

REVISION BIBLIOGRAFICA ANALISIS CITOGENETICO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES EN LINFOCITOS PERIFERICOS IN VIVO. SU PAPEL EN EL "MONITOREO" BIOLOGICO

A. Rojas

Laboratorio de Mutagénesis, Departamento de Farmacología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 25 de febrero de 1987

ABSTRACT. Different aspects related to structural chromosome aberration analysis on peripheral blood lymphocytes, as well as its role on monitoring the occupational exposure to mutagens and carcinogens are reviewed. Features of the in vitro system, technical and methodological considerations, chromosome damage evidences from exposed populations and health significance of chromosomal injury are discussed.

RESUMEN. En el presente trabajo se analizan diferentes aspectos relacionados con el análisis de aberraciones cromosómicas estructurales así como su papel en los estudios de monitoreo de poblaciones ocupacionalmente expuestas a mutágenos y cancerígenos. Se discuten diversos aspectos tales como: características del sistema in vitro, consideraciones metodológicas y técnicas, evidencias de daño en poblaciones expuestas, así como, el significado para la salud de dicho indicador.

INTRODUCCION

El "monitoreo" biológico de grupos de individuos expuestos a compuestos genotóxicos, es desde hace ya algunos años un elemento constante dentro de los programas de salud ocupacional en diferentes países.

Entre las metodologías más empleadas para este propósito se encuentran las técnicas citogenéticas y dentro de ellas, el análisis de aberraciones cromosómicas estructurales que es hasta el presente el más utilizado.

En la actualidad, estas metodologías constituyen el único método de rutina aceptado para la determinación de daño genético en células somáticas.

En el presente trabajo se discuten diversos aspectos de interés desde el punto de vista básico como metodológico, de esta técnica y su papel en el "monitoreo" de grupos de individuos expuestos a compuestos genotóxicos.

Características del sistema in vitro

Desde el punto de vista citológico la mayoría de los linfocitos periféricos se encuentran en la fase G₀ del ciclo celular. Sin embargo, ellos pueden ser inducidos a dividirse por medio de la es-

timulación in vitro con determinados mitógenos tales como fito hemaglutinina y concanavalina A.

Inmediatamente después de la estimulación in vitro (comúnmente realizada con fitohemaglutinina), se produce un incremento de la síntesis de ARN, fundamentalmente de tipo mensajero,¹ a como, un aumento del número de polirribosomas.²

Respecto al inicio de la síntesis de ADN, ésta comienza aproximadamente 24 h después de la estimulación mitogénica aun cuando este comienzo está condicionado por factores técnicos (tipo medio utilizado, tipo de suero, mitógeno empleado), así como características intrínsecas del donante.^{3,4} De toda la población folicular, la mayor parte responde a la estimulación mitogénica incrementando la síntesis de ADN y proteínas, pero sólo el 50 % los linfocitos estimulados entran en fase S, de los cuales solamente todos atraviesan la fase M del ciclo celular.⁵

La fitohemaglutinina estimula principalmente la fracción de linfocitos T que se encuentra en sangre periférica,⁶ pero en tiempos avanzados de cultivo los linfocitos B o "non-T" pueden ser estimulados vía función "helper" de los linfocitos T.⁶⁻⁸

La mayor parte de las células entran en su primera división celular *in vitro*, después de la estimulación, a las 48 h y la proporción de primeras metafases (M1) declina hasta valores cercanos al 0 % a las 72 h de iniciado el cultivo.³

Tipos y clasificación de las aberraciones cromosómicas

El término "aberraciones cromosómicas" aplicado a cromosomas en metafase incluye tanto aberraciones de tipo cromosómico donde ambas cromátidas están involucradas en la lesión, así como aberraciones de tipo cromatídico, donde una sola cromátida está afectada.

Las aberraciones de tipo cromosómico generalmente representan daño ocasionado en los estadios G₀ - G₁ del ciclo celular y éste fue duplicado durante la fase S del ciclo celular.

Las aberraciones cromatídicas son el resultado de daño producido durante la fase G₂ o S del ciclo celular (Fig. 1).

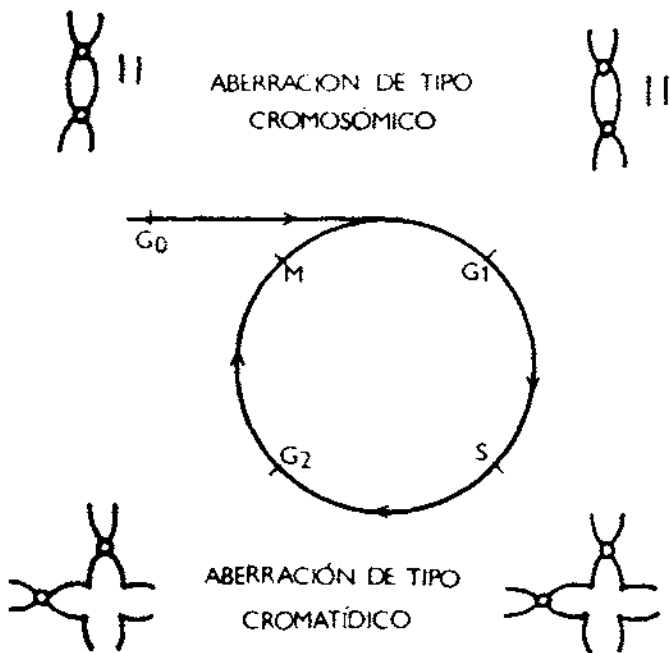


Fig. 1. Representación esquemática de un ciclo celular típico y los tipos de aberraciones formadas en sus diferentes estadios

Diversos esquemas de clasificación de las aberraciones cromosómicas estructurales han sido descritos detalladamente en la literatura.⁹⁻¹²

Consideraciones técnicas

Los linfocitos constituyen el 90 % de la población de células linfáticas humanas y se encuentran localizados principalmente en los nódulos linfáticos y en otros tejidos, pero solamente una pequeña proporción (aproximadamente el 2 %) se encuentra circulando en el torrente sanguíneo.

Sin embargo, existe una alta recirculación de linfocitos entre sangre, nódulos linfáticos y bazo. Por esta razón cerca del 90 % de los linfocitos que se encuentran en torrente sanguíneo son linfocitos recirculantes siendo en su mayoría linfocitos T.^{14,15}

Respecto al ciclo de vida *in vivo*, los linfocitos pueden dividirse en dos grandes grupos: linfocitos de corto período de vida (1 a 10 d) y linfocitos de largo período de vida (al menos 3 años). En el torrente sanguíneo la proporción de linfocitos de corto período de vida es de sólo 10 % comparado con el 90 % de linfocitos de larga vida.^{14,15}

Esta última característica representa una ventaja metodológica del sistema para estudios *in vivo*, pues permite la detección de efectos mutagénicos que ocurren después de tratamientos o exposiciones a largo plazo, debido a la acumulación de lesiones en linfocitos que se encuentran en el estadio G₀ del ciclo celular.¹⁶

Los resultados de las investigaciones *in vivo* utilizando el presente sistema, están influenciados en gran medida por los mecanismos moleculares involucrados en la formación de aberraciones cromosómicas.¹⁹⁻²⁰

Los agentes mutagénicos (químicos o físicos) son capaces de inducir una amplia gama de alteraciones en la molécula de ADN (Fig. 2).

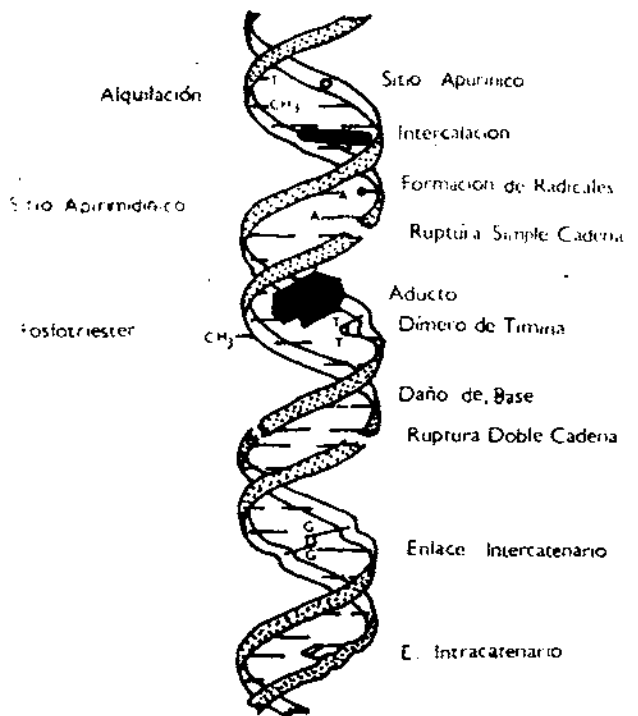


Fig. 2. Diferentes lesiones primarias en el ADN debido al tratamiento con agentes mutagénicos

La mayor parte de las aberraciones cromosómicas inducida por la casi totalidad de mutágenos químicos son debidas a errores que ocurren durante la replicación del ADN, probablemente por la replicación errónea, así como por errores durante la reparación.^{18,20-22} (Fig. 3).

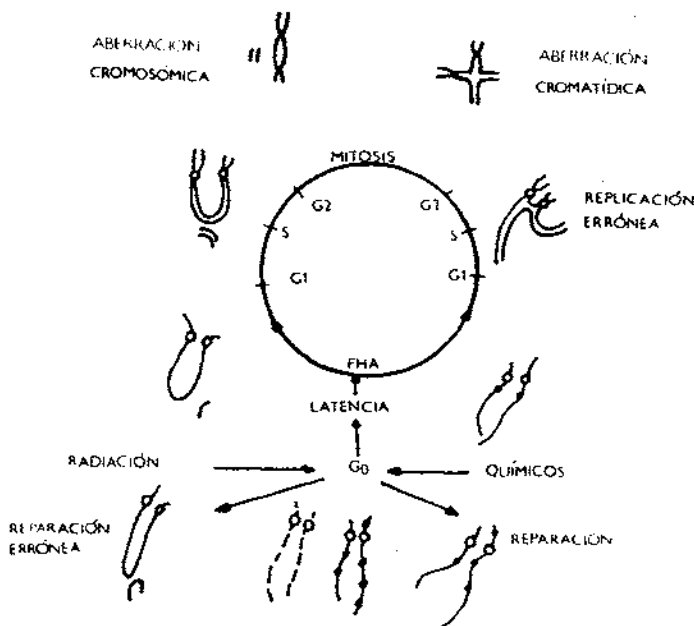


Fig. 3. Representación del origen de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos periféricos, los cuales se encuentran en estado de reposo (G0). Los puntos representan regiones de la molécula de ADN que han sido alterados químicamente, las cuales originarán aberraciones de tipo cromatídico cuando pasen a través de la fase S del ciclo celular (replicación errónea). En el caso de la radiación ionizante, las lesiones inducidas o resultantes son mayoritariamente rupturas de doble cadena, representadas por discontinuidades en los cromosomas. Estas lesiones son fijadas inmediatamente como aberraciones de tipo cromosómico debido a reparación errónea.

Generalmente los mutágenos químicos inducen aberraciones de tipo cromatídico en la fase G1 y S. Dichas aberraciones pueden ser observadas en la primera división mitótica (M1) posterior a la ocurrencia del daño primario. Las lesiones producidas en G2 serán observadas como aberraciones cromatídicas en la segunda división mitótica (M2) después de que se haya producido la lesión.

En el caso de las radiaciones, las lesiones son fijadas inmediatamente. En los linfocitos periféricos, los cuales se encuentran en fase G0, las lesiones inducidas por radiaciones ionizantes serán reparadas correcta o erróneamente de forma inmediata (debido a la naturaleza de la lesión inducida); en este último caso se originarán aberraciones de tipo cromosómico (Fig. 3), principalmente cromosomas dicéntricos, anillos, translocaciones, inversiones y fragmentos. La frecuencia de estas aberraciones, su mayor parte están enmarcadas dentro de la categoría de aberraciones estables, no puede ser inducida excepto por una dilución poblacional de linfocitos no afectados o por recambio entre sangre, nódulos linfáticos y bazo.¹⁶

En el caso de lesiones inducidas por sustancias químicas, éstas deben pasar a través de la fase S para originar aberraciones y generalmente los linfocitos periféricos sólo entran en fase S por estimulación in vitro. Por ende, las células, probabilísticamente pueden permanecer un largo período (días, semanas, meses, e incluso años) en el torrente sanguíneo sin entrar en fase S. Podría pensarse que este largo período de vida permitiera un largo tiempo potencial de reparación de lesiones. Sin embargo, ha sido demostrado que solamente alrededor del 30 % de las lesiones inducidas pueden ser reparadas antes que la célula entre en fase S,²³ lo cual permite que el 70 % restante pueda ser potencialmente expresado en la siguiente metafase (M1) después de la estimulación.

Por lo tanto, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos que sufren su primera división celular in vitro después de la estimulación puede ser considerada como un indicador bastante representativo de la situación in vivo.²⁴

Elección de individuos expuestos y controles

Este punto constituye uno de los aspectos metodológicos de mayor importancia en un estudio citogenético o cualquier otra metodología, pues de él depende en gran medida el poder establecer una verdadera relación causa-efecto en el grupo expuesto que será sometido al estudio.

El grupo expuesto, será tan homogéneo como sea posible. Es condición obligatoria coleccionar datos anamnésticos relacionados con la edad, sexo, hábitos tóxicos (hábito de fumar, consumo de alcohol) historia ocupacional previa, exposición a rayos X, radioterapia, influencia de enfermedades virales recientes o vacunación, consumo de medicamentos, todos estos datos deben ser analizados con el objetivo de excluir a aquellos individuos que hayan estado o estén sometidos a exposición o contacto a conocidos agentes clastogénicos.

Las bases matemáticas para el tamaño de muestra, así como el número mínimo de metafases a analizar han sido discutidos ampliamente por diferentes autores.^{13,25,26}

La elección del grupo control es también de suma importancia, ya que la edad y posiblemente el sexo son factores que poseen determinada influencia directa sobre la frecuencia "espontánea" de aberraciones cromosómicas,^{19,24} el apareamiento de los sujetos estudiados con controles sanos del mismo sexo y aproximadamente la misma edad, así como semejantes hábitos tóxicos parecen ser una buena medida para eliminar el efecto de dichos factores.^{25,27,28}

Estos individuos controles deben ser elegidos o rechazados bajo los mismos criterios de elección/rechazo utilizados en el grupo expuesto.

Evidencias de daño cromosómico en poblaciones expuestas

Daño inducido por radiación ionizante

Daño inducido por sustancias químicas

La base de la dosimetría biológica en la protección radiológica la constituye la cuantificación de aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos periféricos y su relación con la dosis absorbida.²⁹⁻³¹

Este método es empleado fundamentalmente para detectar exposición aguda a radiaciones ionizantes. Hace ya más de 20 años que se realizó el primer estudio de dosimetría biológica cuantitativa sobre la base de detectar daño cromosómico en linfocitos periféricos.³²

Las curvas dosis-efecto están basadas asumiendo que la radiosensibilidad de linfocitos irradiados in vivo es similar a la exposición in vitro. Para la construcción de estas curvas se tomaron en cuenta los mecanismos de inducción de aberraciones cromosómicas, así como, toda una serie de consideraciones biofísicas.

De esta forma han sido establecidas relaciones lineales o cuadráticas lineales entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas y la dosis adsorbida.³⁰

Con el empleo de esta metodología ha sido demostrado un efecto acumulativo a dosis muy por debajo del nivel máximo permisible de 5 rem/año.³³

El incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos, ha sido descrito en numerosas ocasiones en sujetos expuestos a compuestos genotóxicos como ha sido encontrado para los agentes siguientes: benceno,²⁷ haloéteres,⁴² cloropreno,⁴³ epíclorhidrina,^{44,45} hidrocarburos policíclicos aromáticos,⁴⁶ estireno,⁴⁷ cloruro de vinilo,⁴⁸ y drogas citostáticas.⁴⁹

El análisis citogenético de linfocitos periféricos de trabajadores expuestos ocupacionalmente a mutágenos y carcinógenos, parece ser hasta el presente la única técnica de rutina aceptada para la detección de daño genético en células somáticas.^{25,26}

Este ha sido recomendado solamente cuando la actividad mutagénica, de los compuestos involucrados en el patrón de exposición, haya sido demostrada en otros ensayos de mutagenicidad.

El análisis citogenético de linfocitos periféricos ha sido recomendado como metodología en los chequeos periódicos a trabajadores expuestos a riesgo químico.³⁴

Igualmente, esta metodología ha tenido un importantísimo papel en el chequeo de la seguridad de las máximas concentraciones permisibles establecidas para los compuestos químicos de uso industrial, pues si bien todos la tienen establecida, esto ha sido sobre la base de criterios toxicológicos y no de genotoxicidad.

Es de gran importancia en este aspecto la determinación del "umbral de seguridad", es decir, la dosis (concentración . tiempo) por debajo de la cual no existe efecto genético detectable (Fig. 4). Este umbral puede variar de un individuo a otro en dependencia de parámetros bioquímicos y fisiológicos característicos del individuo.

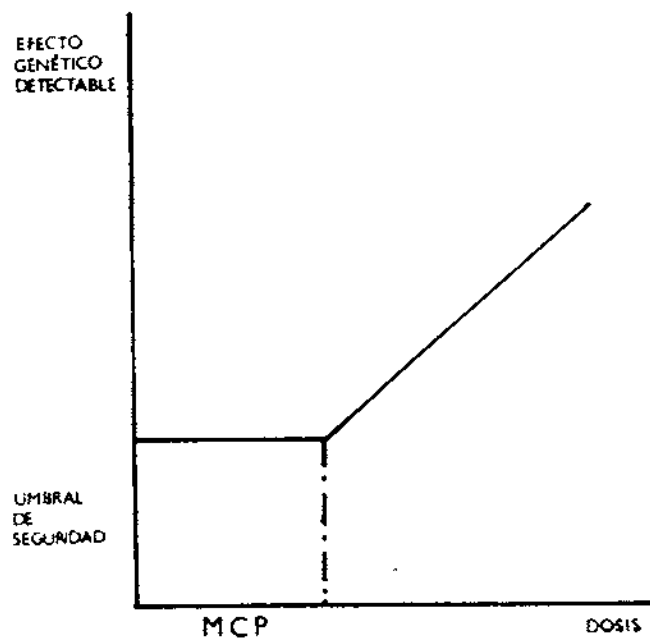


Fig. 4. Umbral de seguridad

Significación del daño cromosómico

La mayor parte de las evidencias experimentales dentro del campo de la carcinogénesis química sugieren la importancia del daño genético en el proceso de transformación maligna.³⁵

Entre las evidencias que relacionan las aberraciones cromosómicas con los procesos de mutagénesis y carcinogénesis se encuentran los denominados "síndromes de ruptura cromosómica" entre los que se pueden citar la Anemia de Fanconi y la Ataxia telangiectasia, ambos caracterizados por la alta frecuencia de rupturas y reordenamientos cromosómicos, además de una alta incidencia de leucemias entre estos individuos.³⁶

Sin embargo, la implicación directa para los procesos de carcinogénesis y mutagénesis de la frecuencia incrementada de aberraciones cromosómicas en sujetos expuestos a agentes genotóxicos está actualmente bajo discusión.

Desde ya algunos años fue demostrada una correlación entre la prevalencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos y anomalías citológicas en tejido diana específico (células bronquiales) en mineros que laboran en la extracción de uranio. Esta población posee un alto riesgo para el desarrollo de neoplasias pulmonares.³⁷

Datos recientes respecto a la localización de oncogenes en el genoma de mamíferos y humanos y el papel de los reordenamientos cromosómicos en su activación,³⁸⁻⁴¹ han brindado un apoyo sólido a la asociación entre daño cromosómico y malignización.

El incremento de daño cromosómico en un grupo de individuos expuestos a agentes genotóxicos tiene como principal relevancia que potencialmente el mismo daño puede ser inducido en otras células del organismo, tanto en tejido somático como germinal.

En los casos en que haya sido establecido una relación bien documentada entre daño cromosómico y determinada exposición, ésta debe ser considerada, como una señal de exposición a compuestos mutagénicos y potencialmente carcinógenos, en la población estudiada, sin embargo, dicha consideración debe ser evaluada sobre bases de grupo, pues el conocimiento actual no permite valorar consecuencias individuales a no ser que una frecuencia incrementada de aberraciones cromosómicas vaya asociada con otros parámetros anatomopatológicos.

BIBLIOGRAFIA

- Ling N.R. and Kay J.E. Lymphocyte Stimulations. Elsevier North-Holland, Amsterdam, 1975.
- Soren L. and Biberfeld P. Exp. Cell. Res. 92, 513, 1975.
- Obe G., Beek B. and Dudin G. Humangenetik 28, 295, 1975.
- Janossy G. and Greaves M.F. Clin. Exp. Immunol. 3, 525, 1972.
- Steffen J.A., Swierkowska K., Michalowski A., Kling E. and Nowakowska A. In vitro kinetics of human lymphocytes activated by mitogens. In Mutagen-induced chromosome damage in man. H.J. Evans and D.C. Lloyd editors, 89-107, Edinburgh University Press, 1978.
- Phillips B. and Roitt I.M. Nature (London) New Biol., 241, 254, 1973.
- Vischer T. J. Immunol. 109, 401, 1972.
- Obe G. and Beek B. The Human Leukocyte System in Chemical Mutagens. Principles and Methods for their detection. F.J. de Serres and A. Hollander editors 337-400 Plenum Press, New York, 1982.
- Buckton K.C. and Evans H.J. World Health Organization, Geneva, 1972.
- Evans H.J. and O'Riordan M.L. Mutat. Res. 31, 135, 1975.
- ISNC. Cytogenet. Cell Genet. 21, 309, 1978.
- Savage J.R.K. J. Med. Genet. 12, 103, 1975.
- Archer P.G., Bender M., Bloom A.D., Brewen J.G., Carrano A.V. and Preston R.J. Report of Panel 1: Guidelines for cytogenetic studies in mutagen-exposed human population. In: Bloom A.D. (ed) Guidelines for studies of human populations exposed to mutagenic and reproductive hazards, New York, March of Dimes Birth Defects Foundation 1-35, 1981.
- Trepel F. Kinetik lymphatischer Zeller, in lymphozyt und Klinische Immunologie. H. Thernl and H. Begemann editors., 15-26 Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 1976.
- Trepel F. Das lymphatische Zellsystem: Struktur, allgemeine physiologie und allgemeine Pathophysiologie. Blut und Blutkrankheiten, Teil 3. Leukocytares und retikulares. System I, H. Begemann, editor, 1-191 Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, New York, 1976.
- Natarajan A.T. and Obe G. Ecotoxicol. Environ. Safety 4, 468, 1980.
- Bender M.A., Griggs H.G. and Bedford J.S. Mutat. Res. 83, 197, 1974.
- Bender M.A. Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production. In: DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. W.M. Generoso, M.A. Shelby and F.J. de Serres editors, Plenum Press, New York, 1980.
- Evans H.J. Cytogenet. Cell Genet. 33, 48, 1982.
- Natarajan A.T. Origin and Significance of Chromosomal alterations. In: Mutations in Man. G. Obe (ed) 156 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1984.
- Preston R.J. Cytogenet. Cell Genet. 33, 20, 1982.
- Perry E.P. Mutagen-induced chromosome damage in Man. In: The use of human cells for the evaluation of risk from physical and chemical agents. A. Castellan: 77 Ed. Plenum Press, New York, 1983.
- Pero R.W. and Norden A. Mutagen Environm. Res. 24, 409, 1981.
- Forni A. Chromosomal aberrations in monitoring exposure to mutagens-Carcinogens in: IARC Scientific Publications #59 A. Berlin, M. Draper, K. Hemminki and H. Vainio (editors Lyon IARC, 1984.
- Sram R.J. and Kuleshov N.D. Arch. Toxicol. Suppl. 4, 11, 1980.

26. Srám R.J. Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes as a method for monitoring environmental levels of mutagen. In: Industrial and Environmental Xenobiotics. I. Gut, M. Cirkrt, and G.L. Plaa, (editors) Springer-Verlag, Heidelberg, 1981.
27. Forni A., Pacifico E. and Limonta A. Arch. Environm. Hlth. 22, 373, 1971.
28. Forni A., Pacifico E. and Vigilani E.C. Arch. Environm. Hlth. 23, 385, 1971.
29. Awa A.A., Nerrilshi S., Honda T., Yoshida M.C., Sofuni T. and Matsui T. Lancet 2, 903, 1971.
30. Bauchinger M. Cytogenet effects in human lymphocytes as a dosimetry system. In: Biological Dosimetry. W.G. Eisert and M.L. Mendelsohn, (editors). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1984.
31. Lloyd C.D. An overview of radiation dosimetry by conventional cytogenet methods. In: Biological Dosimetry. W.G. Eisert and M.L. Mendelsohn (editors). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984.
32. Bender M.A. and Gooch P.C. Radiat. Res. 29, 568, 1966.
33. Evans H.J., Buckton K.E., Hamilton G.E. and Carothers A. Nature 277, 531, 1979.
34. Srám R.J. Gechoslovak Medicine 1, 193, 1978.
35. Sorsa M. J. of Toxicol. and Environm. Hlth. 6, 977, 1980.
36. German J. Patterns of neoplasia associated with the chromosome-breakage syndromes. In: Chromosome mutation and Neoplasia. 134, German J. ed. Alan R. Liss inc. New York, 1983.
37. Brandon W.F., Saccomanno G., Archer V.E., Archer P.G. and Bloom A.D. Radiat. Res. 76, 159, 1978.
38. Sanger W.C. Ann. of Clinical and Laboratory Science 13, 366, 1983.
39. Sager R. Genomic rearrangements and the origin of cancer in: Chromosome Mutation and Neoplasia 333-346 ed. Alan R. Liss. New York, 1983.
40. Sandberg A.A. Cancer Genet. and Cytogenet. 8, 277, 1983.
41. Yunis J.L. Science, 221, 227, 1983.
42. Zudová Z. and Landa K. Mutat. Res. 46, 242, 1977.
43. Katosova L.D. Gig. Tr. Prof. Zabol. 17, 30, 1973.
44. Kucerová M., Zhurkov V.S., Polivkova Z. and Ivanova J.E. Mutat. Res. 48, 355, 1977.
45. Srám R.J., Zudová Z. and Kuleshov N.P. Mutat. Res. 70, 115, 1980.
46. Srám R.J. Mutat. Res. 120, 181, 1983.
47. Meretoja T., Vainio H., Sorsa M. and Harkonen H. Mutat. Res. 56, 193, 1977.
48. Ducatman A., Hirschora K. and Selikoff I.J. Mutat. Res. 31, 163, 1975.
49. Gebhart E., Losing J. and Wopfner F. Human. Genet. 55, 53, 1980.

II CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA

7 al 11 de agosto de 1990

Ciudad de La Habana, Cuba

La Asociación Latinoamericana de Biotecnología y Bioingeniería (ALABYB), se complace en convocar la celebración del II Congreso Latinoamericano de Biotecnología, el cual se llevará a cabo en las instalaciones del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba, del 7 al 11 de agosto de 1990.

El Primer Congreso Latinoamericano de Biotecnología se efectuó en Tucumán, Argentina en 1987.

Es propósito de esta Asociación, realizar un congreso cada dos años en un país diferente de América Latina.

En esta ocasión el Congreso se realizará en Cuba con el coauspicio del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar y el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

TEMATICAS

Aplicaciones de la Biotecnología en la:

Salud Pública

Producción agropecuaria

Industria de Transformaciones

Protección del medio ambiente

(Continúa en la página 74)