MX0100332

EVALUACION DE LA RECOMBINACION EN CELULAS SOMATICAS INDUCIDA POR RADIACION EN DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO LARVARIO DE DROSOPHILA

Cruces, Martha P. y Morales- Rámirez, P. Departamento de Biología. ININ.

La recombinación mitótica se define, como el proceso que genera células diploides con una combinación de genes diferente a la de la célula que le dio origen. Es el resultado de la interacción entre dos cromosomas (generalmente dos cromosomas homológos) y puede ser identificada por un cambio en la secuencia del ADN o un cambio en el alineamiento alélico (Würgler , 1992).

Los términos recombinación mitótica y recombinación somática son frecuentemente utilizados como sinónimos, sin embargo es más correcto referirse al fenómeno como recombinación mitótica, ya que además de las células somáticas, incluye a las células premeíoticas de la línea germinal, las cuales también se dividen mitoticamente (Darras y Francke ,1987).

La recombinación entre cromosomas homólogos en células somáticas, tiene consecuencias comparables a la del entrecruzamiento en las células germinales: modifica el patrón de la segregación de los alelos involucrados.

La recombinación puede inducir la pérdida de la heterocigocidad. En las células que son heterócigas para dos alelos de un gene marcador en los cromosomas homólogos, la recombinación recíproca en el segmento entre el gene marcador y el centrómero, conducirá a la perdida de la heterocigocidad (Würgler, 1992). Como consecuencia de esto, en un tejido en proliferación, se desarrollarán dos células homocigóticas para un gen marcador (Becker, 1976., Würgler and Sobels, 1986). Si el gen produce un fenotipo facilmente distinguible, se podrán detectar grupos de células fenotipicamente alteradas.

Tradicionalmente, se piensa en la recombinación como un mecanismo que genera variabilidad genética, pero que además de proveer variación genética, permite a las células el restablecer las secuencias perdidas cuando el ADN es dañado por errores en la duplicación o por agentes físicos y químicos reemplazando las secuencias dañadas por otras sin daño tomando como molde el cromosoma homologo.

De esta manera el significado biológico de la recombinación es el de funcionar como un mecanismo de tolerancia al daño inducido por diferentes agentes, ya que le permite a la célula sobrevivir a pesar de que el ADN ha sido dañado; aún mas, se sabe que algunos tipos especiales de recombinación, regulan la expresión genética , activando segmentos especificos dentro de los cromosomas, esto es, se colocan genes inactivos en sitios en donde puedan ser activados (Watson, y col.1987).

El fenómeno de la recombinación esta cobrando actualmente una gran importancia dado su posible papel como uno de los pasos iniciales en la transformación celular que conducen a la formación de un tumor canceroso (Würgler, 1992).

Drosophila melanogaster, la mosca de la fruta ha jugado un papel muy importante en el conocimiento del proceso de la recombinación mitótica, de hecho fue en este organismo donde se demostró por primera vez este fenómeno por Stern en 1936. y en el que se indujo este evento por un agente químico (Becker, 1976).

En Drosophila, desde principios de los 80's, se están utilizando pruebas con células somáticas para determinar la genotoxicidad de una gran cantidad de agentes (Würgler, y Sobels, 1986, Graf, 1984). Estas pruebas están basadas en la utilización de larvas heterocigóticas para dos marcadores que producen un fenotipo fácilmente reconocible en la cutícula de la mosca adulta.

Las larvas poseen grupos de células indiferenciadas, que están destinadas a dividirse en una configuración determinada, de tal manera que si se induce una alteración en el ADN, en una de las células expuestas esta producirá una modificación del fenotipo que se expresará como un grupo de células mutantes al que se denomina "mancha". Entre las ventajas que presenta esta prueba, quizá una de las más importantes es que permite detectar la actividad recombinogénica de los agentes (Würgler, 1986., Vogel, 1992).

Para realizar las prueba de mutación y recombinación somática , se precisa de dos condiciones : La primera es una combinación heterocigótica en un locus con alelos que en condición homocigótica conduce a fenotipos fácilmente distinguibles. La segunda es una configuración transheterócigа de dos diferentes loci en los brazos de dos cromosomas homólogos.

La frecuencia de los clones inducidos, por recombinación, depende principalmente de la distancia física entre los marcadores, pero puede ser modificada por factores ambientales y genéticos y por la dinámica de proliferación del tejido en el cuál se están analizando los clones.

En Drosophila, la recombinación somática, está influenciada por varios factores genéticos y ambientales que también afectan el entrecruzamiento meiotico (Ashburner, 1989).

Uno de los factores genéticos que afectan la recombinación, es la presencia de un grupo de genes, denominados Minute, los cuales son letales recesivos con un efecto sobre el desarrollo de los individuos y que incrementan significativamente la frecuencia de recombinación inducida en el cromosoma en el que se encuentran (Ashburner, 1989).

Entre los factores no genéticos que han sido más estudiados con respecto a su efecto en la recombinación mitótica , se encuentran la temperatura y la edad de los individuos (Becker, 1976).

Aunque la recombinación mitótica puede ocurrir espontáneamente, su frecuencia es muy baja, sin embargo la taza de recombinación de una célula puede ser incrementada por la exposición a agentes que causan daño al ADN. A este tipo de agentes, se les conoce comúnmente como recombinógenos y entre ellos podemos mencionar a la radiación ionizante y a numerosos agentes químicos. (Vogel, 1992).

OBJETIVO :

Determinar si la proporción mutación/recombinación inducida por rayos gamma varia con la etapa de desarrollo.

MATERIAL Y METODO:

Para realizar la siguiente investigación se utilizó la prueba de mutación y recombinación somáticas del ala de Drosophila. (Graf y col. 1984). Se utilizaron las cepas mwh / mwh y flr^3/ TM3, Ser.

Tanto mwh como flr^3, son marcadores recesivos que modifican la forma de las cerdas de las células en el ala. Ambos marcadores encuentran en el brazo izquierdo del cromosoma 3.

El marcador mwh (múltiple wing hair), está localizado en posición 0.03, afecta los tricomas de todas las regiones del cuerpo de la misma manera, incrementado el número de elementos, lo cual está relacionado con una reducción en la longitud y modificaciones en la orientación. En el ala, la mutación produce células con 3 a 7 tricomas en lugar de uno por célula como en el tipo silvestre. (Lindsley y Zimm 1986)

El gene flr^3 modifica la forma del tricoma, produciendo un engrosamiento en la base que esta asociado con una reducción en el tamaño del tricoma confiriéndole la apariencia de una flama, en condición homocigótica, el gene es letal y por lo tanto en la cepa está balanceado con el cromosoma TM3, Ser, un cromosoma que porta inversiones múltiples. Dado que la recombinación en las células heterocigóticas para inversiones múltiples presentes en el cromosoma balanceador

conduce a configuraciones anormales que no son viables, el cromosoma TM3 en condición heterocigótica, es capaz de suprimir la inducción de manchas por recombinación mitótica (Frei y col. 1992).

La metodología que se utilizó fue la siguiente : se cruzaron hembras vírgenes de la línea mwh/ mwh con machos de la cepa flr^3/TM3,Ser. Una vez cruzados se colectaron huevos durante 5 días consecutivos en frascos lecheros de250 ml. de capacidad que contenían medio de cultivo normal durante 6 horas, para sincronizar la edad de los individuos. Transcurrido ese tiempo, los huevos colectados se incubaron en el cuarto de cultivo .

El día destinado para el tratamiento, las larvas correspondientes a las edades de 24, 48, 72, 96, y 120 horas, se separaron del medio de cultivo por densidad en sacarosa y se irradiaron con 20 Gy de rayos gamma en el irradiador experimental Gammacell-250. Una vez irradiadas las larvas se colocaron en medio de cultivo normal y se introdujeron al cuarto de cultivo hasta completar su desarrollo. Cuando los adultos emergieron se fijaron en alcohol al 70 %, se les disectaron las alas y se montaron en preparaciones fijas.

Como resultado de la cruza de las dos cepas utilizadas en esta investigación, se obtienen dos tipos de descendientes. 1) mwh/flr^3 y mwh /TM3, Ser. Las alas se analizaron al microscopio óptico a 400 aumentos. Para cada ala se registró el número y el tipo de las manchas (grupos de células mutantes) encontradas .

RESULTADOS

En la tabla No. 1, se presenta el número de manchas simples (mwh ó flr^3), gemelas y totales, inducidas por rayos gamma en los individuos mwh - flr^3 (parte a) y mwh/ TM3, Ser (b) , sin embargo como la principal diferencia entre las etapas de desarrollo es el número de células presentes en el disco imagal, se propuso un análisis de las manchas inducidas en relación al número de células presentes en cada etapa de desarrollo, el incremento de las manchas inducidas por los rayos gamma en cada etapa de desarrollo en relación a la frecuencia basal, se dividió entre el número de células expuestas para obtener la frecuencia de mutación. El valor obtenido, se multiplico por 1000 y entonces se obtuvo la frecuencia de mutación en 1000 células. La frecuencia relativa se obtuvo dividendo la frecuencia de manchas inducidas en las diferentes etapas, en relación a la de las larvas de 120 horas. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para las manchas totales en los tipos de descendientes.

La proporción de manchas inducidas por recombinación, se obtuvo dividiendo la frecuencia de manchas inducidas en los individuos mwh /flr^3, entre la inducida en los organismos portadores de inversiones, como se mencionó anteriormente, las manchas inducidas en estos individuos son debidas a mutación. Los resultados se presentan en la figura No. 1. Una vez obtenido la proporción de manchas debidas a mutación o a recombinación se determinó en que región del cromosoma había ocurrido el intercambio. Dada la posición en el cromosoma de los dos marcadores utilizados en la prueba de mutación y recombinación somáticas en el ala de Drosophila ,existen dos posibilidades de recombinación. Si la recombinación ocurre en la región del cromosoma entre flr^3 y el centrómero se formarán células hijas que presentan los dos tipos celulares (mancha gemela). En la figura No 2 se presentan los resultados para la distrbución de la recombinación en las regiones mwh-flr^3 y flr^3-centrómero

DISCUSION

El número de células en el disco imagal se incrementa en relación directa con la edad de la larva, por esta razón es lógico que el número de manchas inducidas por los rayos gamma, en los individuos mwh/flr^3 y mwh /TM3, Ser se incremente en las diferentes etapas de desarrollo, sin embargo se tiene que tomar en consideración que la principal diferencia entre cada una de ellas es el número de células presentes en el disco imagal en el momento de la irradiación. Por medio de estudios con rayos X, se ha determinado que el disco imagal que dará origen a las alas de Drosophila , inicia con entre 20 a 50 células las cuales se dividen continuamente hasta alcanzar el número de células del ala que es de 30,000. La duración del ciclo celular es de 8.6 horas aproximadamente. (Würgler y Vogel., 1986). Con el objetivo de realizar una comparación real entre las diferentes etapas, se relacionó el número de manchas inducidas con el tamaño del blanco celular en cada etapa. Con este análisis el número de manchas en 1000 células, es inversamente proporcional a la edad de las larvas, esto es; las larvas mas jóvenes (24 horas) son las más sensibles ya que en ellas se indujo un mayor número de manchas por célula, mientras que en las etapas tardías, la eficiencia para inducir manchas por 1000 células fue mucho menor. Si observamos la frecuencia relativa, en las larvas de 24 horas se inducen 33 veces más manchas que en las de 120. Este hecho se explica dado que se sabe que la radiosensibilidad es directamente proporcional a la actividad reproductora de la célula, e inversamente proporcional a la etapa de desarrollo. Las células en una larva de 24 horas son más radiosensibles posiblemente debida a que su capacidad reproductora es mayor comparada con la de las etapas tardías.

En la figura 3, aparece la proporción de manchas inducidas por recombinación o por mutación en las larvas de 24 y 48 horas el 100 % de las manchas fueron inducidas por recombinación y el valor más bajo corresponde a las larvas de 120 horas en las que el 79.26 % de las manchas fueron inducidas por recombinación. Estos resultados parecerían indicar que existe una relación inversa entre la edad de los individuos y la recombinación inducida por rayos gamma. Aún cuando se asume que en el cromosoma con inversiones impide la inducción de manchas por recombinación, la inversión no abarca el cromosoma completo, y existe la posibilidad de recombinación en la región distal del brazo izquierdo del cromosoma 3 (Zimmering y col. 1997), las diferencias encontradas en esta investigación en la proporción mutación/recombinación podrían ser explicadas por este hecho. En cuanto a la recombinación inducida en las dos regiones del cromosoma, se observa claramente que la proporción de recombinación en la región flr^3-centrómero, se incrementa de 0 en las larva de 24 y 48 horas hasta 36.80 en larvas de 120 horas. Los resultados obtenidos en esta investigación parecen indicar que la sensibilidad en esta región se modifica en las diferentes etapas de desarrollo.

REFERENCIAS

1. Ashburner, M. 1989 Cold Spring Harbor Press.
2. Becker, H.J.1976 Genetics and Biology of Drosophila,Vol. 1 Academic Press. New York.
3. Graf, U., F. Wurgler and A. Katz. (1984).. Environ Mutagen .6 :153-188.
4. Frei, H., Clements, J., Howe, D y Würgler, E. 1992. Mutation Research , 279 : 21-33
5. Lindesley , L .and Zimm, G. (1990). Phiip W. Hedrick
6. Watson, J. , Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J.A., and Weiner, A. 1987. The Benjamin/Cummings Publising Company , Inc. Fourth edition.
7. Würgler, F. E. and E.W. Vogel (1986).10 Plenum New York.pp. 1-7
8. Würgler F. E. (1992).Mutation Research, 284 :3-14.

9. Zimmering, S., Cruces, M.P., Pimentel, E., Arceo., C., Carrasco,G., y Olvera,O. 1997. Mutation Research , 379:77-89

TABLA 1. NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR 20 GY DE RAYOS GAMMA

a) mwh/flr^3

EDAD	N	MS	MG	MT
T	507	145	5	150
24	110	73	0	73
48	120	109	0	109
72	120	286	71	357
96	82	491	195	686
120	68	637	262	899

b) mwh/TM3

EDAD	N	MS
T	206	47
24	60	8
48	60	12
72	60	29
96	60	87
120	60	168

N= número de alas MS= manchas simples MG= manchas gemelas MT= manchas totales

TABLA No. 2 NUMERO DE MANCHAS INDUCIDAS POR RAYOS GAMMA EN RELACION AL TAMAÑO DEL BLANCO

mwh /flr^3

C			TOTALES				
Edad	N	No. de Células	Células expuestas	Δ Manchas	M/C	Manchas/ 1000 cel.	Frecuenci a relativa
T	507	24400	12370800	150	1.213E-05	0.012	0.022
24	110	21	2310	41	0.0177	17.74	33.50
48	120	67	8040	74	0.0092	9.20	17.37
72	120	487	58440	321	0.0054	5.49	10.36
96	82	3492	286344	661	0.0023	2.30	4.35
120	68	24400	1659200	879	0.0005	0.52	1

mwh /TM3, Ser

Edad	N	No. de Células	Células expuestas	Δ Manchas	M/C	Manchas/ 1000 cel.	Frecuenci a relativa
Tes	206	24400	5026400	47	9.351E-06	0.0093	0.0883
24	60	21	1260	0	0	0	0
48	60	67	4020	0	0	0	0
72	60	487	29220	16	0.00054	0.547	5.17
96	60	3492	209520	74	0.00035	0.353	3.33
120	60	24400	1464000	155	0.00010	0.105	1

Fig. 1 PROPORCION MUTACION RECOMBINACION INDUCIDA POR RAYOS GAMMA

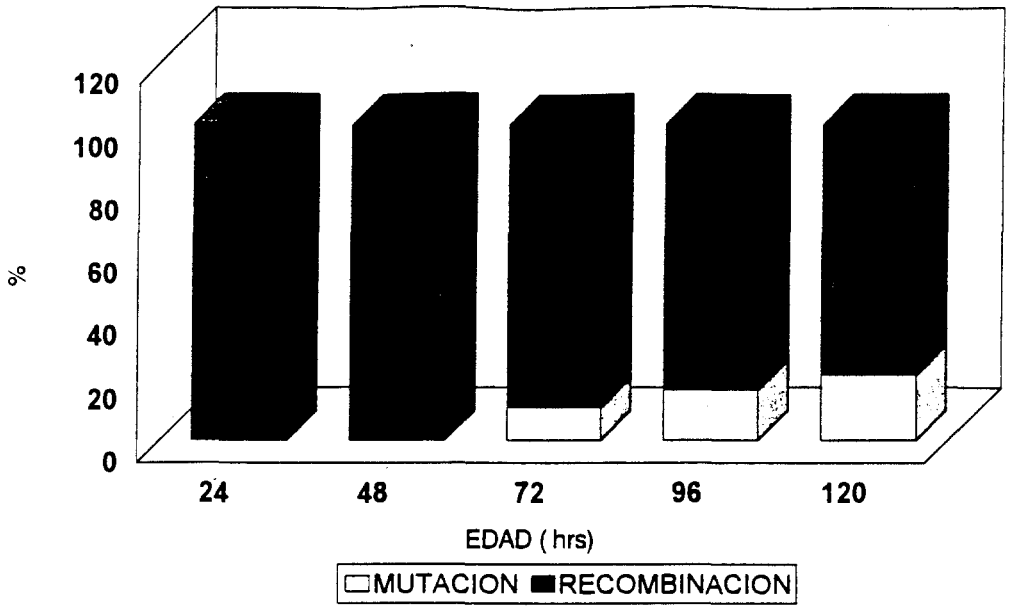
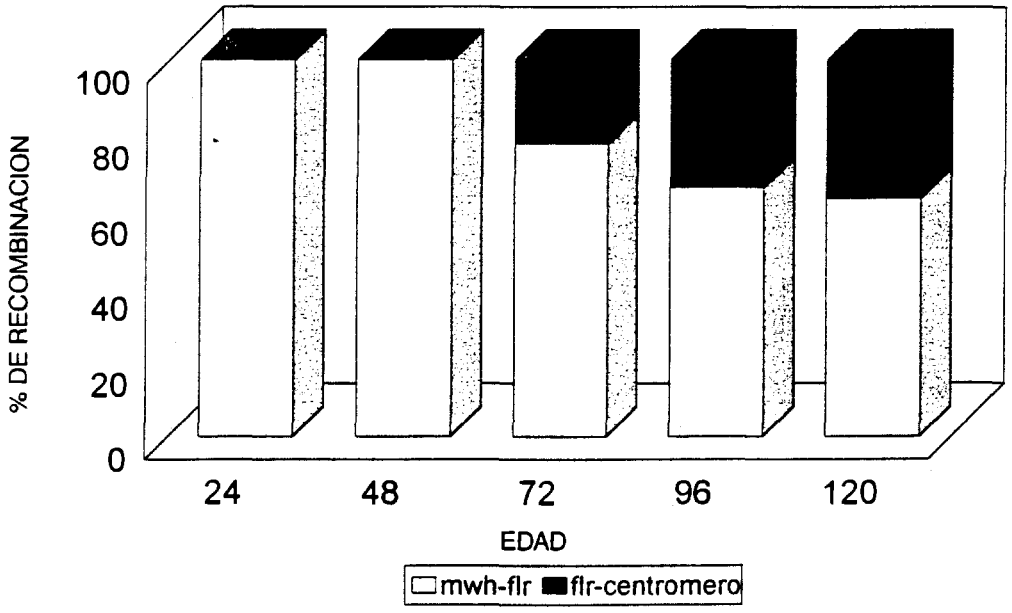
Fig. 2 RECOMBINACION INDUCIDA POR RAYOS GAMMA EN LA DIFERENTES REGIONES DEL CROMOSOMA