

INFLUENCIA DEL COMPLEJO SEROTONINA-SULFATO DE CREATININA EN LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LA RAZÓN DE DOSIS Y EL FRACCIONAMIENTO DE LA DOSIS DE RAYOS X EN LA FRECUENCIA DE MORTALIDAD DE *DUGESIA DOROTOCEPHALA* (TRICLADIDA, PALUDICOLA)

RAFAEL VILLALOBOS-PIETRINI *

RESUMEN

Se demuestra que el factor de reducción de dosis (DRF) obtenido cuando se administra el complejo de serotonina-sulfato de creatinina (5-HT) es mayor a medida que decrece la razón de dosis de rayos X. También 5-HT es efectiva cuando se fraccionan las dosis. El aumento de planarias supervivientes al fraccionar dosis subletales se adjudica (Lange, 1968) a la multiplicación de neoblastos que producen la repoblación. Con esta hipótesis no se explica el aumento de supervivencia por acción de 5-HT cuando se fraccionan dosis supraletales, lo que indicaría la existencia de un mecanismo de reparación celular.

ABSTRACT

It is shown that the dose reduction factor (DRF) is larger with the diminution of dose-rate of X-rays in presence of serotonin-creatinine sulfate complex (5-HT). 5-HT is also effective when the dose has been fractionated. Although it is considered that during an exposition to a fractionated sublethal dose there is an increase in survival and in repopulation due to the multiplication of neoblasts (Lange, 1968), this does not explain the increase of survival by 5-HT when a fractioned supralethal dose is applied. It appears more likely to be due to a mechanism of cellular repair.

INTRODUCCIÓN

Se ha descrito la influencia de la razón de dosis y del fraccionamiento de la dosis en las frecuencias de aberraciones de doble impacto (Sax, 1939, 1940), así como también, en algunos casos de mutaciones puntuales (Tazima *et al.*, 1961; Russell, 1965; Baldwin, 1965). La mayor letalidad en las exposiciones de corto tiempo y en las sin fraccionar, puede explicarse por la existencia de mecanismos de recuperación del daño de radiación (Russell, 1958; Tazima y Kondo, 1963).

Se ha demostrado que el complejo

serotonina-sulfato de creatinina (5-HT) protege a las planarias contra los rayos X (Laguarda-Figuera y Villalobos-Pietrini, 1969) y que aplicado como post-tratamiento, también disminuye la mortalidad (Villalobos-Pietrini y Laguarda-Figuera, en preparación), por lo cual es de importancia conocer el efecto de 5-HT cuando se aplican diferentes intensidades de radiación y también cuando se fraccionan las dosis para hacer consideraciones sobre los factores de reducción de dosis y también acerca de la existencia de mecanismos de reparación.

* Laboratorio de Genética y Radiobiología. Instituto de Biología, UNAM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las planarias utilizadas fueron identificadas como *Dugesia dorotocephala* por R. Lamothe (Laboratorio de Helmintología, UNAM) mediante cortes sagitales seriados y teñidos con hematoxilina-eosina. Fueron colectadas en un estanque del Jardín Botánico del Instituto de Biología (UNAM) entre las raíces del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y se mantuvieron a la temperatura del laboratorio (alrededor de 25°C) en recipientes de 3,200 cc con agua purificada (Electropura, México, D. F.) alimentándolas dos veces a la semana con un licuado de hígado de cerdo o de res que se agregó al medio a una concentración final de 4 mg/ml. Es importante señalar que se interrumpió el suministro de alimento a las planarias de los experimentos, una semana antes de la irradiación, y así se mantuvieron durante todo el tiempo de observación (60 días).

Se utilizó como fuente de radiación al acelerador Van de Graaff (Instituto de Física, UNAM) con un blanco de oro, operado a 1.5 MeV y con una corriente de haz de electrones de 20 μ A. Se determinaron las dosis absorbidas en rads (r) mediante un dosímetro químico, la solución acuosa de cloral hidratado (0.2 M.). Reyes *et al.* (1968) demostraron que las soluciones acuosas mencionadas pueden ser utilizadas para dosimetría con niveles bajos de dosis debido a que es posible obtener una relación entre el pH y la dosis. Se estableció la siguiente relación dosimétrica para el cloral hidratado 0.2 M.

$$D = \frac{(\text{pH})_0 - (\text{pH})_1}{4.45} \times 10^4 \text{ rads}$$

en donde $(\text{pH})_0$ y $(\text{pH})_1$ son los pH de las soluciones inicial e irradiada, respectivamente.

La dosis absorbida se determinó utilizando la siguiente expresión

$$D_p = \frac{(\mu/\rho)_p}{(\mu/\rho)_d} D_d$$

en donde, D_p y D_d , son las dosis para las planarias y el dosímetro, respectivamente, y $(\mu/\rho)_p$ y $(\mu/\rho)_d$ los promedios de los coeficientes de absorción de masa de las planarias y el dosímetro, respectivamente. Como el cociente de los coeficientes es 1, la dosis absorbida por las planarias se cuantificó directamente de: $D_p = D_d$.

La sustancia utilizada, la serotonina (5-hidroxitriptamina), tiene un peso molecular de 176.2 y es preparada con una sal de sulfato de creatinina (peso molecular 405.4), constituyendo así el complejo de serotonina-sulfato de creatinina (Hy-cel, Houston, Texas, EUA).

Los experimentos de irradiación X se hicieron bajo el diseño necesario para aplicar el método de Reed y Muench (1938), con grupos de la misma cantidad de planarias (60) y con dosis que aumentaron logarítmicamente.

Para los experimentos de razón de dosis se seleccionaron las siguientes: 14.63, 26.47 y 112.5 r/min y las dosis totales fueron 200, 400, 800, 1600, 3200 y 6400 r, como aparece en la Tabla 1.

Para los experimentos de comparación de efectos entre dosis única y dosis fraccionada, se aplicaron dosis totales de 3200 r y con razón de dosis fija de 112.5 r/min; las exposiciones y los intervalos en cada experimento, fueron de la misma longitud (Tabla 2).

La dosimetría y la irradiación del material se realizaron en frascos (Kimax) de 5 cc.

TABLA 1

LETALIDAD PRODUCIDA EN *DUGESIA DOROTOCEPHALA* POR DIVERSAS DOSIS DE RAYOS X APLICADAS A DIFERENTES RAZONES DE DOSIS CON Y SIN TRATAMIENTO DE 5-HT. LD_{50/60} Y DRF

Dosis (r X 10 ²)	% de mortalidad en las razones de dosis (r/min)					
	14.63		26.47		112.5	
	Sin 5-HT	Con 5-HT	Sin 5-HT	Con 5-HT	Sin 5-HT	Con 5-HT
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	39.3	10
8	4	0	25	4.9	74.7	48
16	84	0	100	8.7	98.0	93.7
32	100	45	100	95.5	100	100
64	100	100	100	100	100	100
LD _{50/60} (r)	1192	3385	1014	2225	493.2	825.8
DRF	2.92		2.19		1.67	

TABLA 2

LETALIDAD PRODUCIDA EN *DUGESIA DOROTOCEPHALA* POR 3200 r DE RAYOS X APLICADOS EN DOSIS ÚNICA Y FRACCIONADAMENTE CON Y SIN TRATAMIENTO DE 5-HT

Razón de dosis = 112.5 r/min.

Exposiciones e intervalos de la misma longitud

Número de Exposiciones	Número de Intervalos	Tiempo de cada exposición e intervalo	% de mortalidad	
			Sin 5-HT	Con 5-HT
1	—	28'2"	100	100
2	1	14'13"	100	60
4	3	7'7"	100	20
8	7	3'33"	100	10

RESULTADOS

Se hicieron registros diarios de la mortalidad ocurrida en cada frasco de 60 planarias. Los resultados aparecen en las porciones centrales de las Tablas 1 y 2.

Se calculó la dosis letal media en 60 días (DL_{50/60}) de los resultados obtenidos con las diferentes razones de

dosis (r/min), y se requirieron mayores dosis cuando se aplicó 5-HT. La mortalidad disminuyó al aumentar la razón de dosis (Figs. 1 y 2). Se calculó también el factor de reducción de dosis (DRF) producido por 5-HT, que fue mayor a razones de dosis menores y viceversa.

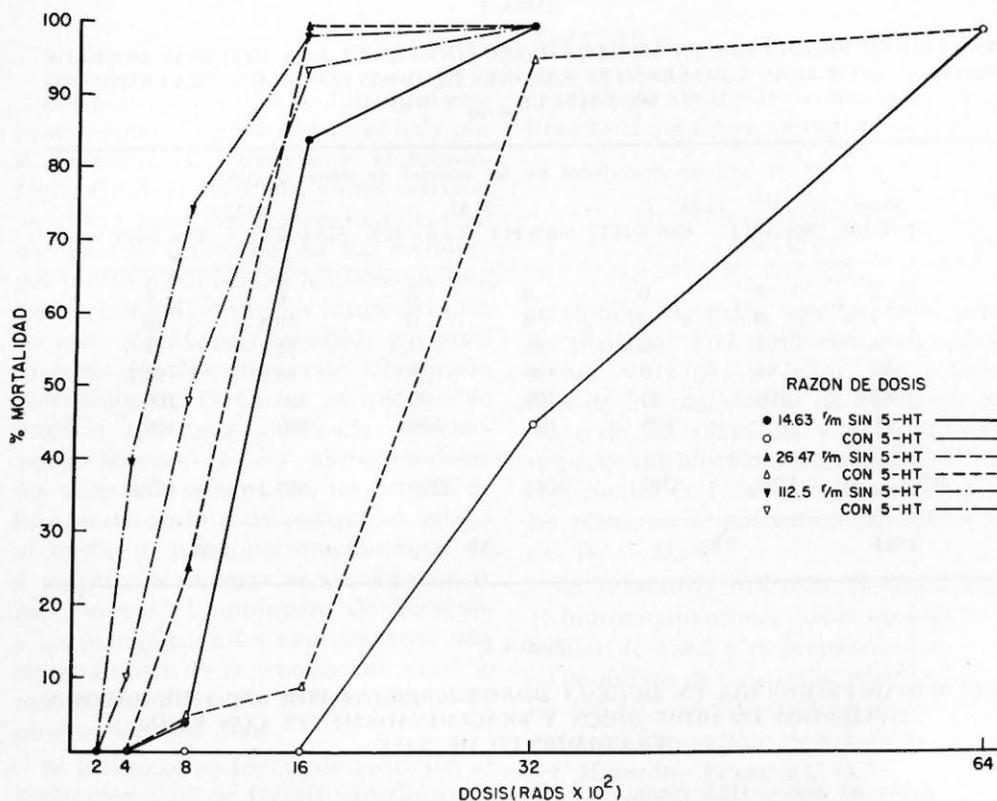


Fig. 1. Mortalidad producida en planarias por diversas dosis de rayos X aplicadas con diferentes intensidades, con y sin tratamiento con el complejo serotonina-sulfato de creatinina.

La comparación de los efectos producidos por la dosis única y la dosis fraccionada aparece en la Tabla 2 y es notable la disminución de la mortalidad

producida por 5-HT al aumentar el número de intervalos y de exposiciones, o sea el fraccionamiento de las dosis con una dosis total fija (3200 r).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Ya establecida la intervención de 5-HT en la recuperación de las planarias a los rayos X, es posible hacer consideraciones sobre esta conclusión mediante el análisis de la influencia de la sustancia mencionada en los efectos producidos al variar tanto la razón de dosis como el fraccionamiento de la dosis.

Al aplicar dosis constantes y disminuir la intensidad de las radiaciones y con ello el tiempo de cada una de las

exposiciones, se logra aumentar la supervivencia en las poblaciones de planarias, lo que indica que a mayor intensidad no solamente se afecta la(s) molécula(s) crítica(s) sino también se interfiere la acción del mecanismo de reparación. Cuando se suministra 5-HT el DRF es mayor conforme decrece la razón de dosis, lo cual demuestra que al alargar el tiempo de exposición a las radiaciones y aumentar así el lapso de

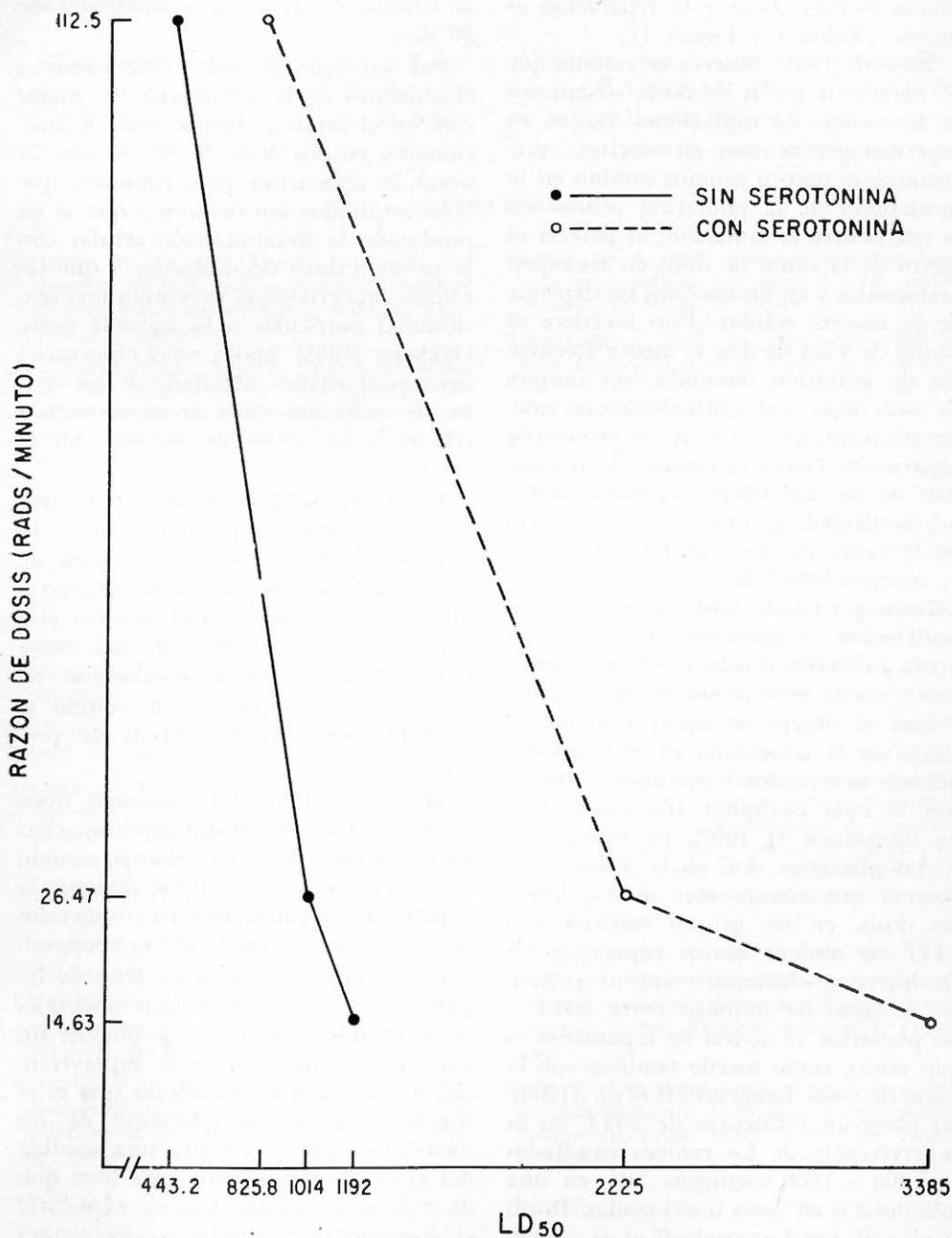


Fig. 2. Relación entre la dosis letal media ($LD_{50/60}$) y la intensidad de la radiación, con y sin tratamiento con el complejo serotonina-sulfato de creatinina.

contacto de 5-HT con las planarias, su acción es más eficaz y la reparación es mayor (Tabla 1 y Figura 1).

Russell (1961) observa en ratones que al reducir la razón de dosis, disminuye la frecuencia de mutaciones (tanto en espermatogonias como en ovocitos), presentándose poco o ningún cambio en la mortalidad de la población celular en la que ocurre la mutación; al parecer el efecto de la razón de dosis en las espermatogonias y en los ovocitos no depende de la muerte celular. Esto fortalece el punto de vista de que la menor frecuencia de mutación obtenida con razones de dosis bajas es el resultado de una recuperación intracelular o de un proceso de reparación. Como el cambio de intensidad de las radiaciones tampoco afecta a la fertilidad, se considera que el efecto de la razón de dosis en las mutaciones es independiente de la selección celular (Oakberg y Clark, 1961), o sea que aparentemente el fenómeno de reparación actúa a diversos niveles en el daño somático y en la producción de mutaciones.

Con el objeto de hacer evidente el efecto de la serotonina en el fraccionamiento, se seleccionó una dosis (3200 r) con la cual cualquier fraccionamiento no disminuyó el 100% de mortalidad en las planarias. Así, en la Tabla 2, se observa que cuanto más se fraccionan las dosis, en los grupos tratados con 5-HT, se obtiene mayor supervivencia. De nuevo se demuestra que al aumentar el lapso de contacto entre 5-HT y las planarias, la acción de reparación es más eficaz, como sucede también con la razón de dosis. Langendorff *et al.* (1965) no observan influencia de 5-HT en la supervivencia de los ratones irradiados con 800 a 1600 roentgens (R) en una sola dosis o en dosis fraccionadas. Doull *et al.* (*cit.* por Langendorff *et al.*, 1965) describen un efecto menor de 5-HT cuando se suministran fracciones diarias de 100 a 200 R que al aplicar una sola dosis de 1000 a 2000 R; no obstante,

obtienen un DRF de 2.0 con 5-HT en la irradiación repetida a intervalos de 30 días.

Por otro lado, Russell (1962) observa el aumento de la frecuencia de mutación en el ratón al aplicar 1000 R fraccionados en dos dosis de 500 R, con 24 horas de separación, pero considera que estos resultados son debidos a que se ha producido la sincronización celular con la primera dosis de radiación y que las células supervivientes presentan una sensibilidad particular a la segunda dosis. Oakberg (1965) apoya estas observaciones con el análisis detallado de los efectos de radiación sobre la supervivencia celular y los ciclos de división en el ratón.

Se ha demostrado (Wolff, 1961) que las aberraciones cromosómicas no se fijan necesariamente en el momento de la irradiación sino que opera un mecanismo de reparación en el periodo posirradiación, el cual depende del metabolismo celular, de la producción de energía, de la especificidad celular y, probablemente, de la síntesis de proteínas.

Maggiore (1961), al fraccionar dosis de 800 a 1600 R, disminuye los efectos de los rayos X en los cobayos; cuando el lapso es de 24 horas, no se presenta la depilación, mientras que con intervalos de 6 y 12 horas la depilación es temporal.

Lange (1968) observa en *Dugesia lugubris* que al fraccionar dosis subletales en intervalos de 48 horas, se obtiene un aumento significativo en la supervivencia, lo cual le hace considerar que es el resultado de la multiplicación de los neoblastos, que representa una medida del grado de repoblación más bien que de reparación celular. Esto no explicaría el aumento de planarias supervivientes por la acción de 5-HT cuando se fraccionan dosis supraletales, lo que sería un índice del restablecimiento de los mecanismos de reparación.

AGRADECIMIENTOS

El autor está muy reconocido a J. Reyes Luján y a M. A. Limón del Laboratorio Van de Graaff, Instituto de Física

(UNAM), por los trabajos de dosimetría y a F. Velázquez por su colaboración en la irradiación del material.

LITERATURA

- BALDWIN, W. F., 1965. Visible mutations frequencies in *Dahlbomimus* oögonia produced by acute X-rays and chronic γ -radiation. *Mutation Res.* 2: 55-59.
- LAGUARDA-FIGUERAS, A. y R. VILLALOBOS-PIETRINI, 1967. Protection by serotonin-creatinine sulfate complex of the planaria *Dugesia tigrina* against lethal effects of X-rays. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 126: 667-669.
- LANGE, C. S., 1968. Studies on cellular basis of radiation lethality IV. Confirmation of the validity of the model and the effects of dose fractionation. *Int. J. Radiat. Biol.* 14: 539-551.
- LANGENDORFF, H., M. LANGENDORFF y H. J. MELCHING, 1965. On the influence of external factors upon the efficacy of radioprotective substances. *Progr. biochem. Pharmacol.* 1: 418-426.
- MAGGIORA, A., 1961. L'epilation par rayons X chez le cobaye. *Dermatologica* 123: 115-118.
- OAKBERG, E. F., 1965. The effects of dose rate and quality of radiation on the dynamics and survival of the spermatogonial population of the mouse. *Jap. J. Genet.* 40: 119-127.
- OAKBERG, E. F., y E. CLARK, 1961. Effect of dose and dose rate on radiation damage to mouse spermatogonia and oocytes as measured by cell survival. *J. cell. comp. Physiol.* 58: 173-182.
- REED, J. y H. MÜENCH, 1938. A simple method of stimulating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- REYES, J., S. A. REYES y M. A. LIMÓN, 1968. Dosimetry studies and radiolysis of aqueous solutions of chloral hydrate. *Revta mex. Fis.* 17: 263-287.
- RUSSELL, W. L., 1961. Effect of radiation dose rate on mutation in mice. *J. cell. comp. Physiol.* 58, Suppl. 1: 182-187.
- RUSSELL, W. L., 1962. An augmenting effect of dose fractionation on radiation induced mutation rate in mice. *Proc. natn. acad. Sci. U. S. A.* 48: 1714-1727.
- RUSSELL, W. L., 1965. The nature of the dose-rate effect of radiation on mutation in mice. *Jap. J. Genet.* 40: 128-140.
- RUSSELL, W. L., L. B. RUSSELL y E. M. KELLY, 1958. Radiation dose rate and mutation frequency. *Science* 128: 1546-1550.
- SAX, K., 1939. The time factor in X-ray production of chromosomes aberrations. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 25: 225-233.
- SAX, K., 1940. An analysis of X-ray-induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics* 25: 41-68.
- TAZIMA, Y. y S. KONDO, 1963. Differential radiation sensitivity of germ cells as a possible interpretation of sex difference in dose-rate dependence of induced mutations rates in the silkworm. In: Sobels, F. M. (Ed.) *Repair from genetic radiation damage*. Pergamon, Oxford, pp. 237-248.
- TAZIMA, Y., S. KONDO, y T. SADO, 1961. Two types of dose-rate dependence of radiation induced mutation rates in spermatogonia and oögonia of the silkworm. *Genetics* 46: 1335-1345.
- WOLFF, S., 1961. Some postirradiation phenomena that affect the induction of chromosome aberrations. *J. cell. comp. Physiol.* 58, Suppl. 1: 151-162.