

FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN DOS CAPAS ENDOCRIADAS DE RATON (MUS MUSCULUS) (*)

LARRAMENDY, M. L. y DULOUT, F. N.

Sección Ecogenética. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular.

SUMMARY

BALB and C57 mice imbreed strains were analysed by means of *in vivo* cytogenetic techniques in order to determine the frequency of chromosomal aberrations not induced by any clastogen.

Results are summarized in tables I, II, III and IV. Statistically significant differences between the two strains were found in the frequency of metaphases with at least one aberrant chromosome, the frequency of several "chromatid type" aberrations (breaks and gaps), the frequency of cells with less than 40 chromosomes, the mitotic index and the frequency of meiotic univalents.

The high incidence of chromosome aberrations in C57 strain may be explained in several ways: a) DNA replication errors in C57 strain; b) DNA repair mechanisms alterations in C57 strain; c) The existence of some causal agent in the C57 strain, mainly viruses, that can induce chromosome abnormalities.

These findings are analysed taking into account that chromosome aberrations play a fundamental role in the evolution of karyotypes. The knowledge of the phenomena involved in the production of spontaneous macromutations could contribute to the understanding of several cytotoxic problems.

INTRODUCCION

El material genético está sujeto a variaciones de distinto tipo. En los tejidos en proliferación, algunas de estas variaciones pueden detectarse como aberraciones cromosómicas. Las causas de éstas pueden ser intrínsecas, debido a errores en el proceso de duplicación semiconservativa del ADN y/o extrínsecas, a causa de la acción de agentes clastogénicos presentes en el medio ambiente en que el tejido debe proliferar, concomitantemente con fallas en los mecanismos de reparación de dichas lesiones.

(*) El presente trabajo fue subvencionado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

La frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas en individuos normales y no tratados específicamente con ningún agente clastogénico tiene un valor que constituye el "plateau" de referencia cuando se realizan estudios de inducción de lesiones cromosómicas. Sin embargo, este valor puede variar debido a las causas mencionadas anteriormente.

Las modificaciones que se producen en la estructura cromosómica, por cualquier causa y que son o pueden ser transmitidas a la descendencia de manera estable, deben considerarse como macromutaciones en relación a las micromutaciones o mutaciones de punto que se producen a nivel molecular. Actualmente en algunos mamíferos se reconoce como mucho más importante a las macromutaciones en los procesos de especiación debido a que la diferencia entre distintas especies se puede producir por modificaciones de tipo robersoniano que, por efecto de posición de los genes, producen modificaciones notables a nivel fenotípico. En general, las aberraciones cromosómicas se estudian como consecuencia de la acción de algún agente clastogénico y no como un fenómeno espontáneo sujeto a todo tipo de variables biológicas.

El presente trabajo sintetiza el estudio sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas no inducidas específicamente por mutágenos en dos cepas endocriadas de ratón, BALB y C57, del bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (I.M.B.I.C.E.); analiza las posibles causas de las diferencias encontradas y constituye un ejemplo más de la variabilidad que puede existir entre individuos de una misma especie, en este caso respecto a la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron ratones de las cepas endocriadas BALB y C57 criadas en el bioterio del IMBICE. El estudio se realizó sobre 5 machos de cada cepa, de la misma edad (2-3 meses) y sometidos a las mismas condiciones de cría en el mismo local. Los estudios se hicieron mediante técnicas *in vivo*. Tres horas antes de su sacrificio los animales se inyectaron intraperitonealmente con una dosis de 0,5 μ /gr peso vivo de colchicina, siendo sacrificados a la misma hora. Material proveniente de la médula ósea de fémures y de testículos se recogió y se lavó por centrifugación en solución de Hanks (pm 7,0). Luego se realizó el tratamiento hipotónico con cloruro de potasio 0,07M a 37°C durante 20 minutos para células de testículo y 40 minutos para células de médula ósea. La fijación se hizo con alcohol metílico: ácido acético 3:1. Los preparados se hicieron sobre portas helados secándoselos al aire (Rothfels y Siminovitch, 1958).

Se estudiaron 20 metafases mitóticas y 20 diacinesis/metafases 1 por cada animal. El índice mitótico se determinó por conteo de por lo menos 1000 células de la médula ósea de cada animal. La selección de las figuras a analizar y de los campos para la determinación del índice mitótico se hizo mediante criterios preestablecidos (Larramendy et al., 1977). Las aberraciones cromosómicas se clasificaron en "tipo cromátida" y "tipo cromosoma", según

Bukton y Evans (1973). El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de la prueba de "t" de Student para diferencias entre proporciones.

RESULTADOS

El cuadro I resume las diferencias encontradas entre las cepas de ratón con respecto al número de metafases con y sin aberraciones cromosómicas. En los ratones BALB, las metafases que llevan por lo menos una aberración cromosómica alcanzan al 8 %, mientras que en C57 este valor asciende al 40 %, siendo las diferencias entre ambas cepas altamente significativas ($p < 0,001$).

Las frecuencias de las distintas aberraciones cromosómicas encontradas se sintetizan en el cuadro II. Las aberraciones tipo cromosoma (fragmento acéntrico, cromosoma diminuto e inversión pericéntrica) no muestran diferencias significativas entre ambas cepas al comparar cada aberración por separado; en cambio, en las aberraciones tipo cromátida, que son las más frecuentes, aparecen diferencias altamente significativas en la comparación con respecto a fracturas y "gaps" monocromáticos e isocromáticos y diferencias no significativas en la comparación de fracturas isocromáticas a intercambios asimétricos. La comparación entre los totales de aberraciones encontradas en cada capa revela asimismo la existencia de diferencias altamente significativas, con un incremento en la capa C57 del $566,66 <$ con respecto a BALB. Para dicho cálculo se tuvo en cuenta el total de cromosomas analizados en cada grupo.

El análisis de la variación del número diploide en células de médula ósea se resume en el cuadro III. La principal variación numérica está dada por la disminución en el número diploide, lo que incide en la frecuencia de células con número cromosómico normal. En ambos casos, las diferencias entre las dos cepas son altamente significativas ($p < 0,001$). Del mismo modo el índice mitótico varía significativamente ($p < 0,001$) de una cepa a otra, con una disminución notable en C57.

En el cuadro IV se sintetiza el análisis de la meiosis. En C57 se incrementa a valores altamente significativos el número de univalentes, tanto autosómicos ($p < 0,001$) como gonosómicos ($p < 0,021$) del mismo modo que la frecuencia de anillos multivalentes ($p < 0,005$). Consecuentemente existe una disminución en la frecuencia de bivalentes con una diferencia altamente significativa con respecto a BALB ($p < 0,001$).

DISCUSION

Los estudios sobre clastogénesis ponen en evidencia en muchas ocasiones resultados contradictorios o no concluyentes. Solamente en aquellos casos en que la acción del agente clastogénico es muy severa, las diferencias con respecto a los controles aparentemente normales tienen cierta contundencia. Por este motivo algunos autores cuestionan los métodos empleados para testificar la acción de sustancias clastogénicas (Schinzel y Schmid, 1976; Léonard, 1975).

Sin embargo, aparte de la consideración que debe tenerse respecto a artefactos de técnica y falencias metodológicas, es necesario evaluar otros factores que pueden incidir en la producción de aberraciones cromosómicas no inducidas en un nivel significativamente distinto de la ausencia total de ellas.

Si consideramos la complejidad de los sistemas genéticos eucarióticos, es indudable la existencia de una serie de factores que pueden inducir aberraciones cromosómicas en el individuo o permitir la continuidad de lesiones cromosómicas a través de por lo menos un ciclo celular.

En ratón se ha señalado la existencia de diferencias entre líneas endocriadas y entre sexos respecto a la respuesta a la acción de agentes mutagénicos (Generoso y Russell, 1969). En seres humanos se encontraron variaciones individuales significativas en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (Lezana et al., 1977), lo que podría indicar diferencias en los procesos de reparación del ADN cromosómico.

Los resultados expuestos señalan sin lugar a dudas la diferencia que existe entre las líneas endocriadas de ratón BALB y C57 con respecto a aberraciones cromosómicas no inducidas. Las causas de este fenómeno son indudablemente intrínsecas a cada cepa en nuestro bioterio debido a las condiciones en que se realizó la observación. Hipotéticamente se pueden considerar varias posibilidades para explicar el fenómeno: a) Fallas en los mecanismos de reparación del ADN en la cepa C57 debido a mutaciones que afectan las enzimas involucradas en el proceso (nucleasas, ligasas y ADN polimerasas) (Lambert et al., 1976); b) Fallas en los mecanismos de duplicación del ADN (Lambert et al., 1976) y c) Presencia de algún agente causal en el individuo. Los animales superiores son simbióticos con una cantidad de microorganismos; de éstos, algunos virus son capaces de inducir daño cromosómico (Stich y Yohn, 1970).

Respecto a la última hipótesis, existen evidencias indirectas significativas. Basombrío (1973) encontró que los sarcomas inducidos por metil colantreno en una cepa híbrida C57 x BALB contienen más virus que los inducidos en ratones BALB puros. La existencia de estos virus fue demostrada inyectando extractos acelulares de los sarcomas en lauchas BALB, las que desarrollan leucemias o linfomas.

Por otra parte, resalta de los resultados expuestos, la mayor frecuencia de aberraciones de tipo cromática. Si existieran fallas en los mecanismos de reparación, la frecuencia de aberraciones tipo cromosoma, "derivadas" de las de tipo cromátida, debería ser mayor, cuando en realidad no difiere significativamente en C57 con respecto a BALB y con la ausencia de este tipo de lesión. Sin embargo, es imposible descartar esta posibilidad sin efectuar un análisis más exhaustivo, más aún cuando la diferencia entre los índices mitóticos de ambas cepas podría indicar que existe mortandad celular, una de cuyas causas puede ser la existencia de alteraciones cromosómicas que impiden la viabilidad de la célula portadora.

Asimismo estos resultados pueden analizarse desde otros puntos de vista. La modificación del cariotipo es uno de los componentes del sistema evolutivo de las especies a nivel cariológico. En general todos los trabajos de citotaxonomía analizan las variaciones cromosómicas intra e interespecíficas a partir del fenómeno concluido, tratando de explicar los mecanismos por los cuales se produjeron esas modificaciones. Tal es el caso de las grandes generalizaciones de Matthey en *Mus* (Leggada) (Matthey, 1964) y de los trabajos de citogenética de Akodon (Bianchi et al., 1971).

Resulta importante entonces desarrollar modelos experimentales que permitan el estudio de las modificaciones cromosómicas con el conocimiento de los factores intervinientes. Este trabajo demuestra de qué manera puede variar la frecuencia de aberraciones cromosómicas no inducidas en dos cepas endocriadas de la misma especie, lo que puede servir de base al considerar las variaciones cariológicas intra e interespecíficas en estudios de citotaxonomía.

BIBLIOGRAFIA

- BASOMBRI, M. A., 1973. Lymphomas in BALB/c mice inoculated with supernatants from chemically induced sarcomas. *Jour. Cancer Inst.* 51 (4): 1157-1162.
- BIANCHI, N. O.; REIG, O. A.; MOLINA, O. J. and DULOUT, F. N., 1971. Cytogenetics of the south american Akodont Rodents (Cricetidae). I. A progress report on argentinian and venezuelan forms. *Evolution*, 25 (4): 724-736.
- BUCKTON, M. E. and EVANS, H. J., 1973. World Health Organization. Geneve.
- GENEROSO, W. M. and RUSSELL, W. L., 1969. Strain and sex variations in the sensitivity of mice to dominant-lethal induction with ethyl methanesulfonate. *Mutation Res.*, 8: 589-598.
- LAMBERT, B.; HANSSON, K.; BUI, T. H.; FUNES-CRAVIOTO, F. and LINDSTEN, J., 1976. DNA repair and frequency of X-ray and u.v.-light induced chromosome aberrations in leukocytes from patients with Down's syndrome. *Ann. Human Genet.*, 39: 293-303.
- LARRAMENDY, M.; BIANCHI, N. O. and ZABALA SUÁREZ, J., 1977. Acción mutagénica de la Trietilenmelamina (TEM) en el ratón. I. Clastogénesis en células somáticas y germinales. *Mendeliana* (en prensa).
- LÉONARD, A., 1976. Heritable chromosome aberrations in mammals after exposure to chemicals. *Rad. and Environm. Biophys.*, 13: 1-8.
- LEZANA, E. A.; BIANCHI, N. O.; BIANCHI, M. S. and ZABALA SUÁREZ, J. 1977. Sister chromatid exchanges in Down syndromes and normal human beings. *Mutation Research*. (En prensa).
- MATTHEY, R., 1966. Cytologie comparée de *Mus* (Leggada) *minutoides minutoides* Smith d'Afrique du Sud et d'une forme voisine de l'Angola. *Genetica*, 37: 171-180.
- ROTHFELS, K. M. and SIMINOVITCH, L., 1958. A air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain Technol.*, 33: 73-77.
- SCHINZAL, M. and SCHMID, W., 1976. Lymphocyte chromosome studies in humans exposed to chemical mutagens. The validity of the method in 67 patients under cytostatic therapy. *Mutat. Res.*, 40: 139-166.
- STICH, H. F. and YOHAN, D. S., 1970. Viruses and Chromosomes. *Progr. Med. Virol.*, 12: 78-127.

	BALB	C57	PRUEBA DE "T"	DIFERENCIA
CELULAS SIN ABERRACIONES	92	60	$P < 0,001$	NS
CELULAS CON ABERRACIONES	8	40	$P < 0,001$	NS
Nº METAFASES ANALIZADAS	100	100		

Cuadro I. — Frecuencia de metafases con y sin aberraciones cromosómicas en BALB y C57

ABERRACIONES		BALB	C 57	PRUEBA DE "T"	DIFERENCIA
TIPO CROMOSOMA	FRAGMENTO ACENTRICO	-	1	$P = 0,36$	NS
	CROMOSOMA DIMINUTO	-	2	$P = 0,16$	NS
	INVERSION PERICENTRICA	1	4	$P = 0,11$	NS
TIPO CROMATIDA	FRACTURA MONOCROMATICA	5	25	$P < 0,001$	NS
	FRACTURA ISOCROMATICA	-	1	$P = 0,36$	NS
	GAP MONOCROMATICO	3	17	$P < 0,005$	NS
	GAP ISOCROMATICO	-	8	$P < 0,01$	NS
	INTERCAMBIO ASIMETRICO	-	2	$P = 0,16$	NS
TOTAL ABERRACIONES		9	60	$P < 0,001$	NS
		566,66%			
TOTAL CROMOSOMAS ANALIZADOS		3997	3971		
Nº DE METAFASES ANALIZADAS		100	100		

Cuadro II. — Incidencia de aberraciones cromosómicas en los cromosomas de médula ósea de ratones BALB y C57

		BALB	C57	PRUEBA DE "T"	DIFERENCIA
CELULAS CON 2n	> 40	1	1	-	-
	= 40	95	70	P<0,001	110
	< 40	4	29	P<0,001	110
INDICE MITOTICO		0,803	0,469	P<0,001	110
Nº METAFASES ANALIZADAS		100	100		

Cuadro III. — Total de células heteroploides e índice mitótico en la médula ósea de ratones BALB y V57

		BALB		C57		PRUEBA DE "T"	DIFERENCIA
		TOTAL	%	TOTAL	%		
BIVALENTES		3950	98,75	3646	91,28	P<0,001	110
UNIVALENTES	AUTOSOMICOS	14	0,35	282	7,06	P<0,001	110
	GONOSOMICOS	36	0,90	58	1,45	P=0,021	110
	TOTAL	50	1,25	340	8,51	P<0,001	110
MULTIVALENTES	ANILLOS	-	-	2A IV	0,20	P<0,005	110
	CADENAS	-	-	-	-	-	-
	TOTAL	-	-	8	0,20	P<0,005	110
Nº CROMOSOMAS ANALIZADOS		4000	100	3994	100		

Cuadro IV: Frecuencia de bivalentes, univalentes y multivalentes en diacinesis-meta-fases I de ratones BALB y V57. Los números romanos precedidos por A (anillo) indican el número de cromosomas involucrados en dicha figura.