

Identificación de fragilidad cromosómica mediante 5'azacitidina en linfocitos de bovinos

Identification of chromosome fragility using 5'azacytidine in cattle lymphocytes

S Llambí^{1*}, R Núñez²

¹ Area Genética, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay.

² Ex Becario CIDEA Área Genética, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay.

SUMMARY

Common fragile sites are regions of the eukaryotic chromosome with a tendency to show breaks or gaps when inductors such as 5'azacytidine are added to the lymphocyte culture media. Recently, chromosome fragile sites have been correlated with hereditary defects affecting humans and domestic animals (mental retardation syndrome, parakeratosis, baldy calf syndrome and low fertility). A spontaneous fragile site in the sexual chromosome X (FRA Xq 3.1) was observed in lymphocyte cultures of Uruguayan Holstein-Friesian cattle. In the present study, the chromosome fragility expression in lymphocyte cultures of Uruguayan Holstein-Friesian female cattle treated with 5'azacytidine was analyzed. A number of different fragility regions were scored considering autosomes and sexual X chromosomes.

Palabras clave: 5'azacitidina, sitios frágiles, cromosomas, bovino.

Key words: 5'azacytidine, fragile sites, chromosomes, cattle.

INTRODUCCION

Podemos definir los sitios frágiles como regiones del cromosoma metafásico con tendencia a sufrir alteraciones tales como fracturas, quiebres y discontinuidades, que nos estarían indicando sitios del genoma de mayor inestabilidad (Sutherland 2003). En el año 1970 se observa la característica heredable de un sitio frágil localizado en el cromosoma 16 del humano (Magenis y col 1970).

Estos presentan una serie de características: a) ocupan un mismo lugar en el cromosoma en las células analizadas de un mismo individuo o familia, b) presentan un modo de herencia mendeliana, c) presentan una expresión altamente variable entre individuos, dependiendo de las condiciones de cultivo celular, así como de la utilización de determinados agentes químicos que potencian los efectos de fragilidad (Sutherland 1979, Sutherland y col 1998). Algunos sitios frágiles se manifiestan en forma espontánea en condiciones normales de cultivos celulares, mientras que otros necesitan la adición de sustancias químicas inductoras altamente específicas (Fundia y Larripa 1996).

La clasificación de los mismos ha sufrido una constante evolución debido a la manifestación citogenética variable y a su desigual frecuencia de aparición en las poblaciones estudiadas. Actualmente se reconocen dos grandes grupos: 1) sitios frágiles raros (frecuencia de

aparición 1 en 20 personas) que se manifiestan en medios de cultivos pobres en ácido fólico o bajo condiciones de inducción por agentes tales como la distamicina A y la bromodeoxiuridina, y 2) sitios frágiles comunes (frecuencia poblacional alta y en bajo número de placas metafásicas, menos de un 5%) que se manifiestan en medios de cultivos inducidos por afidicolina (agente inhibidor de la ADN polimerasa alfa) o 5'azacitidina (antimetabolito análogo de la citidina que actúa inhibiendo a la ADNmetiltransferasa empleándose como antileucémico) (Sutherland y col 1998, Szyf 2003). La expresión de los sitios frágiles comunes se debería a una falta de espiralización del ADN por falla en la compactación de la cromatina en regiones ricas en bases nitrogenadas adenina/timina, pobres en genes y con retraso en la replicación (Le Beau y col 1998, Arlt y col 2003). La caracterización de estas regiones de fragilidad heredables nos permiten profundizar en el conocimiento de la evolución cariotípica, ya que se encuentran asociadas con regiones de recombinación génica; formación de secuencias repetidas de ADN inestables y sitios de metilación (Tedeschi y col 1992). Otro aspecto a tener en cuenta es la relación estrecha entre la disposición tridimensional que presenta la cromatina en el núcleo celular y su funcionalidad, donde la regulación epigenética de la expresión génica puede comprometer el reposicionamiento de loci a través de cambios de la cromatina (Van Driel y col 2003).

Por otro lado, en humanos y otros mamíferos la fragilidad cromosómica ha sido asociada en procesos de enfermedades multigénicas con efectos fenotípicos graves

Aceptado: 02.05.2006.

* Fax 59826280130, e.mail: silvia.llambi@gmail.com Lasplacas 1550 CP 11600 Montevideo, Uruguay.

(distintos procesos oncológicos, síndrome X frágil de retardo mental en humanos, alteraciones de la fertilidad) (Sutherland y col 1998, Slota 2000). Con respecto a los procesos oncológicos los sitios frágiles representan puntos donde hay una mayor predisposición a rupturas y reordenamientos cromosómicos en las células somáticas llevando a la posible activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumor, relacionándose de este modo con la patogénesis del desarrollo neoplásico (Fundia y Larripa 1996). Estos sitios son frecuentes en neoplasias hematológicas y de tumores sólidos (Fundia y Larripa 1996).

En bovinos diversos trabajos han asociado la fragilidad cromosómica con alteraciones fenotípicas tales como síndrome de calvicie en terneros, paraqueratosis hereditaria, enanismo, alteraciones de la fertilidad (Basrur 1994, Rincón y col 1997).

En la raza Holando-Uruguayana (Holstein Friesian, *Bos taurus*) está descrita la manifestación espontánea de fragilidad en el brazo q del cromosoma sexual X (Xq 3.1) con una frecuencia del 2,97% (Llambí y Postiglioni 1997). Estudios con el inductor afidicolina en esta raza han permitido construir un idiograma de regiones de fragilidad en el cariotipo de esta especie (Rodríguez y col 2002).

Debido a la importancia que presentan estas regiones de inestabilidad cromosómica es que en el presente trabajo se plantea como objetivo observar la acción del inductor químico 5'azacitidina sobre la estructura cromosómica de células linfocitarias de bovinos.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó extracción de 10 ml de sangre periférica (vena yugular) con jeringa estéril heparinizada a un bovino hembra de la raza Holstein Friesian (N° caravana 307) proveniente de un establecimiento lechero. Se utilizó la técnica de macrocultivo para análisis cromosómico linfocitario, a partir de 0,2 ml de sangre entera en tubos estériles conteniendo cada uno 5 ml de medio de cultivo estándar completo, RPMI 1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino y fitohemaglutinina M como estimulante mitótico de los linfocitos T (Bohlein y col 1989, Llambí 2002). Las células se cultivaron durante 72 horas a 38°C en estufa de cultivo. A las 48 horas de cultivo se adicionó el inductor 5'azacitidina a concentraciones finales de 4,92 µM y 7,38 µM (López-Corrales y Arruga 1996). Se mantuvo un tubo de cultivo control (sin inductor). Dos horas antes del sacrificio celular se adicionó 0,8 ml colchicina (4µg/ml), posteriormente las células se sometieron a un choque hipotónico de KCl (0,075 M) durante 20 minutos para luego pasar a la etapa de fijación en metanol: ácido acético (3:1). Las preparaciones se realizaron mediante la técnica de goteo a la llama (metanol 70°) utilizándose el colorante Giemsa para la tinción de las placas metafásicas. Las observaciones de los

cromosomas se llevaron a cabo en un microscopio óptico binocular (Olympus BHA). El criterio para la identificación de los cromosomas que presentaban fragilidad fue la presencia de regiones de interrupción de la cromatina (fracturas, quiebres, huecos), observándose como zonas de tinción negativa al colorante Giemsa.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de chi-cuadrado en tablas de contingencia de 2 X 2 para 1 grado de libertad (Beiguelman 1991).

RESULTADOS Y DISCUSION

Del análisis citogenético realizado a los tres tubos de cultivo se estudió un total de 150 placas metafásicas (50 placas metafásicas por tubo de cultivo) correspondiendo al número normal cromosómico del *Bos taurus* (2n=60, XX).

Se realizó el test de Chi-cuadrado para comparar las fragilidades obtenidas en el cultivo con inductor 5'azacitidina (concentración final 7,38 µM) con el cultivo control obteniendo un resultado no significativo (P<0,2), mientras que para el cultivo con concentración final 4,92 µM el resultado obtenido fue significativo (P<0,01). En los cultivos sometidos al efecto de la 5'azacitidina (concentración 4,92 µM) se evidenció el efecto inductor de fragilidad cromosómica en autosomas y en el cromosoma sexual X (cuadro 1).

En cuanto a la distribución de fracturas autosómicas por tamaño cromosómico en los cultivos inducidos, se encontró una distribución en cromosomas de gran tamaño (par cromosómico I a par cromosómico VI con una frecuencia del 5%) y de mediano tamaño (par cromosómico VII a par cromosómico XIV con una frecuencia del 95%) de acuerdo al idiograma bovino (Di Bernardino y col 2001) (figura 1). En los cultivos inducidos con 5'azacitidina, el 6% de las metafases presentó fragilidad en el cromosoma sexual X. En cuanto a la distribución de fracturas autosómicas en relación al largo cromosómico (fragilidad en cromosomas de gran tamaño y de mediano tamaño) nuestros resultados estarían apoyando la hipótesis de correlación entre el largo cromosómico y

Cuadro 1. Porcentaje de sitios frágiles observados en los cultivos celulares tratados con 5'azacitidina y en el cultivo celular control.

Percentage of fragile sites observed in cell cultures treated with 5'azacytidine and in the cell control culture.

Inductor (µM)	Fragilidad en cromosoma X (%)	Fragilidad en autosomas (%)
0	0	0
control		
4,92	2	16
7,38	4	0

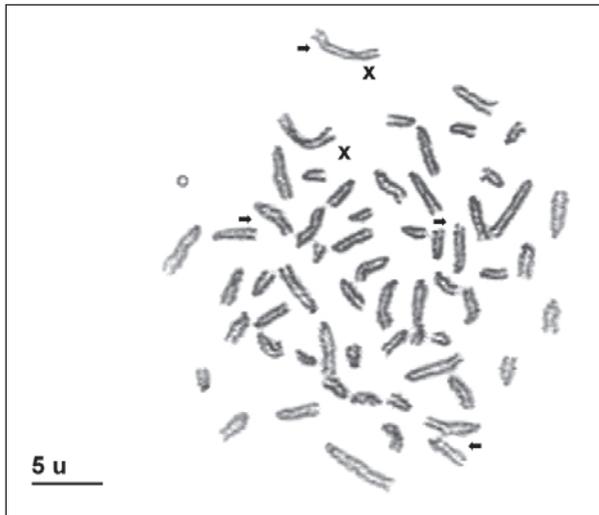


Figura 1. Metafase pretratada con 5'azacitidina. Las flechas indican sitios frágiles en el cromosoma X y en cromosomas autosómicos.

5'azacytidine pre-treated metaphase. Arrows indicate fragile sites in X chromosome and autosome chromosomes.

el número de fracturas propuesta por Di Berardino y col en 1983 al inducir fragilidad cromosómica en bovinos con bromodeuxiuridina.

Por otro lado, se observó una expresión diferencial de fragilidad al utilizar distintas concentraciones de 5'azacitidina con una respuesta del 18% de fragilidad para la concentración 4,92 μM y 4% para la concentración 7,38 μM (cuadro 1). Al haber encontrado una respuesta diferencial debemos tener en cuenta las variaciones intracultivos observadas por Catalán y col en 1995 al estudiar el intercambio de cromátidas hermanas en cromosomas bovinos. Dicho fenómeno diferencial estaría dado por la heterogeneidad de la población linfocitaria (linajes celulares altamente sensibles) cuando los cultivos se someten a pruebas genotóxicas con sustancias químicas (Catalán y col 1995). En el presente trabajo nosotros estaríamos observando el efecto de la 5'azacitidina sobre linfocitos T de acuerdo al estimulante mitótico utilizado (Bohnlein y col 1989).

Estudios sobre el efecto de distintas concentraciones de 5'azacitidina en la expresión del X frágil humano demostraron que al aumentar la dosis se producía un efecto inhibitorio (Abruzzo y col 1985). Actualmente diversos autores apoyan la hipótesis de que los sitios frágiles podrían ser la manifestación citológica del fenómeno dinámico de la impronta genómica, el cual está estrechamente asociado a las regiones metiladas del genoma (Simonin y Gericke 1996). La metilación del ADN como patrón hereditario puede determinar cuál de los alelos (origen paterno, materno o ambos) se exprese, explicando de esta manera las variaciones fenotípicas observadas en determinadas enfermedades (Bartolomei y col 1997). El efecto inhibitorio también observado en nuestro traba-

jo (concentración final 7,38 μM de 5'azacitidina) podría estar asociado a regiones inestables e hipermetiladas de la cromatina.

El descubrimiento de que los errores en el patrón epigenético, y no las mutaciones, sean los implicados en la causa molecular de algunas patologías, hace que para continuar en el avance hacia los secretos del funcionamiento celular se deba incluir otro tipo de estudios que bien podrían englobarse con el nombre de era epigenómica (Neissa y Guerrero 2004). De ahí se desprende el interés de compañías farmacéuticas y Universidades en ejecutar el proyecto Epigenoma Humano, que pretende el mapeo de todas las secuencias de ADN metiladas* (Neissa y Guerrero 2004).

En conclusión, podemos decir que el cariotipo bovino presenta regiones de inestabilidad cromosómica (autosomas y cromosoma sexual X) frente a la exposición de una concentración de 4,92 μM de 5'azacitidina. El presente trabajo nos permitió establecer un protocolo de concentraciones de este inductor ya que se desconocía el efecto sobre la fragilidad cromosómica en cultivos linfocitarios bovinos. Por otro lado, debemos aumentar la muestra de animales a analizar, probar el efecto de la aplicación del inductor a distintas horas de cultivo, así como realizar técnicas de bandedo cromosómico para identificación precisa de estas regiones. Estos estudios permitirán conocer aspectos de la dinámica de la fragilidad cromosómica y su implicancia con heredopatologías en bovinos.

RESUMEN

Los sitios frágiles comunes se definen como regiones del cromosoma eucariota con tendencia a sufrir fracturas o quiebres frente a sustancias inductoras adicionadas al medio de cultivo linfocitario como la 5'azacitidina. Actualmente en humanos y animales domésticos las regiones de fragilidad cromosómica han sido correlacionadas con heredopatologías diversas (síndrome de retardo mental, paraqueratosis hereditaria, síndrome de calvicie en terneros, alteraciones de la fertilidad). En bovinos de la raza Holando-Uruguay ha sido descrita la presencia de un sitio frágil en el cromosoma sexual X (FRA Xq 3.1) con manifestación espontánea en cultivos linfocitarios. En la presente comunicación se analiza la respuesta de fragilidad cromosómica en cultivos linfocitarios de una hembra bovina (raza Holando-Uruguay), sometidos a la inducción de 5'azacitidina. Se contabilizan regiones de fragilidad a nivel autosómico y en el cromosoma sexual X.

AGRADECIMIENTOS

A la señora Iris Hernández, preparador técnico del Área Genética-Facultad de Veterinaria-UDELAR.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Facultad de Veterinaria (CIDECE).

* www.epigenome.org

REFERENCIAS

- Abruzzo M, M Mayer, P Jacobs. 1985. The effect of methionine and 5'azacytidine on fragile X expression. *Am J Hum Genet* 37, 193-198.
- Artl M, A Casper, T Glover. 2003. Common fragile sites. *Cytogenet Genome Res* 100, 92-100.
- Bartolomei M, SM Tilghman. 1997. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet* 31, 493-525.
- Basur PK. 1994. Contributions of cytogenetics to animal reproduction. Past, present and future. *Rev Bras Reprod Anim* 18, 153-175.
- Beiguelman B. 1991. Curso práctico de bioestadística. *Revista Brasileira de Genética* 224, 1-40.
- Bohnlein E, D Ballard, H Bogerd, N Peffer, JW Lowenthal, W Greene. 1989. Induction of interleukin-2 receptor-alpha gene expression is regulated by post-traslational activation of kappa B specific DNA binding proteins. *J Biol Chem* 264, 8475-8.
- Catalán J, C Moreno, MV Arruga. 1995. Sister-chromatid exchange in cattle: breed, sex and BrdU dose effects. *Mutation Research* 331, 205-211.
- Di Berardino D, G Di Meo, D Gallagher, H Hayes, I Iannuzzi. 2001. ISCNDB 2000 International System for chromosome nomenclature of domestic bovids. *Cytogenet Cell Genet* 92, 283-299.
- Di Berardino D, I Iannuzzi, G Di Meo. 1983. Localization of BrdU induced break sites in bovine chromosomes. *Caryologia* 36, 285-292.
- Fundia A, I Larripa. 1996. Participación de los sitios frágiles en cáncer. *Medicina (Buenos Aires)* 56, 393-396.
- Le Beau M, F Rassool, M Neilly, R Espinosa, T Glover, D Smith, T McKeithan. 1998. Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for mechanism of fragile site induction. *Hum Mol Genet* 7, 755-761.
- Llambí S. 2002. Estudios citogenético-moleculares de la fragilidad del cromosoma sexual X y enfermedades hereditarias monogénicas en bovinos de la raza Holando-Uruguaya (*Bos taurus*). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza-España.
- Llambí S, A Postiglioni. 1997. Frequencies and cytomorphological manifestation of sexual X-chromosome fragility (FRA Xq 3.1) in Holstein Friesian cattle. *Archiv Zootec* 45, 203-208.
- López-Corrales N, MV Arruga. 1996. Induction of chromosomal fragile sites in goats: a preliminary study. *Genet Sel Evol* 28, 129-139.
- Magenis R, F Hecht, E Lovrien. 1970. Heritable fragile site on chromosome 16: probable localization of haptoglobin locus in man. *Science* 170, 85-87.
- Neissa J, C Guerrero. 2004. Del código genético al código epigenético: Nuevas estrategias terapéuticas. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 52, 287-303.
- Rincón G, S Llambí, A Postiglioni. 1997. Expression of X chromosome fragility in Holstein-Friesian cattle: a preliminary study. *Genet Sel Evol* 29, 395-401.
- Rodríguez V, S Llambí, A Postiglioni, K Guevara, G Rincón, G Fernández, B Mermies, MV Arruga. 2002. Localization of aphidicolin-induced break points in Holstein-Friesian cattle (*Bos taurus*) using RBG-banding. *Genet Sel Evol* 34, 649-656.
- Simonc I, G Gericke. 1996. The enigma of common fragile sites. *Hum Genet* 97, 524-531.
- Slota E, B Danielak-Czech, J Pietrasszewska, A Kozubska. 2000. Preliminary identification of the fragile X in two crossbred cows. *Veterinarni medicina* 45, 308-310.
- Sutherland G. 1979. Hereditable fragile sites in human chromosomes. I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 31, 125-135.
- Sutherland G, E Baker, R Richards. 1998. Fragile sites still breaking. *TIG* 14, 501-506.
- Sutherland G. 2003. Rare Fragile site. *Cytogenet Genome Res* 100, 77-84.
- Szyf M. 2003. DNA methylation and cancer therapy. *Drug Resist Updates* 6, 341-353.
- Tedeschi R, P Vernole, M Sanna, B Nicoletti. 1992. Population cytogenetic of aphidicolin-induced fragile sites. *Hum Genet* 89, 543-547.
- Van Driel R, S Fransz, P Verschure. 2003. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* 116, 4067-4075.