

## MEDICINA AL DIA

### MONITOREO GENETICO: UTILIZACION DE BIOMARCADORES EN POBLACIONES HUMANAS

\* Dra. Claudia Liliana Roncancio Peña.

\*\* Dr. Hernando Augusto Clavijo Montoya.

#### Resumen

El monitoreo genético involucra una serie de técnicas específicas que permiten estimar el riesgo asociado con exposición a agentes genotóxicos, con el fin de indicar acciones preventivas que puedan ser tomadas para reducir o eliminar sus efectos. En este artículo, nos referiremos a algunos biomarcadores que pueden ser utilizadas en el desarrollo de estos programas.

Monitoreo genético

Biomarcadores citogenéticos

Agentes genotóxicos

#### Abstract

Genetic monitoring involves a series of specific techniques to assess the risk associated with exposure to genotoxic agents, to indicate preventive actions to reduce or eliminate the effects. In this article we will study some biomarkers used on this programs..

Genetic monitoring

Cytogenetic biomarkers

Genotoxic agents

Existe una gran preocupación con respecto a los efectos en la salud del hombre que puede causar la exposición a agentes químicos, físicos o biológicos y por esta razón día a día se investigan nuevas metodologías que permitan identificar y estimar el riesgo

asociado por exposición a estas sustancias. Los estudios de monitoreo están enfocados principalmente a la detección de efectos de exposición de forma ocupacional, permitiendo identificar los riesgos y las poblaciones implicadas mediante una serie de técnicas

\* Microbióloga. Instituto Nacional de Salud. Grupo de Genética. Ave El Dorado Cra 50. Santa Fe de Bogotá, Colombia.

\*\* Médico Genetista, Escuela Colombiana de Medicina, El Bosque. Apartado Aéreo 085206, Santa Fe de Bogotá, Colombia.



FIGURA No. 1.- MARCADORES BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA DOCUMENTAR EL DAÑO POR EXPOSICIÓN A AGENTES GENOTÓXICOS.

específicas; indicando acciones que puedan ser tomadas para reducir o eliminar este hecho, así como para fijar límites de exposición en el lugar de trabajo.<sup>1</sup>

En este tipo de estudios es posible realizar un monitoreo de los individuos que se encuentran expuestos a estas sustancias, evaluando diferentes marcadores biológicos ó biomarcadores que reflejan la exposición, respuesta y susceptibilidad a diferentes niveles:<sup>2</sup>

**Marcadores de dosis externas.-**

Evalúan la concentración de las sustancias posiblemente tóxicas presentes en el medio.

**Marcadores de dosis internas.-**

Es la dosis absorbida por el organismo, los cuales incluyen estudios farmacocinéticos.

**Marcadores de dosis efectivas.-**

Es la cantidad de sustancia que puede producir efectos detectables en las células blanco, por ejemplo el estudio de aductos en ADN y proteínas.

**Marcadores de efecto.-**

Determinan la respuesta de un organismo frente a una exposición reflejando la posibilidad de aparición de efectos adversos en la salud del hombre, por ejemplo los estudios citogenéticos.<sup>1,3,4</sup>

El monitoreo genético en una población permite obtener una aproximación inicial del riesgo asociado por exposición a estos

agentes; sin embargo la única forma de definir el potencial carcinogénico de una sustancia es mediante la realización de estudios epidemiológicos. Los estudios de monitoreo pueden realizarse en un menor período de tiempo, siendo posible definir los niveles de exposición, la duración, el número de individuos expuestos con controles apareados apropiadamente; teniendo en cuenta las diversas fuentes de variación que han sido identificadas y que incluyen los factores de cultivo, asociados con el crecimiento in vitro de los linfocitos, factores biológicos relacionados con el genotipo, estilo de vida y condiciones generales de salud del individuo.

Dentro del proceso de monitoreo genético son muy importantes los ensayos citogenéticos, los cuales permiten detectar el daño genético inicial que tiene lugar en un proceso neoplásico y tienen un valor predictivo con oncogenicidad de 60 a 90%, dependiendo de las características químicas de las sustancias, del tipo de prueba y del laboratorio que lo realiza. La prueba de AC posee una sensibilidad de 80%, la de ICH de 78% y la de MNs de 69%.<sup>6,7</sup>

Estos estudios citogenéticos han demostrado ser muy útiles e informativos y se han evaluado un gran número de sustancias que incluyen: metales (cromo, cobalto y níquel)<sup>8</sup>, contaminantes ambientales (nitrato



de peroxiacetil)<sup>9</sup>, y cigarrillo<sup>10</sup>. También existen técnicas que permiten evaluar el proceso de reparación del ADN, como la Técnica del Cometa.<sup>11</sup>

El sistema celular más utilizado para estos estudios es el de linfocitos de sangre periférica, ya que estos pueden ser considerados como un sistema interno de monitoreo no orgánico específico, debido a que continuamente se encuentran circulando en el cuerpo. Estas células poseen un tiempo de vida media de 4 meses; por lo tanto pueden acumular daños causados por exposiciones repetidas y son entonces un tipo celular ideal para detectar el daño causado por exposición crónica a bajas dosis de agentes genotóxicos.<sup>12</sup>

A continuación vamos a tratar cada una de estas técnicas de una forma más específicas, teniendo en cuenta su importancia dentro de los procesos de seguimiento a diferentes poblaciones.

### I Aberraciones cromosómicas (AC)

Este ensayo es usado frecuentemente para documentar la inducción de rupturas cromosómicas y rearrreglos, formados por la exposición a mutágenos; en el cual se realiza un cultivo de linfocitos, induciendo la división celular (especialmente linfocitos T) por acción de un mitógeno (fitohemaglutinina). Se han realizado un gran número de estudios con el fin de lograr explicar el mecanismo de formación de las AC; existe evidencia que indica que el daño causado al ADN ocurre por mecanismos de reparación anormal y se ha observado que la ruptura en cadenas dobles son las lesiones que finalmente van a formar las AC.<sup>12</sup>

Las AC pueden ser clasificadas en 2 tipos:

#### 1.- Aberraciones cromosómicas.-

En las cuales ambos brazos de uno o varios cromosomas están implicados en la formación de la anomalía; son inducidas por radiaciones ionizantes, agentes químicos como la beomicina y neocarzinostatina.<sup>12</sup>

Las AC son eventos irreversibles que pueden tener diversas consecuencias biológicas, especialmente cuando la célula afectada está dividiéndose y sus efectos van a depender de la cantidad de material

genético perdido; en el caso de una deleción grande ambas células pueden morir, mientras que si se presentan deleciones de menor tamaño, estas células pueden sobrevivir, dividirse y causar efectos en la salud a largo plazo.<sup>12</sup>

Las translocaciones cromosómicas son causadas por errores en la reparación del ADN, en las cuales una secuencia de ADN se une con otro cromosoma diferente del original, dando como resultado translocaciones balanceadas, que se forman por la unión recíproca de fragmentos de ADN de otro cromosoma; si no hay pérdida neta de material genético el rearrreglo no causa la muerte celular, sin embargo debido a la yuxtaposición de genes los rearrreglos cromosómicos pueden producir una expresión anormal de genes translocados y la anomalía es transmitida a las células hijas. Frecuentemente a los rearrreglos cromosómicos se les atribuye como responsables del desarrollo de cáncer o de problemas de desarrollo en el individuo. Otro tipo de AC, incluye la formación de cromosomas dicéntricos, los cuales son eventos letales para la célula.<sup>12</sup>

#### 2.- Aberraciones cromatídicas.-

En las que un brazo de uno o más cromosomas están implicados en la formación de la anomalía y son causados por radiaciones ultravioleta y la gran mayoría de las sustancias químicas.

Las aberraciones cromatídicas también pueden causar ciertos efectos en la salud, aunque la predicción acerca de los efectos sobre la salud del hombre son bastante complejos, ya que una célula con una aberración cromatídica puede dar origen a una célula normal y a otra con deficiencia de material cromosómico; esta última célula probablemente muera. Una célula con un intercambio cromatídico balanceado al dividirse tiene un 25% de probabilidad de producir una célula normal, un 25% de obtención de una célula con traslocación balanceada y un 50% de probabilidad de producir células hijas con material cromosómico deficiente o adicional.<sup>12</sup>

La frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas (estructurales y numéricas) en recién nacido es de 6 por 1000. En poblaciones expuestas a radiación



ionizante (sobrevivientes a la bomba atómica) o a sustancias genotóxicas (cloruro de vinilo y benceno) se ha observado el aumento en la frecuencia de AC. Además muchos tipos de cáncer han sido asociados con aberraciones cromosómicas específicas y no específicas, de igual forma este incremento en la frecuencia de AC se ha observado en diferentes enfermedades hereditarias (Ataxia telangiectasia, Anemia de Fanconi y Síndrome de Bloom).<sup>13</sup>

Se ha documentado que las células expuestas a agentes químicos son más susceptibles a la inducción de daño por otras fuentes exógenas o endógenas; siendo incapaces de reparar este daño, como se reportó en un estudio realizado con fumadores, en el cual se observó que los linfocitos de personas fumadoras eran más susceptibles al daño y presentaban un menor nivel de reparación; mediante la técnica conocida como "challenge assay" (Ensayo del reto).<sup>10</sup> También este ensayo permite detectar las deficiencias en reparación del ADN debido a la modificación del ADN/proteínas, por formación de aductos o por mutaciones en genes que reparan el ADN, produciendo así, un mayor número de errores en la reparación. Dentro de un proceso carcinogénico esta anomalía causa múltiples alteraciones genéticas que de una forma secuencial, promueven la formación del cáncer.<sup>14</sup>

## II. Intercambio de Cromátides Hermanas - (ICH)

Un ICH se origina como consecuencia de la ruptura y unión de forma errada de las cadenas de ADN, lo cual puede evidenciarse citogenéticamente adicionando al medio de cultivo una sustancia química, que va a permitir diferenciar las cromátides durante el ciclo de replicación. Un ICH puede intercambiar aparentemente segmentos idénticos de ADN sin una alteración conocida en la viabilidad celular o en su función.<sup>13</sup>

El intercambio de las cadenas que resulta en los ICH ocurre durante la replicación del ADN, y se requiere que las células pasen por la fase S (síntesis) para poder visualizar el daño; algunos agentes que son muy buenos inductores de ICHs son

llamados dependientes de la fase S. La frecuencia basal de ICHs es de 7-10 por célula y se puede ver aumentada en algunas enfermedades como el Síndrome de Bloom o la Esclerosis Múltiple. Las células de pacientes con Xeroderma Pigmentosum son hipersensibles a la inducción de ICHs por luz ultravioleta y agentes alquilantes; sin embargo no existe una relación clara entre la capacidad de reparación de estas células y la sensibilidad para la inducción de ICHs.<sup>13</sup>

Los ICH son inducidos de forma muy eficiente por aquellas sustancias que forman aductos (interacciones covalentes) con el ADN, en el cual se ha sugerido la participación de las enzimas girasas o topoisomerasas, responsables de la relajación del ADN superenrollado en el proceso de replicación en procariotes y eucariotes respectivamente. El número de ICH puede verse aumentado cuando al ADN se unen aductos, los cuales contribuyen a dar mayor tensión al ADN haciendo que ocurra un mayor número de rupturas en sus cadenas y también en aumento en el número de errores en la unión. Se han realizado estudios a personas ocupacionalmente expuestas a óxido de etileno (5-10ppm) en las que se observó un aumento significativo en la frecuencia de ICH con respecto a la población control. También se ha observado que los ICHs pueden ser el resultado del efecto que causan ciertas sustancias que interfieren en el proceso de reparación.<sup>13, 15</sup>

## III. Micronúcleos (MN)

Los micronúcleos son pequeños fragmentos de ADN que pueden ser detectados en el citoplasma de una célula hija, la cual puede ser fácilmente observada ya que el cultivo celular ha sido tratada con Citocalasina B, agente encargado de bloquear la citocinesis. La frecuencia basal de MNs es de 0 -10 en 1000 células binucleadas. El tipo de mutaciones que contribuyen a la formación de los MNs incluyen:

- Mutaciones en proteínas del cinetocoro (placa proteica en la región centromérica del cromosoma en la cual se unen las fibras del huso mitótico), centrómero y huso mitótico que producen una distribución desigual de los



cromosomas en la anafase, causadas por agentes conocidos como aneuploidógenos.  
- Rupturas en cadenas de ADN no reparadas que van a formar fragmentos cromosómicos acéntricos, causada por sustancia clastogénicas.

- Existe otro mecanismo mediante el cual se pueden formar MN conocido como muerte celular programada, que consiste en una forma de destrucción nuclear en la que se desintegra el núcleo y se forman fragmentos nucleares, seguido de fagocitosis.<sup>16</sup>

Se han realizado estudios con el fin de determinar la naturaleza de los MN, mediante el uso de anticuerpos anti-cinetocoro; en los cuales se sugiere que en 50% de los casos los MN se forman por la pérdida cromosómica total y el otro 50% es debido a la presencia de fragmentos acéntricos.<sup>17</sup>

#### IV. Ensayo del Cometa.

Este ensayo permite medir y analizar el daño y el nivel de reparación del ADN a un nivel celular individual; detectando las rupturas en cadenas sencillas en el ADN y sitios hábiles al álcali; así como eventos de reparación por excisión incompletos y sustancias que causan entrecruzamientos con el ADN (Mostaza nitrogenada).<sup>18</sup>

Mediante esta técnica se puede detectar el daño de forma altamente sensible (aproximadamente) 1 rupturas del ADN/10<sup>9</sup> daltons); rápida, ya que los resultados se pueden obtener en un día y a partir de muestras muy pequeñas (1 a 10.000 células) de sangre total, de fibroblastos en cultivo o de células que se han mantenido congeladas para su preservación.<sup>18</sup>

Esta técnica se realiza mezclando las células eucarióticas con agarosa sobre una lámina, posteriormente las células se lisan usando detergentes y altas concentraciones de sales y el ADN liberado se somete a una electroforesis y posteriormente se colorea con un fluorocromo específico, evaluando las células por el desplazamiento de la región nuclear al ánodo. Esta medición puede hacerse utilizando un micrómetro o mediante el uso de analizadores de imagen.<sup>18</sup>

Una aplicación muy importante de este ensayo del cometa es la estimación del daño

del ADN en células de individuos expuestos ocupacional, clínica o ambientalmente, así como para la evaluación de la capacidad de reparación del ADN entre individuos controles y expuestos.<sup>18</sup>

Una aplicación muy importante de este ensayo del cometa es la estimación del daño del ADN en células de individuos expuestos ocupacional, clínica o ambientalmente, así como para la evaluación de la capacidad de reparación del ADN entre individuos controles y expuestos.<sup>18</sup> Por ejemplo Rajeswari realizó un estudio en el que evaluó el daño y reparación del ADN en pacientes con cáncer de seno, sus familiares en primer grado y un grupo control; se encontró un aumento significativo en el daño en los familiares de los pacientes, en relación con el grupo control, pero menor que el reportado de los pacientes con cáncer.<sup>19</sup>

#### REFERENCIAS.

1. Van Damme K, CAsteleyn L, Heseltine E, et al. Individual susceptibility and prevention of occupational diseases: scientific and ethical issues. JOEM. 1995. 37(1): 91-99.
2. Vainio H. Elimination of environmental factors or elimination of Individual: biomarkers and prevention. JOEM. 1995. 37(1):12-13.
3. Plygers E. P. Biomarkers. Med. Lav. 1995. 86(3): 278-282.
4. Legator M & Au W. Monitoreo de poblaciones humanas. Comunicación personal. 1993.
5. Soderkuist P & Axelson O. On the use of molecular biology data in occupational and environmental epidemiology. JOEM. 1995. 37(1): 84-90.
6. Groot de RH, Sicard D, Roncancio CL et al. Monitoreo de poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos. Publicado en el libro de resúmenes de la IX Convención Científica Nacional, organizada por la ACAC. 1992. p:46.
7. Tomatis L, Aintio A, Wilbourn J. et al. Human carcinogens so far Identified. Jpn. J.CancerRes. 1989. 80:795-807.
8. Gennart J. Ph, Baleux C, Verellen-Dumoulin Ch, et al. Increases Sister Chromatid Exchanges and tumor marks in workers exposed to elemental chromium, cobalt and nickel-containing dusts. Mut Res. 1993;299:55-61.
9. Heddle JA, Shepson PB, Gingerich JD, et al.

- Mutagenicity of peroxyacetyl nitrate (PAN) In vivo: Tests for somatic mutations and chromosomal aberrations. *Environ. Mol. Mutag.* 1993; 21:58-66.
- 10.- Au W, Walker DM, Ward, JB, et al. Factors contributing to chromosome damage in Lymphocytes of cigarette smokers. *Mut. Res.* 1991;260:137-144.
- 11.- McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mut Res.* 1993; 288:47-63.
- 12.- Aw W. Monitoring Human Populations for effects of radiation and chemical exposures using cyogenetic techniques. *Occup. Med.* 1991; 6(4): 597-611.
- 13.- Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mut Res.* 1988; 204:379-406.
- 14.- Au W, Wilsinson GS, Tying SK, et al. Monitoring populations for DNA repair deficiency and for cancer susceptibility. *Environ. Health Persp.* 1996. 104, Supp 3: 579-584.
- 15.- Holden HE, Barret JF, Huntigton CM, et al. Genet Profile of a nalidixic acid analog: a model for the mechanism of sister chromatid exchange induction. *Environ. Mol. Mutag.* 1989; 13:238-252.
- 16.- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mut. Res.* 1983; 123:61-118.
- 17.- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutag.* 1991; 18:227-231.
- 18.- Tice, RR. The single cell gel/comet assay. In DH Phillis & S Venitt eds. *Environmental Mutagenesis.* 1995. Oxford, U.K. 315-339.
- 19.- Rajeswari N. Blomonitoring individual risk in relatives of breast cancer patients by comet assay. *Ind. J. Hum. Genet.* 1995;1:33-41.