

---

## RADIOBIOLOGÍA Y ABERRACIONES CROMOSOMICAS

---

RAFAEL VILLALOBOS-PIETRINI

Programa de Genética y Radiobiología. Comisión N. de Energía Nuclear y Laboratorio de Genética. Instituto de Biología, U.N.A.M.

Presentado en el Simposio para conmemorar el Centenario de Mendel. México, D. F., 1965.

La Radiobiología y en particular la Radiogenética han tenido gran desarrollo en muy poco tiempo, debido al interés del hombre en conocer desde los fenómenos de interacción de las radiaciones con los organismos y las etapas sucesivas, hasta los efectos finales y el reflejo de esas reacciones en la descendencia. Es debido a ese súbito desenvolvimiento, el hecho de que la enorme literatura que se ha vertido en las revistas y en los libros sea en muchas ocasiones confusa.

Los estudios sobre los efectos genéticos de las radiaciones en los organismos que fueron iniciados por Müller (12) y Stadler (20), han sido continuados por un gran número de investigadores, cuyos resultados son analizados en las revisiones de Catcheside (6), Hollaender (10), Lea (11), Bacq y Alexander (3) y Wolff (25).

Han sido encontradas varias sustancias químicas cuyos efectos son similares a los de las radiaciones, por lo que se les denomina "Sustancias Radiomiméticas", los estudios con estos agentes químicos se originaron en los trabajos de Oehlkers (14) con uretano y Auerbach (2) con gas mostaza, habiéndose observado que su acción es tan variable como su estructura química.

Las radiaciones capaces de producir efectos biológicos pueden clasificarse en ionizantes y no ionizantes, entre las primeras tenemos a los rayos X, los rayos  $\gamma$ , las partículas  $\alpha$  (núcleos de Helio), las partículas  $\beta$  (electrones), los protones y los neutrones. Las radiaciones ionizantes se caracterizan porque al interferir con la materia desplazan electrones de sus órbitas, los cuales ionizan a su vez otros átomos. Lógicamente las ionizaciones no se distribuyen al azar sino que se localizan a lo largo de la trayectoria de los electrones primarios o secundarios. Después de varias colisiones los electrones pierden su velocidad o energía y son capturados por un átomo, produciendo así un ion químicamente reactivo, o por una molécula que se hace inestable y se descompone en fragmentos muy reactivos denominados radicales libres. Las partículas  $\alpha$ , los protones y los neutrones son más densamente ionizantes que los electrones expedidos por los rayos X y  $\gamma$  lo que significa que producen mayor cantidad de pares de iones en un volumen dado.

Se ha determinado que por cada par de iones que se forman, la cantidad promedio de energía invertida es de 32.5 eV. A la cantidad de energía depositada o al número de ionizaciones producidas por unidad lineal de trayectoria se denomina transferencia lineal de energía, que no es la misma para todas las partículas, ya que algunas radiaciones ionizan más densamente que otras, de aquí que las partículas  $\alpha$  cedan más rápidamente su energía, por lo que son más efectivas, pero pierden rápidamente su velocidad y tienen poca penetración. Lo contrario acontece con los rayos X ó  $\gamma$  que son más penetrantes por tener una transferencia lineal de energía (T L E) baja. Los protones y neutrones ocupan una posición intermedia.

La radiación U.V., siendo no ionizante transfiere su energía a través de excitación a átomos y moléculas, que alcanzan por ello niveles energéticos más altos. Debido a su baja energía y escasa penetración, la radiación U.V. es menos eficiente en Radiobiología que las radiaciones ionizantes, pero esta desventaja está compensada por el hecho de que es selectivamente absorbida por las nucleoproteínas de los cromosomas. Son de citarse los trabajos de Bloom y colaboradores (5), Bloom (4) y Zirkle y colaboradores (28), que describen la irradiación microhaces de U.V., de los cromosomas de las células del corazón de salamandra, en cultivos de tejidos, los cuales se hacen adhesivos cuando son irradiados 5 segundos y se empalidecen al aumentar el tiempo de irradiación a 10 segundos, mientras que al hacer incidir el microhaz por un período de 150 segundos en el citoplasma es observada la desaparición del huso mitótico. Datos similares se obtienen de la irradiación de células del endospermo de *Haemaphysalis katharinae* en las cuales se logra tanto la desaparición del huso como la del fragmoplasto. Es sorprendente el hecho de que al irradiar con 20 protones en un haz de 8 micrones, se obtenga la adhesividad cromosómica y para empalidecer los cromosomas y destruir el huso mitótico, sea necesario aplicar decenas de miles de protones y un millón de protones, respectivamente.

En la acción primaria de las radiaciones, al interferir con el material biológico, los pares iónicos formados tienen una vida extremadamente corta, que generalmente no alcanza al orden de los microsegundos y cuya inestabilidad les lleva unas veces a disociarse y otras a combinarse entre sí, en estas reacciones suelen originarse radicales libres dotados de gran reactividad. Las reacciones radioquímicas se han evaluado midiendo el número de moléculas transformadas o producidas por cada par iónico formado, empleándose el "valor G" para denominar al número de estas moléculas por cada 100 eV. de energía absorbida. Este valor depende de las características del material irradiado, de su estado físico, del tipo de radiación y en especial de su transferencia lineal de energía.

El efecto de las radiaciones se manifiesta mediante dos mecanismos:

a) acción directa, cuando las ionizaciones o excitaciones se producen en las mismas moléculas que estudiamos y que son transformadas.

b) acción indirecta, que se verifica por intermedio de las moléculas del solvente, en donde los radicales libres inducidos son los responsables de las transformaciones de las moléculas que se analizan.

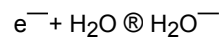
Al estudiar la acción indirecta de las radiaciones en la materia viva es de importancia tener presente los fenómenos que se originan por la irradiación del agua, ya que el contenido de ésta es muy alta en los tejidos.

Los principales productos formados, cuando las radiaciones inciden sobre el agua, son bien conocidos, pero los mecanismos detallados no están completamente comprendidos. Esquemáticamente podríamos indicar:

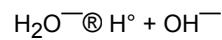


El ión  $\text{H}_2\text{O}^+$  se disocia

El electrón  $e^-$  puede ser capturado por otra molécula de agua.



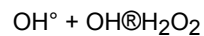
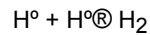
que se disocia



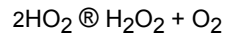
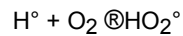
° Radical libre.

Los productos de la reacción primaria se difunden, recombinan o reaccionan dependiendo los resultados de su distribución espacial debida a la transferencia lineal de energía de la radiación usada.

Con valores altos de LET (ejemplo, una partícula  $\alpha$  que forma 400 pares de iones por micron), los radicales libres adyacentes  $\text{OH} - \text{OH}$  y  $\text{H} - \text{H}$  están más cercanos que los  $\text{OH} - \text{H}$ , favoreciéndole así las reacciones:



En este caso la formación de hidrógeno (gas) y de peróxido de hidrógeno, se realiza con o sin la presencia de oxígeno, mientras que la situación se presenta diferente con las radiaciones de bajo LET (rayos X ó g) pues existen enormes espacios entre los eventos ionizantes, según Dale y colaboradores (8) la separación de los radicales formados es del orden de  $150\text{Å}$ , comprendiendo hasta 70 moléculas de agua entre ellos. Por lo tanto, la producción de peróxido de hidrógeno se realiza solamente si existe oxígeno disuelto:



se sabe también que el oxígeno tiene gran afinidad por los electrones:



Al irradiar una sustancia en estado de pureza, la acción es por definición directa, pero al hacerlo con sustancias en disolución, coexisten ambos modos de acción aumentando la importancia relativa de la acción indirecta al disminuir la concentración, de modo que puede predominar casi absolutamente en soluciones muy diluidas.

La acción biológica de las radiaciones se estudia especialmente sobre sistemas que por su importancia dentro del metabolismo celular son capaces de multiplicar el efecto primario desencadenando una serie de consecuencias realmente desproporcionadas en magnitud a la causa inicial. Entre estos sistemas encontramos los genéticos, cuyos cambios producidos por las radiaciones, se pueden clasificar en intragénicos o intergénicos, los primeros, llamados también mutaciones puntuales, implican cambios en la secuencia de las bases nitrogenadas del DNA y los segundos, que son el tema a tratar, consisten en alteraciones estructurales, denominadas también aberraciones cromosómicas, cuya detección es posible realizarla a nivel citológico y que constituye uno de los criterios más adecuados para la determinación del efecto producido por las radiaciones.

Ha sido posible entender el mecanismo de estas aberraciones cromosómicas inducidas, por las acciones directa e indirecta de las radiaciones, considerándose que los cromosomas son rotos al incidir la radiación sobre ellos, además del efecto de la deposición de energía en el medio que los rodea (Thoday y Read, 21).

Revell (15) no acepta al rompimiento y a la reunión de los cromosomas como los primeros eventos producidos, puesto que considera en su hipótesis de intercambio la inducción de un cambio de estado en los cromosomas, el cual se traduce en un intercambio cromatídico real durante el desarrollo cromosómico subsecuente, lo que equivale a un "cross over" mitótico.

En los estudios cuantitativos de las frecuencias de aberraciones, los datos proporcionados por Revell (15) no difieren de los obtenidos tomando en cuenta las acciones directa e indirecta.

En nuestro caso consideraremos el hecho de que los cromosomas se rompen al ser irradiadas las células y los extremos libres sufren diversos comportamientos:

- A) Permanecen separados.
- B) Se restituyen a su posición original.
- C) Se reúnen ilegítimamente con otros extremos rotos.

De éstos sólo el segundo caso no se puede detectar citológicamente. Los cromosomas de las glándulas salivales de *Drosophila* fueron los primeros en utilizarse para estas investigaciones citogenéticas, ya que su gran tamaño permite el estudio tanto de cambios grandes, como de pequeños, puesto que poseen numerosos marcadores que permiten analizarlos con facilidad. Lo mismo acontece con *Zea mays* en estado de paquíteno. Otro material adecuado para el estudio de aberraciones en la meiosis lo constituyen las microsporas de *Tradescantia* y en la mitosis, los meristemos de la punta de la raíz de *Vicia faba*. Los cambios estructurales pueden clasificarse en dos tipos: cromatídicos y cromosómicos. Los primeros se originan de la exposición a las radiaciones de las células cuyos cromosomas han pasado el período de síntesis de DNA (ácido desoxirribonucleico), encontrándose dobles, o sea con dos cromátidas, esto ocurre en el llamado período  $G_2$  que corresponde a la porción final de la interfase. La cromátida es considerada la unidad de rompimiento en esta fase. Las aberraciones cromosómicas ocurren cuando las células se encuentran en la primera porción de la interfase ( $G_1$ ) antes del período de Síntesis (S), constituyendo el cromosoma la unidad de rompimiento.

El estado de la célula más adecuado para verificar el registro de las aberraciones es el de la metafase, momento en que los cromosomas están perfectamente individualizados y de buen tamaño para analizarlos; los cambios inducidos al ser detectados en este estado (Tabla I y II), se describen como Rompimientos (Fig. 1), Intracambios (Fig. 2) e Intercambios (Fig. 3). También se pueden observar las aberraciones en anafase (Tabla I y II), aunque su descripción no es tan clara como en el caso anterior, así tenemos Puentes (Fig. 4), Anillos y Fragmentos (Fig. 5), y en interfase al observar la frecuencia de Micronúcleos (Fig. 6). Todos estos cambios nos conducen a deficiencias, duplicaciones, inversiones y translocaciones de porciones de cromosomas.

Las deficiencias consisten en pérdidas de partes de los cromosomas y de los genes incluidos en ellos, y pueden ser distales o intersticiales. El efecto de la delección o deficiencia es evidente que está determinado por la cantidad cromosómica implicada y por la importancia de los genes del segmento perdido. A veces se confunde una delección muy pequeña con una mutación de gene, pues en muchos casos la aberración es difícilmente detectable microscópicamente. Pérdidas mayores podrían reflejarse como letales recesivos y por supuesto deficiencias aún mayores aparecerán como letales dominantes.

La duplicación implica la presencia de un gene o grupo de genes más de una vez en el genoma normal, son menos letales que las deficiencias y pueden tener efectos visibles en el fenotipo.

Las inversiones se originan de dos rompimientos que ocurren en un simple cromosoma, los cuales se reúnen por los extremos rotos después de girar  $180^\circ$ . Este tipo de aberración se expresa como el cambio en el orden de los genes en un grupo de encadenamiento.

Las translocaciones ocurren cuando se producen dos rompimientos en diferentes cromosomas. Si el intercambio es simétrico reduce la viabilidad, pero si es asimétrico resulta generalmente en la letalidad de la célula.

Mucho se ha discutido sobre la dinámica de la producción de aberraciones de uno y dos impactos (Tablas I y II) y varios modelos proporcionados por Lea (10), Giles (9), Müller (13) y Wolff (24) han tratado de explicarla.

El cambio inducido por las radiaciones, expresado en forma de aberraciones cromosómicas puede ser modificado por diversos factores que tienen influencia en la frecuencia de los rompimientos observables o en los fenómenos de recuperación. En el primer caso se encuentra el hallazgo del efecto del oxígeno. Debido al enorme ímpetu que se le dio al estudio de la protección de las radiaciones tanto como al mecanismo básico en la producción de aberraciones, en 1947, Thoday y Read (21) publicaron un artículo, que actualmente es clásico en Radiobiología, mostrando que el daño de los rayos X se reducía a  $\frac{1}{3}$  cuando se verificaba anóxicamente. Ellos reportaron que tal efecto no se producía si eran usadas partículas densamente ionizantes.

En lo referente a la recuperación es interesante conocer los experimentos de intensidad y fraccionamiento de Sax (17, 18, 19) en los que demuestra que al administrar los rayos X a bajas dosis o al fraccionarlas algunos de los rompimientos se restituyen antes de que otros se produzcan, habiendo así menos rompimientos abiertos al mismo tiempo y en consecuencia disminuyendo el número de intercambios formados.

El disturbio mecánico que produce la centrifugación en el momento de irradiar un material biológico y también en post-tratamiento (Wolff y von Borstel, 26 y Anderson, 1) disminuye el número de restituciones y por lo tanto aumentan las frecuencias de los rompimientos observables. Conger (7) obtuvo los mismos resultados con ultrasonido.

Otro factor importante y el último que mencionaré es el de la temperatura. Sax y Enzmann (19) irradiaron microsporas de *Tradescantia* a temperaturas altas (30 grados centígrados) y el daño producido se redujo a un cuarto del obtenido a bajas temperaturas (3 grados centígrados). Esto fue interpretado en términos de que a las temperaturas elevadas hay menos oxígeno en disolución que a las bajas y la ausencia del oxígeno, como ya se explicó, representa un efecto protector.

Cuando se aplican temperaturas bajas (1°-10°C) y elevadas (20°-30°C) después de la irradiación X y se analizan los efectos producidos en las aberraciones cromatídicas (Villalobos-Pietrini 22, 23.), o sea en los periodos G<sub>2</sub> y S y en las aberraciones cromosómicas (Villalobos-Pietrini, Palomino y Breña datos no publicados) de la porción G<sub>1</sub> de la interfase, se observa que solamente los rompimientos cromatídicos e isocromatídicos tienen un comportamiento significativo, presentándose con mayor frecuencia a elevadas temperaturas que a bajas.

Otros aspectos interesantes sobre la reunión de los rompimientos están analizados en el trabajo de Wolff y Luippold (27) quienes consideran que las frecuencias de los mismos dependen del metabolismo celular, pues al tratar con inhibidores metabólicos (KCN y CO) el material irradiado, observan la disminución de la cantidad de ATP que tiene un efecto profundo en la restitución de los rompimientos.

El conocimiento de los mecanismos que intervienen en la producción de las aberraciones cromosómicas es uno de los criterios que permite analizar el efecto biológico de las radiaciones, considerando que una de las partes especialmente sensibles a ellas son los núcleos celulares cuyas alteraciones determinarán los cambios que manifiestan los organismos.

#### REFERENCIAS

1. ANDERSON, L. 1995. *Genetics* 40, 563.
2. AUERBACH, C. and ROBERSON, J. M. 1947. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, B. 62, 284.
3. BACQ, Z. M. and ALEXANDER, P. 1961. *Fundamentals of Radiobiology*, Academic Press. N. Y.
4. BLOM, W. 1959. *Rev. Modern. Phys.* 31, 21.
5. BLOM, W. ZIRKLE, R. E. and URETZ, R. B. 1955. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 59, 503.
6. CATCHESIDE, D. C. 1948. *Adv. Genetics* 2, 271.
7. CONGER, A. D. 1948. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 34, 470
8. DALE, N. M., GRAY, L.M. and MEDERITH, W. J. 1949. *Phil. Trans.* 242,33.
9. GILES, N. H. 1954. En *Radiation Biology* (edit. A. Hollaender). McGraw-Hill, N. Y.
10. HOLLAENDER, A. (edit. ) 1954. *Radiation Biology*, McGraw-Hill, N. Y.
11. LEA, D. E. 1955. *Action of Radiations on Living Cells*. Cambridge Univ. Press.
12. MÜLLER, H. J. 1928. *Zeitchr. Ind. Abstam. Verebungsl. Suppl.* 1, 234.

13. ———, 1954. En Radiation Biology (edit. A. Hollaender). McGraw-Hill, N. Y.
14. OEHLKERS, F. 1943. Zeitchr. Ind. Abstam. Verebungsl. 81, 313.
15. REVELL., S. M. 1963. Chromatid Aberrations—The Generalized Theory. En Radiation Induced Chromosome Aberrations (edit. S. Wolff) New York Univ. Press.
16. SAX, K. 1939 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 25, 225.
17. ———, 1940. Genetics 25, 41.
18. ———, 1941. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 2, 93.
19. SAX, K. and ENZMANN, E. V. 1939. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 25, 397.
20. STANDLER, L. J. 1928. Science 68, 186.
21. THODAY, J. M. and READ, J. 1947. Nature 160, 608.
22. VILLALOBOS-PIETRINI, R. 1965. Bol. Soc. Bot. Méx. 29, 178.
23. VILLALOBOS-PIETRINI, R., CRUZ, T. y ALMAZANA, R. 1965. Proceedings of the Fifth interamerican Symposium on the Peaceful Application of the Nuclear Energy.
24. ———, (ed.) 1963. Radiations Induced Chromosome Aberrations, New York Univ. Press.
25. WOLFF, S. 1962 J. Theoret. Biol. 3, 304.
26. WOLFF, S. and BORSTEL, v. R. C. 1954. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 40, 1138.
27. WOLFF, S. and LUIPPOLD, H. E. 1955. Science 122, 231.
28. ZIRKLE, R. E. , URETZ, R. B. and HAYNES, H. 1960. Ann. N. Y. Acad. Sci. 90, 435.

Cromosoma completo	Rompimiento	Metáfase (Tipo de aberración)	Anafase (Tipo de aberración)	Fenómeno		
		Rompimiento Cromatídico	Fragmento	1 Impacto	Rompimiento	
		Rompimiento Isocromatídico	Fragmento Doble	1 ó 2 Impactos	Rompimiento	
		Intracambio Isocromatídico	Puente y Fragmento	1 ó 2 Impactos	Rompimiento y Reunión	
		Intracambio Isocromatídico	Puente y Fragmento Doble	1 ó 2 Impactos	Rompimiento y Reunión	
		Intracambio Isocromatídico	Fragmento	1 ó 2 Impactos	Rompimiento y Reunión	
		Intracambio Cromatídico	Fragmento	2 Impactos	Rompimientos y Reunión	
		Intracambio Cromatídico	Fragmento	2 Impactos	Rompimientos y Reuniones	
		Intracambio Cromatídico	Anillo y Fragmento	2 Impactos	Rompimientos y Reuniones	
			Intracambio Cromatídico	Fragmento	2 Impactos	Rompimientos y Reuniones
			Intracambio Cromatídico	Fragmento	2 Impactos	Rompimientos y Reuniones
Intracambio Cromatídico			Puente y Fragmento	2 Impactos	Rompimientos y Reuniones	
Intracambio Cromatídico			Puente y Fragmento	2 Impactos	Rompimientos y Reuniones	

Tabla 1. Aberraciones cromatídicas.

INSERTAR PG 175b

Tabla 2. Aberraciones cromosómicas.

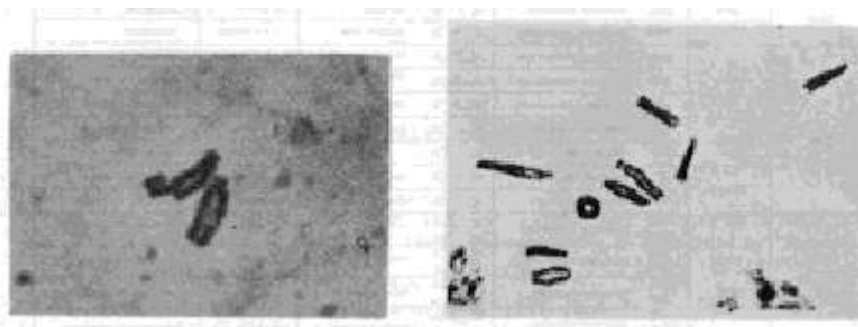


Fig. 1. Rompimiento cromatídico en cromosomas de *Vicia faba*.

Fig. 2. Anillo cromosómico en una célula meristemática de *Vicia faba*

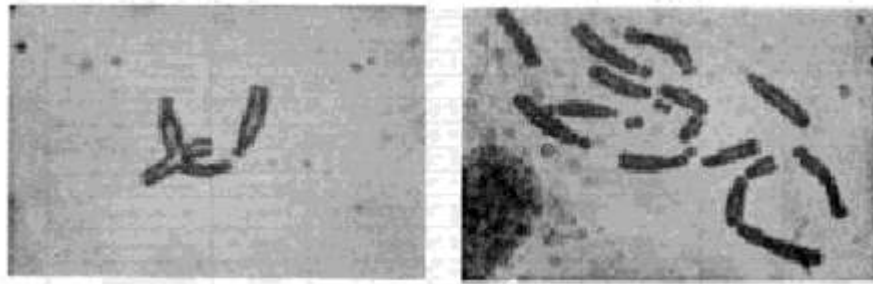


Fig. 3. Intercambio cromatídico en una célula de la raíz de *Vicia faba*.

Fig. 4. Dicéntrico y dos pares de fragmentos dobles en metafase de *Vicia faba*.

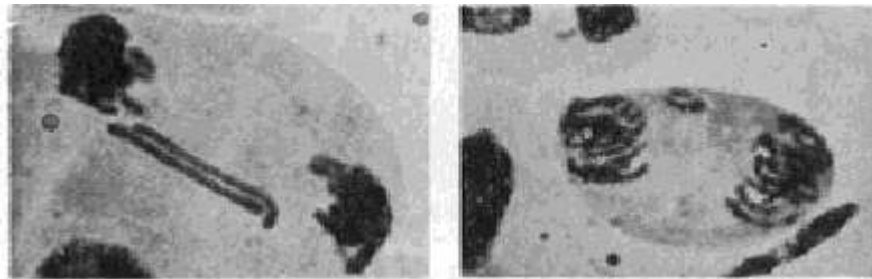


Fig. 5. Doble puente anafásico en una célula meristemática de la raíz de *Vicia faba*.

Fig. 6. Final de anafase con dos fragmentos en una célula de *Vicia faba*.

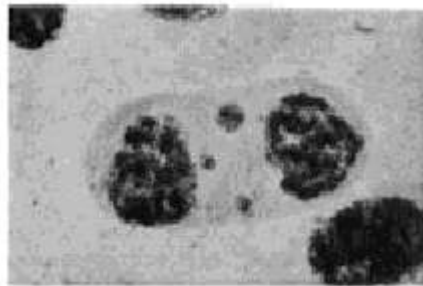


Fig. 7. Dos células de la raíz de *Vicia faba* en interfase conteniendo micronúcleos.