

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA FISH EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES

Espinoza, M.⁽¹⁾; Oliveros, N.⁽²⁾; Quintana, M.⁽³⁾; Montez, R.⁽⁴⁾

(1) Departamento de Biología – IPEN / Lima / Perú

(2) Universidad Nacional Mayor de San Marcos / Lima, Perú

(3) Universidad Nacional Federico Villarreal / Lima, Perú

(4) Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas / Lima, Perú

RESUMEN

Se muestran los resultados de la estandarización y uso de una técnica para hacer la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en el Laboratorio de Citogenética y Radiobiología del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN). Tras una búsqueda de información bibliográfica se decidió trabajar con el método que emplea sondas para cromosoma total marcadas con un fluorocromo de emisión verde (WCP). Se hizo el estudio con dos muestras de sangre irradiadas y una muestra control. Las dosis suministradas a dos de las muestras fueron 0.75 y 1.8 Gy de rayos gamma del Co-60. Por razones de tipo económico se tuvo que trabajar tan sólo con las sondas para los cromosomas 1 y 2. Eso ha causado que nuestra eficiencia para detectar translocaciones por FISH haya sido baja (25%) siendo usual en otros laboratorios trabajar con eficiencias de alrededor del 33% para lo cual debemos incluir al menos tres pares de cromosomas. Como consecuencia de lo anterior la proporción de dicéntricos y translocaciones en la muestra de células estudiadas no concuerda con lo esperado: 1 dicéntrico por cada translocación.

ABSTRACT

Results of standardization work and use of a methodology for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) under development in the Cytogenetics and Radiobiology Laboratory of Peruvian Nuclear Energy Institute (IPEN), are shown. After searching for scientific literature, it was decided to work with a method that employs whole chromosome probes (WCP) labeled with a spectrum green fluorochrome. The study was performed using two irradiated blood samples and a control one. Doses delivered were 0.75 and 1.8 Gy of gamma rays from Co-60. For economical reasons, it was necessary to buy only WCP FISH probes for

chromosomes 1 and 2. This situation has occasioned that the efficiency to detect FISH translocations is poor (about 25%) and in the meanwhile, other laboratories around the world are getting near 33% of efficiency working with three pairs of chromosomes in order to reach 33% of efficiency. As a consequence of this, the proportion of dicentrics and translocations found in our samples does not agree with expected values: 1 dicentric for each translocation.

1. INTRODUCCIÓN

Las radiaciones ionizantes son un agente mutagénico y cancerígeno de comprobada eficiencia. Su principal efecto biológico es la ionización y ruptura de las cadenas del ADN. Como consecuencia de esto, se origina una serie de alteraciones cromosómicas estructurales estables (translocaciones, inversiones, duplicaciones) e inestables (cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos y fragmentos acéntricos de diversa morfología)[1, 2, 3] (Fig. 1). Desde 1962, el estudio de las alteraciones cromosómicas inestables ha sido una vía para hacer estimaciones de la dosis de radiación ionizante absorbida por el cuerpo humano, especialmente en casos de exposición accidental externa. Para hacer esta estimación de dosis o «dosimetría biológica» se tiene que hacer el análisis y determinar las frecuencias de los cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillo y los correspondientes fragmentos cromosómicos acéntricos que son producidos por la radiación ionizante en los tejidos del cuerpo. Por presentar una serie de ventajas en su estudio frente a otros tipos de células, los linfocitos de la sangre circulante son las células elegidas como «dosímetros biológicos» [1].



Figura 1. Metafase de una célula sometida a irradiación mostrando las aberraciones citogenéticas más características: un dicéntrico, un cromosoma en anillo y 2 fragmentos.

Ocurre que la presencia de cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillo y fragmentos producen, dentro de las células que los portan, una serie de desajustes fisiológicos, reproductivos y genéticos que hacen que éstas tengan una tendencia a morir y por ende a desaparecer dentro de los tejidos con el paso del tiempo. De este modo, una persona que ha sufrido sobreexposición a las radiaciones ionizantes y en la cual no se ha hecho una estimación de la dosimetría biológica de acuerdo a su número de cromosomas dicéntricos, anillos y fragmentos, después de unos años habrá perdido casi todas las células portadoras de las mencionadas alteraciones y ya no sería posible determinar la dosis que absorbió como producto de la sobreexposición que sufrió. Sin embargo se sabe que las radiaciones ionizantes inducen aproximadamente el mismo número de cromosomas dicéntricos que translocaciones dentro de las células. Además, las translocaciones, sobre todo las denominadas «balanceadas» o «recíprocas», pueden permanecer durante todo el resto de la vida del individuo, siendo de ese modo una fuente de información estable dentro de las células para averiguar las dosis en una perspectiva retrospectiva [4, 5, 6]. El problema es que mientras el estudio de los cromosomas dicéntricos, anillos y fragmentos es relativamente fácil e inequívoco como indicador de sobreexposición, el estudio de las translocaciones ha sido, tradicionalmente, muy engorroso, oneroso y difícil.

El desarrollo durante la década pasada, de la llamada «citogenética molecular» ha hecho

posible que el estudio de las translocaciones de cualquier tipo dentro de las células sea tanto o más fácil e inequívoco que el estudio de dicéntricos, anillos y fragmentos para evaluar a una persona sobreexpuesta [6, 7, 8]. En base al estudio de las translocaciones que porta en sus células un individuo se está desarrollando en el varios laboratorios del mundo la denominada «dosimetría biológica retrospectiva».

Para entender mejor el párrafo anterior es necesario hacer una breve explicación de la metodología general usada en la dosimetría biológica retrospectiva. Ésta se basa en el desarrollo de sondas de ADN marcadas con fluorocromos, que se fijan (hidridizan) específicamente a determinadas secuencias del ADN de los cromosomas de tal modo que se puede marcar o teñir de forma diferencial cromosomas completos, lo que se conoce como «pintado cromosómico». Así, podemos escoger las sondas que van a «pintar» un determinado par cromosómico (o determinados pares cromosómicos) de forma que se van a detectar las translocaciones en las que éste (o éstos) cromosoma(s) esté(n) implicado(s). Esta técnica se reproduce en el laboratorio más rápida y confiablemente que las antiguas tinciones para bandeamiento cromosómico, haciendo innecesario el armado de cariotipos. La técnica de marcado de cromosomas se llama hibridización *in situ* (ISH) y si la molécula que marca es fluorescente (F) se obtienen las siglas FISH. Esta técnica también se conoce como «pintado cromosómico» y su uso adecuado permite la identificación fácil de las partes de un cromosoma translocado en otros de la misma célula (Fig.2).

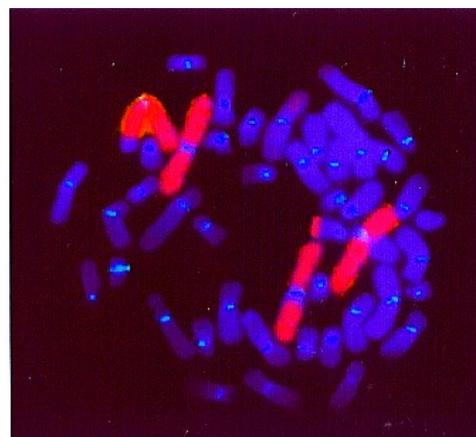


Figura 2. Marcación FISH de una translocación balanceada radioinducida y teñida con sondas WCP y pancentromérica. Cortesía del HGUGM (Madrid, España).

El presente trabajo trata sobre la estandarización de la técnica de tinción FISH hecha en el Laboratorio de Citogenética y Radiobiología del Departamento de Biología (Dirección General de Promoción y Desarrollo Tecnológico – IPEN) sobre la base de varias técnicas usadas en laboratorios de Europa y que fueron, de alguna manera, adaptadas a nuestra realidad. Hicimos también un avance en el estudio de translocaciones radioinducidas en dos experimentos con muestras que fueron irradiadas con miras a establecer una versión de la curva de calibración para la dosimetría biológica de los rayos gamma.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de linfocitos

Se colectó sangre venosa de dos donantes, masculino (45 años) y femenino (41 años), en buen estado de salud. La sangre, recibida en tubos de vidrio, sellados al vacío, heparinizada, en condiciones estériles y a temperatura ambiente fue irradiada con una fuente de Co-60 de uso médico, en volúmenes de 4 ml con dosis de 0.75 y 1.8 Gy a la tasa de 0.24 Gy/min. De cada volumen se hizo dos cultivos y de cada uno se obtuvo entre 2 y 5 portaobjetos con muestra para análisis al microscopio. La técnica de cultivo utilizada es la descrita por el OIEA [1] modificada para nuestro laboratorio [11] y que en resumen, consiste en preparar tubos de cultivo conteniendo 6 ml de medio RPMI 1640 con glutamina, .15 ml de PHA, 2 ml de suero bovino fetal, sin antibióticos y 0.8 ml de sangre total. El cultivo fue a 37 °C, en total oscuridad y por 45 horas. Al cabo de ese tiempo se añadió 0.5 ml de colchicina 40 µg/ml y se dejó incubar por otras tres horas más. Luego se hizo el tratamiento hipotónico con KCl 0.075 M por 20 minutos y tras separar las células por centrifugación (10' a 1000 rpm) se las fijó con una mezcla metanol: ácido acético, 3:1. Se repite este proceso de fijación dos veces más y se preparan las muestras haciendo un goteo sobre portaobjetos limpios y congelados. Las muestras se almacenaron en frío a -20 °C hasta su utilización en el proceso de hibridización in situ con fluorescencia (FISH).

Técnica de hibridización in situ con fluorescencia (FISH):

Se estableció como técnica de trabajo una que reducía de tres a dos los días de trabajo sobre

la base de una técnica empleada en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (HGUGM), España. En este trabajo empleamos 5 kits de sondas WCP (whole chromosome probes) Spectrum Green de la marca VYSIS, Inc., USA. Para las observaciones empleamos un microscopio ZEISS Axioscop 2 provisto de un lente Neofluar 100X y dotado de los filtros necesarios para la observación. Las fotos mostradas en este trabajo fueron tomadas con apoyo del HGUGM durante la primera parte de nuestro trabajo.

Primer Día:

Pretratamiento de los portaobjetos:

Pasarlos por una solución de formamida:2xSSC al 70% (en una jarra Coplin colocar 35 ml de formamida + 15 ml de 2xSSC) a 73 °C por 5 minutos.

Pasarlos por una serie de etanoles al 70%, 85% y 100%, un minuto en cada solución.

Dejar en el etanol al 100% hasta un poco antes de la hibridización (en este momento se empiezan a preparar las sondas).

Unos dos minutos antes de hacer la hibridización colocar los portaobjetos en la plancha calefactora termostática a una temperatura entre 45 - 50 °C (para evaporar totalmente el etanol).

Preparación de la sonda:

Mezclar 7 µl de T4 (tampón de hibridización)

1 µl de P1 (painting 1)

1 µl de P2 (painting 2)

1 µl de agua destilada

10 µl (volumen total que se coloca en un tubito Eppendorf)*

(* si sólo se utiliza 1 sonda painting, se añaden 2 µl de agua destilada para completar el volumen total a 10 µl.

Se hace la desnaturalización de la mezcla a 73 °C durante 5 minutos en el baño termostático (en el tubito Eppendorf).

Hibridización:

Colocar 10 µl de la mezcla anterior en el portaobjetos, cubrir con cubreobjetos de vidrio y sellar los bordes del cubreobjeto con pegamento.

Dejar en cámara húmeda durante la noche a 37 °C.

Segundo Día:

Lavados: (Elegir uno de los dos descritos a continuación y proceder en oscuridad o al menos con luces de seguridad)

Lavado Lento: (poner el baño termostático a 46 °C)

Pasar el portaobjetos por una solución de formamida:2xSSC al 50% (poner en una jarra Coplin 25 ml de formamida + 25 ml de 2xSSC) a 46 °C, agitándolo por unos segundos y dejándolo por 10 minutos en total.

Pasar el portaobjetos a otra jarra Coplin con solución de formamida:2xSSC al 50% a 46 °C por 10 minutos, agitándolo por unos segundos y dejándolo por 10 minutos en total.

Pasar el portaobjetos a una tercera jarra Coplin con solución de formamida:2xSSC al 50% a 46 °C por 10 minutos, agitándolo por unos segundos y dejándolo por 10 minutos en total.

Pasar a una jarra Coplin con solución 2xSSC a 46°C, agitar y dejar 10 minutos.

Pasar a una jarra Coplin con una solución de 2xSSC:0.1 NP40 a 46 °C y dejar por 5 minutos.

Lavado Rápido:

Pasar el portaobjetos por una jarra Coplin con una solución de 0.4xSSC a 70 °C durante 2 minutos.

Dejar secar el portaobjetos en oscuridad.

Coloración de contraste (Contratinción): Con DAPI 1 o contratinción de otra marca (1 µl de colorante de contraste + 9 µl de agua destilada).

Mezclar 6 µl del colorante de contraste así preparado + 200 µl de Mountant.

Los portaobjetos tratados con el lavado lento recibirán 10 µl de colorante de contraste.

Los portaobjetos tratados con el lavado rápido recibirán 12 µl de colorante de contraste.

Cubrir con cubreobjetos de vidrio y mirar al microscopio.

3. RESULTADOS

La tabla mostrada abajo resume de manera concisa los hallazgos en el análisis de metafases de 46 o más piezas cromosómicas, adecuadamente pintadas por el proceso citado arriba y tabuladas tras la verificación de las alteraciones observadas al menos por dos personas. Desafortunadamente, el hecho de no contar con un sistema fotográfico conectado al microscopio (equipo muy costoso para nuestro laboratorio) no nos permitió hacer vistas de las metafases de células irradiadas. La rapidez con que se difumina la fluorescencia hace necesario un trabajo muy rápido en el análisis y la posterior verificación de alguna duda en la observación. Por esa razón debíamos hacer el pintado de pocas láminas por vez y eso hizo lento el avance del trabajo.

Al inicio de nuestro trabajo, con la colaboración del Laboratorio de Dosimetría Biológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, España, pudimos lograr algunas fotografías de nuestras primeras metafases (no irradiadas) pintadas con sondas WCP para marcar los cromosomas 1 y 2, aprovechando una breve estancia de uno de nosotros en ese laboratorio (Figuras 3, 4 y 5).

Tabla 1. Análisis de las anomalías cromosómicas inestables en linfocitos irradiados con ⁶⁰Co y marcados según la metodología FISH estandarizada. La falta de concordancia entre la cantidad de translocaciones detectadas y de cromosomas dicéntricos, que se ven en ambos experimentos de irradiación (0.75 y 1.85 Gy) se debe a la baja eficiencia de detección de translocaciones con la marcación de sólo dos pares de cromosomas, 1 y 2 en este caso.

DOSIS (Gy)	CÉLULAS ANALIZADAS	Translocs (*)	DIC	Translocs totales / célula (*)	SE x 10 ⁻³	Dicéntricos FISH / Célula
0	135	0	0	0		0
0.75	112	2	6	0.0179	8.74	0.0534
1.8	78	4	3	0.0513	30.5	0.0385

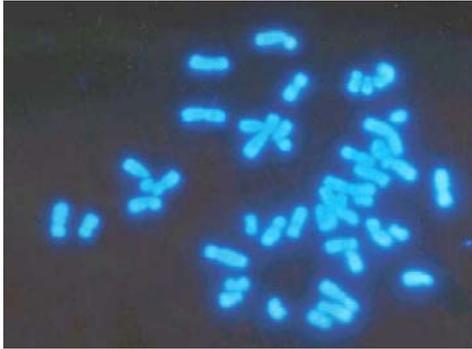


Figura 3. Contratinción con DAPI. 1000X.

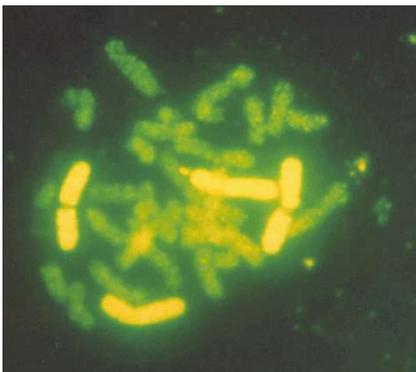


Figura 4. Marcación FISH de los cromosomas 1 (extremos derecho e izquierdo) y 2 (al centro, arriba y abajo). Los cromosomas sin marcación aparecen en segundo plano con fluorescencia verdosa.

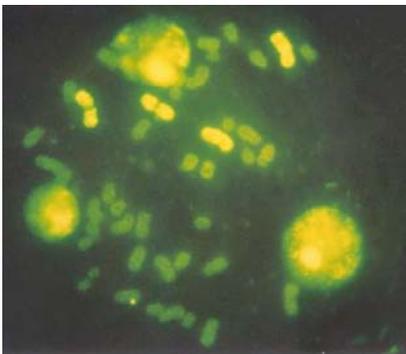


Figura 5. Es posible marcar con FISH los cromosomas interfásicos. Los cromosomas 1 aparecen con el centrómero fácilmente distinguible y el par 2, a la derecha de los anteriores, se hallan cerca de varios núcleos en interfase dentro de los cuales es posible distinguir las marcas fluorescentes de los mencionados cromosomas.

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue lograr la estandarización de una metodología que permita a nuestro laboratorio usarla como herramienta para la dosimetría biológica de las radiaciones ionizantes en los casos en que se

necesite saber, en retrospectiva, la dosis recibida por personas sobreexpuestas a radiaciones ionizantes. Después de una detallada revisión de la literatura escogimos dos métodos FISH usados en el HGUGM de Madrid, España. Uno, el denominado «Método Indirecto» resultaba difícil de probar porque requería adquirir sondas de ADN de una marca que no tenía representación oficial en Sudamérica. Preferimos, entonces, ensayar el denominado «Método Directo» que se pudo aplicar gracias a la colaboración de la organización GRIAPRA de España. Tardamos varios meses en lograr una respuesta adecuada del método (Figuras 3, 4 y 5). Sin embargo, hay todavía muchos aspectos que debemos mejorar para poder hacer una aplicación correcta de esta metodología, primero, en el establecimiento de una apropiada curva de calibración y, posteriormente, para dar la adecuada rigurosidad estadística a la evaluación citogenética por FISH de los casos que se presenten.

La sensibilidad del método podría ser incrementada incrementando la eficiencia para detectar translocaciones en las metafases. Actualmente, debido a limitaciones de orden presupuestal, sólo estamos estudiando la marcación FISH de los cromosomas 1 y 2 que, juntos, equivalen al 16.32% del genoma [1]. Eso nos da una eficiencia de detección del 25% aproximadamente, lo cual está aún lejos del 33% con el que trabajan casi todos los laboratorios del mundo que aplican la tinción FISH a la dosimetría biológica de las radiaciones ionizantes. Para alcanzar ese valor es indispensable trabajar al menos con tres pares de cromosomas: por ejemplo, 1, 2 y 4, como fue nuestro planteamiento inicial. En los trabajos que haremos posteriormente haremos la inclusión del cromosoma 4 con lo que llegaremos al 22.71% del genoma.

La principal ventaja del análisis de las translocaciones con la metodología FISH es que tales aberraciones son evidenciadas de tal manera que se hace muy fácil detectarlas e identificar su tipo rápidamente. Además, se puede hacer la discriminación entre translocaciones y dicéntricos coloreando específicamente los centrómeros con una sonda pancentromérica [12]. Sin embargo, eso, en nuestro caso, incrementaría los costos de nuestro proyecto en un 20% por lo que debemos ver cuál debe ser nuestra estrategia para desarrollar completamente la técnica en nuestro país.

5. REFERENCIAS

- [1] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual. Technical Reports Series N° 405. Vienna, 2001.
- [2] STRAUME, T.; LANGLOIS, R. G.; LUCAS, J.; JENSEN, R. H.; BIGBEE, W. L.; RAMALHO, A. T.; BRANDAO-MELLO, C. E. Novel biodosimetry methods applied to victims of the Goiania accident. *Health Phys.*, 60 (1) 71-76, 1991.
- [3] SCHEID, W.; WEBER, J.; PETRENKO, S.; TRAUT, H. Chromosome aberrations in human lymphocytes apparently induced by Chernobyl fallout. *Health Phys.* 64(5): 531-534; 1993.
- [4] LLOYD, D. C.; LUCAS, J. N.; EDWARDS, A. A.; DENG, W.; VALENTE, E.; HONE, P. A.; MOQUET, J. E. A study to verify a reported excess of chromosomal aberrations in blood lymphocytes of Namibian uranium miners. *Radiat. Res.* 155, 809-817, 2001.
- [5] LUCAS, J. N.; AWA, A.; STRAUME, T.; POGGENSEE, M.; KODAMA, Y.; NAKANO, M.; OHTAKI, K.; WEIER, H. U.; PINKEL, D.; GRAYS, J.; LITTLEFIELD, G. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing ionization. *Nt. J. Radiat. Biol.* 62 (1), 53-63, 1992.
- [6] DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Application of FISH chromosome painting assay for dose reconstruction: state of the art and current views. *Radiat. Prot. Dosim.*, 88 (1), 51-58, 2000.
- [7] RAVE-FRANK, M.; VIRSIK-PEUCKERT, P.; SCHMIDBERGER, H.; RODEMANN, H. P. Reciprocal translocation frequency in irradiated sensitive and resistant human tumor cells in correlation with clonogenic in vitro cell survival: a possibility of tumor radiosensitivity prediction? *Radiother. Oncol.* 38 163-170, 1996.
- [8] MOQUET, J. E.; EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C.; HONE, P. A. The use of FISH chromosome painting for assessment of old doses of ionizing radiation. *Radiat. Prot. Dosim.* 88 (1), 27-33, 2000.
- [9] LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A.; MOQUET, J. E.; HONE, P. A. Doses in radiation accidents investigated by chromosome aberration analysis. XXII: Review of cases investigated, 2000-2002. NRPB-W33. National Radiological Protection Board. 2003.
- [10] GONZÁLES CALVO, A.; ASUNCIÓN DIEZ, S. Dosimetría biológica: análisis de las aberraciones cromosómicas para la estimación de dosis. Casos investigados en España. Consejo de Seguridad Nuclear. Colección Otros Documentos CSN, 9. 1998.
- [11] ESPINOZA, M. E.; ALFARO, J.; CANO, Y.; ACOSTA, O. Estudio de los cromosomas en personas rutinariamente expuestas a radiaciones ionizantes. Informe Final Científico. Contrato de Subvenciones CONCYTEC N°677-09-93-OAI. 1998.
- [12] PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 2934-2938, 1986.