

Efectos citogenéticos de las radiaciones ionizantes sobre los embriones de los mamíferos

M. RAMOS VECÍN Y G. BOCHAROFF

Dpto. de Morfología C.N.I.C., Habana

ABSTRACT. In this work we verified that the cytogenetic radiosensitivity of the different embryonic organs in ten-day mouse embryos varies. Maximum radiosensitivity is a characteristic of the embryonic hepatic cells. A dose of 200 r. in these cells induces 70% chromosomal aberration. The embryonic brain is the organ in which fewer chromosomal aberrations were found. The cells with aberrations were eliminated in a period of 10-20 hours after irradiation. Irradiation of the golden Hamster embryo does not interfere with the frequency of formation of pseudochiasmata, but provokes the apparition of a great number of delayed chromosomes.

RESUMEN. En este trabajo comprobamos que la radiosensibilidad citogenética de los diferentes órganos embrionarios en los embriones de ratón de 10 días es diferente. La radiosensibilidad máxima es característica de las células hepáticas embrionarias. La dosis de 200 r. induce en estas células un 70% de aberraciones cromosómicas. El cerebro embrionario es el órgano en que se encontraron menos aberraciones. Las células con aberraciones se eliminan en un período de 10-20 horas después de la irradiación. La irradiación de los embriones de Hamster dorado no influye en la frecuencia de formación de los pseudoquiasmas, pero provoca la aparición de un gran número de cromosomas retrasados.

INTRODUCCION

La influencia de la radiación sobre los embriones de mamífero representa un complejo que abarca todos los sistemas orgánico-embrionarios. Desde el momento en que apareció el trabajo básico de Russell (1954) se supo que los efectos de la radiación sobre los embriones de mamífero eran distintos según se realizara la irradiación durante el estadio de preimplantación o en el período en que se llevan a cabo las principales organogénesis. La radiación durante el período de preimplantación produce una elevada mortalidad embrionaria, pero los embriones sobrevivientes son completamente normales. Por el contrario, la irradiación durante el período en que se realizan las principales organogénesis no ejerce una acción letal tan fuerte y produce varias anomalías del desarrollo.

A su vez en el desarrollo de todos los órganos pueden destacarse períodos de elevada radiosensibilidad cuando la irradiación con dosis relativamente pequeñas provoca la aparición de anomalías manifestadas ostensiblemente, también pueden

detectarse períodos de radiosensibilidad reducida en los órganos embrionarios (*Svetlov P. G. y Corsakova G. F., 1960*).

Las investigaciones radiobiológicas realizadas en los últimos años han aportado muchos datos útiles sobre los niveles concretos de la radiosensibilidad en algunos períodos de la embriogénesis (*Rugh R., 1962*). Sin embargo, aún en nuestros días no está claro el mecanismo de la afección primaria de la radiación sobre los embriones. Russel (*1954*) expresó la hipótesis de que la afección inicial de la radiación sobre los embriones de mamífero es la inducción de aberraciones cromosómicas en las células embrionarias, lo que conlleva una destrucción celular masiva y de esta forma a una alteración del desarrollo del órgano.

Hasta nuestros días esta hipótesis no ha obtenido una confirmación experimental. Los trabajos dedicados al estudio de la influencia de la radiación ionizante y de las sustancias radiomiméticas sobre los embriones de mamífero, mostraron el alto nivel de aberraciones cromosómicas inducidas en los tejidos embrionarios. Sin embargo, la influencia de la radiación ionizante y de las sustancias radiomiméticas resultó ser inespecífica con respecto a la inducción de anomalías del desarrollo (*Shirley U. y cols., 1965 y Socup S. y cols., 1967*).

La finalidad de este trabajo es la siguiente:

- 1) El estudio sobre las frecuencias de las reorganizaciones cromosómicas inducidas por las radiaciones en los distintos órganos de los embriones de mamíferos.
- 2) El estudio del tiempo de permanencia de las aberraciones en los tejidos irradiados.
- 3) El estudio de la influencia fisiológica de la irradiación sobre la formación de pseudoquiasmas o adherencias cromosómicas.

En esta comunicación se formulan los resultados preliminares del trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron embriones de ratones blancos y embriones de hamster dorado. La edad de los embriones de ratón se calculó a partir del momento en que se observó el tapón vaginal en la hembra. La edad de los embriones de hamster dorado se determinó por la medida del embrión, según la escala de Bayer (*1953*).

La irradiación de las hembras embarazadas se realizó dentro de las primeras 48 horas que siguieron a la fecundación, y al séptimo y décimo día del embarazo.

Los embriones irradiados 48 horas después de la fecundación se encontraban en la fase de segmentación. Los embriones de 7 días se hallaban en la fase de formación de las somitas. En los embriones de 10 días son típicas las organogénesis intensas y variables (*Otis E., 1954*).

Los embriones de hamster dorado fueron irradiados a los 10 días de edad, o sea cuando se encontraban en el período de las organogénesis principales.

Los ratones se irradiaron con rayos Röntgen en la máquina RNM-3. Las condiciones de irradiación fueron: fuerza de la corriente 15 mA, tensión 165 Kvts, filtro de 0.5 mm KHz, distancia 30 cm, potencia de la dosis* 48r al minuto. La irradiación de los hamsters se realizó con rayos gamma Co^{60} . La dosis de irradiación en todos los casos fue de 200 roentgens.

Los animales fueron sacrificados por narcosis con éter a distintos intervalos de tiempo después de la irradiación. Los embriones se fijaron en solución Carnoy.

Para este trabajo se tomaron: el hígado, el cerebro y el mesénquima de los esbozos de las extremidades. Así podemos comparar la radiosensibilidad citogenética de los derivados de las tres hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Las piezas de los órganos fijados se colorearon con aceto-carmín y se prepararon entre cubre y porta con presión digital.

El efecto citogenético de la irradiación se determinó por el método anafásico. Para esto se calcularon las anafases anormales, las anafases con puentes y fragmentos cromosómicos, los cromosomas retrasados y los pseudoquiasmas. Como índice de la influencia de la radiación se tomó el porcentaje de anomalías anafásicas en relación al número total de anafases calculadas.

RESULTADOS

El estudio de las aberraciones espontáneas en los cromosomas de los tejidos de embriones de 10 días de edad no irradiados, mostró que el porcentaje de aberraciones espontáneas era muy bajo. De 4739 anafases estudiantales sólo 33 anafases presentaban puentes y fragmentos individuales (0.69%). La irradiación de las hembras embarazadas dentro de las 48 horas siguientes a la fecundación provocó una fuerte disminución del número de embriones en los úteros. Sin embargo, los embriones sobrevivientes en el décimo día presentaron un pequeño porcentaje de aberraciones (Tabla I). En los embriones irradiados al comienzo del período de organogénesis y sacrificadas al décimo día también se encontró un pequeño porcentaje de aberraciones cromosómicas.

TABLA I

NUMERO DE ANAFASES CON ABERRACIONES EN LAS CELULAS DE LOS EMBRIONES DE RATON QUE FUERON IRRADIADOS ANTES DE LA IMPLANTACION Y AL COMIENZO DEL PERIODO DE ORGANOGENESIS

| <i>Edad en el momento de la irradiación</i> | <i>Edad en el momento de la obtención del embrión</i> | <i>Núm. de embriones</i> | <i>Total de anafases</i> | <i>Anafases con aberraciones</i> | <i>%</i> |
|---|---|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|------------|
| 2 días | 10 días | 4 | 2804 | 39 | 1.39 ± 0.2 |
| 7 días | 10 días | 8 | 5138 | 59 | 1.14 ± 0.1 |
| control | 10 días | 6 | 4739 | 33 | 0.69 ± 0.1 |

El bajo porcentaje de aberraciones en este experimento hace suponer que la mayoría de las células en las que se producen las reorganizaciones, se eliminan en los primeros ciclos después de la irradiación. Para excluir esta posibilidad en el experimento dedicado a la determinación de la radiosensibilidad citogenética, comparativa entre los distintos órganos, se utilizó la fijación fraccionada de los embriones en distintos períodos después de la irradiación. Los resultados de este experimento se presentan en las Tablas II, III y IV.

Examinando los datos obtenidos en el experimento, ante todo puede verse que la radiosensibilidad citogenética de algunos órganos embrionarios no es igual. El número máximo de anafases con aberraciones cromosómicas se encontró después de la irradiación en el hígado embrionario. El mesénquima de las extremidades de los embriones y las células del cerebro embrionario son menos radiosensibles con respecto a la inducción de aberraciones cromosómicas que las células del hígado. Si se comparan la radiosensibilidad de las células del hígado, del mesénquima y del cerebro según su nivel máximo de aberraciones, puede parecer que su radiosensibilidad es igual. Sin embargo, la comparación de la producción general de células con aberraciones cromosómicas en el período investigado muestra que la radiosensibilidad citogenética de las células del mesénquima es mayor que la de las células del cerebro. El porcentaje promedio de células con aberraciones en el período de las 20 horas de esta investigación, equivale a un 16.7% para las células del mesénquima de las extremidades y sólo al 12.5% para las células del cerebro.

Reviste mayor interés el hecho de que la radiosensibilidad encontrada por nosotros en el hígado embrionario es excesivamente alta. Tan solo 4 horas después

TABLA I I

NUMERO DE CELULAS CON ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN
EL HIGADO DE EMBRIONES DE RATON DE 10 DIAS

| <i>Horas después de la irradiación</i> | <i>Total de anafases</i> | <i>Anafases con aberraciones</i> | <i>%</i> |
|--|--------------------------|--------------------------------------|-------------|
| 4 | 514 | 197 | 38.3 ± 2.63 |
| 6 | 518 | 380 | 73.3 ± 1.94 |
| 8 | 639 | 231 | 36.1 ± 1.95 |
| 10 | 526 | 176 | 33.3 ± 2.06 |
| 20 | 452 | 16 | 3.5 ± 2.63 |
| control | 1590 | 15 | 0.9 ± 0.23 |

TABLA I I I

NUMERO DE CELULAS CON ABERRACIONES CROMOSOMICAS
EN EL MESSENGUIMA DE LAS EXTREMIDADES DE
EMBRIONES DE RATON DE 10 DIAS

| <i>Horas después de la irradiación</i> | <i>Total de anafases</i> | <i>Anafases con aberraciones</i> | <i>%</i> |
|--|--------------------------|--------------------------------------|-------------|
| 4 | 287 | 19 | 6.6 ± 1.46 |
| 6 | 669 | 132 | 21.2 ± 1.53 |
| 8 | 372 | 113 | 30.3 ± 1.72 |
| 10 | 232 | 47 | 20.2 ± 2.63 |
| 20 | 376 | 14 | 3.7 ± 0.96 |
| control | 2818 | 18 | 0.6 ± 0.14 |

de la irradiación el número de células hepáticas con aberraciones alcanza un 38.3% y después de las 6 horas el número de anafases con aberraciones sobrepasa el 70%. Si se toma en consideración que nuestro método de cálculo de las aberraciones de las anafases de la mitosis no permite descubrir algunas aberraciones cromosómicas, entonces podemos creer, con gran razón, que el número real de

TABLA IV

NUMERO DE CELULAS CON ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN
EL CEREBRO DE EMBRIONES DE RATON DE 10 DIAS

| <i>Horas después de la irradiación</i> | <i>Total de anafases</i> | <i>Anafases con aberraciones</i> | <i>%</i> |
|--|--------------------------|--------------------------------------|-------------|
| 4 | 424 | 3 | 0.7 ± 0.40 |
| 6 | 622 | 119 | 19.1 ± 1.57 |
| 8 | 446 | 141 | 31.6 ± 2.20 |
| 10 | 347 | 37 | 10.6 ± 1.65 |
| 20 | 633 | 9 | 1.4 ± 0.45 |
| Control | 835 | 2 | 0.23 ± 0.17 |

TABLA V

NUMERO DE ANAFASES ANORMALES EN LOS ORGANOS DE LOS
EMBRIONES DE HAMSTER DESPUES DE 3 HORAS DE
HABER RECIBIDO 200 r. RAYOS GAMMA.

| <i>Tipo de anomalía citogenética</i> | <i>CONTROL</i> | | <i>IRRADIADO</i> | |
|--------------------------------------|----------------|-------------|------------------|-------------|
| | <i>Número</i> | <i>%</i> | <i>Número</i> | <i>%</i> |
| Total de anafases | 2167 | | 1295 | |
| Total de anafases anormales | 65 | 2.9 ± 0.36 | 152 | 11.7 ± 0.88 |
| Fragmentos y cromosomas inmóviles | 27 | 1.20 ± 0.22 | 88 | 6.7 ± 0.69 |
| Pseudoquiasmas | 20 | 0.92 ± 0.20 | 16 | 1.2 ± 0.30 |
| Puentes cromatídicos y cromosómicos | 18 | 0.78 ± 0.17 | 48 | 3.8 ± 0.52 |

células con aberraciones cromosómicas en el hígado sobrepasa considerablemente el 70%. A las 20 horas después de la irradiación el número de células con aberraciones disminuye fuertemente en todos los órganos investigados. Este hecho nos dice que la mayoría de células con aberraciones no son viables y se eliminan de los órganos irradiados en uno o dos ciclos mitóticos.

En la segunda mitad del período embrionario el hígado es el principal órgano embrionario formador de sangre. Por eso la muerte del mayor porcentaje de células hepáticas tiene que llevar obligatoriamente a una alteración en la formación de la sangre y a la hipoxia en todas las células del embrión en desarrollo. Actualmente se conoce que la hipoxia es uno de los factores teratogénicos más importantes que provocan distintas anomalías del desarrollo (*Lopachov y cols., 1963*). Por eso, la constatación de una radiosensibilidad citogenética excesivamente alta en el hígado embrionario nos permite suponer que la alteración de la formación de la sangre embrionaria y la hipoxia siguiente en los tejidos del embrión es uno de los componentes principales del efecto radiobiológico durante la irradiación de los embriones de mamíferos.

Influencia "Fisiológica" de la Irradiación sobre los Cromosomas de los Embriones de Mamíferos

Bajo la influencia fisiológica de la irradiación sobre los cromosomas se comprende la adhesión cromosómica como resultado de la irradiación.

Para este tipo de daño se han propuesto distintos términos (*Melander, 1963*). Nosotros utilizaremos el término "pseudoquiasmas", propuesto por Levan y Tjio (*1948*). Para estudiar la influencia de la irradiación sobre la formación de los pseudoquiasmas utilizamos los embriones de hamster dorado. En estos embriones la aparición espontánea de los pseudoquiasmas fue muy frecuente en las células de los distintos órganos embrionarios. Para la irradiación tomamos el estadio en que el porcentaje de pseudoquiasmas surgidos espontáneamente es más alto. Para tener la posibilidad de estudiar la frecuencia de las adhesiones en la primera mitosis, los embriones fueron fijados 3 horas después de la irradiación. En la tabla V se muestran los resultados de este experimento.

Los resultados fueron bastante sorprendentes. Según la tabla V la irradiación no provocó el aumento de la frecuencia de formación de pseudoquiasmas en comparación al control. Sin embargo aumentó, en mucho, el porcentaje de anafases con fragmentos y cromosomas retrasados. Es importante notar que en muchos casos es imposible diferenciar entre cromosomas y fragmentos. Por eso, unimos estos dos tipos de alteraciones en un solo grupo. No obstante, en algunos casos (cerca de un 10% en este grupo de alteraciones) se pueden identificar los cromosomas retrasados sin duda alguna. En el material no irradiado utilizado como control no se encontró ningún caso de retraso cromosómico en la anafase de la mitosis. De estas observaciones se deduce que la irradiación estimuló en la primera mitosis la aparición de un gran número de células con cromosomas retrasados.

Es importante subrayar esta circunstancia ya que el porcentaje de los fragmentos y los cromosomas retrasados es bastante próximo al porcentaje de pseudoquiasmas que se ha observado en el control en el estadio anterior del desarrollo del embrión 5.1% (*Ramos Vecin y Bocharoff, 1969*).

Así pues, en este experimento se obtuvieron dos resultados que exigen una explicación:

- 1) La ausencia de aumento en la frecuencia de los pseudoquiasmas después de la irradiación y
- 2) la formación elevada de cromosomas retrasados.

En calidad de hipótesis, para explicar los resultados de nuestros experimentos, suponemos que la formación de los pseudoquiasmas está ligada a un debilitamiento de los centrómeros de los cromosomas. Este debilitamiento de los centrómeros puede ser provocado por la acción de la radiación y puede surgir espontáneamente en determinadas fases de la embriogénesis. El debilitamiento de la función de los centrómeros dificulta la división de los cromosomas en la anafase de la mitosis, lo que excita la formación de los pseudoquiasmas. Si la irradiación actúa sobre el centrómero normal entonces el resultado de su afección parcial será la formación de los pseudoquiasmas. Si la irradiación influye sobre centrómeros espontáneamente debilitados, el resultado será la inactivación total y la aparición de los cromosomas retrasados. En nuestras investigaciones se utilizaron materiales con un porcentaje elevado de pseudoquiasmas espontáneos, es decir, en nuestro material los cromosomas ya tenían los centrómeros debilitados.

Precisamente por eso, el resultado de la acción de la irradiación no fue la formación de pseudoquiasmas sino la inactivación total de los centrómeros con la aparición de cromosomas retrasados en la anafase. Esta hipótesis exige una comprobación experimental, la que será de interés para comprender algunos procesos citológicos.

CONCLUSIONES

- 1) La radiosensibilidad citogenética de los órganos de los embriones de ratones de 10 días de edad es diferente. La máxima radiosensibilidad es característica de las células del hígado embrionario. La dosis de 200 r inducen que las células hepáticas embrionarias las aberraciones cromosómicas, con una frecuencia que excede al 70%.
- 2) El menor número de células con aberraciones cromosómicas se encontró en las células del cerebro embrionario.

- 3) La mayoría de las células con aberraciones se eliminaron de los órganos irradiados en el intervalo comprendido entre las 10 y 20 horas después de la irradiación.
- 4) La irradiación de los embriones de hamster dorado con dosis de 200 r rayos gamma del cobalto no influye en la frecuencia de la formación de los pseudo-quiasmas, pero provoca la aparición de un gran número de cromosomas retrasados.

REFERENCIAS

- BAYER CH. C. Chronology of development for the golden hamster. *J. Morphol.*, **92**, 1, 1953.
- EVANS H. Y. Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Intern. Rev. Cytol.* **13**, 1962.
- LOPASHOV G. V. Y STROEVA O. G. Development of an eye in the light of experimental investigations. M. 1963.
- MELANDER Y. Mitotic events in animal embryogenesis and alterations of genetic activity. *Hereditas*, **52**, 387, 1965.
- OTIS E. B. Equivalent ages in mouse and human embryos. *Anat. Rec.*, **120**, 33, 1954.
- RUGH R. Low levels of X-radiation and the early mammalian embryo. *Amer. J. Roentgenology*, **87**, 559, 1962.
- RUSSEL L. B. Y RUSSELL W. Y. An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. *J. Cell Compar. Physiol.*, **43**, 103, 1954.
- SHIRLEY W., SOUKUP S., TAKACS E. Y WARKANI Y. Chromosome changes in rat embryos following X-irradiation. *Cytogenetics*, **4**, 13, 1965.
- SOUKUP S., TAKACS E. Y WARKANY Y. Chromosome changes in embryos treated with various teratogens. *J. Emb. Exper. Morph.*, **18**, 215, 1967.
- SVETLOV P. G. Y KORSAKOVA G. F. Patogenic action of ionizing radiation on pregnancy state, of embryos and new borns. L. **37**, 1960.