EFECTOS DE LA IRRADIACION EN RATONES SOBRE: FECUNDACION, EMBARAZO Y FETOS

Prof. FELIX WACHSMANN, Dr. ARMIN UTRERAS (1) y Dra. ERIKA SCHREINER

Instituto de Medicina Física, Universidad de Erlangen - Nürnberg

En los días actuales, sobre todo en centros de investigación atómica, es mayor la frecuencia de accidentes en los cuales uno o más individuos reciben dosis altas de radiación. En forma general, se ha observado en estos pacientes, que es factible la recuperación de los trastornos somáticos, en tanto que son permanentes las lesiones a nivel de las células germinales. Ante estas circunstancias, surge para el médico el dilema de si debe o no desaconsejar la procreación; y, en casos afirmativos, hasta por cuánto tiempo después de ocurrido el accidente.

A fin de dilucidar este problema se han realizado numerosas investigaciones tendientes a precisar la magnitud del efecto de los rayos ionizantes sobre las gonadas en la primera generación en ratones¹⁻³. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos, han considerado exclusivamente la fecundación temprana, es decir aquella que se realiza inmediatamente después de la irradia-

ción. Otras investigaciones se relacionan con el efecto de dosis progresivas de radiación sobre los diferentes estados de evolución de los embriones.

El presente trabajo tuvo por objeto determinar la relación que existe entre las lesiones o trastornos que se presentan en la primera generación de ratones y el tiempo transcurrido desde que se realiza el tratamiento de irradiación hasta que se lleva a cabo la fecundación. Según se conoce en los actuales momentos, las células germinales tienen diferente sensibilidad a la radiación, la cual depende del estado de madurez alcanzado por aquellas. Por otro lado, debe considerarse que a medida que transcurre el tiempo luego de la irradiación, las células lesionadas mueren y aparecen, en cambio, células sanas no afectadas por el tratamiento. Por tanto, puede esperarse que el efecto de la irradiación sobre la primera generación tenga características diferentes, según que la fecundación se

(1) Dirección actual: Departamento de Radiología: Hospital Militar, Quito.

realice inmediata o mediatamente al tratamiento con radiación ionizante.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratones jóvenes de la cepa NMRI. La irradiación se efectuó bajo las siguientes condiciones: 200 Kv. 20 mA. Filtro 0.5 Cu. CHR: 1.1 mm. Cu. Campos 3 cm. D. F. P. 28 cm. Rendimiento 157 r' minuto.

Los ratones fueron inmovilizados en un cilindro plástico y se irradió

luego el abdomen, incluyendo las gonadas, con dosis que variaron entre 200 y 600 r' en piel.

EXPERIMENTOS PREVIOS

Según varios autores, oscila entre amplios límites la dosis apropiada para producir lesiones en las gonadas. Por esto fue necesario efectuar experiencias previas para determinar la dosis óptima, capaz de ocasionar lesiones severas a nivel de las gonadas sin producir esterilidad definitiva, permitiendo su recuperación funcional.

Se irradiaron series de machos y hembras con dosis de 200, 400 y 600 r'. La fecundación se efectuó 10 y 20 días después de esta irradiación, en las siguientes combinaciones:

Serie 0 — animales de control.

Serie 1 — hembras irradiadas con machos no irradiados.

Serie 2 — machos irradiados con hembras no irradiadas.

Serie 3 — machos y hembras irradiados.

Las hembras fecundadas fueron sacrificadas por dislocación cervical a los 17 y medio días de iniciada la gestación. El útero fue abierto y su contenido examinado (Fig. 1). Este procedimiento fue necesario ya que cuando se espera el fin de la preñez, en forma normal, los animales muertos o anormales son devorados inmediatamente por la madre.

En el útero se registró minuciosamente el número de implantaciones y la cantidad de embriones vivos, muertos o reabsorbidos. Cada embrión, a su

Fig. 1.—Ratona sacrificada a los 17,5 días de preñez. La cavidad abdominal-pelviana está abierta y el útero expuesto. Obsérvese el aspecto de 10 implantaciones embrionarias normales.

vez, fue examinado en cuanto a su sexo, peso y posibles anomalías macroscópicas.

Según estos experimentos iniciales la dosis óptima encontrada fue de 400 r'.

EXPERIMENTOS PRINCIPALES

Se utilizaron las mismas series indicadas anteriormente: 0, 1, 2 y 3. Cada serie, a su vez, se dividió en 8 grupos diferentes de 20 ratones cada uno. En cada grupo se realizó la fecundación con intervalos de 1 a 3 días hasta 3 meses después de la irradiación. Simultáneamente se fecundaron animales de control, sin irradiar.

Para llevar a cabo la fecundación se juntaron 5 machos con 20 hembras. Las hembras fueron examinadas cada 12 horas, controlando la aparición del tapón vaginal, que es signo evidente de que la fecundación se ha llevado a cabo. Las hembras fecundadas fueron marcadas y colocadas en jaulas separadas según su grupo y serie.

En el caso del primer grupo, dentro de cada serie (fecundación de 1 a 3 días después de la irradiación) antes de someterles a tratamiento se examinaron previamente las hembras para determinar la fase de su ciclo mediante frotis vaginal; fueron seleccionadas sólo las que se encontraban en celo. Esta precaución fue necesaria para tener la seguridad de obtener, en este grupo, una fecundación temprana.

RESULTADOS

Experimentos previos:

Se examinaron 30 camadas provenientes de padres sin irradiar con un total de 306 implantaciones. Además 89 camadas de padres irradiados con un total de 747 implantaciones.

Con la dosis de 400 r', se observó un alto porcentaje de embriones reabsorbidos en todos los grupos. Los embriones reabsorbidos son considerados como efecto de mutaciones letales dominantes.

Llamó la atención la aparición de 2 embriones con exencefalia, así como un cráneospago igualmente con exencefalia.

Experimentos principales:

Fueron examinadas en total 249 hembras fecundadas, de las cuales 146 estuvieron preñadas y presentaron un total de 1.273 implantaciones, considerando exclusivamente la primera generación.

Serie 0: Nos sirvieron de control 42 hembras fecundadas, no irradiadas las cuales presentaron 419 implantaciones con 93% de embriones normales, 6 a 4% reabsorbidos y 0,6% de embriones muertos.

Con estos valores se relacionan los datos obtenidos con los animales irradiados.

Serie 1: Hembras irradiadas, fecundadas con machos sin irradiar. Se constatan lesiones de importancia cuando se realiza la fecundación de 1

Fig. 2.—Comparación del número de embriones normales, reabsorbidos y muertos en lotes de ratones cuyas gonadas fueron irradiadas con 400 r. Posteriormente las hembras fueron fecundadas a diferentes intervalos de tiempo: desde 1 a 3 días hasta 9 semanas después del tratamiento.

a 3 días después de la irradiación; en este grupo se encontró 35% de embriones reabsorbidos. (Fig. 2). Al final de la primera semana encontramos valores prácticamente normales. Cuando la copulación se realiza al final de la segunda semana, nuevamente hallamos un aumento considerable de reabsorciones y embriones muertos. La curva luego comienza a descender, para adoptar en séptima y novena semanas valores casi normales.

En el grupo de décimosegunda semana se presentaron muchos animales enfermos, razón por la cual no fueron considerados en el presente análisis.

Serie 2: Machos irradiados y hembras sin irradiar. Los resultados obtenidos en esta serie de ensayos se diferencian de los de la primera serie en que no se encontró el mínimo de lesiones al final de la primera semana. Por lo demás hallamos también aquí un

máximo de alteraciones al final de la segunda semana, con una tendencia gradual a la recuperación en semanas sucesivas (Fig. 2).

Serie 3: Machos y hembras irradiados. Esta serie presenta datos similares a los de la segunda serie. Lo que llama la atención es que no se puede apreciar ningún efecto de sumación de las lesiones, lo cual sería de esperarse después de irradiar ambos progenitores.

Al relacionar con los grupos de control el número de implantaciones y embriones normales de las 3 series experimentales, se observó lo siguiente: En todos los grupos, al finalizar la segunda semana se encontró el menor número de implantaciones y embriones normales, para luego poco a poco volver a las cifras del grupo de control. (Figs. 3, 4 y 5).

Se muestra aquí nuevamente que

Fig. 3.—Comparación del número de implantaciones y de embriones normales obtenidos en el lote de ratones de la serie I: madres irradiadas y fecundadas a diferentes intervalos de tiempo; padres no irradiados. Para detalles ver el texto.

Fig. 4.—Comparación del número de implantaciones y de embriones normales obtenidos en el lote de ratones de la serie II: Madres no irradiadas y fecundadas a diferentes intervalos de tiempo; padres irradiados. Para detalles ver el texto.

Fig. 5.—Comparación del número de implantaciones y de embriones normales obtenidos en el lote de ratones de la serie III: Madres irradiadas y fecundadas a diferentes intervalos de tiempo; padres irradiados.

Fig. 6.—Comparación del grado de fertilidad en hembras irradiadas con 400 r a nivel de sus gonadas: series I y III, o que fueron fecundadas con machos irradiados: series II y III. Obsérvese a nivel de la quinta semana, una esterilidad casi completa en las 3 series experimentales.

TABLA I
 DEFORMACIONES MACROSCOPICAS OBSERVADAS

DOSIS	TIEMPO DE FECUNDACION DESPUES DE LA IRRADIACION	IRRADIADOS	TIPO DE LA DEFORMACION
200 R.	10 DIAS	♂ + ♀	EXENCEFALIA Y CRANEOPOGO
"	20 "	♀	"
400 R.	1 SEMANA	♂	"
"	20 DIAS	♂ + ♀	"
600 R.	" "	♂	"

la mayor lesión de los embriones se produce en aquellos engendrados aproximadamente dos semanas después de la irradiación y que existe una recuperación casi total hacia la séptima y novena semanas.

El porcentaje de hembras preñadas en relación a las hembras que con seguridad fueron fecundadas, se indica en el diagrama de la Fig. 6.

En el grupo de control estuvieron preñadas el 88% de las hembras fe-

cundadas.

En todos los grupos se encontró una disminución de la fertilidad inmediatamente después de la irradiación, más acentuada cuando se irradió ambos progenitores. (Hay fecundación pero no preñez). Luego se aprecia una recuperación hasta valores normales al final de la primera semana para descender gradualmente hasta encontrar una esterilidad casi completa en la quinta semana. De allí en adelante se nota una

Fig. 7.—Deformaciones macroscópicas observadas en embriones provenientes de progenitores irradiados con 400 r en sus gonadas.

1) embrión normal. 2) Exencefalia.
3) y 4) Exencefalia y craneópago.

recuperación progresiva que, sin embargo, no llega a valores normales hasta la décimosegunda semana.

Es interesante señalar que en la quinta semana, en la que hay una gran disminución de la fertilidad, se observó que las hembras preñadas presentan un número prácticamente normal de implantaciones y embriones sanos.

En cuanto a la relación del sexo, no encontramos cambios de significación en los embriones estudiados. Tampoco el peso registrado nos dio datos de importancia.

Malformaciones observadas: En los 1.388 embriones examinados, encontramos 5 con exencefalia. Tabla I. Uno de estos embriones fue cráncupago. (Fig. 7).

DISCUSION

Examinando los resultados obtenidos al irradiar las gonadas femeninas y con fecundación temprana, se observó un número considerable de embriones reabsorbidos. El número total de implantaciones no está sensiblemente reducido, con respecto al valor promedio normal. Esto se puede interpretar en el sentido de que los óvulos irradiados poco antes de la fecundación no pierden su fertilidad; sin embargo, su desarrollo posterior está fuertemente interferido en la fase muy temprana. Esta observación coincide con la experiencia realizada por Nurnberger³.

Cuanto mayor es el tiempo entre la irradiación y la fecundación tanto me-

nor es el número de embriones muertos o reabsorbidos.

Con la dosis por nosotros empleada se aprecia la mayor disminución de la fertilidad a la quinta semana con moderada tendencia a la recuperación en las siguientes semanas.

Al irradiar las gonadas masculinas hallamos, igualmente al final de la primera semana, un gran número de embriones reabsorbidos. Este número aumenta en la segunda y tercera semanas para llegar a valores normales al final de la quinta semana.

De esto se deduce, en primer lugar, que los espermatozoides maduros no han sufrido en su fertilidad; y segundo, que los espermatozoides que han madurado 14 días después de la irradiación se encontraban en la fase más sensible a los rayos.

Bateman⁶ encontró igualmente el mayor número de embriones no desarrollados en la tercera semana después de la irradiación de las gonadas masculinas.

En este grupo constatamos igualmente que al finalizar la segunda semana hay un gran número de hembras fecundadas que no han quedado preñadas, encontrándose en la tercera semana valores prácticamente normales.

Este fenómeno es de difícil interpretación y seguramente se debe a la diferente sensibilidad de las células germinales en las fases de la espermatogénesis.

Al final de la quinta semana se aprecia una esterilidad casi completa, con una tendencia franca a la recuperación en semanas posteriores.

De esto podemos deducir, que el

desarrollo de los espermatozoides dura de 5 a 6 semanas y, teniendo en cuenta la normalización de los valores de las implantaciones y reabsorciones al final de la quinta semana, podemos deducir igualmente que las lesiones provocadas en las células germinales antes de la meiosis no son transmisibles a los espermatozoides maduros.

Al contrario de lo que podría esperarse, no hay una suma de efectos cuando se irradian ambos progenitores. La curva de reabsorciones e implantaciones, corresponde aproximadamente a la curva obtenida cuando se irradia únicamente los machos.

Solamente en la curva de la fertilidad apreciamos en este grupo con fecundación temprana, un aumento de la cantidad de hembras no preñadas, que podría corresponder a un efecto de suma. La esterilidad casi completa se presenta aquí igualmente al final de la quinta semana.

En cuanto a las malformaciones observadas en el presente trabajo, cabe anotar que se acepta en forma general, que no se encuentran malformaciones en la primera generación al irradiar las gonadas antes de la fecundación (exceptuando naturalmente las mutaciones letales dominantes).

Únicamente Hertwig⁷ manifiesta haber encontrado mutaciones que consistían esencialmente en malformaciones de la cola, de las extremidades y microftalmias. En ningún caso encontró exencefalias.

Como las exencefalias son malformaciones extremadamente raras en ratones, y tampoco encontramos ningún caso en nuestro grupo de control, nos

creemos autorizados para considerar estas malformaciones como verdaderas mutaciones inducidas por la irradiación.

Haile y Bagg⁸, Kaven⁹, Wilson y Karr¹⁰, Russell¹¹, Hicks¹², y algunos otros autores se han ocupado intensivamente de investigar la aparición de malformaciones del sistema nervioso central después de la irradiación de embriones de ratones. Según ellos, se encuentran con más frecuencia malformaciones del sistema nervioso central, incluyendo exencefalias, cuando la irradiación se realiza al noveno día de la gestación. A esta altura es el neuroblasto, el grupo celular más numeroso, de modo que una lesión del embrión en este período produce esencialmente malformaciones del sistema nervioso central.

RESUMEN

Mediante ensayos previos en ratones, se encontró que 400 r², es la dosis de irradiación capaz de producir lesiones transitorias a nivel de las gonadas, con recuperación funcional posterior.

Luego se determinó la relación que existe entre la frecuencia de alteraciones embrionarias en la primera generación de ratones y el tiempo transcurrido entre la irradiación de las gonadas y la fecundación.

Al irradiar las gonadas femeninas con fecundación temprana (1 a 3 días después del tratamiento) se encontró 35% de embriones reabsorbidos, sin

reducción apreciable del número de implantaciones.

Irradiando las gonadas masculinas, al final de la primera semana hay un número igual de embriones reabsorbidos; este número aumenta en la segunda y tercera semanas, para llegar a valores normales al final de la quinta semana.

Se observó una disminución de la fertilidad en las hembras que fueron fecundadas inmediatamente después del tratamiento de irradiación; cuando la fecundación se llevó a cabo después de la quinta semana, se encontró una esterilidad casi completa, con tendencia franca a la recuperación en las semanas siguientes.

Las malformaciones encontradas en 1.388 embriones examinados, fueron la exencefalia (5 casos) y un craneopago.

SUMMARY

On previous tests done on mice, the irradiation dose capable of producing transitory injury to their gonads, with posterior functional recovery, was found to be 400 r.

Later, the existing relation between the frequency of embryonary alterations on mice of the first generation and the time that elapsed between gonad irradiation and fecundation, was also determined.

While irradiating feminine gonads with an early date of fecundation (1 to 3 days after treatment), it was found that 35% of all embryos were reabsorbed without appreciable reduction on the number of implantations.

On masculine gonad irradiation, it

was noticed that by the end of the first week there is an equal number of reabsorbed embryos; this number was found increased on the second and third weeks, and reached normal figures by the end of the fifth week.

The following observations were also made:

a) Fertility decreased on female mice which were fecundated immediately after irradiation treatment.

b) When fecundation took place after the fifth week from the date of treatment, a near total sterility with a marked tendency towards recovery on the following weeks, was also to be noticed.

The abnormal formations found in the 1.388 embryos examined were:

a) Exencephalia: five cases; b) craneopagus: one case.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BAGG, H. J., LITTLE, C. C., *Amer. J. Anat.* 33: 119, 1924.
2. MARTIUS, H., FRANKEN, H., *Zbl. Gynak.* 50: 25, 1926.
3. NURNBERGER, L., *Strahlentherapie* 21: 577, 1926.
4. SNELL, G. D., DICHEN, D., *J. Genet.* 31: 213, 1935.
5. RUSSELL, T. B., RUSSELL, W. L., *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 19: 50, 1954.
6. BATKMAN, A. J., *Nature* 178: 1278, 1956.
7. HERTWIG, P., *Biol. Zbl.* 58: 273, 1938.
8. BAILY, H., BAGG, H., *Amer. J. Obstet. Gynec.* 5: 561, 1923.
9. KAVEN, Z., *Z. Mensch. Vererb. u. Konstit. Lehre.* 22: 238, 1938.
10. WILSON, J. G., KARR, J. W., *Amer. J. Anat.* 88: 1, 1951.
11. RUSSELL, L. B., *J. exp. Zool.* 114: 545, 1959.
12. HICKS, S. P., *J. Pediatr.* 40: 489, 1952.