

Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear  
Facultad de Biología

## **CONVERSIÓN Y REVERSIÓN GÉNICA EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. UN MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DAÑO PRODUCIDO POR RADIACIÓN GAMMA**

*Lic. Damaris Moreno, Lic. Jorge L. Fuentes, Lic. Ángel Sánchez, Lic. Ligia Baluja y Lic. Enrique Prieto*

### **RESUMEN**

Se estudió la radiosensibilidad y la cinética de inducción de eventos de conversión y reversión génica en la cepa D7 de *Sacharomyces cerevisiae* frente a radiación gamma, en rangos de dosis entre 100-800 Gy y entre 50-300 Gy, respectivamente. Se utilizó una fuente de <sup>60</sup>Co PX-g-30 con una tasa de dosis 49,43 Gy/min. La curva de supervivencia celular mostró un DL<sub>50</sub> de 150 Gy. La cinética de muerte celular fue lineal con un ajuste superior a 98 %. La inducción de eventos de conversión génica fue significativa respecto al control a partir de 50 Gy. Por el contrario, la reversión génica fue significativa solo a partir de 200 Gy. En general, las frecuencias de eventos de conversión génica fueron superiores a las de reversión, esto sugiere que la radiación gamma induce preferentemente eventos recombinogénicos. Tanto para los eventos de conversión como de reversión génica se obtuvo una dependencia exponencial de la dosis de radiación gamma. Se discutió sobre la utilidad relativa del ensayo para estudios de mutagénesis y antimutagénesis.

*Palabras clave:* Daño en el ADN, radiación gamma, conversión y reversión génica, *Sacharomyces cerevisiae*.

Las radiaciones ionizantes en su interacción con el ADN producen una variedad de daños, entre las que se encuentran: modificaciones de bases, rupturas de enlaces fosfodiéster de la hélice, uniones covalentes intracadenas e intercadenas y entre bases y proteínas.<sup>1</sup> Muchas de estas alteraciones en la estructura de la hélice del ADN están directamente implicadas en eventos mutacionales y recombinogénicos y se le atribuye un papel determinante en

la génesis de los procesos carcinogénicos y de envejecimiento de células humanas.<sup>2-4</sup> En esta dirección, la estandarización de ensayos que sirvan de biosensores de daños genéticos producidos por agentes mutagénicos, constituyen un tema de investigación de actualidad y de gran importancia práctica.<sup>5</sup>

El ensayo de genotoxicidad con la cepa D7 de *S. cerevisiae* desarrollado por Zimmerman en 1975, permite medir 3 tipos

de eventos génicos diferentes: entrecruzamiento mitótico, conversión y reversión génica. Dicho ensayo permite evaluar 2 niveles de expresión del daño en el ADN (daño primario en el ADN y mutación génica) y su utilidad ha sido probada tanto para agentes químicos como físicos, incluidas las radiaciones ionizantes.<sup>6</sup>

Considerando el eventual uso de este ensayo en estudios de mutagénesis y antimutagénesis que utilicen radiación gamma como mutágeno, el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar la inducción de eventos de conversión y reversión génica en la cepa D7 de *S. cerevisiae* frente a este tipo de tratamiento.

## MÉTODOS

### MICROORGANISMO Y MEDIOS DE CULTIVO

Fue utilizada la cepa D7 de *S. cerevisiae* desarrollada por Zimmerman<sup>7</sup> en 1975 de genotipo *a/a, ade2-119/ade2-40, trp5-112/trp5-27, ile1-92/ile1-92*. Esta cepa permite evaluar 3 eventos genéticos: entrecruzamiento mitótico, conversión y reversión génica. Las células de levaduras conservadas en el medio descrito por Bronzetti<sup>8</sup> en 1995 y con previo chequeo del genotipo, fueron crecidas a 32 °C durante 72 h en medio completo (A) hasta fase estacionaria de crecimiento, centrifugadas a 4 000 rpm durante 15 min, lavadas y suspendidas en agua estéril. La suspensión celular ( $4-5 \times 10^8$  células/mL) resultante, fue conservada a 8 °C hasta su uso en los ensayos de conversión y reversión.

### IRRADIACIÓN

La irradiación se realizó en una fuente de <sup>60</sup>Co, modelo PX-g-30M. Las células

fueron irradiadas a diferentes dosis dependiendo del tipo de estudio, a una temperatura de  $2 \pm 0,5$  °C. El valor de la tasa de dosis fue de 49,43 Gy/min, calculada con el dosímetro Fricke<sup>9</sup> Luego de la irradiación las células fueron colocadas a 4 °C hasta su uso.

### RADIOSENSIBILIDAD CELULAR

El estudio de radiosensibilidad celular, se desarrolló a partir de un cultivo crecido durante toda la noche en similares condiciones a las antes descritas. Suspensiones celulares que contenían entre  $6-8 \times 10^7$  células/mL fueron lavadas y suspendidas en *buffer* fosfato (pH 7) y distribuidas en viales de irradiación. El rango de dosis gamma utilizado estuvo entre 100-800 Gy. Fueron plaqueadas diluciones entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  para el control y las dosis 100 y 200 Gy, y entre  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  para las restantes dosis.

### EVENTOS DE CONVERSIÓN Y REVERSIÓN GÉNICA

Las células crecidas hasta fase estacionaria fueron lavadas, suspendidas en agua estéril y distribuidas en viales de irradiación en concentraciones de  $10^7$  células/mL, para el estudio de reversión y de  $10^5$  células/mL para conversión. Las células fueron irradiadas en un rango de dosis entre 50-300 Gy. Para el cálculo de las frecuencias de conversión y reversión se procedió según lo indicado por Bronzetti, en 1995.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores medios de viables totales, convertantes y revertantes fueron calculados mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov y posteriormente se comprobó la

homogeneidad de varianza de los datos por medio de una prueba de F-máxima. Los valores medios obtenidos por dosis de radiación, fueron comparados con los controles no irradiados utilizando una prueba de Dunnet con una significación de 95 %.<sup>10</sup> El ajuste de los datos experimentales al modelo teórico fue desarrollado en el programa Microcal Origen-PC, versión 5.

## RESULTADOS

En el presente estudio, el porcentaje de supervivencia celular fue considerado como una medida de la toxicidad de la radiación gamma sobre *S. cerevisiae*. La curva de sensibilidad celular mostró un  $DL_{50}$  de 150 Gy (fig. 1).

Con el objetivo de caracterizar la cinética de muerte celular por este tipo de tratamiento, se desarrolló un ajuste a los

datos según el modelo descrito para estos fines en bacteria.<sup>11</sup> Según este modelo existe una relación lineal inversa entre el logaritmo de la supervivencia y la dosis aplicada de radiación gamma. Adicionalmente, la muerte celular es consecuencia del daño primario en el ADN producido por la radiación gamma. (fig. 2). Los datos experimentales obtenidos en el presente estudio mostraron ajustes de regresión con el citado modelo teórico superiores a 0,98 (tabla 1), sugiriendo que este puede también describir los eventos de muerte celular en levaduras.

En la tabla 2, se muestran los valores medios de viables totales, convertantes (medio B) y revertantes (medio C) obtenidos a las diferentes dosis de radiación gamma. La inducción de eventos de conversión génica fue significativa respecto al control a partir de 50 Gy. Por el contrario, la reversión génica fue significativa solo a partir de 200 Gy.

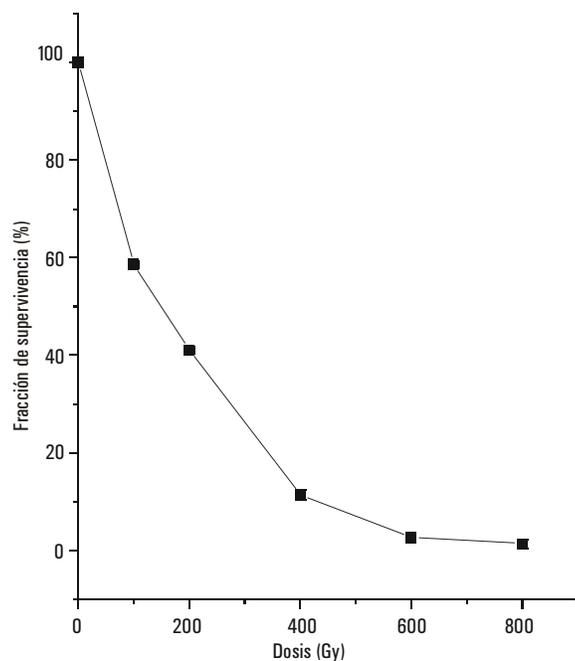


Fig. 1. Fracción de supervivencia celular (%) de la cepa D7 de *S. cerevisiae* frente a radiación gamma.

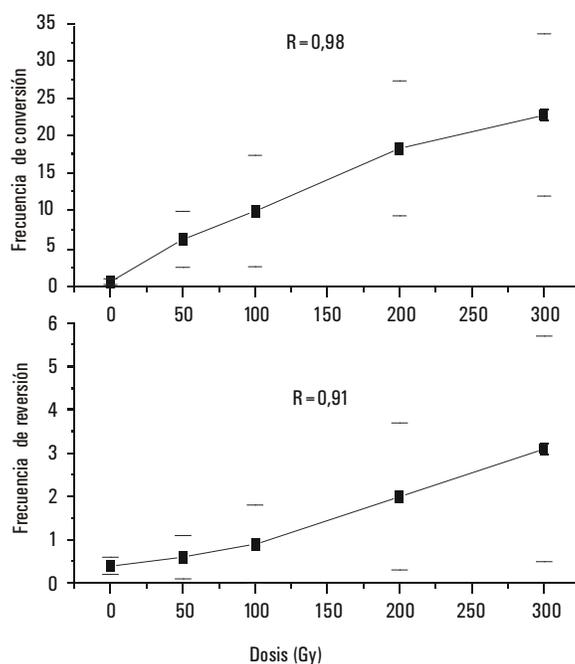


Fig. 2. Cinética de inducción de los eventos de conversión y reversión dependientes de la dosis de radiación gamma en células de *S. cerevisiae*.

Tabla 1. Valores medios de fracción de supervivencia celular, su logaritmo y desviación estándar obtenidos para la diferentes dosis de radiación

	Control	Dosis(Gy)				
		100	20	400	600	800
Fracción de supervivencia	1 ± 0	0,58 ± 0,29	0,41 ± 0,25	0,11 ± 0,06	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,07
Ln S*	0 ± 0	-0,6 ± 0,4	-1,0 ± 0,4	-2,4 ± 0,8	-3,7 ± 0,5	-4,4 ± 0,6

\* El coeficiente de regresión para el ajuste según el modelo descrito por Iwanaami y Oda, (1985) fue de 0,98 ( $p < 0,01$ ).

Tabla 2. Valores medios de colonias totales, revertantes y convertantes obtenidos para cada tratamiento en la cepa D7 de *S. cerevisiae*. Son presentado además, los valores medios de frecuencias de conversión y reversión y sus desviaciones estándar

	Control	Dosis (Gy)			
		50	100	200	300
Medio A	n=52	n=51	n=53	n=53	n=55
Número de colonias totales	143	141	125	129	127
Medio B (typ)	n=21	n=42	n=38	n=44	n=35
Número de convertantes	34	99	163	236	289
Frecuencias de conversión x 10 <sup>5</sup>	0,6 ± 0,4	6,3 ± 3,8 *	10,1 ± 7,5*	18,5 ± 9,1***	23,0 ± 10,9***
Medio C (ile)	n=21	n=31	n=26	n=35	n=35
Número de revertantes	1	6	13	18	28
Frecuencias de reversión x 10 <sup>6</sup>	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,5n,s	0,13 ± 0,9n,s	2,0 ± 1,7***	3,1 ± 2,6***

n: número de réplicas con que fueron calculados los valores medios tabulados; \* y \*\*\*: significación respecto al control una prueba de Dunnett para un 95 y 99,9 % de confianza, respectivamente.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, fueron caracterizados en la cepa D7 de *S. cerevisiae* los eventos de muerte celular, conversión y reversión génica producto de la acción de la radiación gamma.

El estudio de radiosensibilidad celular mostró un valor  $DL_{50}$  de 150 Gy. En estudio previo<sup>12</sup> se obtuvo un valor de  $DL_{50}$  de 400 Gy para la cepa D7 de *S. cerevisiae*. Las diferencias encontradas entre ambos estudios pudieran deberse al uso de diferentes tasas de dosis de radiación gamma. Diferentes autores<sup>13</sup> han encontrado que la tasa de dosis puede ser un factor determinante en la sensibilidad celular a este tipo de mutágeno.

Con el objetivo de caracterizar la cinética de muerte celular de la cepa D7 producto de la radiación gamma, se desarrolló un ajuste a los datos experimentales según uno de los modelos que describe dicho evento en bacteria.<sup>11</sup> Los resultados mostraron valores de coeficientes de regresión superiores a 0,98 (tabla 1); esto sugiere que dicho modelo puede también describir los eventos de muerte celular en levaduras.

Se ha planteado que las roturas de doble cadena en la hélice producidas por irradiación gamma son determinantes en la muerte celular.<sup>14</sup> Dardalhon y otros,<sup>12</sup> encontraron que las roturas de doble cadena son las responsables de la muerte celular cuando la cepa D7 de *S. cerevisiae* es tratada con este mutágeno. Dichos autores mostraron que a dosis de 100 Gy se podía detectar este tipo de daño. Los resultados aquí presentados están acordes con los obtenidos por estos autores.

Como se conoce, el ensayo de conversión génica permite obtener un estimado del nivel de daño primario producido en el ADN. En este son detectadas únicamente

lesiones potencialmente recombinogénicas, las cuales son susceptibles de ser reparadas. Por el contrario, la reversión génica es una medida del nivel de mutación fijada en la célula. Los resultados obtenidos con los ensayos de conversión y reversión génica sugieren que a dosis de hasta 100 Gy una buena parte de los daños producidos por la radiación gamma pueden ser reparados, dado que estos no son fijados como mutación. El hecho de que a dosis menores de 100 Gy, la fracción de supervivencia (fig. 1) es aún relativamente alta (fracción de supervivencia de 60 %), sostiene esta hipótesis.

En general, la frecuencia de revertantes obtenidos en el presente trabajo fue superior a la de revertantes, lo que sugiere que la radiación gamma induce preferentemente eventos recombinogénicos. Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos por Hoffman y otros.<sup>15-17</sup> No obstante, el ensayo fue lo suficiente sensible para detectar mutación, es posible que de diverso origen y preferentemente inducido por lesiones del tipo modificación de bases. Otros autores, han mostrado que la radiación gamma produce mutaciones génicas en otros tipos de microorganismos como *Salmonella typhimurium*.<sup>18-20</sup>

El ajuste de los datos obtenidos a un modelo teórico (fig. 2) evidenció que tanto los eventos de conversión como de reversión siguen una dependencia exponencial de la dosis de radiación, con un ajuste entre datos experimentales y modelo teórico superior a 95 %. La cinética de inducción descrita por estos eventos en *S. cerevisiae* es similar a la obtenida por otros autores en *Escherichia coli*,<sup>21</sup> cuando el daño primario producido sobre el ADN se estima de forma indirecta por medio de genes reporteros de respuesta SOS en bacteria. Esto sugiere que la radiación gamma produce daños genéticos a través de mecanismos comunes en ambos modelos biológicos.

A modo de conclusión se puede plantear lo siguiente:

1. La muerte celular en *S. cerevisiae* tiene una dependencia lineal de la dosis de radiación gamma.
2. La radiación gamma es un potente inductor de eventos de conversión y reversión génica en levaduras.
3. La inducción de ambos eventos cumple una dependencia exponencial de la dosis de radiación gamma.
4. La naturaleza del daño preferentemente inducido por radiación gamma en levaduras es del tipo recombinogénico.
5. El ensayo de conversión génica resultó ventajoso porque permite tener un estimado del nivel de daño inducido en el

ADN a dosis de radiación gamma relativamente bajas.

6. Los ensayos de conversión y reversión génica en levadura pueden resultar efectivos para estudios de agentes, tanto químicos como naturales, que modifiquen el modo de acción de la radiación gamma.

## AGRADECIMIENTOS

A la colaboración brindada por la asistente técnica Mercedes Guerra del Departamento de Radiobiología del CEADEN y la gentileza del doctor G. Bronzetti del Instituto de Mutagénesis y Diferenciación del Centro Nacional de Investigaciones (CNR) de Pisa, Italia por suministrar la cepa D7 de *S. cerevisiae*.

## SUMMARY

Radiosensitivity and kinetics of induction of gene conversion and reversion events in *Sacharomyces cerevisiae* strain D7 to gamma radiation at dose ranges from 100 to 800 Gy and 50 to 300 Gy respectively were studied. A source of  $^{60}\text{Co}$  PX-g-30 at a dose rate of 49,43 GY/min was utilized. The cell survival curve showed  $\text{DL}_{50}$  of 150 Gy. Cell death kinetics was linear and adjusted over 98 %. The induction of gene conversion events was significant in relation to control from 50 Gy on. However, gene reversion was significant only at 200 Gy. Generally speaking, gene conversion event frequencies were higher than those of reversion, which indicates that gamma radiation preferably induces recombinogenic events. Both the conversion and reversion events showed exponential dependence on gamma radiation dose. The relative benefits of this test for mutagenesis and anti-mutagenesis studies were debated in this paper.

*Key words:* ADN damage, gamma radiation, gene conversion and reversion, *Sacharomyces cerevisiae*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Møller P, Wallin H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutat Res* 1998;410:271-90.
2. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of ageing and cancer. *Mutat Res* . 1991;250:3-16.
3. Wallace SS. DNA damage processed by base excision repair: biological consequences. *Int J Radiat* 1994;66:587-9.
4. Jaruga P, Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acid Res* 1996;24:1389-94.
5. Billinton N, Barker MG, Michel CE, Knight AW, Heyer W-D, Goddard NJ, Fielden PR, Walmsley RM. Development of a green florescent protein report for a yeast genotoxicity biosensor. *Biosen Bioelectr* 1998;13:831-8.
6. Hoffmann GR. Toxicology. The Basic Science of Poisons. New York: Casarett and Graw-Hill; 1996

7. Zimmermann FK, Kern R, Rasenberg H. A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation. *Mutat Res* 1975;28:381-8.
8. Bronzetti G. "1o Corso di perfezionamento in genotossicità per medici del lavoro : Protocolli". Pisa:Istituto di Mutagenesi e Differenziamento; 1995.
9. Prieto E, Cañet F. Aspectos a considerar en el dosímetro Fricke. *Tecnol Quím* 1990;2:19.
10. Sigarroa A. *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana:Editorial Pueblo y Educación;1985.
11. Iwanami S, Oda N. Theory of survival of bacteria exposed to ionizing radiation. *Rad Res* 1985;102:46-58.
12. Daralhon M, Nohturfft A, Meniel V, Averbeck D. Repair of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* using  $\gamma$ -ray doses-rates: a pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Int J Radiat Biol* 1994;65:307-14.
13. Kappos A, Pohlit W. A cybernetic model for radiation reactions in living cells. I. Sparsely ionizing radiation: stationary cells. *International J Radiat Biol* 1972; 22:51-65.
14. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 1994;63:915-48
15. Hoffmann GR, Sayer AM, Littlefield LG. Potentiation of bleomycin by aminothiols WR-1065 in assays for chromosomal damage in Go Human lymphocytes. *Mutat Res* 1994;307:273-83.
16. Hoffmann GR, Littlefield LG. Enhancement of the activity of bleomycin by cysteamine in a micronucleus assay in Go human lymphocytes. *Toxicol Lett* 1995;78:147-51.
17. Hoffmann GR, Quaranta JL, Shorter RA, Littlefield LG. Modulation of bleomycin-induced mitotic recombination in yeast by aminothiols cysteamine and WR-1065. *Mol. Gen. Genet* 1995;249:366-74.
18. Imray FP, MacPhee DG. Mutagenesis by ionizing radiation in strains of *Salmonella typhimurium* used in the Ames test. *Int J Radiat Biol* 1981;40:111-5.
19. Isildar M, Bakale G. Radiation-induced mutagenicity and lethality in Ames strains of *Salmonella*. *Radiat Res* 1984;100:396-411.
20. Roos H, Thomas WH, Kellerer A. Enhanced response of the *Salmonella* mutagenicity test to ionizing radiations. *Radiat Res* 1985;104:102-8.
21. Kozubek S, Ogievetskaya MM, Krasavin EA, Drasil V, Soska J. Investigation of the SOS response of *Escherichia coli* after  $\gamma$ -irradiation by means of the SOS Chromotest. *Mutat Res* 1990;230:1-7.

Recibido: 13 de Noviembre de 2002. Aprobado: 30 de junio de 2003.

Lic. *Jorge L. Fuentes*. Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear. AP 6122. Calle 30 No. 502, esq. 5ta Avenida, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: fuentes@ceaden.edu.cu Fax: (53-7) 241188