

AUSENCIA DE RECUPERACIÓN DE LAS CELULAS HUMANAS DESPUES DE LA IRRADIACION CON RAYOS X

RAFAEL DE LA VEGA y V.M.* MIJELSON

Centro Nacional de Investigación Científica, La Habana, Cuba
(Trabajo recibido en Septiembre de 1968)

RESUMEN

Se trató de demostrar el restablecimiento postradiativo de los linfocitos del ser humano según el criterio de las aberraciones cromosómicas, variando los intervalos de tiempo entre la irradiación y el inicio de la división de las células. Las aberraciones cromosómicas fueron registradas 48 horas después de haberse efectuado la adición de FHA al cultivo. La prolongación del plazo entre la irradiación y la adición de la FHA, a las 24 horas y a las 48 horas no produjo la disminución de la frecuencia en las roturas cromosómicas en comparación con el control, en el cual la FHA se agregó inmediatamente después de la irradiación. Se discuten las posibles causas de la inexistencia del restablecimiento postradiativo en estas condiciones.

SUMMARY

Human plasm with leukocytes was irradiated in vitro by X-rays with doses of 50, 100 and 150 r (14,3 r/min). The lymphocyte cultures in the Parker medium were prepared and incubated at 37°C. PHA was instilled immediately after irradiation, in 24 and in 48 hours, and the incubation was prolonged 48 hours more. The number of chromosome breaks was the same irrespective of the interval between irradiation and the PHA instillation. The reasons for the lack of postradiation recovery are discussed.

La recuperación del organismo irradiado puede efectuarse ya sea por la sustitución de las células destruidas a cuenta de la multiplicación de las restantes (recuperación a nivel de tejido) o por el restablecimiento de las mismas células lesionadas (recuperación a nivel celular). Uno de los procedimientos más conocidos para el estudio de la recuperación a nivel celular es la prolongación del intervalo entre la irradiación y la primera mitosis. Si la recuperación de las células lesionadas tiene lugar, entonces al prolongarse este intervalo, debe disminuir la cantidad de células lesionadas por los rayos. Al encontrar recuperación postradiativa pueden exis-

* Instituto de Citología, Academia de Ciencias de la URSS, Leningrado.

tir condiciones en las cuales ésta se efectúe completamente y con más rapidez, y así formular recomendaciones para la práctica médica.

Para la revelación y el estudio de la reparación postradiativa de las lesiones manifiestas en las células no son adecuados los tejidos donde se efectúa una división celular activa y permanente. Para estos fines son indispensables modelos, donde las mitosis no se realicen espontáneamente, pero que puedan ser causadas por determinadas influencias, o sea, que el inicio de la mitosis pueda ser dirigido.

En estas condiciones, si las mitosis producidas son bastante sincrónicas, hay posibilidades de revelar la recuperación, modificando los intervalos de tiempo entre la irradiación y la primera mitosis. Un ejemplo de ese modelo es la variación del plazo entre la irradiación y la fecundación de los huevecillos del erizo de mar,⁽¹⁾ el remojo de semillas,⁽²⁾ el cultivo de células en un medio alimenticio,⁽³⁾ etc.

La restauración de las lesiones cromosómicas manifiestas en las células de los mamíferos fue estudiada en las células del hígado de los ratones y de las ratas, que en condiciones normales prácticamente no se dividen. Los resultados obtenidos son contradictorios. Shapiro⁽⁴⁾ provocó mitosis en el hígado de los ratones mediante la resección de un lóbulo en plazos diferentes después de la irradiación y no encontró la restauración según el criterio de las aberraciones cromosómicas. Albert y Bucher obtuvieron resultados análogos en las ratas.⁽⁵⁾ En trabajos posteriores, sin embargo, se han obtenido datos a favor de la existencia de la reparación en este objeto.^(6, 7)

Un sistema adecuado para el estudio de la recuperación postradiativa es el cultivo de linfocitos en la sangre periférica del hombre; los linfocitos empiezan a dividirse, solamente después de la adición de fitohemaglutinina (FHA). Kozlov⁽⁸⁾ no observó reparación de las aberraciones cromosómicas después de la gamma-irradiación de los linfocitos in vitro. En este trabajo, sin embargo, la frecuencia de las aberraciones cromosómicas fue registrada a las 60 horas de cultivo de los linfocitos con la FHA. En este período la población no es sincrónica,⁽⁹⁾ y de acuerdo con los cálculos de Bukton y Pike⁽¹⁰⁾ aproximadamente el 60% de las células que se dividieron se encuentran en la segunda mitosis en mitosis posteriores después de la irradiación. De esa forma, una parte considerable de las aberraciones cromosómicas se eliminan en ese tiempo.^(11, 12) Además, como está demostrado en los más variados objetos, la reparación postradiativa se efectúa durante el primer ciclo celular, después de la irradiación.⁽¹³⁾ Por estas causas, los resultados obtenidos al efectuar la observación de las segundas mitosis y de mitosis posteriores, en un grado considerable, pueden no ser demostrativas.

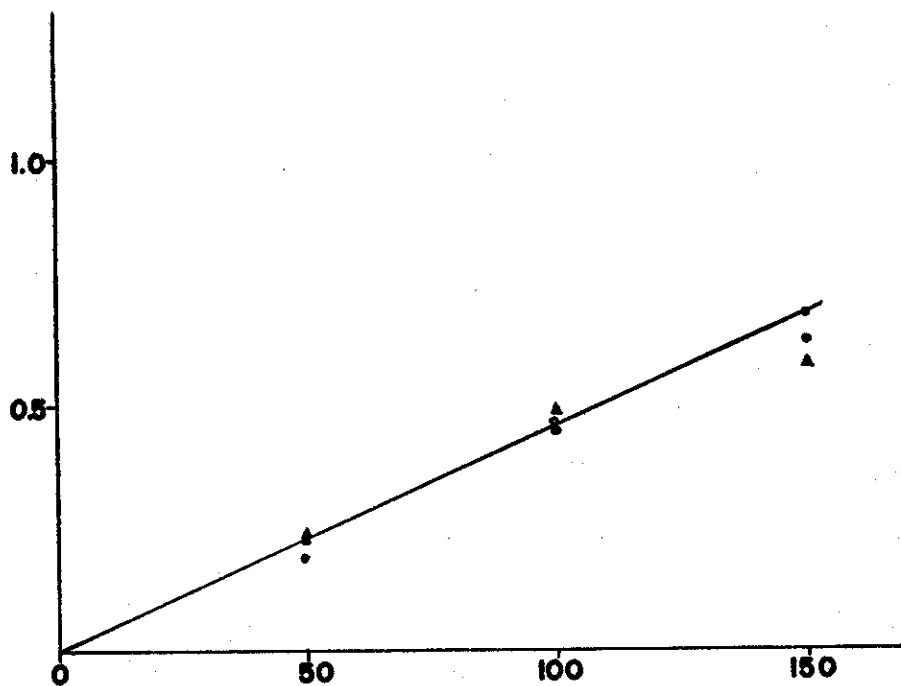


FIG. 1. Dependencia del número de las roturas cromosómicas por linfocito, de la dosis de irradiación en diferentes intervalos entre la irradiación y la adición del FHA. En el eje de las abscisas: la dosis de irradiación en rayos X; en el eje de las ordenadas el número de roturas por célula. Círculos claros: sin intervalo entre la irradiación y la adición de FHA; círculos oscuros: con un intervalo de 24 horas; triángulos: con un intervalo de 48 horas.

Nosotros, en este trabajo empleamos un cultivo de linfocitos humanos de 48 horas. A las 48 horas después de la adición de la FHA en los cultivos se observa la primera onda mitótica máxima.⁽¹⁴⁾ pero al mismo tiempo, todas o casi todas las mitosis son las primeras después de la aplicación de la FHA.^(10, 15) La población en ese período es sincrónica.⁽⁹⁾ Además, tal plazo de incubación ofrece, en nuestros experimentos, menos tiempo para la recuperación espontánea en el control.

METODO

Se sometió el plasma con los leucocitos en probetas de cristal, de paredes finas a los Rayos X, con dosis de 50, 100 y 150 r. en el aparato Westinghouse Quadrocoudex (230 Kv, 20 ma, intensidad de la dosis 14.3 r/min. filtro de 2 mm Cu + 2 mm Al, distancia de foco, 50 cm). Inmediatamente después de la irradiación se prepararon los cultivos de los linfocitos irradiados en medio 199 de acuerdo con el método generalmente aceptado⁽¹⁶⁾ y se incubaron a 37°C. La FHA-M "Difco" o la FHA de preparación nuestra a base de los frijoles *Phaseolus vulgaris* se adicionó a una parte del cultivo de células irradiadas (también al control no irradiado), inmediatamente, a otra parte a las 24 horas y a una tercera parte a las 48 horas después del inicio de la incubación. Después de haber agregado la FHA, la incubación se prolongó 48 horas más.

Teniendo un esquema así, distintas variantes estaban en cultivo un tiempo diferente, desde 48 hasta 96 horas. Para igualar las condiciones en una parte de los experimentos el esquema se modificó: todos los cultivos se prepararon y se incubaron al mismo tiempo; la irradiación se efectuó a una parte inmediatamente, a otra a las 24 horas y a la tercera a las 48 horas después de la preparación de los cultivos; a las 48 horas de incubación en todas las variantes se agregó la FHA, después de lo cual la incubación continuó 48 horas más. De esa forma, entre la irradiación y la aplicación de la FHA pasaron 48, 24 o 0 horas correspondientemente, igual que en los experimentos del primer esquema, pero todas las variantes estuvieron en cultivo el mismo tiempo (96 horas). Ya que entre los resultados, de acuerdo al primer y segundo esquemas no se descubrió ninguna diferencia, nosotros preferimos el primer esquema ya que desde el punto de vista técnico es más cómodo.

Se agregó la colchicina 3 horas antes de terminar la incubación, los preparados se colorearon con Giemsa. Las imágenes metafásicas se analizaron por lo general, directamente con el microscopio; en los casos dudosos se efectuaron análisis cromosómicos con microfotografías.

El orden de los cálculos de las aberraciones cromosómicas se describe en el trabajo anterior.⁽¹²⁾ Con respecto a las aberraciones de tipo cromosómico, en el control no irradiado prácticamente no se encontraron. Se hizo un recuento de la cantidad de deleciones (fragmentos pares), de los dicéntricos y de los anillos. El número de roturas cromosómicas se determinó partiendo de que para la producción de una deleción, tiene que haber una rotura, y para la formación de los dicéntricos y los anillos tendrán que efectuarse dos roturas. En las células con dicéntricos y anillos los dos pares de fragmentos se contemplaron como el resultado de esas mismas dos roturas, los fragmentos restantes se consideraron independientemente. No se tomaron en cuenta los defectos en los cromosomas sin desplazamiento de los fragmentos. La diferencia entre el número de roturas, que fueron observadas al agregar la FHA inmediatamente después de la irradiación y al hacer la adición a las 24 y a las 48 horas, debía haber servido como índice de la presencia de la recuperación.

RESULTADOS Y DISCUSION

El número de aberraciones espontáneas del tipo cromosómico en el control no irradiado fue bajo: 0.007 roturas por célula.

Como se señala en la Tabla, las correlaciones de los diferentes tipos de aberraciones con una dosis igual son cercanas en las diferentes variantes. Al aumentar la dosis el número de dicéntricos y anillos aumenta un poco más rápidamente que el número de deleciones, pero en los límites de la dosis de irradiación aplicada por nosotros, la dependencia del número de roturas cromosómicas por célula de la dosis de irradiación, es cercana a la lineal (ver gráfico). Esto permitió calcular el número de roturas por célula por 1 roentgen. No habiendo ningún intervalo entre la irradiación y la aplicación de la FHA, la cifra fue de 0.0043 ± 0.00015 con un intervalo de 24 horas 0.0044 ± 0.00015 ; con un intervalo de 48 horas, 0.00046 ± 0.00014 . Estas cifras no difieren significativamente entre sí.

De esa forma, la prolongación del intervalo de tiempo entre la irradiación de los linfocitos del ser humano y la primera mitosis no produce una atenuación de la lesión del cromosoma.

Esto se podría explicar porque en las condiciones dadas la recuperación postradiativa no se efectúa. Se puede pensar también, que las 48 horas que pasan en el control entre la irradiación y la fijación son suficientes para la reparación, máxima posible en estas condiciones y que la prolongación adicional del tiempo para la reparación (48+24 y 48+48 horas) no puede producir ya más reparación. Además, puede haber una tercera expli-

cación: se tienen datos (17, 18) referentes a que la FHA por sí sola es un radioprotector fuerte, el cual es todavía efectivo al realizar la adición hasta dos días después de la irradiación. Con la prolongación del intervalo entre la irradiación y la adición de FHA este efecto disminuye gradualmente (como criterio en estos experimentos se tomó la sobrevivencia de los linfocitos).

Si la FHA influye de esa misma forma sobre las aberraciones cromosómicas, su acción deberá enmascarar el efecto de la reparación postradiativa en nuestros experimentos.

Los experimentos efectuados a pesar del empleo de los cultivos sincrónicos y de las primeras mitosis después de la irradiación no permiten llegar a conclusiones sobre la existencia de la recuperación de las lesiones cromosómicas en las células humanas. De todas formas los resultados obtenidos nos dan la posibilidad de limitar la esfera de la investigación y señalar la ruta y dirección para los trabajos futuros. Las explicaciones expuestas anteriormente sobre las posibles causas de la ausencia de la reparación en nuestros experimentos se pueden comprobar experimentalmente.

Dosis en r.	Intervalo entre la irradiación y la adición de la FHA (horas)	Número total de células	CANTIDAD DE ABERRACIONES		Número de roturas cromosómicas	Número de roturas por células
			Deleciones	Dicéntricos y anillos		
0	0	900	8	0	8	0.009
	24	900	4	0	4	0.004
	48	900	10	1	12	0.013
50	0	300	35	11	57	0.19 ± 0.02
	24	300	48	9	66	0.22 ± 0.02
	48	300	44	13	70	0.23 ± 0.02
100	0	600	154	80	274	0.46 ± 0.02
	24	600	120	74	268	0.45 ± 0.02
	48	600	165	64	293	0.49 ± 0.02
150	0	200	67	35	137	0.68 ± 0.03
	24	200	51	38	125	0.63 ± 0.03
	48	300	78	49	174	0.58 ± 0.03

RECONOCIMIENTO

Nuestro agradecimiento a la compañera Zenaida Leonard, del Departamento de Radioterapia del Hospital Nacional, por su cálida colaboración, así como a los compañeros del Banco de Sangre del propio Hospital.

REFERENCIAS

1. Henshaw, P.S. 1940. Amer. J. Roentgenol., 43,6:899.
2. Luchnik N.V., Izmozherov N.A., Poriadkova N.A., Tsarapkin L.S.; Timofeev-Resovsky N.V. 1960. "Informe en la 8a. Sesión del Comité de la ONU para los efectos de las irradiaciones".
3. Yarmonenko S.M. 1963. Radiobiología, 3,5:689 (ruso).
4. Shapiro I.M. 1959. Informes de la Academia de Ciencias de la URSS, 129,3:681 (ruso).
5. Albert M.D., Bucher N.Y.R. 1960. Cáncer res. 20:1914.
6. Curtis H.J., Tilley J., Crowley C. 1964. Radiation res. 22,4:730.
7. Shapiro I.M., Yarmonenko S.M., Paliga C.F., 1965, Radiobiología (Boletín de Información), 7:17 (ruso).
8. Zozlov V.M. 1968. Radiobiología, 8,1:79 (ruso).
9. Ribas-Mundo M., 1966. Blood, 28,6:891.
10. Bukton K.E., Pike M.C., 1965. Internat. J. Radiat. Biol., 8,5:439.
11. Heddle J.A., Evans H.J., Scott D., 1967, "Human radiation cytogenetics", Amsterdam:6.
12. Vega R. de la, Mijelson V.M. (en este número).
13. Elkind M.M., Sutton H., 1959. Nature, 184, 4695:1293.
14. Bender M.A., Prescott D.M., 1962. Exptl. cell res. 27,2:221.
15. Sasaki M.S., Norman A. 1966. Nature, 210,5039:913.
16. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford D.A. 1960. Exptl. cell res. 20,3:613.
17. Stefani S., Schrek R. 1963, Radiat. res., 19,1:23.
18. Schrek R., Stefani S. 1964, J. Natl. Cancer inst, 32,2:507.