ADAPTACION DE LA TECNICA DE CULTIVO DE LINFOCITOS PARA EL ANALISIS DE MUTACIONES CROMOSOMICAS RADIOINDUCIDAS

Jaime DESCAILLEAUX [a], Marco ESPINOZA [b], Dora VALENCIA [a], Maria L. GUEVARA [a]
(a) Laboratorio de Genética Humana, Instituto de Ciencias Biológicas "Antonio Raimondi"
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(b) Instituto Peruano de Energía Nuclear, Apt. 1687, Lima.

Recibido el 5 de enero de 1994

RESUMEN

Se describen las modificaciones introducidas en nuestro laboratorio a la técnica de cultivo de linfocitos, con miras a su aplicación como una metodología de dosimetría cromosómica, complementarias a las técnicas físicas de radioprotección, en nuestro medio. Las experiencias realizadas nos permiten afirmar que a 48 horas de cultivo no existen diferencias en la utilización de los medios TC 199 y MEM; que la incorporación de 5-BrdU permite diferenciar metafases en la primera división, y que con la finalidad de contabilizar un número de tubos de cultivo por paciente.

ABSTRACT

Modifications introduced to the lymphocyte culture technique routinely used in our laboratory are described. Our objective is to apply this results as a methodology for chromosomal dosimetry and to complement, in this way, radioprotection physical — techniques in Perú. The experiences realized have permitted us to point out the — following remarks: 1) there is not differences between 48-hours cultures with TC 199 and MEM media; 2) 5-BrdU incorporation into chromosomes allowed us diffentiate first and second metaphase cells; and 3) it is needed to increase the number of culture tubes in each patient in order to score a number of metaphases statistically significant for biological dosimetry.

1. *INTRODUCCION*

La utilización del análisis de alteraciones cromosómicas, como un método de dosimetría biológica, data de 1968, a raíz del accidente "Recuplex" ocurrido en Handord, USA en 1962 [1], a partir de esta fecha un número relativamente pequeño de Laboratorios, ha establecido esta técnica como un método rutinario para estimar el equivalente de dosis a cuerpo entero, llegando a convertirse en una metodología muy importante en la radioprotección, conjuntamente con los métodos de dosimetría física.

A pesar de que la técnica de cultivo de linfocitos para análisis citogenético, es de fácil realización, sin embargo, su adaptación para estimar la dosis cromosómica requiere de algunas modificaciones, que permitan la comparación de resultados interlaboratorios, en concordancia con las recomendaciones del Organismo Internacional de Energía Atómica [2], siendo particularmente determinante para estas comparaciones, aquella que se refiere a la utilización en el recuento de aberraciones, de las metafases correspondientes a la primera división celular.

Este trabajo, tiene como objetivo fundamental, comunicar las modificaciones introducidas por el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con miras al establecimiento del análisis de aberraciones cromosómicas como un método rutinario de dosimetría citogenética a ser utilizado en radioprotección. Debemos mencionar que la adaptación de esta técnica se realiza por primera vez en el Perú y lo hacemos con el convencimiento de la imperiosa necesidad de desarrollar métodos de radioprotección tendientes a salvaguardar la salud del personal rutinariamente expuesto.

2. *MATERIAL Y METODOS*

Las experiencias realizadas estuvieron orientadas a lograr una técnica que permita el recuento del mayor número posible de metafases correspondientes a células en primera división. Para el efecto, tenemos que decidir sobre los siguientes aspectos:

a) Elegir el medio de cultivo mas adecuado entre aquellos utilizados rutinariamente en el Laboratorio de Genética Humana (MEM y TC 199, del Institut Pasteur de Paris).

b) El número de horas de cultivo (48 y 72 horas).

c) Marcación con 5-BrdU (5-Bromo-2'. deoxyuridine, 5002-Sigma) para diferenciar células en primera división.

d) Efecto de la 5-BrdU sobre el índice mitótico.

La técnica de cultivo de linfocitos empleada, es la misma que se utiliza rutinariamente en nuestro Laboratorio [3], y basicamente consiste en :

i.- Obtención de sangre periférica en condiciones de asepcia, utilizándose jeringas descartables, tubos heparinizados estériles y al vacío (143 UI de heparina).

ii.- Preparación de un medio cuya composición es:

6 ml de medio (199 o MEM)

2 ml de suero humano.

2 gotas de PHA-M Difco

100 µg/ml de streptomicina

100 UI/ml de penicilina

10µg de 5-BrdU

La colchicina y la preparación citológica no muestra variación con la técnica clásica, a excepción de la utilización del suero humano diluido 1/6 como solución hipotónica.

Para la identificación de metafases de primera división, utilizamos la técnica de Perry & Wolff [4], modificada. Las láminas fueron coloreadas en una solución Hoechst al 0.5 % y sometidas a la acción de una lámpara UV germicida por 12 horas, tratadas con una solución 2XSSC a 50°C por 1 ó 2 minutos y coloreadas en Giemsa al 3 %, pH 6.8 durante 10 minutos.

3 RESULTADOS

3.1 DEL CULTIVO DE LINFOCITOS

Nuestros resultados se presentan en la Tabla No. 1, donde podemos apreciar el número de células analizadas en cada medio, a 48 y 72 horas de cultivo, habiéndose empleado el 5-BrdU unicamente en los cultivos de 48 horas.

A pesar de que el número de células analizadas es pequeño, es fácil apreciar que resulta claramente superior en los cultivos de 72 horas, que en ambos medios, con un mayor índice de células analizables en el medio 199 (0.01 a las 48 horas y 0.025 a las 72 horas).

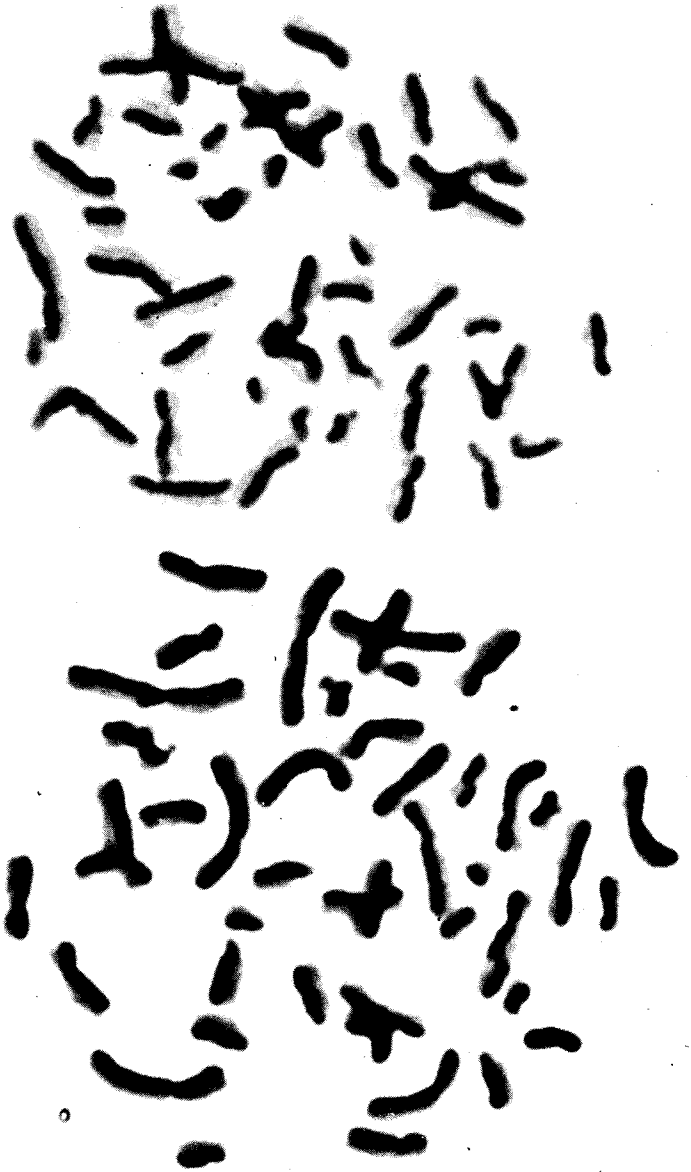
MEDIO	HORAS DE CULTIVO	BrdU 10ug/ml	CELULAS ANALIZAD.	TOTAL CEL'. ANALIZ	CELULAS ANALIZABLES
MEM	48	+	135		0.01
MEM	48	—	131	677	0.005
MEM	72	—	411		0.01
199	48	+	141		0.01
199	48	—	203	731	0.01
199	72	—	387		0.025

TABLA 1

Número de Células analizadas en los medios MEN y 199 a diferentes condiciones de cultivo

En relación a la acción del BrdU sobre el índice mitótico, apreciamos a través del número de células analizadas en cultivo de 48 horas, que los resultados aparecen un tanto contradictorios en cada medio, puesto que en el MEM parecería no tener efecto, y en el 199, - el número de células analizadas es claramente superior en el cultivo sin BrdU (141-203).

Cuanto a la diferenciación de metafases de primera división la técnica de coloración diferencial de cromátidas permite señalarlas con precisión. La coloración homogénea indica a las células en primera división y la coloración diferencial a las de segunda división (Ver fig. No. 1 y No. 2).



Coloración diferencial de cromátides que caracterizan a células en segunda división celular. Apreciese que cada cromosoma presenta una cromátide coloreada con mayor intensidad, y en algunas de ellas es posible verificar la ocurrencia de intercambio de cromátides hermanas.

Metafase coloreada homogeneamente en ambas cromátides, correspondiente a la primera división celular, acompañada del arreglo cariotípico identificando cada par cromosómico.

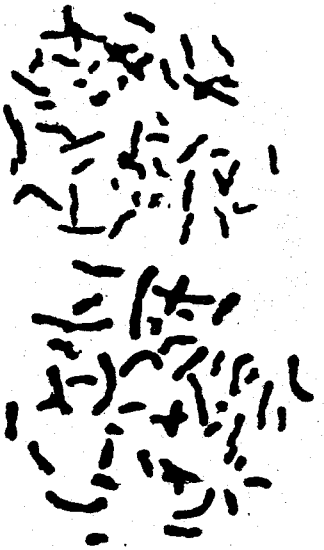


Fig. 1 Coloración diferencial de cromátidas que caracterizan a células en segunda división celular. Apreciese que cada cromosoma presenta una cromátide coloreada con mayor intensidad, y en algunas de ellas es posible verificar la ocurrencia de intercambio de cromátides hermanas.

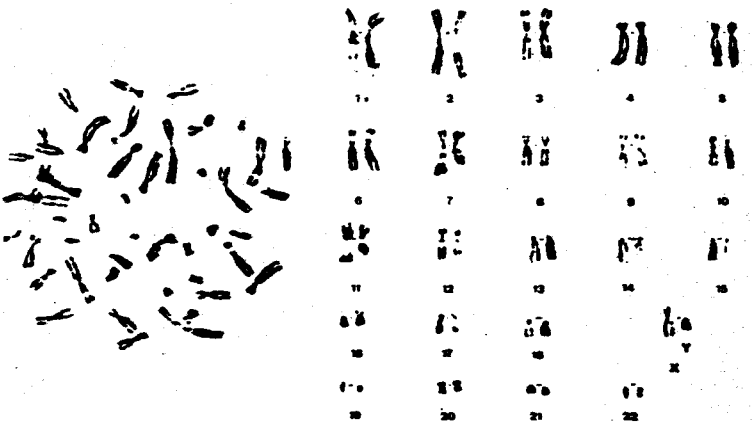


Fig. 2 Metafase coloreada homogeneamente en ambas cromátides, correspondiente a la primera división celular, acompañada del arreglo cariotípico identificando cada par cromosómico.

3.2 *DEL ANALISIS CROMOSOMICO*

Para la identificación de las aberraciones cromosómicas es necesario determinar algunos criterios que permiten señalarlas con precisión, especialmente aquellas que son consideradas significativas para la estimación de dosis biológicas. En nuestro laboratorio hemos aceptado los siguientes :

a) Para considerar un cromosoma como dicéntrico (dic), la metafase debe tener 45 cromosomas y 46 centrómeros, independientemente de la presencia del fragmento.

b) Para señalar un anillo (r), no es necesario que se encuentre acompañado del fragmento acéntrico.

c) En caso de duda para la identificación de anomalías estructurales, se procede al análisis de la metafase en ampliaciones fotográficas; si la duda persiste, se realiza al bandeo C, y si ella aún persistiera, la metafase no es considerada para el recuento.

d) Los otros tipos de aberraciones cromosómicas se caracterizan de acuerdo al ISCN [5].

4 *DISCUSION*

Basados en los resultados obtenidos, podemos afirmar que:

a) En relación al medio de cultivo a utilizar, aparentemente este puede ser tanto el TC 199 como el MEM, a pesar de que priori; el MEM por tener una mayor concentración de vitaminas y aminoácidos, está considerado como un medio de crecimiento mas apropiado; sin embargo el número total de células analizadas es mayor en el 199, al igual que la frecuencia relativa de células analizables, tanto a 48 horas - como a 72, y solo pierde cuando se considera el número de células en el cultivo de 72 horas.

Considerando que no existe ventaja del MEM sobre el 199, y que rutinariamente en nuestro laboratorio empleamos el 199, hemos decidido utilizar el TC 199 como medio de cultivo para la evaluación de mutaciones cromosómicas en dosimetría biológica.

b) Es indudable que la variable horas de cultivo, resulta determinante para el número de células analizables; encontrándose que resulta significativamente menor a 48 horas. Creemos que por esta razón, es necesario aumentar el número de tubos por paciente, en nuestro caso lo hemos elevado a 8.

c) En lo referente a la utilización de las células de primera división, la aplicación del BrdU, a la concentración utilizada, resulta de gran valor para que el recuento de las aberraciones cromosómicas con significado dosimétrico, se realice unicamente en células en primera división; fundamentalmente por tratarse de aberraciones del tipo inestable (dic, ace r) que puede perderse en divisiones posteriores dando lecturas por debajo de su valor real.

d) Cuanto al efecto inhibidor del 5BrdU sobre el índice mitótico nuestros resultados indican que a la concentración utilizada, este efecto es mínimo.

Respecto al reconocimiento de las aberraciones cromosómicas, debemos mencionar que resulta indispensable un período de entrenamiento del observador, que le permita realizar el recuento de cromosomas y centrómeros, así como la observación de cada miembro del cariotipo para la identificación de formas anormales en el menor tiempo posible, puesto que este análisis está basado en un número elevado de metafases [6, 7].

Finalmente, podemos afirmar que la adaptación de la técnica de cultivo de linfocitos para el análisis de aberraciones cromosómicas con significado en la dosimetría, ha sido estandarizada en nuestro Laboratorio permitiendonos iniciar una nueva etapa que muy pronto nos permitirá realizar estimaciones de dosis absorbida en los trabajadores expuestos ocupacionalmente, tanto en casos de sobreexposición accidental, como en caso de control de exposición crónicas.

5. *CONCLUSIONES*

En la adaptación de la técnica de cultivo de linfocitos para análisis de mutaciones cromosómicas radioinducidas, podemos concluir :

i.- Aparentemente no existen diferencias significativas cuanto al número de células analizables entre los medios TC 199 y MEM.

ii.- La marcación con 5-BrdU permite la utilización en el análisis de células en primera división.

iii.- Para alcanzar un número adecuado de células con significado dosimétrico, es necesario aumentar el número de tubos de cultivo por casos.

REFERENCIAS

[1] BENDER, M.A., and Gooch, P.C. Radiat. Res. 29, 1966 (568)

[2] Research Coordination Meeting on Chromosomal Aberration Analysis. Harwell, U.K. 15-19 Nov. 1982. IAEA Ref. No. JI/C239.

[3] DUTRILLAUX, B., et Couturier, J. La pratique de l analyse chromosomique. 10 Paris - Mason 1981.

[4] PERRY, P., and WOLFF, S. Nature, Lond. 251 (1974) 156

[5] ISCN (1978) : An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978). Birth Defects : Original Article Series; Vol XIV, No. 8 (The National Foundation, New York 1978); also in Cytogenet. Cell Genet. 21 : 309 - 404 (1978).

[6] LLOYD, D.C., and PURROTT, R. J., Radiat. Prot. Dosim. 1, 1, (1981) 19.

[7] WAGNER, R., SCHMID, E., and BAUCHINGER, M., Mutation. Res. 109 (1983).

Adaptación de la técnica de cultivo de linfocitos para el análisis de mutaciones cromosómicas radioinducidas por Jaime Descailleux, Marco Espinoza, Dora Valencia, María Guevara se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.