

# INFERENCIA DE UNA GEOMETRÍA CROMOSÓMICA EN INTERFASE A PARTIR DE LA FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS RADIOINDUCIDAS

Nasazzi, N; Otero, D<sup>\*</sup>; Di Giorgio, M.

Ente Nacional Regulador Nuclear - \* Comisión Nacional de Energía Atómica

## RESUMEN

Las radiaciones ionizantes producen rupturas en la doble hélice de ADN cuya interacción y recombinación dan origen a aberraciones cromosómicas.

Las aberraciones cromosómicas estables (ACE) surgen de la recombinación de dos rupturas intercromosómicas (translocaciones) e intracromosómicas (inversiones).

Asumiendo que la producción e interacción de las rupturas es completamente al azar, proporcional a la longitud en megabases de cada cromosoma (Mb) y desechando efectos de proximidad la relación esperada entre translocaciones e inversiones es:  $F = 86$ .

Se analizó el número translocaciones e inversiones usando bandedo G en 16 cultivos de sangre periférica irradiada in vitro con radiación  $\gamma$  de  $Co^{60}$  (rango de dosis: 0.5Gy -3Gy).

A partir de estos resultados se obtuvo  $F = 13.5$ , valor significativamente menor a  $F = 86$ . Los datos de la literatura muestran similares valores de  $F$  menores aunque ampliamente dispersos.

El exceso de inversiones podría explicarse en base a un "efecto de proximidad": dos rupturas próximas en el espacio tienen una mayor probabilidad de interacción. En consecuencia es posible postular una particular configuración espacial de los cromosomas durante la interfase.

Se propone un modelo donde los cromosomas muestran un confinamiento espacial por plegamiento sobre sí mismos definiendo dominios esféricos con cierto grado de imbricación y una producción de rupturas proporcional a la sección eficaz geométrica del dominio. Se asume una función de probabilidad de interacción con una distancia máxima de interacción =  $1\mu$ . Se propone que la amplia dispersión de  $F$  experimentales se debería a una variación temporal del grado de imbricación de los dominios cromosómicos.

## SUMMARY

Ionizing radiation induces DNA double strand breaks (DSBs) and their interaction and illegitimate recombination produces chromosome aberrations. Stable chromosome aberrations comprise inter-chromosomal events (translocations) and intra-chromosomal events (inversions).

Assuming DSBs induction and interaction is completely random and neglecting proximity effects, the expected ratio of translocations to inversions is  $F=86$ , based on chromosome arm lengths.

We analyzed the number of translocations and inversions using G-banding, in 16 lymphocyte cultures from blood samples acutely irradiated with  $\gamma$ -rays (dose range: 0.5Gy-3Gy). Our results give  $F=13.5$ , significantly smaller than  $F=86$ . Literature data show similar small  $F$  values but strongly spread.

The excess of inversions could be explained by a "proximity effect", it means that more proximate DSBs have an extra probability of interaction. Therefore, it is possible to postulate a special chromosome arrangement during irradiation and the subsequent interval.

We propose a model where individual chromosomes show spherical confinement with some degree of overlapping and DSBs induction proportional to cross section. We assume a DSBs interaction probability function with cut-off length  $= 1\mu$ . According to our results the confinement volume is  $\cong 6.4\%$  of the nuclear volume. Nevertheless, we propose that large spread in  $F$  data could be due to temporal variation in overlapping and spatial chromosome confinement.

## INTRODUCCIÓN

Las radiaciones ionizantes producen efectos clastogénicos sobre el material genético que conducen a la producción de aberraciones cromosómicas generalmente reconocidas en el periodo de metafase del ciclo celular y que se clasifican en estables (ACE) e inestables (ACI) de acuerdo a su capacidad de sobrevivir a la división celular.

Las ACI (dicéntricos y anillos) constituyen un dosímetro adecuado para el caso de irradiaciones agudas mientras que las ACE (translocaciones e inversiones) proveen una estimación más adecuada para las irradiaciones prolongadas o en el caso de dosimetría retrospectiva.

Las ACE requieren técnicas especiales para su detección (1-3) y su reconocimiento insume más tiempo que en el caso de las ACI.

El mecanismo molecular más aceptado para la producción de aberraciones cromosómicas es la reunión ilegítima intra o intercromosómica de las rupturas producidas en ambas hélices del ADN (double-strand breaks: DSB) (4) alterando la secuencia original de bases nitrogenadas.

El presente trabajo analiza la relación (F) entre las ACE radioinducidas resultantes de la recombinación de DSB producidos en distintos cromosomas (translocaciones) respecto de los producidos en un mismo cromosoma (inversiones pericéntricas) a fin de obtener información y proponer un modelo de geometría cromosómica a gran escala en el núcleo interfásico.

## MATERIAL Y METODOS

El número de translocaciones e inversiones radioinducidas fueron obtenidos a partir de 16 cultivos de linfocitos de sangre periférica de dadores de ambos sexos irradiadas in vitro con radiación  $\gamma$  y de  $\text{Co}^{60}$  en un rango de dosis entre 0.5Gy y 3Gy.

Los cultivos se realizaron por micrométodo, con 48 hs. de incubación de sangre heparinizada en 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado al

20% con suero fetal bovino y fitohemaglutinina P como estimulante de la división (0.15 mg/ml). La detención del cultivo en metafase se realizó mediante el agregado de colchicina a las 47 horas (0.2 µg/ml).

La identificación de las aberraciones cromosómicas se realizó aplicando la técnica de bandeo G según Seabright modificada (5-6)

Se analizaron 1040 metafases bandeadas registrándose 325 translocaciones y 24 inversiones pericéntricas.

La relación entre translocaciones e inversiones resultante es  $F=13.5$

## MODELO

Asumiendo que la producción y recombinación de DSB es aleatoria (7-8) y que la distribución de DSB sobre un determinado brazo cromosómico sigue una distribución de Poisson y fuera proporcional a la longitud en megabases (Mb) (9) de dicho brazo se puede obtener una estimación teórica de la relación de translocaciones e inversiones según la siguiente fórmula (10):

$$F = \frac{\sum_{i=1}^{46} (L_i + S_i)(T - S_i - L_i)}{2 \sum_{i=1}^{46} L_i S_i} = 86$$

$L_i$  = longitud en Mb. del brazo largo del  $i$ ésimo cromosoma.

$S_i$  = longitud en Mb. del brazo corto del  $i$ ésimo cromosoma.

$T_i$  = longitud en Mb del conjunto diploide promedio pesado para ambos sexos.

Las consideraciones previas a la estimación teórica implican que los cromosomas se encuentran libremente distribuidos en el volumen del núcleo. El valor obtenido  $F=86$  es significativamente mayor que nuestro valor experimental  $F=13.5$  y que los obtenidos por otros autores (10-11).

Una consideración plausible para interpretar el exceso de inversiones pericéntricas es el "efecto de proximidad".

Una función  $g(r)$  (12-14) establece la probabilidad de que dos DSB separados por una distancia  $r$  interactúen siendo:

$$g = \text{cte} \quad \text{si } r \leq h \quad \text{y} \quad g = 0 \quad \text{si } r > h$$

Aquí  $h$  es la distancia máxima de interacción y su orden de magnitud es  $h \approx 1\mu$ .

Si se asume que los cromosomas presentan un confinamiento espacial por plegamiento sobre sí mismos constituyendo dominios cromosómicos esféricos de volumen menor al volumen del núcleo, dos DSB producidos en un mismo cromosoma tendrán una probabilidad de interacción mayor que dos DSB producidos en distintos cromosomas viéndose favorecida la producción de inversiones pericéntricas y obteniéndose menores valores teóricos de  $F$ .

Las consideraciones sobre "efecto de proximidad" y confinamiento espacial conducen a la necesidad de analizar las interacciones de DSB en base a la existencia de primeros vecinos. Se eligió un modelo de empaquetamiento máximo de dominios cromosómicos esféricos con 12 primeros vecinos en contacto, corregido por efecto de superficie del núcleo.

Nuestro modelo propone además que la producción de DSB es proporcional a la sección eficaz geométrica del dominio cromosómico definida por  $(\text{longitud en Mb})^{2/3}$ .

En base a las hipótesis propuestas la relación teórica entre translocaciones e inversiones pericéntricas resulta:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^{46} (L_i + S_i)^{2/3} \alpha^{2/3} \beta \delta}{2 \sum_{i=1}^{46} (L_i + S_i)^{4/3} \frac{L_i S_i}{(L_i + S_i)^2}}$$

$\alpha$  = longitud promedio de un cromosoma en Mb (140.3)

$\beta$  = número promedio de cromosomas vecinos considerando la corrección por efecto de superficie ( $12 * 0.58$ )

$\delta$  = factor de corrección por distancia máxima de interacción ( $1\mu$ )

Los dominios cromosómicos en contacto sin imbricación tienen un radio promedio de  $1\mu$  considerando el radio nuclear de  $4\mu$ . La interacción entre rupturas está dada fundamentalmente por la distancia máxima de

interacción  $= 1\mu$ . El valor obtenido en estas condiciones es  $F=10.7$  para dominios de radio mayor estos deben imbricarse aumentando por lo tanto la probabilidad translocaciones y el valor de  $F$ . El límite superior (imbricación total), radio del dominio  $4\mu =$  radio del núcleo) corresponde a  $F=86$ . El valor experimental de nuestro laboratorio,  $F=13.5$ , indicaría una leve imbricación de los dominios. Los resultados de otros laboratorios muestran una amplia dispersión en los valores de  $F=16.4\pm 13$ .

El presente modelo permite representar la dispersión de los valores de  $F$  experimentales, variando el radio del dominio cromosómico y respetando la cota de distancia máxima de interacción  $= 1\mu$  (parámetro  $\delta$ ).

En consecuencia los dominios cromosómicos fluctuarían entre el contacto y cierto grado de imbricación que favorecería la producción de translocaciones y por lo tanto valores mayores de  $F$ .

Se propone que la dimensión de los dominios cromosómicos in vivo podría variar temporalmente.

#### REFERENCIAS

- 1- Bender, M.A.; Awa, A.; Brooks, A.L. et al. *Mutat. Res.* 196, 103-159 (1988)
- 2- Savage, J.R.K. *Br. J. Radiol.* 62, 507-520 (1989)
- 3- Lucas, J.N.; Tenjin, T.; Straume, T. et al. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 35-44 56, 201 (1989)
- 4- Savage, J. R. K. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340 B, 385-396 (1990)
- 5- Scabright, M. *Lancet* 2, 971-972 (1971)
- 6- Ohtaki, K.; Shimba, H.; Awa, A.; Sofuni, T. *J. Radiat. Res.* 23, 441-449 (1982)
- 7- Cornfort, M. N. *Radiat. Res.* 121, 21-27 (1990)
- 8- Hlatky, L.; Sachs, R.; Hahnfeldt, P. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 1147-1172 (1991)
- 9- Morton, N. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7474-7476 (1991)
- 10- Hlatky, L. R.; Sachs, R. K.; Hahnfeldt P. *Radiat. Res.* 129, 304-308 (1992)
- 11- Sachs, R. K.; Awa, A.; Kodama, Y. et al. *Radiat Res.* 133, 345-350 (1993)
- 12- Brenner, D. J. *Radiat Environ. Biophys.* 27, 189-199 (1990)
- 13- Kellerer, A. M. *The Dosimetry of Ionizing Radiation* pp. 78-162 Academic Press (1985).
- 14- Brenner, D. J. *Radiat. Res.* 124, S29-S37 (1990)