

ESTUDIO DEL INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS EN GEMELOS

Carmen Navarrete*
Eyra Cárdenas*
Rosenda Peñaloza*
Carlota Núñez*
Héctor Rodríguez*
Fabio Salamanca*

El intercambio de cromátides hermanas (ICH), consiste en la obtención de cromosomas con cromátides químicamente diferentes mediante la incorporación *in vitro* de una base análoga a la timidina, la bromodeoxi-uridina (BrdU) y representa el intercambio de los productos de la replicación del ADN en *loci* cromosómicos homólogos.

A pesar de que el mecanismo de formación del ICH no se ha dilucidado, este fenómeno ofrece una oportunidad particular para tratar de entender la compleja interrelación estructura-función de los cromosomas de organismos superiores.

Con el empleo de la BrdU (Zakharov y Egolina, 1972), el fluorocromo 33258 Hoechst (Latt, 1973) y el colorante de Giemsa (Korenberg y Freedlender, 1974; Perry y Wolff 1974), se ha logrado la visualización clara del intercambio entre cromátides hermanas, el cual sólo había podido estudiarse mediante la técnica de autorradiografía, utilizando timidina marcada con tritio (Taylor, 1958).

El análisis de los ICH ha resultado de notable utilidad en la valoración del efecto que numerosos agentes clastogénicos tienen sobre la estructura cromosómica (Kato, 1974; Bradley, Hsu y Harris, 1979; Nakanishi y Schneider, 1979) y en el

* Unidad de Investigación Clínica en Genética Humana, C.M.N.-IMSS México.

diagnóstico y caracterización de algunos padecimientos hereditarios. Así por ejemplo, en el Síndrome de Bloom, entidad en la que existe fragilidad cromosómica y predisposición al desarrollo de neoplasias y que se transmite con un patrón de herencia autosómico recesivo, se ha encontrado elevada frecuencia de ICH (Chaganti *et al*, 1974).

A pesar de que la frecuencia del intercambio no presenta grandes fluctuaciones en los individuos considerados normales de la población general (Morgan y Crossen, 1977; Carrano, *et al*, 1980), se desconoce sin embargo cuál es el componente genético de esta importante manifestación del comportamiento cromosómico en las células somáticas.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el componente genético del intercambio de cromátides hermanas mediante la comparación de las frecuencias encontradas en gemelos monocigóticos y en gemelos dicigóticos.

Material y métodos

La muestra estuvo constituida por 26 pares de gemelos de los cuales 16 pares fueron gemelos monocigóticos (6 pares varones y 9 mujeres) y 11 pares fueron gemelos dicigóticos (6 pares varones, 3 mujeres y 2 pares varón-mujer). El rango de edad varió entre 4 y 17 años.

El criterio de cigocidad se basó en el estudio de marcadores genéticos tales como los grupos sanguíneos (ABO, Rh, MN, S, P, Duffy, Kidd, Kell, Diego, Lutheran, Lewis) y determinaciones enzimáticas (fosfatasa ácida eritrocítica y haptoglobina) con lo cual el grado de certeza de la discriminación es de 99 por ciento.

Ninguno de los gemelos incluidos había recibido transfusiones o habían estado expuestos a la acción de agentes mutagénicos por lo menos en los seis meses anteriores a su inclusión en el estudio.

A cada individuo se le tomó una muestra de 7 ml de sangre periférica. Se realizó cultivo de linfocitos según la técnica de Moorhead y Cols. (Moorhead, *et al*, 1960) con las modificaciones establecidas en la Unidad de Investigación Clínica en Genética Humana I.M.S.S. A las 24 horas de la siembra se agregó BrdU (3 g/ml), los cultivos crecieron en la obscuridad. Las laminillas fueron teñidas en soluciones 33258 Hoechst (0.5 g/ml) durante 60 minutos y se colocaron posteriormente

en solución buffer pH 8, a 40°C a la luz solar durante 60 minutos. Finalmente se tiñeron con solución Giemsa pH 6.8 al 5%. La frecuencia de ICH se analizó en metafases obtenidas a las 72 horas de la siembra.

La comparación estadística de los resultados se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Resultados y discusión

El promedio de ICH por metafase en gemelos monocigóticos y dicigóticos, aparece en el cuadro 1 y las diferencias intrapar en los dos grupos se muestran en el cuadro 2 (fig. 1). Puede apreciarse que a pesar de que la concordancia es mayor en los monocigóticos que en los dicigóticos, las diferencias sin embargo no son estadísticamente significativas. Por otra parte, el promedio de ICH por metafase en los varones de la muestra, fue de 3.53 y el de las mujeres fue de 3.23, no siendo la diferencia significativa.

Con la metodología empleada, al cultivar las células en presencia de BrdU, durante el primer ciclo celular, cada filamento de la doble espiral del ADN sintetiza su filamento complementario utilizando esta base análoga. Durante la primera mitosis, las cromátides hermanas del cromosoma metafásico no se distinguen entre sí, ya que tienen la misma composición química. Sin embargo, si se deja proseguir el cultivo por un segundo ciclo celular, y por tanto se permite una segunda síntesis del ADN, una de las cromátides resultantes será "híbrida", al igual que las obtenidas después del primer ciclo celular mientras que la otra tiene ambas cadenas del ADN con BrdU en lugar de timina.

En este momento, segunda metafase *in vitro*, las cromátides hermanas del cromosoma son químicamente diferentes, lo que puede ponerse de manifiesto por la tinción diferencial que dan ambas cromátides. Cuando se colorean con el fluorocromo 33258, los cromosomas así teñidos muestran una cromátide con intensa fluorescencia, que es la que sólo posee un filamento reemplazado con BrdU, y otra en la cual la fluorescencia es más pálida ya que ha incorporado BrdU en ambos filamentos. Cuando se colorea con Giemsa la primera cromátide aparecerá teñida en oscuro y la segunda en claro (fig. 2). De esta manera los segmentos que han sido intercambiados entre las dos cromátides pueden apreciarse claramente.

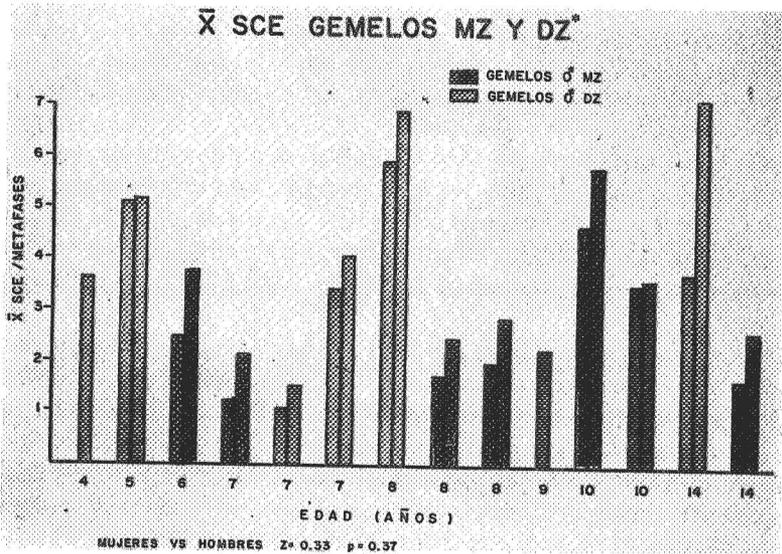
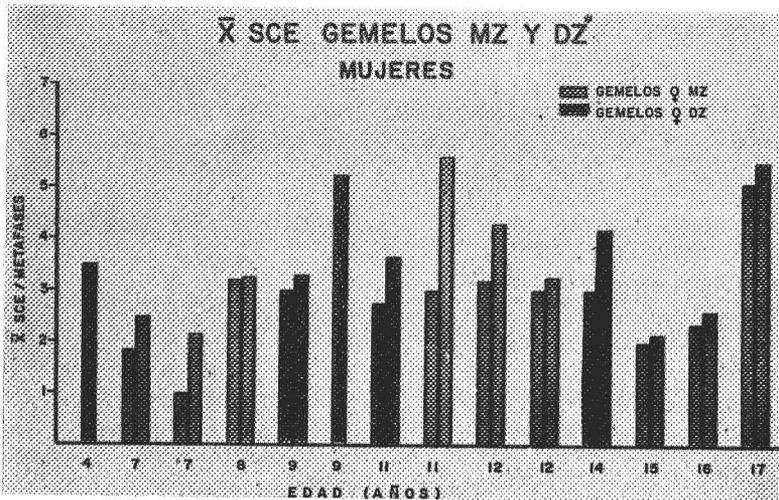


Fig. 1: Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas en gemelos monocigóticos y dicigóticos.

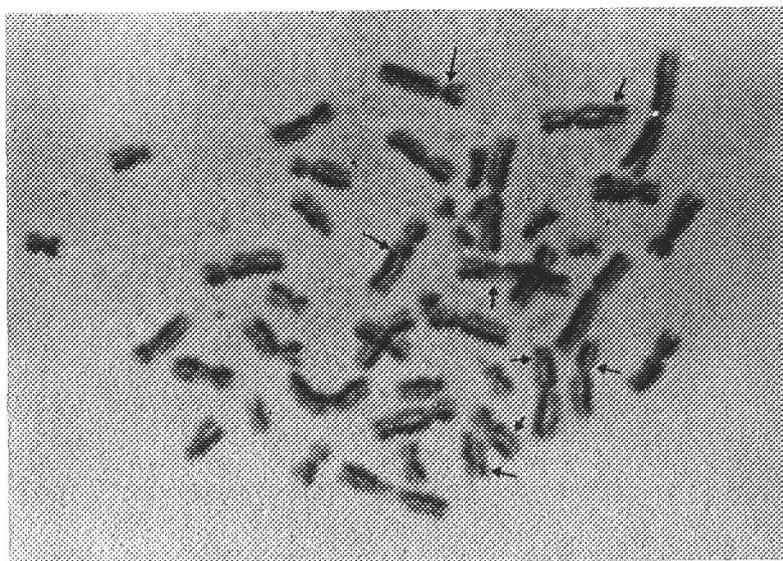


Fig. 2: Metafase en la que se ilustran los intercambios entre cromátides hermanas.

Los resultados revelan una mayor concordancia de los intercambios en los gemelos monocigóticos. Sin embargo, el hecho de que no exista en estos valores significancia estadística, puede sugerir que el componente genético no influya de manera notable la frecuencia del fenómeno, aunque quizás debiera aumentarse el tamaño de la muestra para hacer conclusiones más valederas.

Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos según el sexo de los gemelos, se observó una frecuencia muy similar en hombres y en mujeres, lo cual corrobora algunos recientes estudios realizados fuera del país (D' Arce, 1981).

Reviste importancia el poder precisar el componente genético del fenómeno de ICH ya que así se podrá valorar en forma más precisa el efecto que los agentes clastogénicos, cuya frecuencia aumenta día con día, tienen sobre la estructura de los cromosomas humanos.

CUADRO 1
PROMEDIO DE ICH EN GEMELOS MONOCIGOTICOS
Y DICIGOTICOS

Gemelos monocigóticos	Gemelos dicigóticos
5.87	5.23
4.7	5.17
5.5	6.94
5.13	5.94
2.0	3.8
2.9	7.2
2.52	3.6
1.77	3.0
2.35	3.0
2.6	3.38
1.73	1.14
2.66	1.8
2.16	3.0
1.25	4.18
2.0	3.46
2.16	4.14
1.0	2.75
2.16	3.65
3.0	3.66
3.25	3.56
1.8	2.33
2.5	5.25
3.77	
2.5	
3.18	
3.15	
4.33	
3.2	
3.0	
5.65	

$z = 1.39$ $p < 0.08$

CUADRO 2

DIFERENCIAS INTRAPAR ENTRE GEMELOS MONOCIGOTICOS
Y DICIGOTICOS

Gemelos monocigóticos	Gemelos dicigóticos
1.17	0.06
0.37	1.0
0.9	3.4
0.75	0.6
0.25	0.38
0.93	0.66
0.91	1.18
0.16	0.68
1.16	0.9
0.25	0.1
0.7	2.92
1.27	
0.03	
1.13	
2.65	

$z = 0$ $p < 0.5$

REFERENCIAS

BRADLEY, M.O., HSU, y C.C. HARRIS (1979). Relation between sister chromatid exchange and mutagenicity, toxicity and DNA damage. *Nature*, 282: 318-320.

CARRANO, A.V., J.C. MINKLER, S.C. STETKA y D.H. MOORE. (1980) Variation in the baseline sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Environ. Mutag* 2: 325-337.

CHAGANTI, R.S.K., S. SCHONBERG y J. GERMAN (1974). A many fold increase in sister chromatid exchange in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 4508-4512.

D'ARCE, M.A. (1981). The effect of donar sex and age on the number of sister chromatid exchanges in human lymphocytes Growing *in vitro*. *Hum. Genet.* 57: 83-85.

KATO, H. (1974). Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp. Cell Res* 85: 239-247.

KORENBERG, J.R. y E.F. FREEDLENDER (1974). Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Cromosoma (Berl)* 48: 355-360.

LATT, S.A. (1973). Microfluorimetric determination of deoxiribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)* 70: 3395-3399.

MOORHEAD, P.S., P.C. NOWELL, W.S. MELLMAN, D.N. BATTIPS y D.A. HUNGERFORD (1960). Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20: 613-616.

MORGAN, W.F. y P.E. CROSSEN (1977). The frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Hum. Genet.* 38: 261-278.

NAKANISHI, E. y E.L. SHNEIDER (1979). *In vivo* sister chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat. Res.* 60: 329-337.

PERRY, P. y C. WOLFF (1974). A new Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158.

TAYLOR, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics.* 43: 515-529.

ZAKHAROV, A.F. y N.A. EGOLINA (1973). Differential spirilization along mammalian mitotic chromosomes I. BuDR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma (Berl)* 38: 341-365.