

*Rev Biomed 1999; 10:71-76.*

## ***Prevalencia de intercambio de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos.***

**Artículo Original**

Norma Pérez-Herrera, José M. Ceballos-Quintal, Doris Pinto-Escalante.

Laboratorio de Genética, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

### **RESUMEN.**

**Introducción.** El intercambio entre cromátides hermanas (ICH) es un evento celular normal, con frecuencia basal relativamente constante de ICH espontáneos por metafase, variable en células de tejidos diferentes. Factores individuales y por proceso de laboratorio pueden hacer variar la frecuencia basal de ICH. La exposición a agentes clastogénicos es capaz de incrementarla. En este trabajo se describe la prevalencia de ICH en una población libre de exposición a agentes clastogénicos conocidos.

**Material y métodos.** Se incluyó 50 individuos sanos de uno u otro sexo, de 10 a 59 años. A cada uno se les realizó dos cultivos de sangre, a los que se agregó bromodeoxiuridina a las 0 y 24 h respectivamente, para la obtención de metafases con tinción diferencial de cromátides. De cada cultivo se analizaron 25 metafases para determinar el promedio ( $\bar{x}$ ) de ICH/célula/individuo.

**Resultados.** El  $\bar{x}$  de ICH/célula/individuo en los cultivos de 0 h y 24 h fue  $4.21 \pm 1.20$  y  $3.91 \pm 0.94$

respectivamente, con intervalo y DE de  $2.12 \pm 1.12$  a  $7.4 \pm 3.31$  en los cultivos de 0 h. En los cultivos de 24 h el intervalo y DE encontrados fueron de  $2.12 \pm 1.3$  a  $7.08 \pm 2.75$ . La diferencia entre los dos cultivos no fue significativa ( $p < 0.10$ ). El grupo de edad con mayor número de ICH fue de 20 a 29 años, sin encontrarse diferencias significativas entre cada decenio de edad. Tampoco se encontró diferencias significativas entre géneros.

**Discusión.** Los resultados encontrados son similares a los encontrados en otras poblaciones, a excepción del decenio de edad con el pico máximo de ICH. Estos resultados permiten tener confiabilidad en el procedimiento utilizado.

*(Rev Biomed 1999; 10:71-76)*

**Palabras clave:** Cromosomas humanos, intercambio de cromátides hermanas, citogenética.

### **SUMMARY.**

**Frequency of sister chromatid exchange in a**

*Solicitud de sobretiros: Dr. José Miguel Ceballos-Quintal, Laboratorio de Genética, Centro de Investigaciones Regionales "Dr Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán. Av. Itzáes No. 490 por 59, C.P. 97000, Mérida, Yucatán, México.*

*Recibido el 20/Julio/1998. Aceptado para publicación el 25/Sep./1998.*

*Este artículo está disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991021.html>*

### **population free of exposure to clastogenic agents.**

**Introduction.** Sister chromatid exchange (SCE) is a normal cellular event, with a relatively constant basal frequency of spontaneous SCE by metaphase, which is variable between cells from different tissues. Individual and technical factors can produce variation in the basal frequency of SCE. Exposure to clastogens can produce an increase in SCE. In this study we describe SCE frequency in a population free of exposure to known clastogens.

**Material and methods.** We included 50 individuals of both genders, from 10 to 59 years old. From each individual two blood cultures, additioned with bromodeoxiruriuridine (BrdU) at 0 and 24 h, were carried out to obtain metaphases with differential chromatid stain. From each culture, 25 metaphases were analyzed to obtain the  $\bar{x}$  of SCE/cell/individual.

**Results.** The  $\bar{x}$  of SCE/cell/individual found in 0 h and 24 h cultures was  $4.21 \pm 1.20$  and  $3.91 \pm 0.94$  respectively, with a range and SD from  $2.12 \pm 1.12$  to  $7.4 \pm 3.31$ . In 24 h cultures the range and SD found was from  $2.12 \pm 1.3$  to  $7.08 \pm 2.75$ . The difference between both cultures was not significant ( $p < 0.10$ ). The age group with the highest number of SCE was from 20 to 29 years old, and no significant differences were found between each ten year age group. Neither were significant differences found between genders.

**Discussion.** The results found in these individuals were similar to those found in other populations, with the exception of the decade with the highest SCE. These results allow us to feel confident in the use of the SCE analysis. (*Rev Biomed 1999; 10:71-76*)

**Key words:** Human chromosomes, sister chromatid exchange, cytogenetics.

### **INTRODUCCIÓN.**

El intercambio entre cromátides hermanas (ICH) es un evento celular normal que se produce durante la fase S de la mitosis. Representa el intercambio simétrico, entre loci homólogos, de productos de

replicación. Estos intercambios se producen por ruptura y reparación posterior del ácido desoxirribonucleico (ADN), en los loci que se intercambian durante la fase de síntesis del ciclo celular. Ocurren sin pérdida de ADN ni cambios en la morfología cromosómica, y es posible detectarlos en preparaciones cromosómicas en metafase obtenidas de cultivos adicionados con un análogo de una base de ADN (1,2).

En condiciones normales, las células humanas tienen frecuencia basal relativamente constante de ICH espontáneos por metafase. El número de ICH varía en células diferentes, con un intervalo de 2-20, y frecuencia promedio por metafase de 5-8 en sangre (1,3,4). Se puede observar incremento en la frecuencia de ICH por exposición de las células a agentes clastogénicos, lo que ha permitido que se reconozca como un evento indicador de daño al genoma. Este procedimiento se utiliza en investigaciones sobre monitoreo biológico de individuos a agentes genotóxicos potenciales o conocidos (5-7). Sin embargo, además de las variaciones ocasionadas por exposiciones ambientales, diversos factores pueden hacer variar la línea basal de ICH entre diferentes personas (7). Así mismo, las condiciones generales del bioensayo, y los procedimientos y criterios aplicados en la interpretación de los sitios de ruptura que producen los intercambios, pueden modificar el resultado obtenido de este análisis (2). Las variaciones determinadas por discrepancias en el proceso técnico de las muestras, y por los criterios utilizados para la interpretación en la observación de las metafases al microscopio, se encuentran entre los factores importantes causantes de las diferencias que pueden encontrarse en el número de ICH en poblaciones normales, y que pueden controlarse para tener confiabilidad en los resultados que se obtienen. Se ha descrito que factores genéticos y ambientales representan entre el 50 y 60% de la variación en la frecuencia de ICH (7). En menor grado, el promedio de ICH varía con la edad y el sexo (3). En este trabajo presentamos la prevalencia de ICH que obtuvimos de una población sana, de grupos de edad diferentes, y sin exposiciones ambientales a agentes clastogénicos reconocidos. Se utilizó diferentes tiempos de exposición *in vitro* a un análogo de una base de ADN.

## *Intercambio de cromátides hermanas en población sana.*

### **MATERIAL Y MÉTODOS.**

**SUJETOS.** Todos los individuos incluidos en este trabajo habitan en la ciudad de Mérida, Yucatán. Se encontraron libres de factores de riesgo por enfermedad, ocupación, terapia y exposiciones ambientales. La población estudiada se integró por 50 individuos sanos de uno u otro género, libres de factores conocidos que incrementen la frecuencia de ICH, distribuidos en grupos de edad por decenios, desde 10 hasta 59 años. Todos los sujetos incluidos fueron seleccionados después de aplicar un cuestionario dirigido para obtener información acerca de su historia médica y familiar, hábitos de fumar, ingesta de bebidas alcohólicas, y exposición a solventes u otros agentes posibles de exposición ambiental conocidos como inductores de daño al genoma.

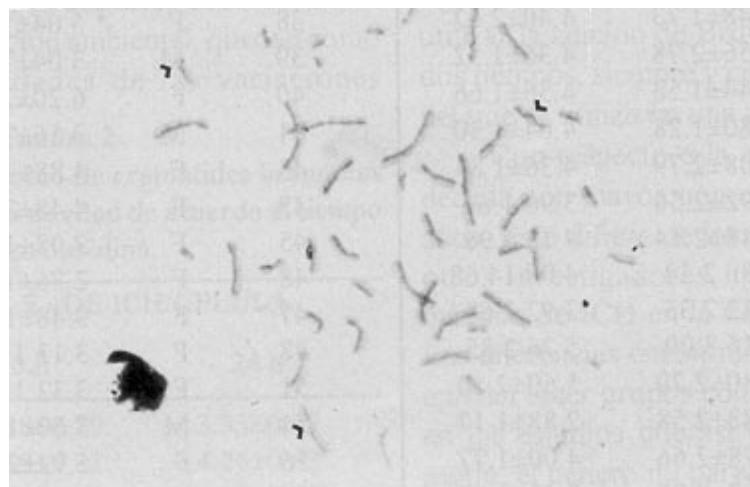
**METODOLOGÍA.** La lectura de ICH se realizó en metafases obtenidas de cultivos de sangre periférica.

**Cultivos celulares.** Se realizaron a partir de sangre total heparinizada. A cada frasco de cultivo se agregó 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO) adicionado con L-glutamina, 0.20 mL de fitohemaglutinina y 0.5 mL de sangre. Se hizo dos cultivos por cada sujeto incluido, a uno se agregó un análogo de la base timina, la bromodeoxiuridina (BrdU), a la concentración final de 4 µg/mL al inicio

del cultivo, y al otro se le agregó esta misma sustancia y concentración a las 24 h de incubación. Se denominaron cultivos de 0 y 24 h, respectivamente. La incubación se realizó a 37°C por 72 h., manteniendo los frascos de cultivos en la oscuridad.

**Preparación cromosómica:** Para la preparación cromosómica, se detuvo la división celular en los medios de cultivo con colchicina 0.20 mg/mL, añadida 90 minutos antes de concluir el período de incubación de 72 h. Al finalizar la incubación se trató a las células con solución hipotónica 0.075 M KCl a temperatura ambiente por dos minutos, y se hizo fijación y lavado por 3 ocasiones con metanol:ácido acético 3:1. La suspensión celular se dejó gotear en portaobjetos limpios y se dejó secar al aire.

**Tinción y lectura de ICH.** La tinción diferencial de cromátides se realizó después de dejar envejecer el material, protegido de la luz, por al menos dos semanas posteriores al goteo en portaobjetos. Se realizó de acuerdo a la técnica de fluorescencia mas Giemsa, que incluye tinción con el colorante Hoechst 33258, exposición por 2 h a luz ultravioleta y tinción posterior con colorante de Giemsa (8). Como resultado de esta tinción se obtiene una cromátide clara y una oscura, que le da al cromosoma el aspecto de arlequín (fig. 1). De cada cultivo se analizó 25 metafases de segunda división celular, sin sobreposición cromosómica, y



**Figura 1.-** Metafase de segunda división que presenta la tinción diferencial de las cromátides de acuerdo a la técnica FPG. Las flechas señalan los sitios de intercambio.

con al menos 46 centrómeros. El criterio para considerar un intercambio fue la discontinuidad de la tinción de la cromátide. Se contabilizó cada sitio de ruptura, se consideró para intercambios intersticiales dos rupturas y para los terminales solo una. Se excluyeron los intercambios ocurridos a nivel de centrómero, debido a que en este sitio pueden resultar indistinguibles de giros de cromátides de 180 grados (2,3). Todas las laminillas fueron codificadas y analizadas en forma ciega.

## RESULTADOS.

Los resultados encontrados en cada uno de los cultivos, del promedio ± DE de ICH/célula/individuo y por grupo, se encuentran en el cuadro 1. El intervalo encontrado de ICH/célula/individuo ± DE en los cultivos de 0 h, fue de  $2.12 \pm 1.12$  a  $7.4 \pm 3.31$ . En los cultivos de 24 h el resultado encontrado fue de  $2.12 \pm 1.3$  a  $7.08 \pm 2.75$ . Se encontró mayor frecuencia de ICH en los cultivos de 0 h, sin embargo, la diferencia con los cultivos de 24 h no fue significativa ( $p < 0.10$ ).

**Cuadro 1.**

**Frecuencias de intercambio de cromátides hermanas correspondientes a 50 sujetos de acuerdo al tiempo de adición de bromodeoxiuridina.**

EDAD*	GENERO	$\bar{x} \pm DE$ ICH/CELULA		EDAD*	GENERO	$\bar{x} \pm DE$ ICH/CELULA	
		0 h	24 h			0 h	24 h
10	M	2.12±1.12	2.68±1.34	31	F	7.43±31	5.72±2.45
11	F	2.48±1.38	2.88±1.26	31	F	4.96±2.49	5.48±2.20
15	M	3.64±2.09	3.92±2.46	32	M	7.00±2.21	7.08±2.75
18	M	2.12±1.42±	3.00±1.47	34	M	4.72±1.45	4.24±1.50
19	M	4.04±1.59	4.20±1.80	35	F	5.52±2.08	4.84±2.76
20	M	3.88±2.04	4.04±1.88	36	F	3.88±1.48	3.72±1.94
20	F	3.96±2.49	3.92±2.37	36	M	3.04±1.42	3.88±1.36
21	M	5.48±2.02	4.20±1.14	36	M	3.04±1.27	3.20±1.29
21	F	5.24±3.70	4.04±2.26	36	M	3.48±1.87	3.76±1.92
21	F	5.76±1.92	4.32±2.26	36	M	3.32±1.24	3.04±1.24
22	F	4.92±2.37	3.90±1.52	37	F	3.08±2.08	3.04±1.09
22	M	3.48±1.73	4.40±2.62	38	F	5.04±1.56	3.60±1.58
22	F	6.56±2.78	4.36±1.52	39	M	3.04±1.51	3.32±1.24
23	M	4.44±1.58	4.56±1.66	40	F	6.20±2.70	4.28±1.76
23	F	3.80±1.28	4.04±1.30	41	M	3.16±1.37	2.32 1.34
24	F	5.08±2.79	4.36±1.84	43	F	4.88±3.17	4.04±1.92
24	F	4.92±2.56	3.96 1.64	43	F	4.48±2.05	5.16±3.19
26	F	4.48±2.14	4.12 1.98	45	F	3.08±1.03	3.68±1.46
27	M	3.80 2.14	4.08 14.68	48	F	2.36±1.14	2.12 1.30
27	F	4.12 2.33	3.92 1.68	47	F	3.48±1.61	2.92 1.63
29	F	5.16 3.00	5.76 2.35	48	F	3.12 1.36	2.40 1.22
29	F	4.80±2.79	5.60±2.10	51	F	3.32 1.18	3.08 1.35
30	F	3.88±2.58	2.88±1.17	54	M	3.60±1.55	3.52±1.98
30	F	4.28±2.66	4.00±1.77	56	F	5.72±2.52	4.20±2.38
31	F	4.32±2.05	3.40±1.68	59	F	2.80±1.89	2.84±1.95

\* años.

F=femenino, M=masculino

### *Intercambio de cromátides hermanas en población sana.*

En el análisis de los ICH por grupos de edad (cuadro 2), encontramos que, para ambos cultivos, el grupo de edad con mayor número de ICH fue el de 20 a 29 años, sin encontrarse diferencias significativas entre cada grupo de edad.

Al analizar los ICH por género (cuadro 3), las diferencias encontradas no fueron significativas ( $p = 0.20$  en el cultivo de 0 h, y  $p = 0.70$  en el de 24 h), aún que en el sexo femenino se encontró mayor promedio de ICH/célula observado en los cultivos de 0 h.

### **DISCUSIÓN.**

Debido a que la observación de que en poblaciones normales puede existir diferencias en la prevalencia de ICH (7,9,12,13), resulta importante que en cada laboratorio en que se realiza estos análisis, se determinen condiciones uniformes en el proceso técnico, y criterios definidos para su interpretación y aplicación adecuada, con el fin de evitar diferencias artificiales, ocasionadas por procesos de laboratorio.

Los resultados presentados en este trabajo se obtuvieron de individuos ajenos a exposiciones ambientales identificables como capaces de incrementar la frecuencia basal de ICH. Así mismo, la interpretación de los ICH tuvo definiciones precisas. Por lo tanto, al excluirse de la variación los factores de exposición ambiental, quedan como principales posibilidades de las variaciones

### **Cuadro 2**

**Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas en 50 sujetos por grupo de edad de acuerdo al tiempo de adición de bromodeoxiuridina.**

EDAD	$\bar{x} \pm DE$ ICH/CELULA	
	0 h	24 h
10-19	2.88±0.89	3.33±0.67
20-29	4.69±0.81	4.26±0.63
30-39	4.37±1.35	4.07±0.63
40-49	3.89±1.28	3.36±1.09
50-59	3.86±1.28	3.41±0.59

ICH= Intercambio de cromátides hermanas.

### **Cuadro 3**

**Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas en 50 sujetos por género de acuerdo el tiempo de adición de bromodeoxiuridina.**

GENERO	$\bar{x} \pm DE$ ICH/CELULA	
	0 h	24 h
FEMENINO	4.44±1.22	3.91±0.91
MASCULINO	3.87±1.15	3.91±1.03

ICH= Intercambio de cromátides hermanas.

encontradas el proceso técnico, la edad y el género. El rango obtenido de ICH por metafase corresponde al obtenido en trabajos previos (1,3).

En el proceso técnico, la diferencia principal fue la variación en el tiempo de adición de BrdU. Debido a que este análogo de la timina es en sí un mutágeno, el tiempo de contacto con las células en división puede modificar el crecimiento celular (9). Así mismo, concentraciones elevadas de BrdU pueden ocasionar incremento en la frecuencia de ICH, y a ciertas dosis puede ser tóxico e inhibir el crecimiento celular (10). En los dos cultivos realizados para este estudio se obtuvo buen crecimiento celular, y a pesar de que el número de mitosis en segunda división fue mayor en el cultivo de 0 h, la diferencia con el cultivo de 24 h no fue significativa. Podemos concluir que es aceptable utilizar la adición de BrdU en cualquiera de estos dos tiempos, siempre y cuando exista uniformidad del que se utiliza en una población determinada.

Con respecto a la edad, se encontró que la década con mayor número de ICH fue de 20-29 años. Esto difiere de los resultados obtenidos por otros investigadores, que encontraron el pico máximo de ICH en la década de 30-39 años (3). Las diferencias encontradas entre grupos de edad apoyan tener grupos controles pareados por edad en los estudios que así lo requieren. Del mismo modo, el género no parece haber influido sobre la prevalencia de los ICH sin embargo, debe tenerse en cuenta cuando se trata de estudios en los que existe un grupo control.

La utilidad que se ha demostrado del análisis de ICH en el monitoreo biológico requiere que existan condiciones que eviten variaciones ocasionadas por razones ajenas al elemento de exposición que está en estudio. Las variaciones determinadas por discrepancias en el proceso técnico de las muestras, y por la interpretación de la observación de las metáfases al microscopio, son factores importantes que pueden controlarse para evitar diferencias artificiales en los resultados que se obtienen de ICH. Este trabajo resulta de utilidad para establecer los criterios definidos para la realización de ICH en este laboratorio, y tener resultados confiables en el estudio de exposiciones ambientales. Así mismo, como testigo histórico puede ser aplicable en el diagnóstico de los Síndromes de Inestabilidad Cromosómica que tienen entre sus manifestaciones rupturas en las cadenas de ADN manifestadas como ICH (11).

#### **REFERENCIAS.**

- 1.- Salamanca F. Metodologías citogenéticas y fundamentos. En: Salamanca F, ed. Citogenética humana. México: Ed. Médica Panamericana; 1990. p. 49-62.
- 2.- Latt SA, Allen JW, Rogers WE, Juergens LA. In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange formation. En: Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C, ed. Handbook of mutagenicity test procedures. Amsterdan-NY-Oxford: Elsevier Scientific Publishing Company; 1979. p. 275-91.
- 3.- Verma RS, Babu A. Human chromosomes. Principles and techniques. 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill; 1995. p. 143-51.
- 4.- Latt SA, Juergens LA. Determinants of sister chromatid exchange frequencies in human chromosomes. En: Hook BH, Porter IH, ed. Population Cytogenetics. Studies in humans. New York: Academic Press INC; 1977. p. 217-36.
- 5.- Ashby J, Richardson CR. Tabulation and assessment of 113 human surveillance cytogenetic studies conducted between 1965 an 1984. Mutat Res 1985; 154:111-3.
- 6.- Reuterwall C, Brogger A, Hagmar L, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, et al. A Nordic data base on somatic chromosome damage in human. Mut Res 1990; 241:325-37.
- 7.- Hirsch BA, Sentz KK, McGue M. Genetic and environmental influences on baseline SCE. Env Mol Mut 1992; 20:2-11.
- 8.- Perry P, Wolff S. New giemsa method for differential staining of sister chromatids. Nature 1974; 25:156-8.
- 9.- Lambert BO, Hanson K, Listein S, Sten M. Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. Hereditas 1976; 83:79-81.
- 10.- Frías S, Molina B, Carnevale A. Sinergismo bromodeoxiuridina-mitomicina C en la producción de aberraciones cromosómicas en anemia de Fanconi. Rev Inv Clin 1989; 41:31-5.
- 11.- Sandberg AA. Chromosome breakage syndromes. En: Sandberg AA, ed. The chromosomes in human cancer and leukemia. 3rd ed. New York: Elsevier Science Publishing; 1983. p. 153-69.
- 12.- Castillo J, Ortiz C, Samano B, Wong L, Cruz G. Frecuencia de Intercambio de Cromátides Hermanas en población mexicana a 2600 m de altura. En: Del Castillo-Ruiz V, Koffman S, Figuera-Tapia HN, Blanco B, Ramírez S de. Memorias del XIV Congreso Nacional de Genética Humana. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán; 1989. p. 65.
- 13.- De Piña-Neto JM, Ferrari I. Frequency and distribution of sister chromatid exchanges in normal individuals. Rev Bras Genet 1981;4:65-73.