversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas, ausência do sistema de reparo de DNA livre de erro e plasmídios contendo genes que causam aumento do processo de reparo sujeito a erro. A especificidade das linhagens fornece informações sobre os tipos de mutações que são induzidas por agentes genotóxicos. Existem bancos de dados disponíveis contendo resultados do teste com *Salmonella* para uma grande variedade de compostos químicos, medicamentos e misturas complexas.

Este teste de mutação gênica utiliza células procarióticas, as quais diferem das células de mamíferos em fatores tais como permeabilidade, metabolismo, estrutura dos cromossomos e processo de reparo do DNA. Os testes são realizados *in vitro*, acrescidos de uma fonte exógena de metabolização visando mimetizar parcialmente as condições de metabolização de mamíferos. O teste não fornece informação direta sobre a potência mutagênica em mamíferos, apesar da boa concordância dos resultados com o teste de Ames e ensaios de carcinogenicidade com roedores (61%, de acordo com o último estudo realizado pelo National Toxicology Program com 446 compostos) .

Princípio do teste

O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido. Tais linhagens são construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA. Essas linhagens não são capazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Suspensões de células bacterianas são expostas à amostra-teste na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica exógeno, e plaqueadas em meio de cultura mínimo. O número de revertentes é facilmente medido, pela contagem de colônias que crescem nesse meio de cultura após a exposição de uma população de bactérias à amostra a ser testada.

Descrição dos métodos

Vários procedimentos podem ser empregados na realização do teste de mutação gênica reversa em bactérias. As variações podem se referir à forma de exposição das bactérias ao agente genotóxico, bem como à utilização de diferentes volumes máximos de amostra por tratamento. As principais variações metodológicas estão listadas a seguir:

- Incorporação em placas

A cultura bacteriana, a amostra em volumes máximos de 200 microlitros e o sistema de metabolização são misturados em um tubo contendo ágar de superfície e plaqueados imediatamente em meio mínimo.

- Pré incubação

A cultura bacteriana, a amostra em volumes máximos de 200 microlitros e o sistema de metabolização são misturados em um tubo e pré-incubados por 20 a 30 minutos antes de receber o ágar de superfície e do plaqueamento em meio mínimo.

- Microsuspensão (Teste de Kado)

Tem sido bastante utilizada quando se tem pouca quantidade de amostra. Essa variação baseia-se na utilização de culturas de bactérias pré-concentradas de 5 a 10 vezes, que são misturadas com menores volumes de amostra (2 a 5 microlitros ao invés de 100 a 200 microlitros no método tradicional) e de sistema de metabolização (50 microlitros). Depois, são pré-incubadas por 90 minutos e finalmente plaqueadas em meio mínimo. Esse método tem sensibilidade 5 a 10 vezes maior que o teste convencional.

- Método direto

Recomendado na avaliação de amostras líquidas pouco concentradas (exemplo: infusões e extratos aquosos de plantas) ou quando se suspeita da presença, em uma amostra, de compostos genotóxicos que podem não ser recuperados pelos métodos tradicionais de extração orgânica (exemplo: alguns voláteis e outros compostos inorgânicos). A modificação consiste no aumento do volume máximo de amostra a ser testada para 2 mL, com alteração na concentração de ágar de superfície, para compensar a sua diluição. Esse método pode ser realizado tanto por incorporação em placas como por pré- incubação.

Para todas as variações descritas as colônias revertentes são, após dois ou três dias de incubação, contadas e comparadas com as observadas no controle negativo.

Linhagens de bactérias utilizadas

As linhagens mais utilizadas são as de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para histidina, TA1535, TA98, TA100, TA1537, TA97, TA97a, TA102 e de *Escherichia coli* auxotróficas para triptofano, WP2 ou WP2 (pKM101).

Ativação metabólica

Os ensaios devem ser realizados tanto na presença quanto na ausência de um sistema de ativação metabólica contendo fração microssomal S9 composta por um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com Aroclor-1254. A fração S9 é acrescida de cofatores e necessita de condições de pH específicas para que as reações de metabolização possam ocorrer. A fração S9 comercial está disponível no mercado internacional.

Utilização de controles negativos e positivos

Em cada ensaio devem ser incluídos controles positivos e negativos (solvente/veículo), tanto na presença como na ausência do sistema de metabolização. Utilizam-se como controles positivos compostos comprovadamente mutagênicos, em concentrações já padronizadas para cada linhagem.

Preparo de amostras e condições do teste

As amostras devem ser testadas até o limite de sua solubilidade e citotoxicidade, dissolvidas em solvente apropriado (água, DMSO ou outro). A solubilidade pode ser medida visualmente, pela precipitação observada na mistura ou na placa. A citotoxicidade pode ser verificada através de observação visual da alteração do crescimento de fundo (conhecido como "background"), pela redução do número de colônias revertentes por placa em relação ao controle negativo, ou ainda pelo decréscimo de sobrevivência celular, calculando-se a viabilidade das culturas tratadas e não tratadas com a amostra teste. As amostras devem ser testadas quanto à sua esterilidade na dose máxima utilizada no ensaio. O ensaio deve incluir pelo menos 5 (cinco) doses da amostra com três repetições por dose ou 7 (sete) doses com duas repetições.

- Compostos químicos puros ou misturas, produtos naturais e fitomedicamentos
O ensaio deve ser realizado pelo método de pré-incubação na presença e na ausência de metabolização (S9), utilizando-se pelo menos cinco linhagens bacterianas de *Salmonella typhimurium* (1) TA98, (2) TA1537 ou TA1538 ou TA97 ou TA97a, (3) TA100, (4) TA1535 e (5) TA102 ou de *Escherichia coli* WP2 ou WP2 (pKM101).

Para amostras no estado sólido e extratos secos de plantas, a dose máxima a ser testada por placa deverá ser 5mg e, para amostras no estado líquido 200 microlitros.

Para infusão ou decocto a dose máxima deverá ser 2 mL. O teste deve ser realizado pelo método direto. A amostra deverá ser preparada na maior concentração possível, ser esterilizada por membrana filtrante e verificada quanto à presença de histidina.

- Amostras ambientais

A coleta deve ser realizada utilizando-se métodos padronizados e ser representativa do ambiente em estudo. As amostras devem ser transportadas protegidas de luz e sob refrigeração.

As amostras ambientais líquidas (efluentes domésticos e industriais, águas superficiais ou subterrâneas, brutas ou tratadas) poderão ser testadas por qualquer uma das variações metodológicas descritas anteriormente. O volume depende do método de preparo de amostra. A escolha da metodologia, tanto de preparo como de teste, deve ser realizada levando-se em consideração o tipo de amostra bem como os tipos de compostos mutagênicos que possam estar presentes. O ensaio deverá ser conduzido minimamente com as linhagens TA98 e TA100 na presença e na ausência de sistema de metabolização exógeno. Outras linhagens devem ser adicionadas sempre que necessário, acompanhadas das justificativas pertinentes. A tabela resume algumas recomendações sobre as variações dos métodos adequados e doses máximas por placa.

Preparo de Amostra	Variação do Teste de Ames	Dose máxima recomendada* (mL equivalente de amostra por placa)			Volume Mínimo a ser coletado*
		Águas Residuárias	Águas Brutas	Águas para Consumo Humano	
Esterilização por filtração 0,22 um	Método Direto	2 mL	2 mL	Não se aplica	500 mL
Extração líquido-líquido (N/H+)**	Microssuspensão Teste de Ames***	5 mL 20 mL	Não se aplica	Não se aplica	250 a 1000 mL
Resina XAD4(N/H+) 1ml resina/litro de amostra	Microssuspensão Teste de Ames***	4 mL 20 mL	50 mL 200 mL	400 mL 1500 mL	10 a 50L

* orientação básica recomendada que poderá ser alterada de acordo com a concentração de matéria orgânica presente e os objetivos da análise.

** Extração realizada em pH natural (N) da amostra e em pH ácido (H+) .

*** Refere-se ao teste de Ames convencional que pode ser realizado pelos métodos de incorporação ou de pré-incubação.

Amostras ambientais sólidas (solo, resíduos e sedimentos) podem ser testadas secas ou in natura. A quantidade de 500g de amostra é suficiente. A variações metodológicas aceitáveis são:

- Solubilização em água ultra pura (1:4), esterilizada por filtração (0,22 micrômetros) e analisada pelo método direto, com dose máxima de 2 mL.
- Extração orgânica por ultrassonicação ou sohxlet, utilizando-se diclorometano/metanol ou outra combinação de solvente, dependendo do tipo de contaminante suspeito.

O solubilizado e os extratos orgânicos obtidos a partir das amostras devem ser testados minimamente com as linhagens TA98 e TA100 na presença e ausência de metabolização pelo teste de Ames por incorporação em placa ou pré-incubação. Para os extratos orgânicos é recomendado o ensaio de microssuspensão, principalmente quando a concentração do material orgânico extraído (MOE) for reduzida. As doses máximas também dependem das características da matriz analisada. Sugerimos 500 mg equivalentes de amostra in natura ou 5 mg de material orgânico extraído (MOE), determinados por gravimetria, sempre que possível. Os resultados poderão ser expressos em número de revertentes por mg de material orgânico extraído (MOE) ou por grama equivalente de amostra.

Para amostras ambientais de material particulado de ar coletado em amostradores de grande volume, o tipo de extração e as doses máximas poderão variar em função da quantidade de material disponível e do objetivo da investigação. Os extratos poderão ser testados pelo teste de Ames tradicional dando-se preferência ao método de microssuspensão, utilizando-se minimamente as linhagens TA98 e TA100 na presença e na ausência de metabolização. Os resultados poderão ser expressos em número de revertentes por mg de material orgânico extraído ou por mg de material particulado de ar equivalente, ou ainda por m3 de ar equivalente.

Análise e interpretação de dados

Os resultados do ensaio deverão ser submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com ponderação de dados de potência de 1,5. Deve ser utilizado para estas análises estatísticas o programa Salanal/Salmonel ou outro programa desenvolvido para esse fim.

Uma amostra será considerada positiva quando apresentar: ANOVA significativa ($p < 0.05$); índice ou razão de mutagenicidade (IM/RM) = a 2.0 para as linhagens TA98, TA100, TA102, TA97a e WP2 e = 3.0 para as linhagens TA1535, TA1537 e TA1538; e efeito dose-resposta significativamente positiva ($p < 0.05$). Caso a ANOVA e a dose-resposta sejam significativas, mas o IM esteja abaixo dos critérios estabelecidos, deve-se proceder como segue:

- para compostos químicos puros ou misturas, produtos naturais e fitomedicamentos, o ensaio deverá ser repetido. Se o resultado for reproduzido, ele será positivo. Caso contrário, deve-se realizar o ensaio uma terceira vez para confirmar a resposta. Se por algum motivo não for possível repetir o ensaio, o resultado deverá ser considerado inconclusivo.
- Para amostras ambientais o resultado deverá ser considerado como indícios de mutagenicidade. Se for possível repetir o ensaio e a resposta for reproduzida, o resultado será considerado positivo.

Amostras positivas ou que apresentem indícios de mutagenicidade poderão ser expressas quantitativamente em número de revertentes por unidade de amostra. Esse número é calculado a partir da porção linear da curva dose- resposta, obtida com a utilização de pelo menos três doses, sendo uma não mutagênica e uma estatisticamente positiva, utilizando-se análises de regressão linear conforme modelos do programa Salanal/Salmonel.

Relatório Técnico (Laudo de Análise)

O relatório técnico deverá incluir as seguintes informações:

1. Substância teste ou amostra

- 1.1 Dados de identificação, natureza física, pureza e número do CAS (se conhecido). Para amostras ambientais, local, método e condições de coleta, data e hora da amostragem, estocagem e preparo detalhado da amostra;
- 1.2 Propriedades físico químicas da amostra relevantes para a condução do estudo;
- 1.3 Estabilidade da amostra teste, se conhecida.

2. Solvente/veículo

- 2.1 Justificativa para a escolha do solvente/veículo;
- 2.2 Solubilidade e estabilidade da amostra teste no solvente/veículo, se conhecida.

3. Linhagens

- 3.1 Linhagens utilizadas;
- 3.2 Número de células por cultura (viabilidade);
- 3.3 Características das linhagens.

4. Condições do teste

- 4.1 Concentração da amostra-teste por placa (quantidade de amostra por placa e no caso de pré incubação também por ml de mistura) com justificativa para a seleção de doses quando menor que as doses máximas recomendadas e número de placas por concentração testada;
- 4.2 Meio de cultura e reagentes utilizados, incluindo o seu grau de pureza e/ou procedência;
- 4.3 Tipo e composição do sistema de ativação metabólica;
- 4.4 Tipo de procedimento empregado.

5. Resultados

- 5.1 Sinais de toxicidade e metodologia empregada para sua definição;
- 5.2 Sinais de precipitação;
- 5.3 Contagem individual das placas;
- 5.4 Média do número de revertentes/placas e o desvio padrão;
- 5.5 Relação dose-resposta, quando possível;
- 5.6 Análise estatística;
- 5.7 Média do número de revertentes por placas e o desvio padrão dos controles negativo e positivo;
- 5.8 Dados históricos referentes aos controles negativo e positivo (variação, médias e desvios padrões);
- 5.9 Interpretação dos resultados analíticos;
- 5.10 Conclusão
- 5.11 Bibliografia

Cetesb, São Paulo. Teste de Kado - Ensaio de microssuspensão com *Salmonella typhimurium* - Método de Ensaio. Cetesb, São Paulo, 43p., 1991 (Norma Técnica L5.241).

Cetesb, São Paulo. Mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* - Teste de Ames - Método Direto - Método de Ensaio. Cetesb, São Paulo, 36p., 1994 (Norma Técnica L5.621).

Gatehouse, D., Haworth, T., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Ohta, T., Venitt, S., Zeiger, E. (1994). Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat. Res.*, 312: 217-233.

Kado, N.Y; Langley, D & Eisenstadt, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. *Mutation Research*, 121:25-32, 1983.

Levin, D.E., Hollstein, M.C., Christman, M.,F., Schwiers, E.A., Ames, B.N. (1982b). A new *Salmonella* test strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 7445-7449.

Maron, D.M., Ames, B.N., (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.*, 113: 173-215. Mortelmans, K and Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29-60, 2000.

NIH, 2004

http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Carc_SA/NTP_Res_Compare.html
acessado em 10/12/2003

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 4: Health Effects, Bacterial Reverse Mutation Test: No. 471.

Umbuzeiro G A e Vargas V M F Teste de Mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, p.81-112 em *Mutagênese Ambiental*, Ribeiro et al., Canoas, Ed. ULBRA, 2003

Vargas, V.M.F.; Motta, V.E.P.; Henriques, J.A.P. Analysis of mutagenicity of waters under the influence of Petrochemical Industrial complexes by the Ames test (*Salmonella*/microsoma). *Rev.Bras.Genet.*, 11(3):505-518, 1988.

Vargas, VMF; Guidobono, RR & Henriques, JAP. Use of two short term tests to evaluate genotoxicity of river water treated with different concentration extraction procedures. *Mutation Research*, 343:31-52, 1995.

TESTE DO MICRONÚCLEO EM ERITRÓCITO DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGO.

Lucia Regina Ribeiro,UNESP; Daisy Maria Fávero Salvadori, UNESP; Catarina Satie Takahashi, USP; César Coppe Grisólia, UNB.

Introdução

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos.

A presença de micronúcleos (MN) é analisada em eritrócitos policromáticos (PCE, eritrócitos jovens) de medula óssea de camundongos, mas pode também ser analisada em eritrócitos normocromáticos (NCE, eritrócitos maduros).

Definições

Micronúcleo: são pequenos núcleos, separados e adicionais ao núcleo principal das células, produzidos durante a telófase da mitose por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros.

Eritrócito policromático (PCE) é um eritrócito imaturo, em um estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda contém ribossomos e, portanto, pode ser distinguido do eritrócito normocromático (NCE) por coloração seletiva para ribossomos.

Eritrócito normocromático (NCE) é um eritrócito maduro, sem ribossomos e que pode ser distinguido do eritrócito imaturo (policromático) pela coloração seletiva para os ribossomos.

Método

Princípios do método: os animais são expostos à substância teste pela via mais adequada e sacrificados em tempos apropriados após o tratamento, para a coleta da medula óssea. As preparações celulares são coradas (Giemsa ou Leishman) e analisadas para a presença de micronúcleos.

Descrição do método

Seleção dos animais: devem ser utilizados animais saudáveis, adultos jovens (entre 6 e 8 semanas de idade), distribuídos ao acaso, tanto para o grupo controle como para os grupos expostos à substância teste. Os animais, identificados individualmente, devem ser aclimatados às condições do biotério por pelo menos 5 dias antes do início do estudo. A variação de peso deve ser mínima, não excedendo 20% do peso médio de cada sexo.

Número e sexo dos animais: em cada grupo (controle e tratados com a substância teste) devem ser incluídos pelo menos 5 animais de cada sexo. Se na época do estudo existirem dados na literatura com a mesma espécie animal e com a mesma via de exposição, e que demonstrem não haver diferença substancial entre os sexos, serão suficientes 10 animais de um mesmo sexo (preferencialmente machos). Quando a exposição humana a um determinado agente ocorrer em um sexo específico, o teste deve ser realizado apenas com animais daquele sexo.

Condições de manutenção dos animais em biotério: a temperatura da sala de manutenção dos animais deve ser de 22°C (\pm 2°C); a umidade relativa do ar de 50% (\pm 20%) e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro. Os animais devem ser mantidos em caixa de polipropileno, em pequenos grupos (máximo 5) do mesmo sexo. Para a alimentação, deve ser utilizada água filtrada e ração para camundongos/ratos oferecidas sem restrição de quantidade.

Preparo da substância teste: as substâncias teste sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos apropriados e diluídas, se necessário, no momento do tratamento dos animais. As substâncias teste líquidas podem ser dosadas diretamente ou diluídas, se necessário. A menos que existam dados comprovando a estabilidade da substância teste após a estocagem, esta deve ser preparada no momento do uso.

Preferencialmente, deve-se utilizar solvente/veículo aquoso. O uso de outro solvente/veículo, que não os convencionais (NaCl 0,9%, carboximetilcelulose ou óleo de milho), deve ser apoiado em estudos anteriores indicando a sua compatibilidade. A suspensão da substância teste deve ser homogênea, a fim de assegurar que cada animal do grupo de tratamento receba a mesma concentração. O solvente/veículo não deve produzir efeitos tóxicos nos níveis de doses utilizados e não deve reagir quimicamente com a substância teste.

Controles: grupos de animais controles negativo e positivo devem ser incluídos em cada estudo e devem ser testados ao mesmo tempo que os grupos tratados. Os animais dos grupos controle devem ser idênticos aos animais tratados com a substância teste; os animais do grupo controle negativo devem ser tratados somente com o solvente/veículo de diluição da substância teste. Deve ser utilizado um grupo controle para cada tempo de amostragem. No entanto, se a existência de controles históricos apropriados justificar o uso de apenas um tempo de amostragem para o controle negativo, deve ser utilizado aquele do primeiro tempo de amostragem. Quando não há controle histórico ou dado publicado para documentar a ausência de efeitos deletérios ou mutagênicos do solvente/veículo escolhido, além do grupo controle solvente/veículo, deve ser incluído, para cada tempo de amostragem, um grupo de animais sem nenhum tratamento.

O grupo controle positivo é utilizado para assegurar que o teste está sendo realizado de acordo com os padrões estabelecidos. O propósito deste grupo é demonstrar a capacidade do investigador de identificar corretamente resposta positiva à indução de micronúcleo, nos casos em que a substância teste não apresenta nenhum efeito. Para que o resultado negativo no teste de micronúcleo seja aceito é necessário que haja aumento significativo de PCEs micronucleados nos animais do grupo controle positivo. A substância utilizada como controle positivo deve ser administrada em concentração que produza aumento moderado, mas estatisticamente significativo, na frequência de PCE micronucleados, quando comparado ao grupo controle negativo (solvente/veículo). Exemplos de compostos recomendados como controles positivos e suas respectivas doses para camundongo: etil- metanosulfonato (EMS, CAS 62-50-0), 200mg/kg; N-etil-n-nitrosourea (ENU, CAS 759-73-9), 50mg/kg; ciclofosfamida (CPA, CAS 50-18-0), 50mg/kg; mitomicina C (CAS 50-07-7), 1mg/kg. Sempre que possível, o controle positivo deve pertencer a uma classe química relacionada à substância teste. É recomendado ao laboratório, o acúmulo de dados históricos referentes aos controles negativo e positivo. A comparação entre os resultados atuais com os valores históricos fornece evidências de que o teste está dentro dos limites esperados.

Esquema de tratamento

Não há um esquema padrão de tratamento. O teste pode ser realizado de duas maneiras:

- 1- tratamento único, no qual os animais são expostos à substância teste uma única vez. Neste, as amostras de medula óssea devem ser coletadas em pelo menos dois momentos após a administração da substância teste: 24 e 48h. Amostragem em tempo menor que 24 horas após o tratamento com a substância teste, deve ser justificada. No caso de resposta positiva a um determinado tempo de amostragem, não é necessária amostragem adicional;
- 2- Tratamento múltiplo, os animais recebem dois ou mais tratamentos diários (p.ex. em intervalos de 24 horas). As amostras devem ser coletadas uma única vez, entre 18 e 24 h após o último tratamento.

Seleção das doses da substância teste

A seleção das doses da substância teste deve ser embasada em dados de toxicidade (considerando dados para a mesma espécie, linhagem, sexo, via e tempos de tratamento e duração do estudo), se disponíveis. A informação apropriada pode ser também obtida por meio de estudo piloto (com 2 ou 3 animais do mesmo sexo, por dose), utilizando o mesmo protocolo e as mesmas condições do estudo principal e focando em sinais clínicos de toxicidade para o animal ou para a medula óssea. O objetivo do teste piloto é identificar a Dose Máxima Tolerada (DMT) da substância teste, para o uso no teste definitivo. A DMT é a dose mais alta que pode ser administrada, sem induzir mortalidade, morbidade, toxicidade excessiva (baseada na presença de sinais clínicos como diarreia, diminuição do apetite e da ingestão de água, perda de peso), ou depleção da medula óssea. Embora a dose mais alta a ser testada deva ser a DMT, ela não deve exceder 2.000 mg/kg/dia. Devem ser testadas 3 doses, cobrindo uma extensão que vai da DMT até aquela que induza pouca ou nenhuma toxicidade. Geralmente, as 2 doses mais baixas devem ser 50% e 25% da DMT. Para o tempo de amostragem mais tardio, é necessário utilizar apenas a dose mais alta. Na ausência de mortalidade ou toxicidade, e se a mutagenicidade não é esperada (com base em dados de agentes químicos estruturalmente relacionados), pode ser testada uma única dose de 2.000 mg/kg/dia. Para a seleção das doses a serem testadas, pode-se também utilizar como referência, a Dose Letal 50% (DL50). Neste caso, a maior dose deve ser 80% da DL50, e as menores 50% e 25% da DL50.

Substâncias com atividades biológicas específicas a doses baixas, não tóxicas (tais como hormônios e substâncias mitogênicas), podem ser exceções aos critérios descritos e devem ser avaliadas caso a caso.

Limite de dose: embora a dose mais alta a ser testada deva ser a DMT, ela não deve exceder a 2.000 mg/kg p.c por dia. Quando, devido ao volume, não for possível administrar a dose de uma única vez, deve-se dividi-la em dois tratamentos com intervalo mínimo de 6 horas. Se o teste com a dose de 2.000 mg/kg p.c., em um único tratamento, ou dois tratamentos no mesmo dia, não produzir efeito tóxico observável, e se a mutagenicidade com base na estrutura-atividade da substância não for esperada, não será necessária a realização de um estudo completo utilizando 3 doses. Para estudos de maior duração, a dose limite deverá ser de 2.000 mg/kg p.c por dia, para tratamentos até 14 dias e 1.000 mg/kg p.c por dia, para tratamentos mais longos. Quando ocorre a exposição humana à substância teste, há necessidade de se utilizar doses mais altas que 2.000 mg/kg p.c por dia.

Vias de exposição: a substância teste pode ser administrada por diferentes vias: oral (dieta ou água de beber), gavagem (sonda gástrica, utilizando cânula ou agulha especial), ou injeção intraperitoneal (IP). Outras vias de exposição podem ser utilizadas quando justificadas (dérmica, inalatória, subcutânea, etc). No entanto, deve-se considerar como a via mais apropriada, aquela que mais se aproxima à exposição humana, ou levando-se em conta as limitações práticas para a realização do teste.

O volume máximo de líquido que pode ser administrado de uma única vez por gavagem depende do tamanho do animal teste, não podendo exceder a 2 ml/100 g p.c.. A utilização de volumes maiores deve ser justificada. Exceto para substâncias irritantes ou corrosivas, as quais normalmente apresentarão efeito exacerbado em altas concentrações, a variabilidade do volume a ser testado deve ser minimizada, ajustando-se a concentração, para assegurar um volume constante em todas as doses. A temperatura da solução/suspensão deve ser próxima à temperatura corpórea. Preferencialmente, os fluidos para administração parenteral devem ser isotônicos.

Análise do material: todas as lâminas, incluindo aquelas dos controles positivo e negativo, devem ser codificadas antes da análise. A proporção de eritrócitos imaturos (PCE) dentre o total de eritrócitos (PCE + NCE) deve ser determinada contando-se pelo menos 200 eritrócitos (PCE + NCE) por animal. Para avaliação de células micronucleadas, devem ser analisados pelo menos 2.000 PCE por animal. Informações adicionais podem ser obtidas pela análise de MN em eritrócitos normocromáticos (NCE). A proporção de PCE não pode ser menor que 20% do valor do controle. Quando os animais são tratados continuamente por 4 semanas ou mais, podem ser também analisados pelo menos 2000 NCE por animal, para avaliação da frequência de micronúcleo.

Apresentação dos resultados: considerando que a unidade amostral é o animal (não as células), os dados individuais devem ser apresentados em uma tabela (número de PCEs analisados, número de PCEs micronucleados e proporção de PCE/total de eritrócitos). Quando os animais forem tratados por 4 semanas, ou mais, devem ser também apresentados os dados referentes aos NCEs. Quando não houver diferença entre os sexos, os dados podem ser combinados para a análise estatística.

Análise e interpretação dos resultados: os critérios para se definir resultados positivos ou negativos devem ser estabelecidos antes da condução do experimento.

1) Critérios para se definir o resultado como positivo: a) aumento do número de células micronucleadas relacionado à dose; b) aumento significativo no número de células micronucleadas, quando se utiliza um único grupo tratado, com uma única dose da substância teste, a um único tempo de amostragem.

Deve ser considerada, em primeiro lugar, a relevância biológica dos resultados. Os métodos estatísticos são utilizados como auxiliares na avaliação e interpretação dos resultados do teste. O significado estatístico não deve ser o único fator determinante para uma resposta positiva. Os resultados contraditórios devem ser esclarecidos pela utilização de testes adicionais, preferencialmente utilizando uma modificação das condições experimentais deste mesmo teste.

2) A substância teste, para a qual os resultados não satisfazem o critério dos parágrafos acima, é considerada não mutagênica.

3) Embora, na sua maioria, os experimentos apresentem resultados claramente positivos ou negativos, em alguns casos os dados podem não ser conclusivos. Os resultados positivos indicam que a substância induz micronúcleos que são resultantes de danos cromossômicos ou danos ao aparelho mitótico nos eritroblastos da espécie testada. Os resultados negativos indicam que, sob as condições do estudo, a substância teste não induz formação de micronúcleos nos eritrócitos imaturos (PCE) da espécie testada.

4) Deve ser discutida a probabilidade da substância teste ou seus metabólitos alcançarem a circulação geral ou o tecido alvo.

Relatório Técnico (Laudo de Análise)

O Relatório Técnico deve incluir as seguintes informações:

1) Especificações da substância teste

- identificação (CAS, se houver)
- natureza física e grau de pureza
- propriedades físico-químicas relevantes para a condução do estudo
- estabilidade da substância teste, se conhecida

2) Solvente/veículo

- justificativa para a escolha do solvente/veículo
- solubilidade e estabilidade da substância teste no solvente/veículo, se conhecida

3) Especificações do animal

- espécie e linhagem usada
- número, idade e sexo
- procedência, condições de manutenção, dieta, etc.
- peso individual no início do experimento, incluindo média e desvio padrão do peso corpóreo para cada grupo experimental

4) Condições do teste

- controles positivo e negativo (veículo/solvente)
- dados do estudo piloto, se realizado
- critérios para seleção das doses
- detalhes da preparação da substância teste
- detalhes da administração da substância teste
- critérios para seleção da via de exposição
- métodos para verificação da presença da substância teste na corrente sanguínea ou no órgão alvo, se aplicável

- conversão da concentração da substância teste na dieta ou água de beber, de ppm para mg/kg p.c por dia, se aplicável
- detalhes da qualidade da ração e da água
- descrição detalhada do tratamento e tempo de coleta da medula
- métodos de preparação das lâminas
- métodos para avaliação da toxicidade
- critérios para a análise de eritrócitos micronucleados imaturos (PCE)
- número de células analisadas por animal
- critérios para considerar o estudo como positivo, negativo ou contraditório

5) Resultados

- sinais de toxicidade
- proporção de PCEs entre o total de eritrócitos
- número de PCEs micronucleados para cada animal
- média e desvio padrão do número de PCEs micronucleados por grupo
- relação dose-reposta, quando possível
- análise estatística e método aplicado
- dados do grupo controle negativo simultâneo e histórico
- dados do grupo controle positivo simultâneo

6) Discussão dos resultados

7) Conclusão

8) Bibliografia

As referências seguintes devem ser consultadas para informações adicionais sobre o teste.

Choy, W.N. Regulatory Genetic toxicology tests. In: Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (Choy, W.N. ed.), Marcel Dekker, Inc, New York, pp.93-113. (2001).

EPA - Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Agosto 1998.

Fielder, R.J. et al. Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In vivo Mutagenicity Assays. *Mutagenesis* 7, 313–319 (1992).

George, E. et al Micronucleus induction by azobenzene and 1,2-dibromo-3-chloropropane in rat: Evaluation of a triple-dose protocol. *Mutation Research* 324:129-134 (1990).

Gollapudi, B. and McFadden, L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Research* 347, 97–99 (1995).

Heddle, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 18: 187-190 (1973).

Heddle, J.A. et al. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Research* 123: 61–118 (1983).

ICH – International Conference on Harmonisation. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. In: ICH Guideline. 2011. [http:// www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/ S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf). Accessed 13 May 2016.

Lovell, D.P. et al. Statistical Analysis of In vivo Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184–232 (1989).

MacGregor, J.T. et al. Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. In: *Developments in Science and Practice of Toxicology*. Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp. 555–558 (1983).

MacGregor, J.T. et al. Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. *Mutation Research* 189: 103–112 (1987).
MacGregor, J.T. et al. The In vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14: 513–522 (1990).

Mavournin, K.H. et al. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 239, 29–80 (1990).

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development (2014). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Guideline for the Testing of Chemicals. Updated Test Guideline 474. Paris, France. Available online for a fee at <http://www.oecd.org//ehs/test/health.htm> #ADOPTED GUIDELINES.

Ribeiro, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: *Mutagênese Ambiental* (Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, Eds), Editora ULBRA, pp.173-200 (2003)

Richold, M. et al. In vivo Cytogenetics Assays, In: D.J.Kirkland (Ed.) *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115–141 (1990).

Schmid, W. The micrococus test. *Mutation Research* 31: 9-15 (1975)