

Departamento de Radiobiología

Informe de Actividades

1975 - 1976

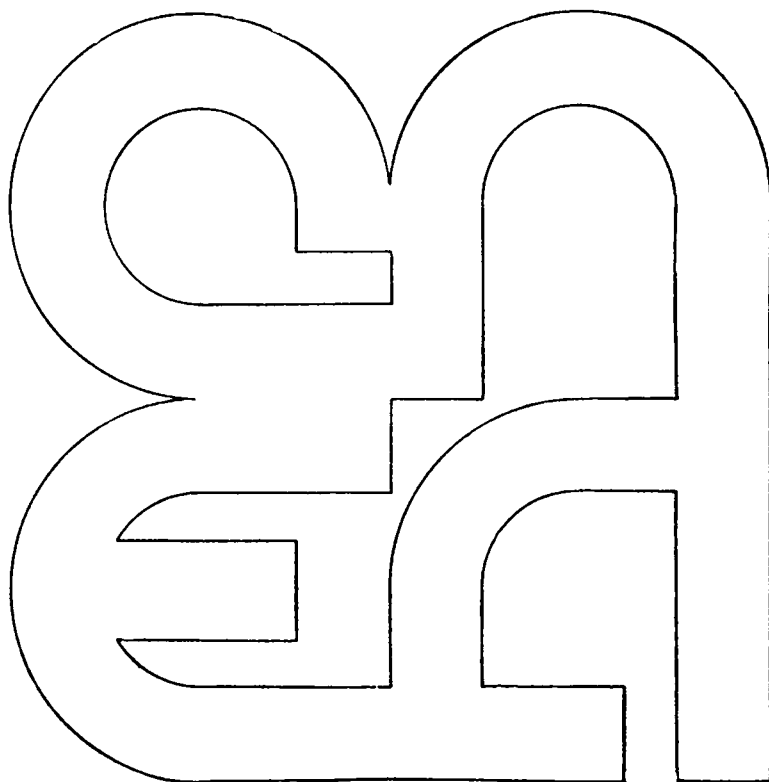
Comisión Nacional
de Energía Atómica

Dirección de
Investigación y Desarrollo

Gerencia de
Investigaciones

República Argentina

Buenos Aires - Marzo 1977



Departamento de Radiobiología

Informe de Actividades

1975 - 1976

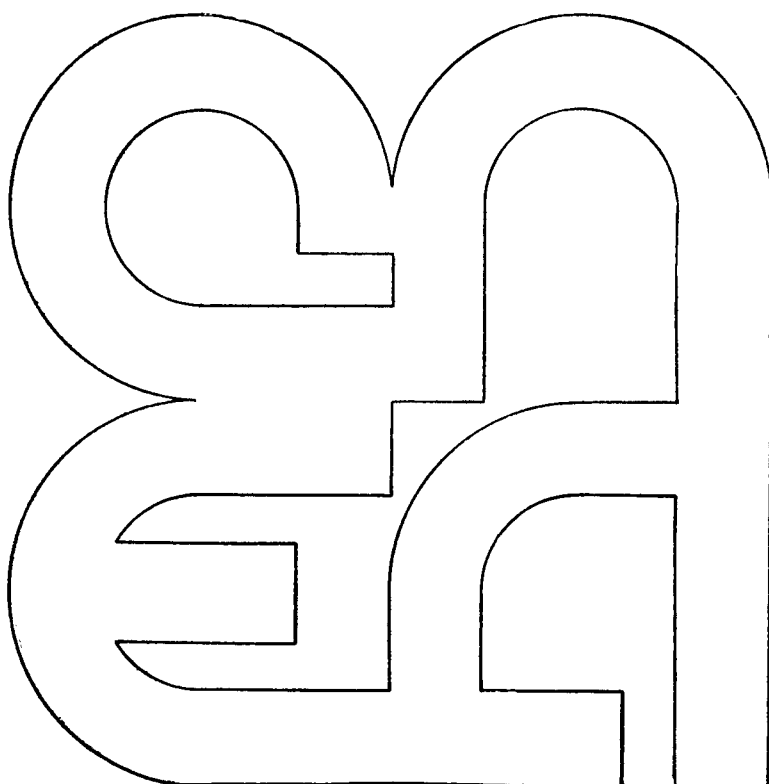
Comisión Nacional
de Energía Atómica

Dirección de
Investigación y Desarrollo

Gerencia de
Investigaciones

República Argentina

Buenos Aires - Marzo 1977



Introducción

El Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica presenta en este informe un detalle de sus actividades de los últimos años. Es éste el fruto del esfuerzo no solo de los autores de los trabajos que allí figuran y sus colaboradores sino también el de toda una Institución que con indeclinable visión de futuro busca el permanente progreso científico del país.

Nacido como Departamento de Biología y Medicina, el actual Departamento de Radiobiología fue el origen de otras importantes actividades dentro de esta Casa y en el se formaron o perfeccionaron, a lo largo de sus 20 años de vida, científicos que hoy desarrollan sus investigaciones en algunos de los más destacados laboratorios del país y del exterior.

No puedo dejar de mencionar que nuestro Departamento ha realizado importantes contribuciones al conocimiento del daño biológico producido por la exposición a las radiaciones y a los mecanismos de reparación de dicho daño, desarrollando para ello metodología muy especializada.

El nivel alcanzado por nuestros investigadores en el manejo de esa compleja metodología es ampliamente conocido en el país, y las consultas y pedidos de asesoramiento que se reciben permanentemente sobre autorradiografías, mapeos cromosómicos, inducción de mutaciones, estudios sobre ácidos nucleicos, inmunología, microespectrofotometría, radioinmunoensayos, ultraestructura celular por microscopía electrónica, etc., permiten que los beneficios de esa capacitación difundan al ámbito nacional.

Los servicios prestados por nuestra Sección Irradiación y Dosimetría han sido empleados en la realización de numerosos trabajos científicos dentro y fuera de la Casa, y lo mismo ocurre con los animales de experimentación provistos por nuestro Departamento. La excepcional calidad de estos últimos se verá acrecentada cuando próximamente comience sus funciones en el Centro Atómico Ezeiza un moderno edificio dedicado a la cría de pequeños mamíferos libres de gérmenes patógenos.

Mi intención de no dar nombres de personas que contribuyeron a los logros alcanzados, para no cometer injusticia por omisión, se quiebra ante la nueva entrada del Dr. Andrés Klein-Szanto para reclamar esta Introducción. Su dedicación y entusiasmo como Editor del presente Informe lo hacen acreedor a nuestro profundo agradecimiento.

Vicente Luis Orce
Jefe Departamento Radiobiología

RESUMEN

La investigación realizada durante los dos últimos años ha sido orientada, como en los años anteriores, al estudio del daño por radiación producido en diferentes sistemas biológicos, como asimismo al desarrollo de técnicas nuevas que permitan una mejor evaluación del efecto de las radiaciones ionizantes.

Los sistemas utilizados comprenden modelos microbiológicos, insectos y mamíferos y las técnicas empleadas para los distintos trabajos variaron marcadamente, de acuerdo con el problema atacado.

Para un mejor ordenamiento de este informe bianual, el programa de actividades ha sido esquemáticamente subdividido en los siguientes encabezamientos:

A) Bioquímica, B) Inmunología, C) Genética, D) Microbiología, E) Efectos somáticos (Oncología), F) Patología y 6) Irradiación y dosimetría.

Cada una de estas secciones comprende una serie de trabajos resumidos de las principales investigaciones desarrolladas en el Departamento. Los lectores interesados en mayores detalles, podrán satisfacer sus inquietudes en el futuro próximo, tan pronto como estos trabajos aparezcan en la literatura científica.

El editor desea expresar su agradecimiento a los Dres. R.L. Cabrini y L. V. Orce, Gerente de Investigaciones y Jefe del Departamento de Radiobiología respectivamente por los comentarios y el apoyo brindado, como así también al Dr. E. Ventura por su desinteresada colaboración, a todos los autores de los diversos trabajos que contribuyeron con gran dedicación a facilitar las tareas del editor, a la Srta. M.T. de Luca por su cooperación en la preparación de la versión final del informe y al Sr. A. Binda por el valioso esfuerzo realizado en la impresión del presente informe.

A. Klein-Szanto

INDICE

	página
A. BIOQUIMICA	
A. 1 Bases moleculares de la producción e involución del bocio. I. Acción del yoduro sobre la incorporación de ^3H - Leucina y ^{14}C galactosamina a proteínas tiroideas.	1
A. 2 Bases moleculares de la producción e involución del bocio. II. Acción del yoduro, tiroxina y AMP cíclico sobre la incorporación de ^3H -uridina y ^{32}P a ARN tiroideo.	4
A. 3 Bases moleculares de la producción e involución del bocio. III. Acción de nucleótidos cíclicos sobre la incorporación de ^3H -uridina a ARN tiroideo y de ^3H -leucina a proteínas.	7
A. 4 Metabolismo del ^{131}I en el estudio de drogas antitiroideas	10
A. 5 Correlación entre el peso molecular estimado y las propiedades inmunológicas del ^{125}I -TSH	13
A. 6 Estudios biológicos en un primate argentino, mediante el uso de trazadores radioactivos	18
A. 7 Estudios con ^{67}Co y ^{64}Co en rumiantes con carencia condicionada de cobre. Resultados preliminares.	21
A. 8 Radioinmunoanálisis de digitálicos. Su normalización	24
B. GENETICA	
B. 1 Pruebas genéticas con BHT y rayos X en espermatozoides maduros de <u>Drosophila melanogaster</u>	32
B. 2 Pruebas de letales recesivos ligados al sexo con 1Ben-cil-3- (2,3-dihidroxipropoxi)-indazol y 2N-butil-malon di (dimetilamina propil)	34
B. 3 Influencia de la retención de huevos sobre la frecuencia de letales dominantes en <u>Drosophila melanogaster</u>	36
B. 4 Influencia de la temperatura sobre la recuperación de daño genético inducido por rayos en machos de <u>Drosophila melanogaster</u>	39
B. 5 Datos preliminares sobre la reversión del locus para dehidrogenasa alcohólica en <u>Drosophila melanogaster</u>	42

B. 6	Frecuencia de translocaciones inducidas por rayos X en macho de <u>Drosophila melanogaster</u> pretratados con cloranfenicol.	44
B. 7	Letales dominantes inducidos por dietilsulfato en <u>Drosophila melanogaster</u>	47

C. RADIOINMUNOLOGIA

C. 1	Reacción antialogeneica en cámaras de difusión. I. Evidencia de destrucción celular	50
C. 2	Reacción anti-alogeneica en cámaras de difusión. II. Demostración de la existencia de un anticuerpo humoral.	53
C. 3	Efecto de la fitohemaglutinina sobre el bazo, el ganglio linfático y el tipo de ratón.	55
C. 4	Bocio familiar con bloqueo parcial de la incorporación de iodo y eutiroidismo debidos al defecto peroxidasa deficiente.	58
C. 5	Acción de las radiaciones gamma sobre la molécula de anticuerpo. I. Estudios inmunológicos del antisuero o tiroglobulina humana	61
C. 6	Acción de las radiaciones gamma sobre la molécula de anticuerpo. II. Estudios inmunológicos del antisuero a albúmina sérica humana (ASH)	62

D. MICROBIOLOGIA

D. 1	Aislamiento de mutantes de envoltura en <u>Salmonella typhimurium</u>	63
D. 2	Actividad autolítica de un mutante de <u>Salmonella typhimurium</u>	65
D. 3	Propiedades de una mutación de envoltura que produce autólisis en <u>Salmonella typhimurium</u>	70
D. 4	Estudio genético de un mutante osmosensible de <u>Salmonella typhimurium</u>	73
D. 5	Efectos del "shock" osmótico sobre la síntesis de macromoléculas en un mutante osmosensible de <u>Salmonella typhimurium</u>	76
D. 6	Modificaciones en la resistencia a la radiación ultravioleta de una cepa osmosensible de <u>Salmonella typhimurium</u>	78
D. 7	Recuperación por incubación en medio líquido de <u>Salmonella typhimurium</u> DA82. I. Influencia de la composición del medio	81

D. 8	Recuperación por incubación en medio líquido de <u>Salmonella typhimurium</u> DA82. II. Influencia de la osmolaridad del medio en la reparación por escisión.	85
D. 9	Recuperación por incubación en medio líquido de <u>Salmonella typhimurium</u> . III. Efecto de los inhibidores de la síntesis de macromoléculas . . .	89
D. 10	Alteraciones de la división celular en un mutante termosensible de <u>Salmonella typhimurium</u>	91
E. EFECTOS SOMATICOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES. (ONCOLOGIA)		
E. 1	Evolución de la infección viral en animales totalmente irradiados. Virus aparentemente pasajeros .	94
E. 2	Evolución de la infección viral en animales totalmente irradiados. Virus con actividad oncogénica demostrada.	96
F. PATOLOGÍA		
F. 1	Efectos de la irradiación en la epidermis de la rata: grupos sulfidrilos y disulfuros	97
F. 2	Efectos de la irradiación en la epidermis de rata: variación de la succinato dehidrogenasa, láctico deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.	100
F. 3	Cambios histoenzimáticos en la epidermis de heridas irradiadas.	103
F. 4	Localización ultraestructural de la fosfatasa ácida en epidermis normal e irradiada	107
F. 5	Alteraciones cuantitativas y ácidos nucleicos en la acantosis reaccional de la epidermis irradiada.	109
F. 6	Respuesta del DNA de la epidermis irradiada a distintas dosis de rayos X.	112
F. 7	Estudio morfométrico de los cambios volumétricos en los queratinocitos irradiados	115
F. 8	Estereología de la epidermis irradiada.	118
F. 9	Efectos de la irradiación local (cabeza y molares) en ratas sometidas a movimientos ortodóncics	124
F. 10	Análisis morfométrico comparativo de la semimucosa del labio y de la piel.	128
F. 11	Datos morfométricos basales de la epidermis humana normal.	132

	página
F. 12 Estudio estereológico de los queratocitos claros y oscuros de la epidermis humana.	134
F. 13 Ultraestructura de la epidermis inyectada con Actinomicina D.	136
F. 14 Tiamino pirofosfatasa ácida. Su localización ultraestructural en piel de rata.	137
F. 15 Diferencias adaptativas de la superficie de las células córneas	139
F. 16 Efecto de la descalcificación sobre la microespectrofotometría de Feulgen	141
F. 17 Aplicación del método microespectrofotométrico para cuantitación del DNA en patología humana .	144
F. 18 Estudio microespectrofotométrico sobre la cuantitación de la reacción de plomo para la demostración histoquímica de la fosfatasa ácida. . .	150
F. 19 Cuantitación de esterases inespecíficas "in situ".	156
F. 20 Cuantitación autorradiográfica por métodos microfotométricos.	159
F. 21 Localización de ^{32}P mediante métodos autorradiográficos.	162
F. 22 Puesta a punto de técnicas de cultivos de piel para uso radiobiológico	165
F. 23 Microscopía electrónica de cromosomas politénicos de <u>Drosophila melanogaster</u>	167
G. SECCION IRRADIACION Y DOSIMETRIA	
G. 1 Actividades - Años 1975-1976.	169
H. SECCION BIOTERIO	
H. 1 Actividades-Años 1975-1976.....	173
APENDICE	
- Personal del Departamento de Radiobiologia.....	174
- Indice de Autores.....	176
- Publicaciones.....	178

A. BIOQUIMICA

A. 1. Bases moleculares de la producción e involución del bocio.

I. Acción del yoduro sobre la incorporación de ^3H - Leucina y ^{14}C galactosamina a proteínas tiroideas

M.A. Pisarev y L.O. Aiello.

La regulación de la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos es un proceso bioquímico íntimamente ligado al crecimiento tisular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas; en el caso de la tiroides, vinculado al desarrollo de los distintos tipos de bocio o de neoplasias.

Con el objeto de aclarar los factores estimulante e inhibitorios que regulan estos procesos, fue desarrollado un modelo "in vitro", utilizando compuestos marcados para valorar la síntesis de proteínas.

Cortes de tiroides bovina (30-80 mg) fueron pre-incubados durante 30 minutos en 5 ml de solución de Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,6 bajo 95% O_2 con 5% CO_2 , en presencia de las diferentes sustancias a estudiar. Al cabo de este período fue agregada una dosis trazadora (0,5-1 μCi) de ^3H -leucina (NEN) (síntesis de proteínas) y/o de ^{14}C -galactosamina (NEN) (incorporación de carbohidratos a las proteínas). Luego de un pulso de 30-60 minutos los cortes fueron lavados, secados, pesados y homogeneizados en 1 ml de H_2O . Las proteínas fueron precipitadas con 0,5 ml de ácido tricloroacético al 20% en frío. Luego de centrifugar lavamos 2 veces con ácido tricloroacético al 10%. El precipitado final fue digerido con Protosol (NEN, EE.UU.) y contado en solución de omnifluor (NEN, EE.UU.) en un contador de centelleo líquido. Las proteínas fueron determinadas mediante la técnica de Lowry (1). En algunos estudios fueron utilizados cortes de hígado o de glándula submaxilar. Las proteínas solubles tiroideas fueron separadas por centrifugación a 105.000 x g durante 60 minutos ó a 40.000 x g durante 150 minutos. La tiroglobulina fue precipitada en esa fracción, utilizando la técnica de Vassart et al. (2) con antiseros facilitados por el Dr. E. Capalbo (C.N.E.A.).

Observamos que la adición del IK, de 10^{-3} a 10^{-6} M, produjo un 50% de inhibición en la incorporación de ^3H -leucina a proteínas totales tiroideas. Este efecto es órgano específico ya que no lo observamos en hígado o glándula submaxilar. Con el objeto de analizar el mecanismo de la acción del halógeno fueron realizadas incubaciones en presencia de 0,5 mM de perclorato de potasio ó 1 mM de metilmercaptoimidazol (MMI). Ambas drogas bloquearon la acción inhibitoria del yoduro (Tabla 1) indicando que el halógeno ejerce su acción mediante una forma intracelular y organizada. Comparamos entonces la potencia inhibitoria del IK con la de las hormonas tiroideas, triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4).

Comprobamos que tanto a concentraciones de 10^{-6} y $5,10^{-7}$ M, las yodotironinas fueron más potentes que el yoduro (Tabla 2). El IK bloqueó no sólo la síntesis de proteínas totales tiroideas sino también la de las proteínas solubles y la de la tiroglobulina, pero no afectó la incorporación de carbohidratos a las mismas fracciones (Tabla 3).

Los presentes resultados proveen nuevos conocimientos sobre el mecanismo de la acción terapéutica del yoduro e indican la existencia de un proceso autoregulatorio tiroideo, probablemente mediado por el nivel endógeno de las propias hormonas.

Podemos entonces concluir que la acción del yoduro sobre la biosíntesis de las proteínas es:

- a) específica para la tiroides,
- b) ejercida a nivel intracelular y mediante una forma organificada,
- c) probablemente mediada por las hormonas tiroideas,
- d) general a las proteínas totales y solubles de la tiroides, incluyendo la tiroglobulina y
- e) restringida al proceso de síntesis de proteínas, pero sin alterar el de glicosidación.

- 1.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193:265, 1951.
- 2.- Vassart, G. y Dumont, J.E., Europ. J. Biochem., 32:322, 1972.

TABLA 1

Influencia del KClO_4 y MMI sobre la acción inhibidora del KI

Experimento	Tratamiento	Radioactividad pre- cipitable con TCA (DPM/ μg proteína)	p<
A	Control	134, 3 $\pm$ 27	-
	KClO_4 0,5 mM	136,1 $\pm$ 17	n.s.
	KI 10 ^4M	74,5 $\pm$ 10	0,001
	KI + KClO_4	122,3 $\pm$ 4	n.s.
B	Control	118,2 $\pm$ 37	-
	MMI 1 mM	210,1 $\pm$ 23	n.s.
	KI 10 ^4M	78,2 $\pm$ 5	0,01
	KI + MMI	127,1 $\pm$ 51	n.s.

Pre-incubación: 30 min.; pulso de [^3H] leucina: 60 min. Cada valor representa un promedio de 5 casos $\pm$ 1 DS

TABLA 2

Efectos comparativos de KI, T₃ y T₄ sobre la incorporación de [³H] leucina

Experimento	Tratamiento	Radioactividad pre-cipitable con TCA (DPM/μg proteína)	p<
A	Control	230,5 ± 46,6	-
	KI 10 ⁻⁴ M	164,2 ± 20,7	0,01
	T ₃ 10 ⁻⁴ M	91,1 ± 5,6	0,001
	T ₄ 10 ⁻⁴ M	143,2 ± 30,7	0,01
B	Control	227,0 ± 28,0	-
	KI 10 ⁻⁶ M	178,3 ± 6,8	0,01
	T ₃ 10 ⁻⁶ M	123,8 ± 5,0	0,001
	T ₄ 10 ⁻⁶ M	114,0 ± 2,0	0,001
C	Control	89,4 ± 8,8	-
	KI 5.10 ⁻⁷ M	113,3 ± 20,5	n.s.
	T ₄ 5.10 ⁻⁷ M	57,5 ± 11,3	0,001

Pre-incubación: 30 min.; pulso de [³H] leucina: 60 min. Cada valor representa un promedio de 5 casos ± 1 Ds

TABLA 3

Acción del KI sobre la incorporación de [³H] leucina y [¹⁴C] galactosamina por parte de proteínas solubles

Tratamiento	Método	[³ H] leucina cuentas/mg proteína	p<	[¹⁴ C] galactosamina cuentas/mg proteína
Control	TCA	209 375 ± 9605	-	15 000 ± 2100
KI 10 ⁻⁵ M	TCA	108 490 ± 1970	0,001	14 900 ± 950
Control	Anti-Tg	31 900 ± 295	-	7575 ± 135
KI 10 ⁻⁵ M	Anti Tg	23 265 ± 850	0,001	7565 ± 565

Pre-incubación: 30 min. Pulso de marcación: 120 min.

A. 2 Bases moleculares de la producción e involución del bocio.

II. Acción del yoduro, tiroxina y AMP cíclico sobre la incorporación de ^3H -uridina y ^{32}P a ARN tiroideo

M.A. Pisarev, L.O. Aiello y D.L. Kleiman de Pisarev.

Los resultados del trabajo anterior (1) indican que el yoduro ejerce su efecto antibociógeno mediante la inhibición de la incorporación de amino ácidos a proteínas. Con el fin de aclarar aun más en profundidad su mecanismo de acción, fue estudiada la modulación de la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) tiroideo mediante la utilización de ^{32}P y de ^3H -uridina.

Cortes de tiroides bovina (30-80 mg) fueron pre-incubados a 37°C durante 30 min. en 5 ml de solución de Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,6, bajo atmósfera de 95% O_2 y 5% CO_2 , en presencia de las sustancias a estudiar. A continuación los cortes fueron marcados con una dosis trazadora (0,5-1 μCi) de ^{32}P (C.N.E.A.) ó de ^3H -uridina (NEN, EE.UU.). Al cabo de 60 min. los cortes fueron lavados, secados, pesados y homogeneizados en 1 ml de H_2O . El ácido ribonucleico y los oligonucleótidos precursores marcados fueron estimados mediante el método de Munro y Eleck (2) en el caso de la ^3H -uridina y por el método de Perry et al. (3) cuando fueron marcados con ^{32}P .

Cuando fue estudiada la vida media del ARN intracelular seguimos el siguiente protocolo: cortes de tiroides fueron marcados con ^3H -uridina durante 10 m.; luego fueron intensivamente lavados con KRB y la incubación continuada en presencia de actinomicina D (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con y sin la presencia de IK, 10^{-5} M, secando 4 cortes de tiroides a diferentes tiempos y determinando la actividad específica tal como fue detallado. También realizamos otra serie de estudios similares pero sin la adición de actinomicina D.

La radioactividad de la fracción ácido perclórico soluble (APC) (Oligonucleótidos) y la del ARN fue contada en solución de Bray. La cantidad total de ARN fue estimada en cada muestra mediante espectrofotometría a 260 nm, comparando con el ARN de levadura. Cada punto experimental fue realizado por cuadruplicado y el análisis estadístico aplicado fue el "test" "t" de Student.

Tanto el IK como la tiroxina (T_4) a 10^{-5} disminuyeron significativamente la incorporación de ^{32}P y de ^3H -uridina a ARN (Fig. 1). Cuando fue explorada la posibilidad de una acción sobre la degradación de ARN, encontramos que en los cortes incubados en presencia de IK, 10^{-5} , la curva de desaparición de ARN era igual a la de los testigos; por lo tanto concluimos que el halógeno afecta la síntesis de ARN y no su degradación.

Con el fin de corroborar si el mecanismo de acción del yoduro era en este caso, igual al observado al estudiar síntesis de proteínas, analizamos el efecto del perclorato y del MMI; ambas drogas bloquearon la acción inhibitoria del IK (Fig. 2), indicando así que la acción de éste es ejercida a través de una forma intracelular y organificada del halógeno.

El AMP cíclico, en una concentración de 2 mM estimuló significativamente tanto la cantidad de radioactividad presente en la fracción APC soluble como la del ARN; este efecto fue inhibido por 10^{-5} de IK (Fig. 3).

También fue examinada la velocidad de acción del IK. Cuando el halógeno fue agregado luego de un pulso de ^3H -uridina, no observamos diferencia en la actividad específica del ARN.

Los presentes resultados explican la acción antibociógena del yoduro por una acción inhibitoria de la síntesis de ARN. La posibilidad de una disminución de la actividad específica del ARN por aumento de su degradación fue excluida en

estos estudios. Seed y Goldberg (4) mostraron que en cortes de tejido bajo la acción de actinomicina D, la síntesis de tiroglobulina (Tg) continúa, en tanto que se detiene la de proteínas estructurales y solubles. Estos resultados sugieren que el ARN mensajero de la Tg tiene una vida media más larga que la de las otras proteínas. En el trabajo anterior (1) mostramos que el IK disminuye en un 50-60% la incorporación de ^3H -leucina a proteínas totales y solubles tiroideas, en tanto que la incorporación a Tg es inhibida en un 30%. Nuestros resultados coinciden, por lo tanto, con la hipótesis arriba enunciada.

Los efectos del IK y del AMP cíclico sobre la fracción APC soluble sugerirían que las acciones inhibitorias y estimulantes de estos compuestos, respectivamente, serían ejercidas a nivel de los nucleótidos precursores de ARN. Una acción similar del AMPc fue demostrada en hueso (5); sin embargo nuestros resultados no excluyen una acción a otro nivel. A este respecto ha sido propuesto que los nucleótidos cíclicos regularían la síntesis de ARN mediante la fosforilación de la ARN polimerasa (6).

En el trabajo anterior (1) fue demostrado que el IK inhibe la biosíntesis de proteínas a través de un compuesto intracelular y organificado y que las yodotironinas eran más potentes inhibitoras que el halógeno. En el presente trabajo corroboramos que la inhibición de la síntesis de ARN es ejercida también por un compuesto yodado intracelular y organificado.

- 1.- Pisarev, M.A. y Aiello, L.O., Acta Endocr. (Kbh), 82:298
- 2.- Munto, H.N. y Fleck, A., Methods in biochemical analysis - D Glicked - vol. 14 - J. Wiley & Jons, New York, N.Y. p. 13, 1966.
- 3.- Perry, R.P., de la Torre, A. y Greenberg, J.R., Biochem. biophys. Acta (Amst), 262:220, 1972.
- 4.- Seed, R.W. y Goldberg, I.H., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 50:275, 1963.
- 5.- Peck, W.A., Messinger, K., Kimmich, G. y Carpenter, J., Endocrinol., 95:289, 1974.
- 6.- Jungmann, R.A., Hiestand, P.C. y Schweppe, J.S., J. Biol. Chem., 249:5444, 1974.

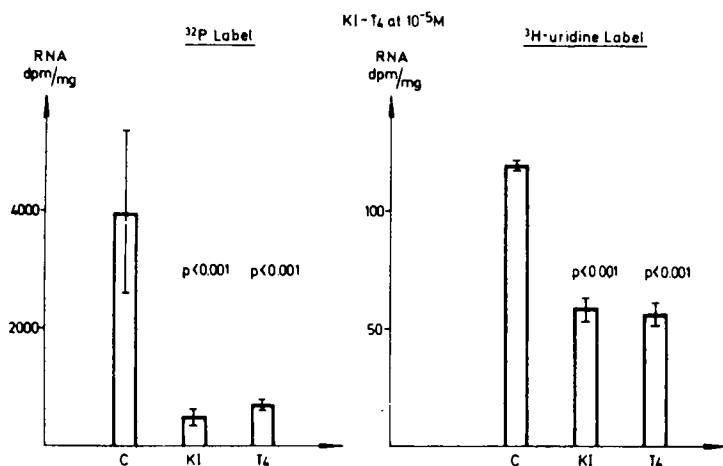


Figura 1

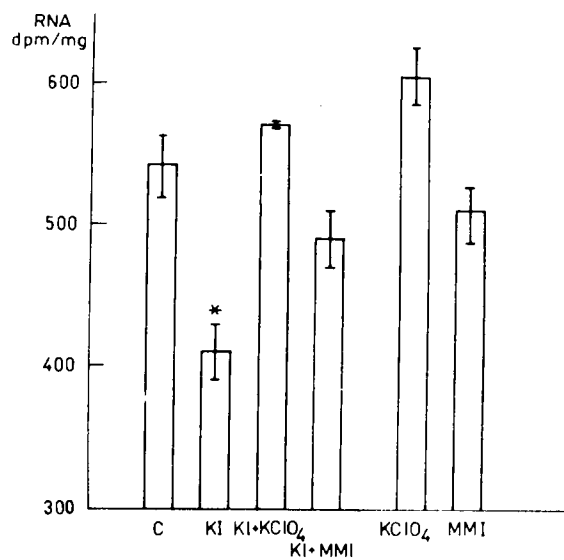


Figura 2

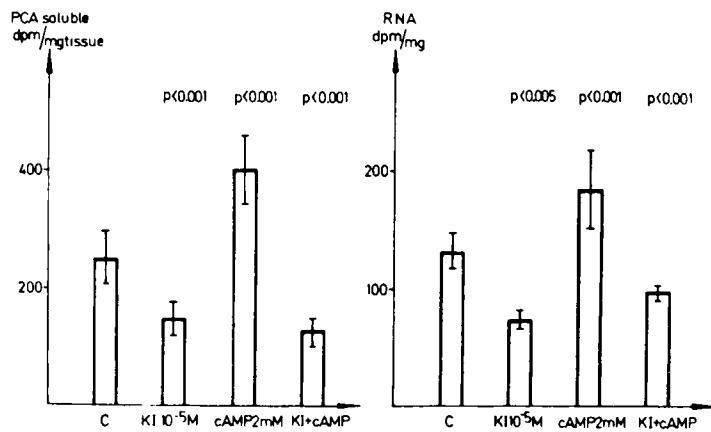


Figura 3

A. 3. Bases moleculares de la producción e involución del bocio,
III. Acción de nucleótidos cíclicos sobre la incorporación
de ^3H -uridina a ARN tiroideo y de ^3H -leucina a proteínas
M.A. Pisarev y D.L. Kleiman de Pisarev.

La tirotrofina (TSH) regula la función tiroidea a través del AMP cíclico (1); este nucleótido estimula la incorporación de aminoácido a proteínas "in vivo" (2) e "in vitro" (3, 4). Otro nucleótido cíclico: el GMP cíclico, también estimula este parámetro, habiendo sido demostrada la existencia en tiroides de guanilato ciclase y de proteína quinasas sensibles. La TSH estimula la síntesis de ARN y este efecto es reproducido por AMPc (4). En el presente trabajo fue estudiada la acción del GMP cíclico y de CMP cíclico, sobre la síntesis de proteínas y de ARN tiroideo.

Los cortes de tiroides bovina fueron incubados en solución de KRB, según fue descrito en los trabajos precedentes. La solución contenía cafeína 1 mM y cuando estudiamos la biosíntesis de proteínas, fue suplementada con L-leucina 2 mM. Durante la pre-incubación (30 min.) fueron incluidas las sustancias a estudiar.

A continuación realizamos un pulso de 60 min. ya sea con ^3H -uridina (síntesis de ARN) o con ^3H -leucina (síntesis de proteínas). Al final de la incubación los cortes fueron lavados y homogeneizados en 1 ml de H_2O .

Cuando examinamos la síntesis de proteínas determinamos la radioactividad ATA precipitable presente en una alícuota de homogenado total; luego de dos lavados el precipitado final fue digerido con Protosol, contando su radioactividad en omnifluor. Las proteínas fueron valoradas mediante el método de Lowry (5). El ARN total y los oligonucleótidos precursores fueron extraídos y valorados según la técnica de Munro y Fleck (6) y la radioactividad presente en ambas fracciones medida en solución de Bray. Los nucleótidos cíclicos eran de Sigma (EE.UU.) y la actinomicina D fue donada por Merck Sharp y Dohme (EE.UU.). El análisis estadístico fue realizado según el "test" "t" de Student.

Tanto el AMPc como el GMPc estimularon significativamente la incorporación de ^3H -uridina a ARN, así como el 5' AMP como también el 5' GMP resultaron inefectivos. Esta acción de los nucleótidos cíclicos fue inhibida por la adición de actinomicina D (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig. 1).

El 3' 5'-CMP cíclico en dosis creciente de 0,35 a 1,5 mM inhibió progresivamente la incorporación de ^3H -uridina a ARN y la cantidad de radioactividad presente en la fracción de oligonucleótidos precursores (Fig. 2).

Cuando estudiamos la interacción entre AMPc y CMPc encontramos que este último había bloqueado la estimulatoria del primero, tanto en lo que respecta a síntesis de proteínas como en lo concerniente a biosíntesis de ARN. (Fig. 3).

Los presentes resultados muestran que tanto el AMPc como el GMPc mimetizan la acción de TSH sobre la incorporación de ^3H -uridina a ARN; aunque ambos nucleótidos tienen efectos paralelos, la regulación de su concentración intracelular tendría lugar mediante diferentes mecanismos. La acción inhibitoria de la actinomicina D sugiere que estos nucleótidos ejercen su acción a un nivel previo a o transcripcional; sin embargo, el aumento de la radioactividad de los oligonucleótidos indicaría una acción a este nivel como ya fue sugerido (4); otra alternativa sería la estimulación, por los nucleótidos cíclicos, de la fosforilación de la enzima ARN polimerasa.

El CMPc disminuyó progresivamente la incorporación de ^3H -uridina a ARN y bloqueó la acción estimulativa del AMPc. Es muy poco lo que se conoce acerca del CMPc; este nucleótido ha sido aislado de extractos de células leucémicas L-1210 y jugaría un papel en la regulación del crecimiento tumoral. En los trabajos referidos a su estudio fue demostrado que posee una acción antagónica a la del AMPc.

Hasta el presente sólo se conocía la existencia de moduladores positivos (estimuladores) en la regulación de la función tiroidea: el AMPc y el GMPc cuyas variaciones son controladas por mecanismos diferentes. Los resultados aquí obtenidos presentan la primera indicación sobre la posible existencia de moduladores negativos (inhibitorios) y plantean un papel para el CMP cíclico en este sentido.

- 1.- Schell-Frederick, E. y Dumont, J.E., Biochemical actions of hormones. Glitwack ed., vol. I. Acad. Press, New York, N.Y., p. 415, 1970.
- 2.- Pisarev, M.A., De Groot, L.J. y Wilber, J.F., Endocrinology, 87:339, 1970.
- 3.- Wilson, B., Raghupathy, R., Tonoue, T. y Tong. W, Endocrinology, 83: 313, 1968.
- 4.- Pisarev, M.A., Aiello, L.O. y Kleiman de Pisarev, D.L., Acta Endoc. (Kbh), 83:313, 1976.
- 5.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193:265, 1951.
- 6.- Munro, H.N. y Fleck, A., Methods in biochemical analysis. D. Glick ed. vol. 14. J. Wiley & Sons, New York, N.Y., p. 113, 1966.

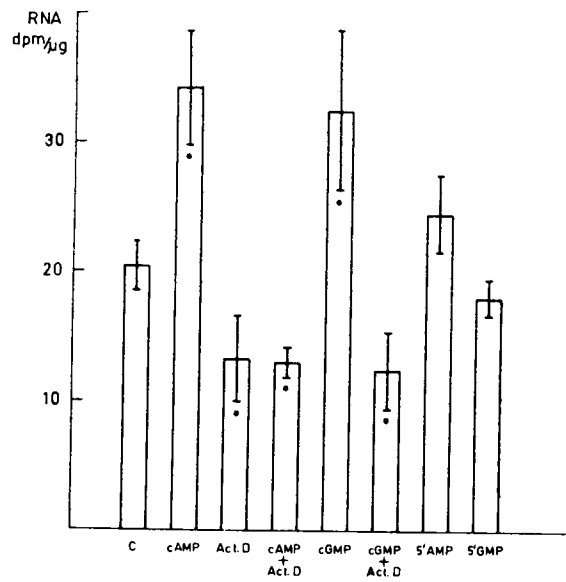


Figura 1

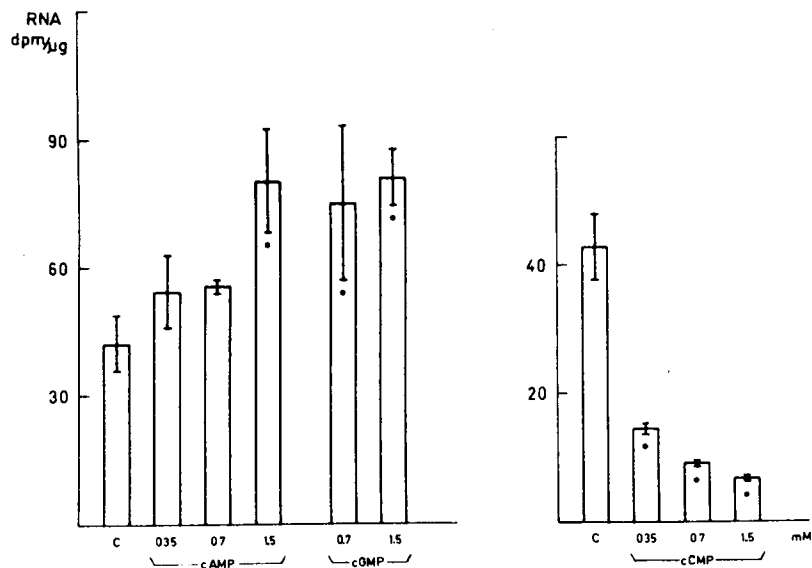


Figura 2

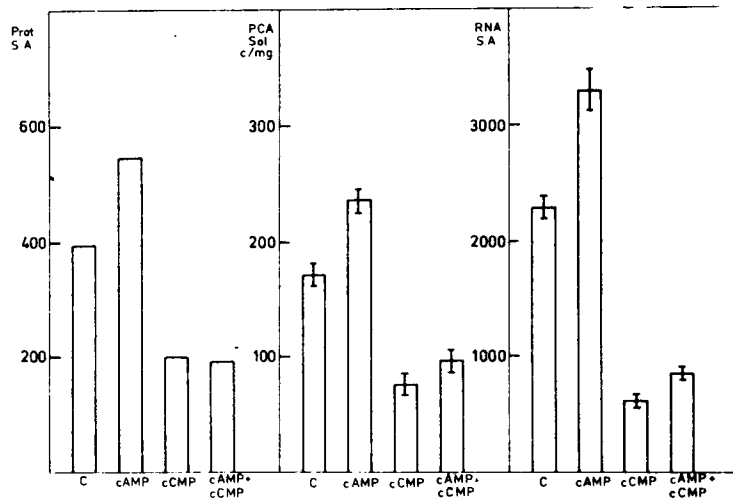


Figura 3

A. 4. Metabolismo del ^{131}I en el estudio de drogas antitiroideas

E.P. Kramar de Valmaggia, R. Valsecchi, R.P. Gagliardi*, M del C. Santalla de Pirovano, M. Pisarev y N. Altschuler.

Como el tratamiento del hipertiroidismo en la mujer embarazada es aún obtejo de controversia, realizamos el presente trabajo con el fin de evaluar distintas drogas usadas en terapéutica, especialmente en lo que se refiere al daño potencial sobre la progenie.

Para nuestro estudio utilizamos ratas Wistar hembras, preñadas, cuyo peso corporal fue de 170 ± 10 gr, las que fueron distribuidas en 3 grupos:

a) Normales,

b) animales a los que suministramos propiltiouracilo (PTU) 3 mg/día vía s.c., a partir de la iniciación de la preñez y

c) animales a los que suministramos metilmercaptoimidazol (MMI) 0,3 mg/día vía s.c., a partir de la iniciación de la preñez.

La administración de estas drogas continuó durante la lactancia, estudiando la función tiroidea de las crías a los 28-36 días de edad. Los animales recibieron, 24 horas antes del sacrificio, una dosis trazadora de ^{131}I .

Fue determinado el peso corporal, peso tiroideo, captación tiroidea de ^{131}I , RAI circulante, PB^{131}I , relación tiroides:suero (T/S), mediante las técnicas habituales.

Las tiroides fueron homogeneizadas con un aparato tipo Potter Elvehjem en 1 ml de buffer 0,1 M TRIS-Cl H, pH 8,5 y luego sometidas a digestión durante 48 horas con 1% de pancreatina (Difco). Alícuotas de los elementos digeridos fueron sembrados en papel Whatman 1 y desarrolladas con butanol-etanol, hidróxido de amonio 1 N (5:1:2) (BEA) durante 22 horas, determinando la distribución de radioactividad en el cromatograma. El grado de maduración neurológica fue evaluado mediante el "test" de natación de Schapiro.

Observamos una notable disminución en la evolución del peso corporal de las crías de madres tratadas con PTU, no encontrando alteraciones en las del grupo de las tratadas con MMI. El peso tiroideo apareció significativamente aumentado en el grupo de PTU, al igual que la captación tiroidea de ^{131}I . Cuando los valores de captación fueron corregidos por peso tiroideo y corporal, encontramos los valores de captación significativamente disminuidos. La relación tiroides/suero estaba disminuida en el grupo de PTU. La radioactividad circulante estaba fuertemente aumentada (300%) en el grupo de PTU, observando un notable aumento del PB^{131}I (Tabla 1). Simultáneamente, las cromatografías revelaron una disminución del porcentaje de yodotironinas en los animales del grupo de PTU.

Tratando de simular un hipertiroidismo experimental, un grupo de animales fue sometido al tratamiento simultáneo de antitiroideos y de l-tiroxina (T_4), 5 μg /día.

La administración de T_4 revertió parcialmente el efecto de PTU, llevando a la normalidad el peso corporal; los restantes parámetros, tales como el peso y captación tiroideos y el PB^{131}I continuaron alterados (Tabla 2). El "test" de natación mostró que los animales del grupo de PTU + T_4 presentaban un retardo en la maduración neuromuscular (Figura 1).

* Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires.

Estos resultados muestran claramente que la administración crónica de PTU produce bocio en la descendencia, en tanto que el MMI no causa mayores alteraciones.

Es bien sabido que el hipotiroidismo neonatal provoca este tipo de alteraciones, por lo tanto resulta factible que los animales hijos de madres tratadas con PTU presenten hipotiroidismo en este período. También es sabido que el PTU produce a nivel periférico un aumento de las hormonas ligadas a proteínas y una disminución de su utilización periférica. Es probable que en nuestras condiciones experimentales se produzca un hipotiroidismo, tanto por la disminución de la síntesis de hormonas - demostrada en las cromatografías - como por la inhibición de la utilización periféricas.

Tratando de aclarar si el transporte de PTU es ejercido a través de la barrera feto-placentaria y/o mediante la secreción láctea, suministramos PTU a un grupo de ratas, desde la iniciación de la gestación hasta la parición y a otro a partir del primer día de nacimiento.

Los resultados aparecen en la Tabla 3. Cabe destacar las diferencias observadas entre ambos grupos experimentales y los normales. Observamos un aumento significativo del peso tiroideo de los animales tratados durante el período de lactancia cuando los comparamos con los del grupo de gestación. Llama la atención la drástica disminución de la captación tiroidea de ^{131}I en los animales que recibieron PTU durante la lactancia, destacando el importante aumento del peso glandular en los mismos.

El efecto del PTU a nivel de los parámetros tiroideos demuestra ser mayor en el grupo tratado durante la lactancia. La prueba de natación realizada para evaluar el grado de maduración neuromuscular mostró un retardo en los animales del grupo tratado durante la gestación, lo que nos induciría a pensar en una mayor sensibilidad de ciertos centros nerviosos durante este período.

Ha sido relatado el nacimiento de niños con bocio e hipertiroidismo cuyas madres habían sido tratadas con antitiroideos. Los presentes resultados sugerirían la conveniencia de utilizar MMI, dado que no hubo alteraciones significativas en este grupo. Sin embargo, visto que estos estudios fueron realizados en ratas, sería necesario analizar estos parámetros en el hombre antes de arribar a una conclusión definitiva.

TABLA 1

	Peso tiroideo mg/100 gr peso corporal	Captación tiroidea % dosis	Capt. tiroi- dea %/mg/100 gr peso corporal	Radioactividad circul. %/ml	T/S	PBI 131 %/ml
Normales	8,28 $\pm$ 1,34	1,86 $\pm$ 0,18	0,27 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,15	0,05
MMI	8,69 $\pm$ 1,36	1,44 $\pm$ 0,44	0,17 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,15	0,50 $\pm$ 0,17	0,06
PTU	30,36 $\pm$ 7,25	2,66 $\pm$ 0,30	0,09 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,26	0,25 $\pm$ 0,08	0,140 0,170

TABLA 2

	Peso tiroideo mg/100 gr pe- so corporal	Captación ti- roidea ^{131}I %	Radioact. circul. %/ml	T/S	PBI ^{131}I %/ml
Normales	$9,8 \pm 3,4$	$1,45 \pm 0,21$	0,32	$0,75 \pm 0,15$	$0,065 \pm 0,010$
MMI + T_4	$10,5 \pm 0,2$	$1,38 \pm 0,15$	0,38	$0,82 \pm 0,16$	$0,068 \pm 0,022$
PTU + T_4	$33,5 \pm 3,6$	$2,14 \pm 0,72$	0,64	$0,38 \pm 0,09$	$0,140 \pm 0,050$
T_4	$9,4 \pm 2,6$	$0,51 \pm 0,30$	0,39	$0,24 \pm 0,04$	$0,066 \pm 0,034$

TABLA 3

	Peso corpo- ral	Peso tiroí- deo mg/100 gr p.c.	Capt.norma- lizada %/ 100 gr pe- so corp.	Radioacti- vidad cir. %/ml	T/S %/mg/100 gr p.c./100 ml	PBI ^{131}I %/ml
C	$59,4 \pm 5$	$7,68 \pm 0,80$	$0,47 \pm 0,21$	$0,47 \pm 0,15$	$0,64 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,03$
PTU (Lac tancia)	$30,4 \pm 7$	$26,91 \pm 3,8$	$0,09 \pm 0,03$	$2,43 \pm 0,49$	$0,04 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,08$
PTU (Ges tación)	$30,3 \pm 12$	$13,17 \pm 1,84$	$0,27 \pm 0,06$	$2,11 \pm 0,21$	$0,13 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,05$

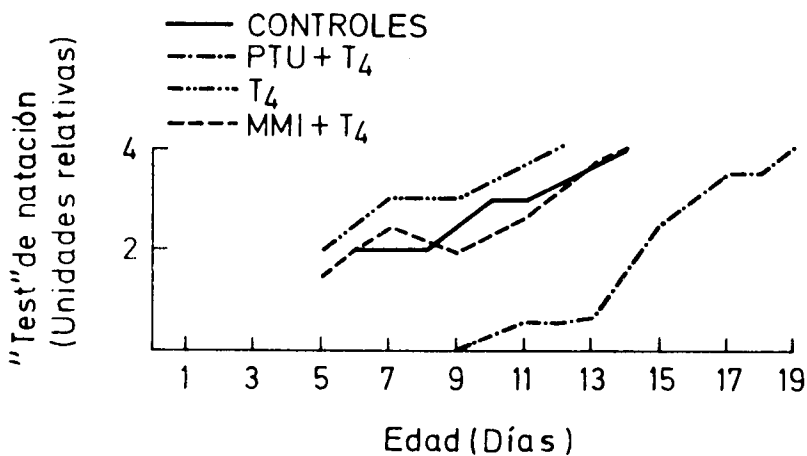


Figura 1

A. 5. Correlación entre el peso molecular estimado y las propiedades inmunológicas del ^{125}I -TSH

M. Barmasch, S.E, Quiroga,* V.A. Ciscato,* H. Kurcbart, S.V. de Giacomini, N. Altschuler y R.A. Caro*

En el presente trabajo se trató de correlacionar el comportamiento de las fracciones de tirotrófina marcada con ^{125}I , de diferente peso molecular con los parámetros radioinmunológicos habituales: unión inespecífica al carbón-dextrán (índice de carbón-dextrán, I.C.D.), unión específica al anticuerpo $(\text{B/F})_0$, y la correspondiente curva de desplazamiento.

Para ello utilizamos hormona tirotrófica humana HTSH marcada con ^{125}I , de acuerdo con el método propuesto por Caro et al. (1), determinando el peso molecular de la hormona marcada mediante una columna de sephadex G 75 calibrada con patrones proteicos de peso molecular conocido. Al purificar la HTSH ^{125}I recién marcada por pasaje a través de la columna calibrada, obtuvimos en los primeros eluidos, polímeros de la hormona con un P.M. mayor de 70.000 (2, 3).

El pico más importante de radioactividad tiene un P.M. comprendido entre 30.000 y 42.000 (en la fig. 1: P.M. = 35.000). La HTSH, que tiene un P.M. semejante al teórico, estaría ubicada en la ladera posterior del pico, obteniendo también péptidos marcados que presentan un P.M. menos de 15.000 (Fig. 1).

Comportamiento similar fue observado en TSH marcadas, de diferentes especies (Tabla 1).

Con cada uno de los eluidos fueron realizadas determinaciones de la unión inespecífica al carbón-dextrán en ausencia de anticuerpo: índice de carbón-dextrán (I.C.D.)

$$\text{I.C.D.} = \frac{\text{radioactividad del sobrenadante}}{\text{radioactividad del precipitado}}$$

obteniendo un valor de alrededor de 0,25 para las fracciones de P.M. de 27.000 presentando valores de 1 en las fracciones correspondientes a P.M. elevado. Dicho índice decrece al disminuir el P.M., siendo muy pequeño para P.M. menores de 15.000.

Al determinar la correlación entre el $(\text{B/F})_0$ y el I.C.D. (SNR) de cada eluido de la columna de sephadex, observamos un único pico correspondiente a la hormona cuyo P.M. es semejante al de la proteína nativa (Tabla 2).

$$\text{SNR} = \frac{(\text{B/F})_0}{\text{I.C.D.}}$$

Este diferente comportamiento de cada uno de los eluidos queda confirmado al analizar por representación logit las curvas dosis respuestas obtenidas cuando son utilizadas como hormonas trazadoras, TSH de distintos pesos moleculares (Fig. 2).

La representación logit realizada con un eluido de ^{125}I TSH de P.M. es-

* Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.

timado en 27.000, muestra (Fig. 3) una buena linealidad así como un valor correcto para la pendiente (-2,7). Con la misma fracción estudiamos el anticuerpo suministrado por el MRC (London) a través de la gráfica Scatchard, obteniendo un valor de K_a (Constante de afinidad) de alrededor de 1×10^9 1/mol (Fig. 4).

Algunos autores utilizan el índice de carbón-dextrán o la unión del exceso de Ac, para conocer la calidad de la hormona marcada. En otros casos mezclan las diferentes fracciones del pico proteico, eluido de la columna, sin tener en cuenta que el gel de sephadex utilizado en la purificación separa fracciones de diferentes pesos moleculares (4).

En el presente trabajo demostramos que la manera más clara de analizar esta condición, consiste en la determinación de la relación entre la unión específica corregida y la adsorción no específica del carbón-dextrán (SNR). Como era de esperar, el valor más alto de este parámetro coincidió con la fracción de P.M. estimativo, similar al de la hormona nativa. Observamos también una buena correlación entre el ICD y el P.M. de las distintas fracciones; esta relación presentó un valor de 0,2-0,3 para la fracción con mejor comportamiento inmunológico (P. M. 28.000) (Tabla 2).

Cuando es usada como control de calidad de la hormona marcada el comportamiento inmunológico de la hormona misma - mediante la unión al exceso de anticuerpo - el dato obtenido puede llevar a conclusiones erróneas, ya que el equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo puede ser revertido por exceso de anticuerpo.

Nuestra experiencia indica que si son normalizadas las condiciones de cromatografía en columna (tipo de sephadex, dimensiones, buffer, velocidad del flujo, etc.) obtendremos un perfil de elución constante que permite omitir el control de la columna con los patrones de P.M. El simple y rápido control de las distintas fracciones mediante el ICD nos permite conocer fácilmente las características de la hormona marcada y elegir la fracción de P.M. más adecuada para utilizarla en el radioinmunoanálisis.

- 1.- Caro, R.A., Ciscato, V.A., Giacomini, S.M.V. de, Quiroga, S. y Radicella, R., Int. J. appl. Radiat. Isotopes, 26:527, 1975.
- 2.- Sherman, L.A., Harwig, S. y Hayne, O.A., Int. J. appl. Radiat, Isotopes 25:81, 1974.
- 3.- Kiefer, J.D., Weintraub, B.D., Leeman, S. y Maloof, F., Acta Endocr., 76:495, 1974.
- 4.- Andrews, P., Biochem, J., 91:222, 1964.

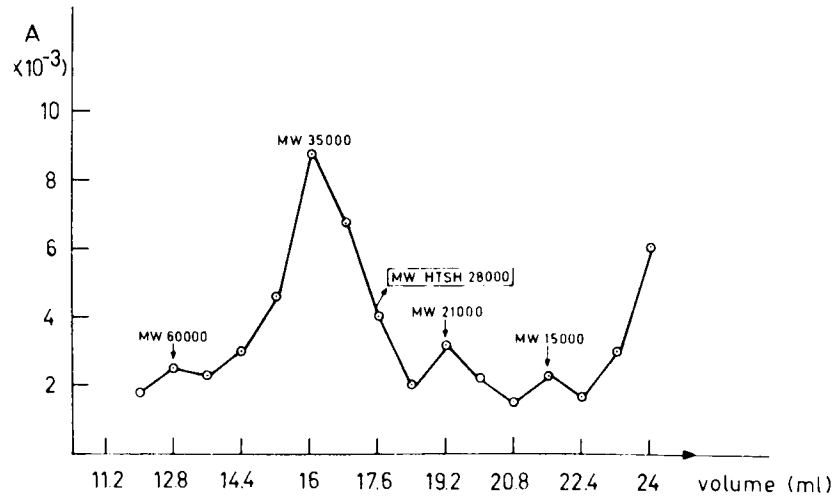


Figura 1

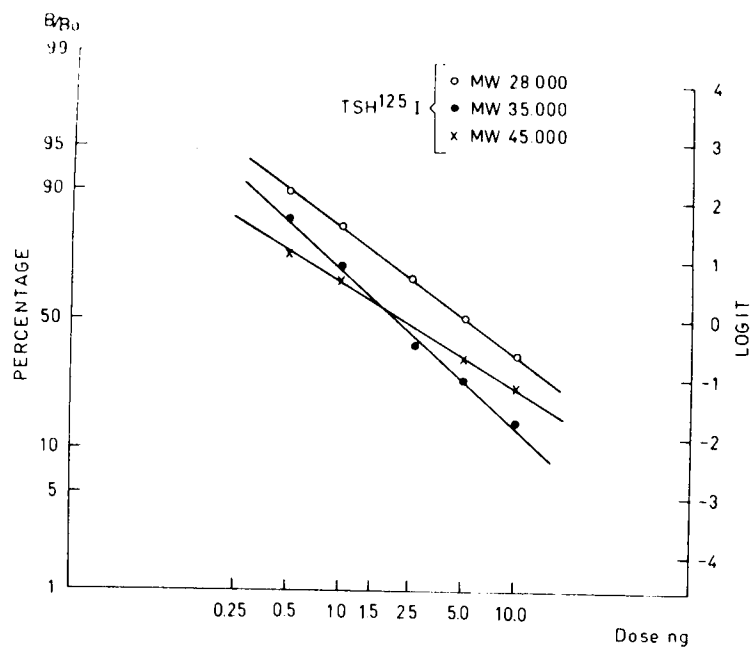


Figura 2

MW estimation of TSH from different species			
HUMAN	RAT	OVINE	BOVINE
70.000	70.000	70.000	70.000
60.000	54.000	42.000	54.000
33.000	34.500	18.000	32.000
15.000	20.500	4.000	14.000
8.000	14.000		4.000
4.000	10.000		
	4.000		

Tabla 1

MW ¹²⁵ I HTSH	DCR	$\frac{(B/F)_o}{DCR} = SNR$
50.000	1.30	0.7
31.000	0.57	2.3
27.000	0.25	4.0
24.000	0.18	2.8
21.000	0.16	2.1
18.000	0.16	1.4
16.000	0.16	1.3

Tabla 2

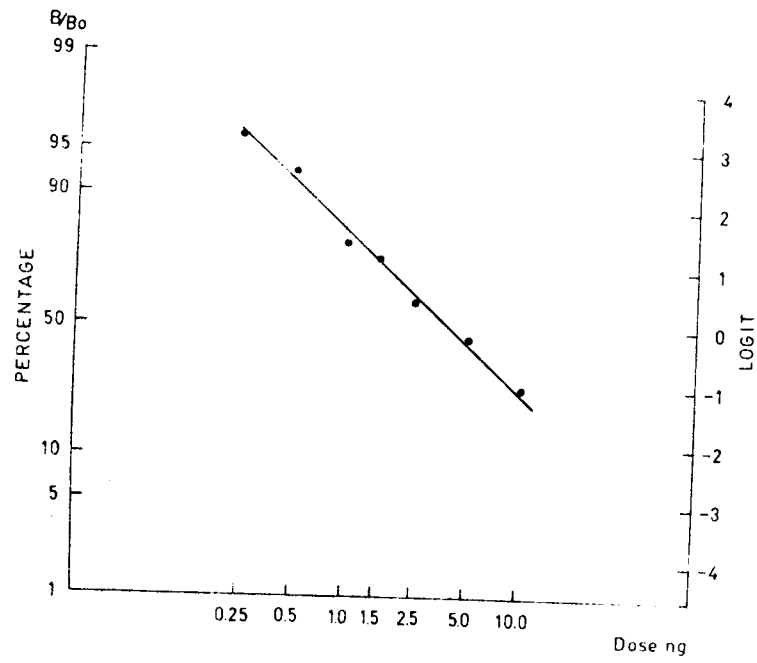


Figura 3

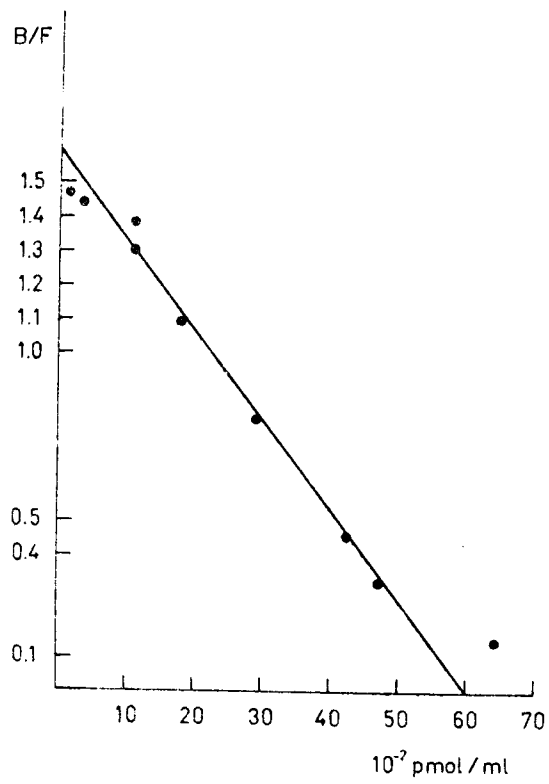


Figura 4

A. 6. Estudios biológicos en un primate argentino, mediante el uso de trazadores radioactivos

R.M. Valsecchi, G. Sala,* V. Dahl,* C. Bergada,* O.J. Degrossi,**
C.P. Lantos*** y N. Altschuler.

Dada la proximidad del hombre con los primates no humanos dentro de la escala zoológica, decidimos desarrollar como modelo biológico un Cébido de origen americano.

Fueron realizados estudios de diversos parámetros tiroideos y suprarrenales, utilizando un primate del Nuevo Mundo (*Alouatta caraya*).

Estudiamos el contenido de yodo estable en el tejido tiroideo, cuyos valores resultaron de 0,95 y 1,4 $\mu\text{gr/mg}$ tejido. Los estudios cinéticos con ^{131}I mostraron un recambio muy acelerado, comparando a estos animales con el hombre; los valores iniciales de radioactividad circulante (10-60 min.) fueron de 0,3% dosis /ml, descendiendo luego de 24 horas a 0,0006% dosis/ml (plasma) (Fig. 1).

La captación tiroidea elevada en la primera hora (20-40%) disminuyó en forma brusca en el período posterior a las 24 horas (4-15% dosis) (Fig. 2).

Las pruebas de estimulación (TSH) y de descarga (ClO_4K) no mostraron efecto alguno en los estudios de captación y de cinética de ^{131}I (Fig. 2).

La distribución intratiroidea de ^{131}I dio valores de 0,4 a 1,9% en la fracción lisosomal; el sobrenadante sometido a gradiente lineal de sacarosa presentó un pico de radioactividad en la fracción 19S (Tg).

En los estudios cinéticos de hormonas tiroideas fueron encontrados valores para T_4 - ^{125}I , de vida media plasmática, de compartimiento y de tasa de degradación diaria inferiores al hombre. Expresando este último parámetro en $\mu\text{gr/kg}$ peso corporal/día, los valores obtenidos resultan coincidentes con los del hombre. Los estudios cinéticos con T_3 - ^{125}I realizados en un animal joven, mostraron una vida media similar a la del hombre, encontrando valores de compartimiento y tasa de degradación diaria muy inferiores a éste; al expresar este último dato en función del peso corporal, los valores obtenidos son similares entre sí (Tabla 1).

Estudios de transporte demostraron ausencia de una proteína específica con capacidad transportadora para hormonas tiroideas.

Fue estudiada la esteroideogénesis suprarrenal en 2 hembras y 1 macho, adultos jóvenes de la especie *Alouatta caraya*, que no se reproduce en cautiverio, tratando de detectar una de las posibles causas de esta ausencia de reproducción y a fin de hallar un modelo adecuado para estudios suprarrenales humanos.

Fueron incubados cortes de tejido suprarrenal de aproximadamente 100 mg durante 90, 120 y 240 minutos en buffer Krebs-Ringer bicarbonato-glucosa a 37°C y pH 7,2, utilizando precursores 7- ^3H -pregnenolona (PR) de actividad específica 62,5 mCi/mg (I) ó 7- ^3H -PR + 4- ^{14}C - progesterona (P), ambas de actividad específica 0,167 mCi/mg (II). Para I fueron cuantitados (Dilución isotópica con

* Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños, Bs. Aires.

** Centro de Medicina Nuclear, C.N.E.A., Bs. Aires

*** Laboratorio de Esteroides, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A.

formación de derivados) los radiometabolitos P, 17 α Hidroxiprogesterona (17 OH-P), desoxicorticosterona (DOC), corticosterona (B), cortisol (F), 11 desoxicortisol (S), cortisona (E), 18 hidrocorticosterona (18-OH-B), aldosterona y dos compuestos (X_1 y X_2) que en el sistema tolueno-propilenglicol presentan un $R_B = 1,4 \pm 0,1$, $N = 6$, correspondiente al de 5-hidrocorticosterona; además, fueron determinados F (competencia proteica) y B (fluorometría) endógenos. Para II caracterizamos los mismos compuestos e investigamos sus caminos metabólicos, observando que 17 OH-P, S, F y E provienen preferentemente de PR y que DOC, B, 18-OH-B y X_2 lo hacen preferentemente de P. A los 240 minutos el porcentaje proveniente de PR era - para determinaciones por duplicado - de 17 α OH-P: 71 ± 2 , S: 58 ± 1 , F: 56 ± 2 , E: 55 ± 1 , DOC: 19 ± 1 , B: 12 ± 1 , 18 OHB: 16 ± 1 y X_2 : 14.

El compuesto X_1 , de identidad y posición metabólica exacta aún desconocida, proviene en un 71 ± 1 por ciento de pregnenolona. Las relaciones entre las cantidades producidas en (I) de F/ X_1 están entre 4,1 y 6,3 ; X_1 en placa delgada (acetato de etilo: hexano, 3:1) tiene un $R_f = 0,77 \pm 0,001$ ($n = 13$); en este sistema el R_f de B es igual a 0,27 (duplicados) y el R_f de X_2 es de $0,38 \pm 0,01$ ($N = 6$), siendo el R_f de dihidrocorticosterona de 0,43 en cloruro de metileno:metanol (150:2); el R_f de X_1 es de 0,35. Este compuesto es acetilable y su acetato, en este último sistema, tiene un $R_f = 0,80$.

Las abreviaturas de los esteroides usadas en el texto son: B: Corticosterona; F: Cortisol; P: pProgesterona; PR: Pregnenolona; S: 11-Desoxicortisol; ALDO: Aldosterona; DOC: 11-Desoxicorticosterona; 17 α OHP: 17 α Hidroxiprogesterona; E: Cortisona; 18; OHB: 18-Hidroxicorticosterona.

	[T_4] $\mu g/100ml$	$T_{1/2}$ día	ED %p.c.	Q_{T_4} μg	T.D.D. $\mu g/día$	T.D.D. $\mu g/kg/día$
Hombre	8,7	7-9	15,2	859,6	89,2	1,4
Alouatta	5,3	1,9 joven	12,1	18,8	7,4	2,2
carayá	4,9 (6)	2,9 adulto	14,4	62,6	14,9	2,1

	[T_3] $ng/100ml$	$T_{1/2}$ día	ED %p.c.	Q_{T_3} μg	T.D.D. $\mu g/día$	T.D.D. $\mu g/kg/día$
Hombre	100-200	1,2	65	63	37	0,57
Alouatta	180	1,3	44	2,6	1,4	0,43
carayá	86 (7)					

Tabla 1

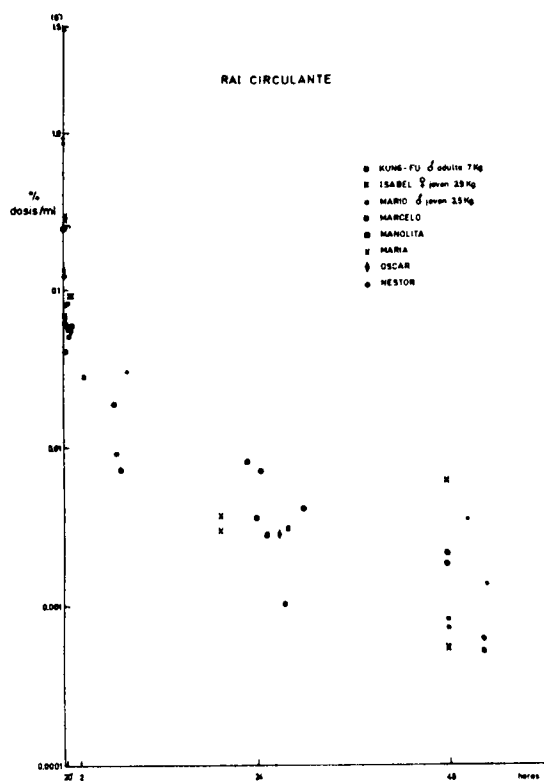


Figura 1

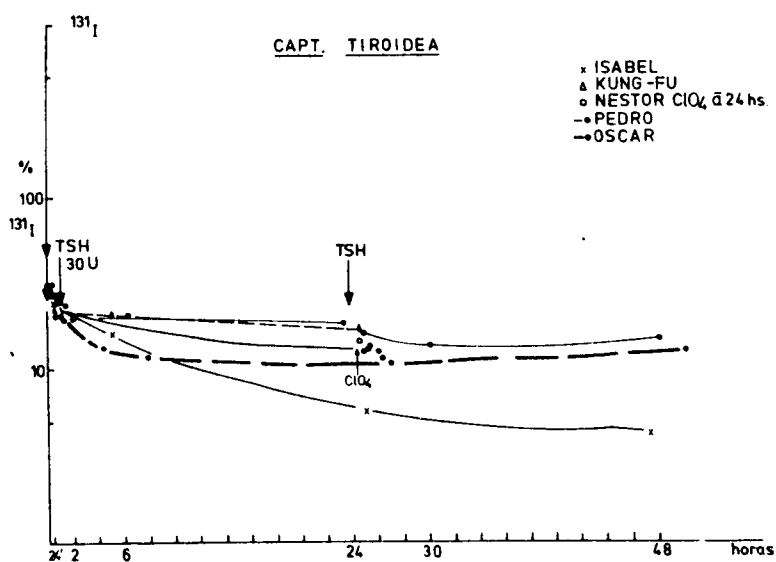


Figura 2

A. '7. Estudios con ^{67}Cu y ^{64}Cu en rumiantes con carencia condicionada de cobre. Resultados preliminares

N.A. Marcilese,* H.D. Figueiras* y R.M. Valsecchi.

La carencia condicionada de cobre en rumiantes, provocada por ingestión elevada de sulfatos y molibdeno, es una de las deficiencias minerales más importantes en el mundo.

En trabajos previos con ovejas estudiamos algunos mecanismos por los cuales el metabolismo del cobre está afectado en estas condiciones.

Demostramos que la capacidad del hígado para acumular ^{64}Cu y su utilización en la formación de ceruloplasmina estaba disminuída.

Una falla hepática en la síntesis de cuproproteínas fue postulada para explicar esta disfunción; además, pudo verse que la pérdida urinaria del cobre estaba significativamente aumentada, explicando en parte la disminución de cobre que ocurre en los animales carenciados.

Fue sugerido también que la excreción fecal endógena de cobre era mayor en los animales que recibieron molibdeno y sulfato; esto no pudo ser demostrado claramente debido al rápido decaimiento del trazador.

Un factor limitante en estos estudios fue la vida media del ^{64}Cu (12,8 hs.); pero al disponer de ^{67}Cu de 61,8 horas de vida media en combinación con ^{64}Cu , permitió realizar nuevos estudios para un mejor conocimiento de la interacción del molibdeno-sulfato sobre el metabolismo del cobre en rumiantes.

Los parámetros estudiados fueron: la depuración plasmática de ^{67}Cu en ovinos y la excreción fecal endógena de ^{67}Cu en ovinos, la depuración de ceruloplasmina marcada con ^{64}Cu "in vivo" en bovinos y la distribución subcelular de ^{64}Cu en hígado de bovinos y ovinos normales y bovinos carenciados.

Bovinos jóvenes (Hereford) y ovinos (Corriedale) fueron sometidos a una dieta compuesta por alfalfa molida de primera calidad, suplementada con molibdato de sodio y sulfato de sodio, a fin de tener una concentración de 50 ppm de molibdeno y 0,4 sulfato (bovinos) o 75 ppm de molibdeno y la misma cantidad de sulfato para los ovinos; estas concentraciones fueron obtenidas en base a materia seca. Los animales utilizados como control recibieron la misma dieta, sin agregado de molibdeno y sulfato. El tiempo necesario para producir una carencia severa varió entre seis y nueve meses; durante los estudios fue administrada la misma dieta.

La absorción aparente de ^{67}Cu fue determinada en dos ovinos normales mantenidos en jaulas metabólicas, luego de la administración de 100 μCi del trazador (Cloruro de cobre libre de portador).

La excreción total fue recolectada durante 12 días. La depuración plasmática y la excreción fecal endógena fue estudiada luego de inyectar por vía venosa 200 μCi del radionucleido en animales normales y carenciados.

La depuración plasmática de ^{67}Cu fue estudiada también en un bovino normal y en uno carenciado durante 12 días, luego de la administración de 600 μCi de ^{67}Cu .

* Div. Agrop. C.N.E.A.

El tiempo medio de ceruloplasmina- ^{64}Cu en plasma fue determinado en dos bovinos normales luego de aplicarles una inyección de 600 ml de plasma, obtenido de un animal normal inyectado 24 horas antes con 20 μCi de ^{64}Cu (cloruro de cobre de actividad específica 10 mCi/mg).

La distribución intracelular de ^{64}Cu en el hígado fue realizada en muestras obtenidas 24 horas post-inyección de 20 mCi de radionucleido, en un bovino normal y uno carenciado y 5 mCi de ^{64}Cu en un ovino normal.

Los animales fueron sacrificados y el hígado extraído rápidamente; 8 gr de tejido fueron cortados en trazos pequeños y homogeneizados en sacarosa en 0,25 molar, en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (Teflón).

El homogenado fue centrifugado a 800 x g 10 minutos, sometiendo el primer sobrenadante a 14.000 x g 30 minutos, el segundo a 20.000 x g 30 minutos y el último fue centrifugado en ultracentrífuga a 105.000 g x una hora. Las fracciones obtenidas fueron: núcleos y debris celular, mitocondrias, lisosomas, microsomas y fracción soluble.

La absorción gastrointestinal aparente de ^{67}Cu en ovinos fue similar en los dos grupos: 7,9 y 6,7 de la dosis administrada en controles y carenciados, respectivamente.

La excreción fecal endógena del trazador inyectado vía venosa fue aproximadamente el doble en los animales carenciados con respecto a los normales: 6,2 y 3,5, respectivamente. La depuración plasmática de ^{67}Cu mostró diferencias significativas entre los animales carenciados y los normales, lo mismo entre los bovinos y ovinos.

Los ovinos presentan una curva de depuración que puede ser ajustada a una función experimental con tres componentes, idéntica a la obtenida para ^{64}Cu en estudios de 30 horas. En ambos estudios los animales carenciados mostraron una disminución en la velocidad de recambio, comparados con los normales. En bovinos esta diferencia fue más notable aún. Estos resultados indican claramente que en los bovinos el efecto negativo del molibdeno-sulfato sobre este parámetro es mucho mayor que en el ovino.

Los estudios más prolongados, posibles a través del uso de ^{67}Cu , permiten verificar diferencias en la producción de ceruloplasmina entre bovinos normales y ovinos. En estos últimos una actividad relativamente baja del plasma desaparece en un porcentaje de aproximadamente del 2,3%, retornando a la circulación y alcanzando un pico alrededor de las 24 horas luego de la inyección del trazador. En este momento la radioactividad presente en la fracción ceruloplasmina de cobre plasmático es del 66% del total. El tiempo medio fue de aproximadamente 70 días. Esto sugiere una baja pero continua incorporación del trazador en ceruloplasmina y su subsecuente liberación a la circulación.

Repeticiones con ^{64}Cu muestran que en algunos casos valores superiores al 20% de la radioactividad inyectada retornan a la circulación sólo 24 horas después de la administración del isótopo; en ese momento más del 85% de la radioactividad estaba presente en la fracción de ceruloplasmina del cobre circulante.

El significado biológico de estas diferencias revelado por la velocidad de la producción de ceruloplasmina y su desaparición en sangre entre el bovino y el ovino, requieren mayor información. Podemos postular tentativamente que estas diferencias explicarían la mayor susceptibilidad del ganado bovino a la ingestión de sulfato-molibdeno. La distribución sub-celular de ^{64}Cu en el hígado de bovinos normales y carenciados muestran diferencias entre las fracciones como podemos observar en la Tabla 1; mayores diferencias hay entre bovinos y ovinos. La falta de datos en animales normales, los escasos conocimientos sobre el metabolismo del cobre en las células hepáticas - principalmente en lo relacionado con el papel que cada fracción juega en el transporte de cobre y

y la síntesis de cuproproteínas - hace difícil una interpretación de los datos. Estos resultados sugieren que resulta necesaria una investigación más amplia, ya que trabajos previos y los datos obtenidos en este trabajo indican que el hígado juega un papel importante en el metabolismo del cobre en el organismo animal.

TABLA 1

	Bovinos normales	Bovinos carenciados	Ovinos controles
	Por ciento		
Núcleos debris celular	17,30	26,41	50,00
Mitocondrias	13,91	15,48	29,10
Lisosomas	2,10	1,70	2,80
Microsomas	1,15	2,10	4,20
Fracción soluble	65,47	54,40	12,90

A. 8. Radioinmunoanálisis de digitálicos. Su normalización

M. Barmasch, L.N. Pérez y N. Altschuler.

La finalidad de este trabajo fue estudiar las condiciones en que son realizadas las determinaciones de digitálicos por radioinmunoanálisis en distintos medios biológicos, así como el comportamiento de dichos compuestos (Digoxina, B-metildigoxina, Digitoxina) frente a un mismo anticuerpo. Los datos así obtenidos servirán de base para una mejor interpretación de los estudios farmacológicos destinados a determinar el pasaje a través de la barrera hematoencefálica de B-metildigoxina y digitoxina, utilizando para ello "Kits" comerciales de Digoxina ^{125}I (Digo K 125-C.I.S.), H^3 Digoxina y H^3 Digitoxina (Schwarz Mann).

Previamente a la determinación de los compuestos digitálicos en las muestras biológicas, fueron normalizadas las condiciones de trabajo; para ello fueron analizadas las curvas dosis-respuesta por el sistema logit-log, por considerar que dicha representación proporciona una información más completa sobre el comportamiento del sistema. Pudieron ser observadas diferencias significativas entre las curvas dosis-respuesta cuando las realizamos con suero fresco y con suero liofilizado.

La figura 1 representa estos resultados, observando que en logit-log no se superponen ambas curvas, contrariamente a lo esperado.

Cuando realizamos las curvas dosis-respuesta de los distintos "Kits" con los diferentes medios biológicos (S, P y LCR), las rectas obtenidas en representación logit-log presentaron distintas pendientes (Figs. 2 y 3). En algunos "Kits" observamos una falta de alineación de los puntos experimentales realizados con plasma.

También fueron realizados estudios de recuperación de β -metil digoxina en los distintos medios de incubación: suero, plasma o LCR, utilizando β -metil digoxina como patrón.

El análisis de las curvas obtenidas, ya sea utilizando como patrón β -metil digoxina o digoxina suministrada con cada uno de los "Kits" (Schwarz Mann, Sorin), demostró una falta de superposición de las mismas. Esto fue debido a que el anticuerpo es capaz de distinguir entre la molécula de β -metil digoxina y la de digoxina (Figs. 4 y 5). Asimismo, podemos observar en la última figura que en la curva realizada con β -MD como estandar los puntos no se alinean, lo que indicaría una falta de equilibrio entre la digoxina utilizada como trazador y la β -metil digoxina con el antisuero.

Para conocer esta distinta afinidad entre el fármaco β -metil digoxina y digoxina con el suero antidigoxina, las curvas dosis-respuesta fueron sometidas al análisis de Scatchard (1).

En el gráfico de Scatchard está representada la relación entre la cantidad de digitálico combinado y la del digitálico libre (B/F) en función de la masa total del digitálico unido [B] al anticuerpo. La pendiente obtenida en esta función da el valor de la constante de afinidad (-K) del antígeno (digitálico) con el anticuerpo en estudio y la intersección con la abscisa nos indica un valor proporcional al número de sitios activos de unión, dado por el parámetro matemático K. (q), siendo K la constante arriba indicada y (q) la concentración total del anticuerpo presente en el sistema.

Al analizar las curvas dosis-respuesta utilizando los patrones de β -metil digoxina y de digoxina, utilizando el "Kit" de Sorin, observamos, mediante el análisis de Scatchard, un comportamiento homogéneo del anticuerpo antidigoxi-

na frente a la digoxina, provista por el "Kit", mientras que con el patrón de β -metil digoxina presenta más de una constante de afinidad (K), índice de la presencia de más de una entidad químico-inmunológica (Fig. 6).

Al someter al análisis de Scatchard las curvas realizadas con el "Kit" de Schuwarz-Mann, observamos que el suero antidigoxina frente a su patrón (digoxina) se aparta de la linealidad, demostrando una falta de homogeneidad.

Los resultados obtenidos con el patrón de β -metil digoxina, demuestran que el antisuero presenta un componente predominante, con una dada afinidad ($-K_1$), observando la presencia de más de un sistema con otras constantes de afinidad (Fig. 7).

Esto de por sí demuestra que en muestras biológicas serán obtenidos distintos valores cuando se interpolen los resultados en curvas construidas con patrones de digoxina o de β -metil digoxina. La relación (8 MD/D) obtenida en las muestras analizadas está comprendida entre, aproximadamente, 2 y 4.

Con el fin de utilizar posteriormente para estudiar también el pasaje de este fármaco a través de la barrera hemato-encefálica, fue analizado el "Kit" de digitoxina.

Fueron realizadas curvas dosis-respuesta con suero humano normal y líquido céfalo-raquídeo normal en el medio de incubación, obteniendo rectas con pendientes correctas en representación logit-log. También fue sometido a análisis de inmunidad cruzada entre β -metil digoxina y digitoxina, observando que las curvas dosis-respuesta no presentan reacción inmunológica cruzada cuando los valores de β -metil digoxina están comprendidos entre 0,5 y 4 ng/ml (valores farmacológicos). En cambio observamos reacción cruzada cuando los valores a dosar de β -metil digoxina circulante son mayores a 10 ng/ml (valores tóxicos (Fig. 8)).

Una vez normalizadas las condiciones de trabajo, estudiamos el pasaje de β -MD, D y Dt a través de la barrera hematoencefálica.

El Cuadro 1 muestra los resultados obtenidos en pacientes digitalizados con β -MD. Estos niveles fueron determinados en curvas dosis-respuesta realizadas con β -MD como patrón. Fueron observados valores no detectables en cuatro pacientes, estando el rango de los otros comprendido entre 1,3 y 2,7 ng/ml. Cuando estas mismas muestras fueron analizadas utilizando D como patrón, los niveles en tres pacientes fueron "no detectables", variando en los otros entre 0,25 y 1,25 ng/ml. En pacientes que presentaron valores "no detectables" de β -metil digoxina en LCR fue determinado el nivel de este compuesto en suero, siendo las cifras obtenidas: 0,3, 0,66 y 3,5 ng/ml, medidas con β -metil digoxina como patrón y de "ND", 1,8 y 1,5 ng/ml, respectivamente, utilizando Digoxina.

Cabe señalar que todos los pacientes digitalizados con Dt mostraron valores "no detectables" en LCR, mientras que las cifras circulantes variaron entre 5,6 y 23,0 ng/ml (Cuadro 2).

De los resultados obtenidos cuando fueron estudiadas las curvas dosis-respuesta realizadas con los diferentes medios biológicos y de la comparación entre las curvas diseñadas con suero liofilizado y suero fresco, se destaca el diferente comportamiento entre los dos últimos, debido a la probable desnaturalización que sufren las proteínas suéricas durante el proceso de liofilización, resultando por lo tanto aconsejable el uso de suero fresco. De ahí que algunos "Kits" comerciales actualmente indican el uso de suero obtenido en el mismo laboratorio, de individuos normales sin digitalizar, con el fin de homologar, en la curva dosis-respuesta el comportamiento de las proteínas suéricas con el suero en estudio. Este hecho es de real importancia en la metodología que usa carbón-dextrán como adsorbente para separar el digitálico libre del que se halla unido al anticuerpo. Asimismo, debe tenerse en cuenta el tipo de concentración de proteínas presentes en los diferentes medios biológicos;

de ahí que la curva dosis-respuesta deba ser realizada con el mismo medio biológico que la muestra en estudio.

De las pruebas de inmunidad cruzada realizadas en este estudio, se desprende que el comportamiento del sistema digoxina⁺-antidigoxina-β-metildigoxina no es comparable con el comportamiento del sistema digoxina⁺ antidigoxina-digoxina, lo que está indicando que el anticuerpo antidigoxina diferencia el grupo metilo unido al hidrato de carbono de la metildigoxina.

Los anticuerpos suministrados por los "Kits" comerciales utilizados en este trabajo fueron capaces de reconocer la molécula de D frente a la de β MD y reaccionar con diferente afinidad con los otros compuestos formados en la metabolización del digitálico. Contrariamente, otros autores publicaron trabajos utilizando anticuerpos que presentan la misma afinidad entre D, β MD y los demás metabolitos (2). Estos resultados indicarían que cada anticuerpo posee la capacidad de reconocer, o no, a los diferentes metabolitos de los cardiotónicos. En el caso de un inmuno-reconocimiento, cada anticuerpo posee la capacidad de reaccionar con una constante de afinidad dada.

Esta diferente constante de afinidad fue comprobada anteriormente por Zettner (3) mediante el método de Scatchard y por la técnica de saturación de Odell.

La diferente afinidad que presentan los anticuerpos utilizados con D y β MD, se ve reflejada en la relación $\frac{SMD}{D}$, la que presenta un rango comprendido entre 2,2 y 3,7, lo que podría ser explicado por la presencia de una mezcla de metabolitos, productos de la demetilación hepática y otras vías y luego vertidos al torrente sanguíneo (4).

Estas conclusiones sugieren la necesidad de desarrollar una batería de anticuerpos, específicos para cada metabolito, tendiente a determinar en forma cuantitativa la concentración de cada uno de ellos presente en el medio en estudio. Esto permitiría el reconocimiento de las formas activas y la determinación del real nivel de digitalización del paciente.

- 1.- Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci., 51:660, 1949.
- 2.- Larbig, D. y Kochstek, K., Dtsch. Med. Wschr., 97:1310, 1972.
- 3.- Zettner, A., Clin. Chem., 19:699, 1973.
- 4.- Rietbrock, N. y Anshagen, U., Dtsch. Med. Wschr., 98:177, 1973.

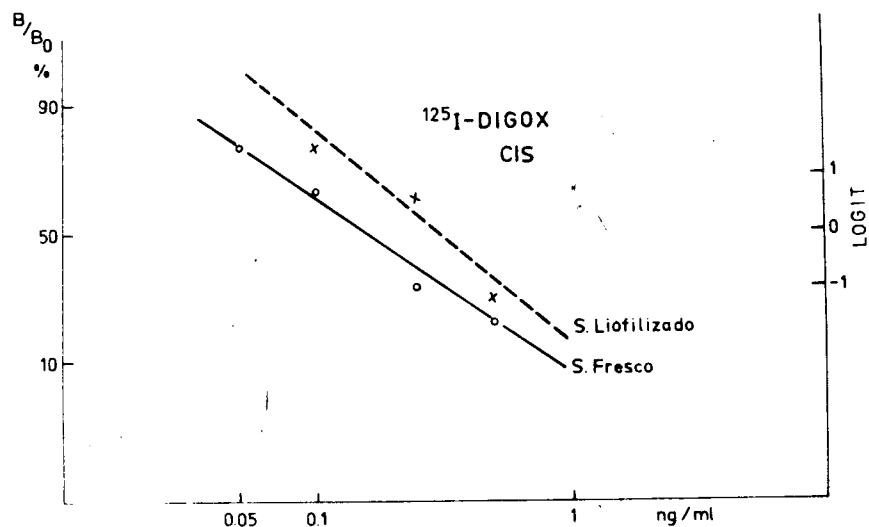


Figura 1.- Representación en logit-log de curvas dosis-respuesta realizadas con suero liofilizado y con suero fresco. "Kit" Cis-Sorin.

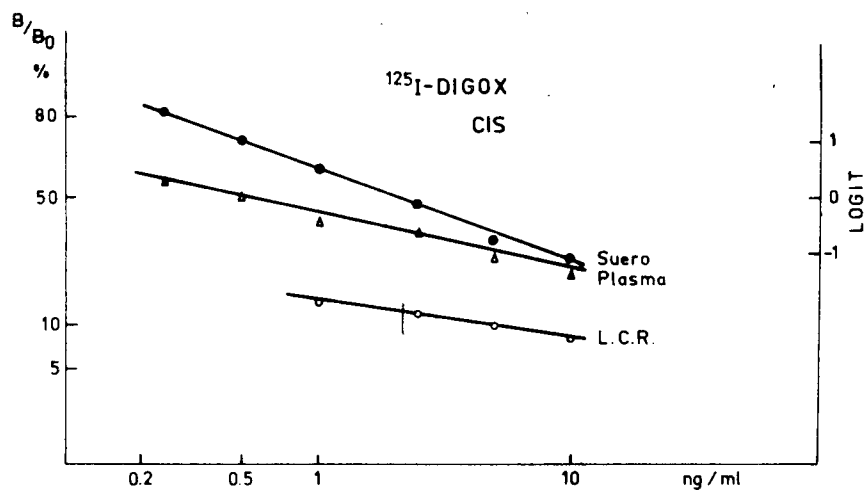


Figura 2.- Análisis por representación logit-log de curvas dosis-respuesta realizadas en sueros, plasma y líquido céfalo-raquídeo. "Kit" Cis-Sorin.

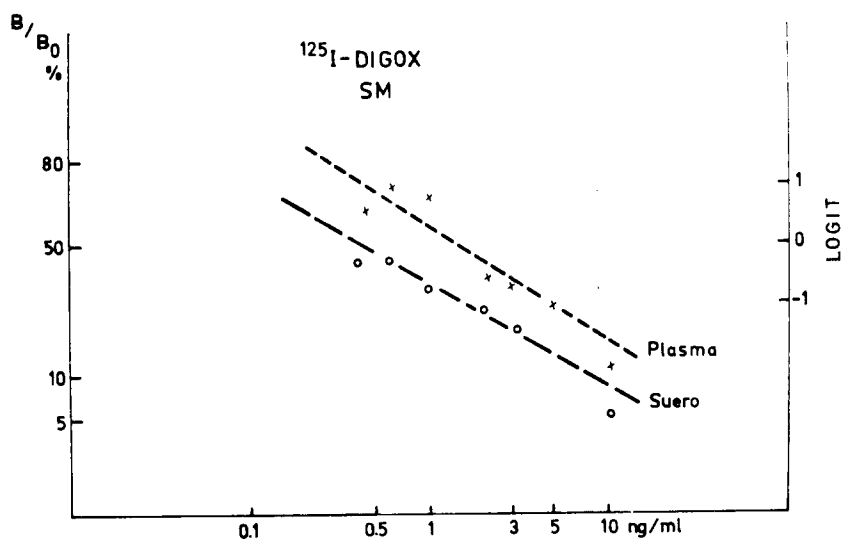


Figura 3.- Análisis por representación logit-log de curvas dosis-respuesta realizadas en suero y plasma. "Kit" de SM-Schwarz-Mann

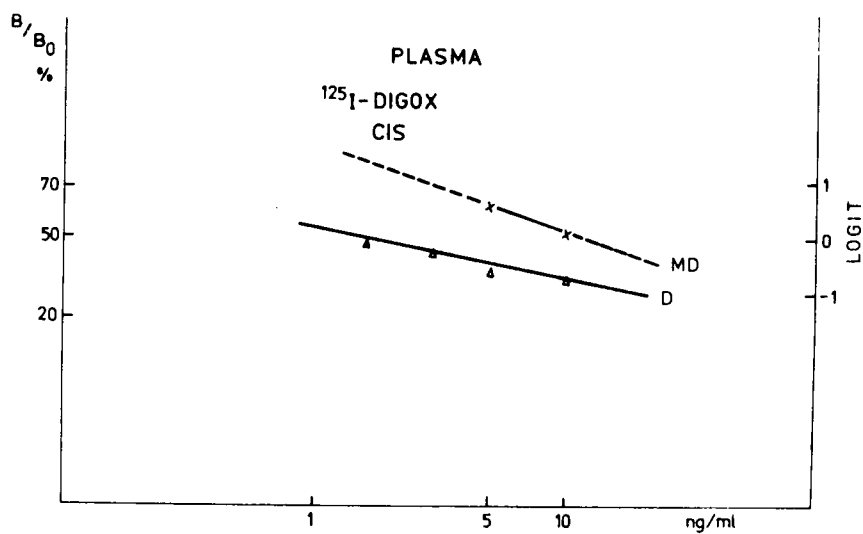


Figura 4.- Estudio comparativo utilizando como referencia Digoxima y β -metil digoxina en plasma, con "Kit" Cis-Sorin.

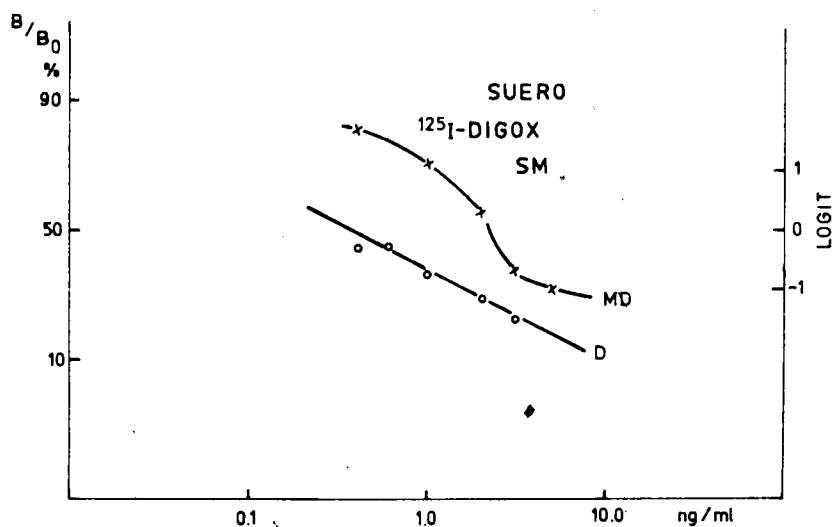


Figura 5.- Estudio comparado utilizando como referencia Digoxina y β -metil digoxina en suero con "Kit" SM-Schwarz-Mann.

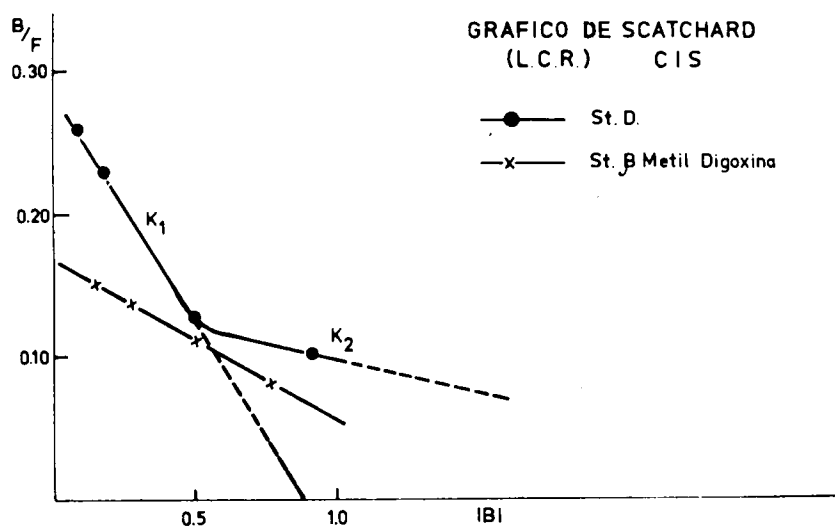


Figura 6.- Estudio de la afinidad de Digoxina y de β -metil digoxina con el suero antidigoxina, utilizando el método de Scatchard. "Kit" de Cis-Sorin.

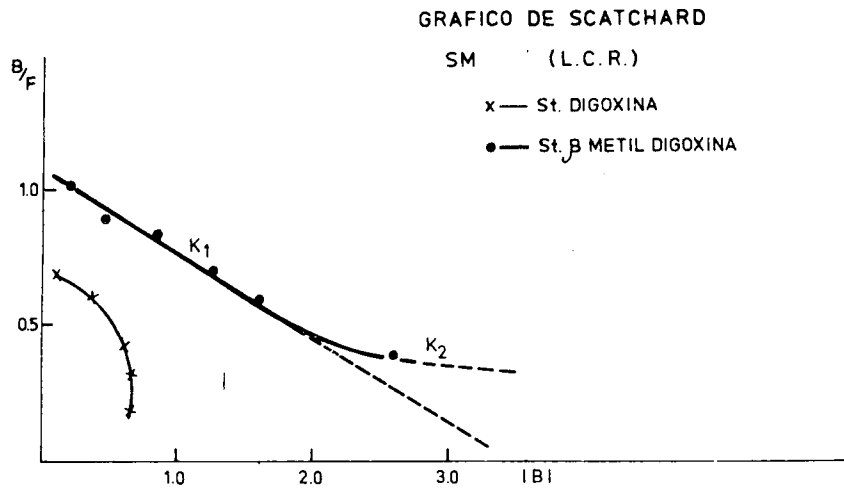


Figura 7.- Estudio de la afinidad de Digoxina y de β -metil digoxina con el suero antidigoxina, utilizando el método de Scatchard "Kit" de SM-Schwarz-Mann.

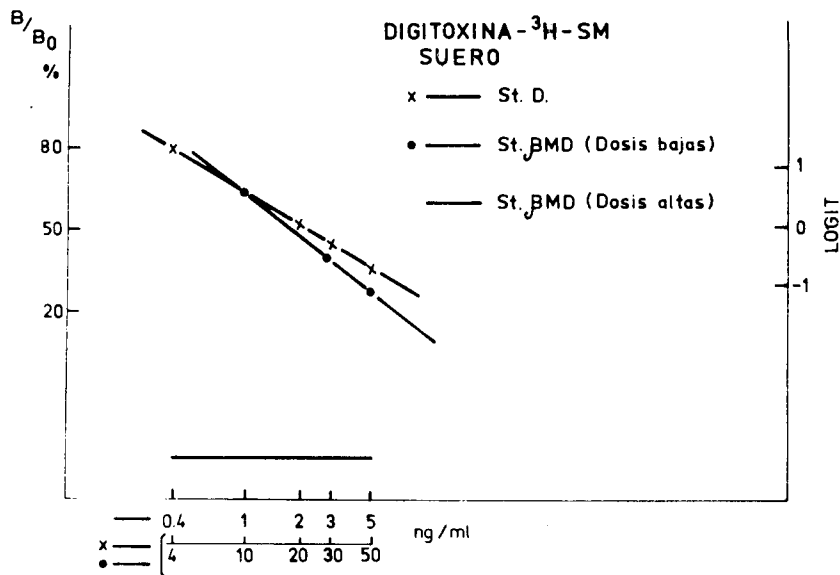


Figura 8.- Estudio de la inmunidad cruzada de Digoxina, β -metil digoxina y digitoxina con suero antidigitoxina, por representación logit-log.

SERIE β METILDIGOXINA

Paciente	Líquido Cefalorraquídeo			Suero		
	Standard digoxina	Standard β -metildigoxina	Relación	Standard digoxina	Standard β -metildigoxina	Relación
Cac.	N.D.*	N.D.	—	1,6	3,5	2,19
E	0,25	N.D.	—	N.D.	0,3	—
Mo.	N.D.	N.D.	—	1,8	0,66	0,36
N	1,25	2,7	2,2			
Mu.	0,68	2,0	2,9			
D	0,5	1,3	2,6			
R	0,6	1,5	2,5			
Can.	0,4	1,5	3,7			
F	N.D.	N.D.	—			

* N D: No Detectable.

Valores expresados en ng/ml.

Tabla 1.- Valores de β -metil digoxina en suero y en líquido céfalo-raquídeo, en pacientes digitalizados, obtenidos por radioinmunoanálisis utilizando Digoxina y β -metil digoxina como patrones de referencia.

SERIE DIGITOXINA
(Valores en ng/ml)

Nombre	Digitoxina en Suero ST	Digitoxina en LCR
M	23,0	N.D.*
S	15,0	N.D.
G	9,5	N.D.
Ro	18,0	N.D.
B	17,0	N.D.
L	10,0	N.D.
AR	5,6	N.D.
P	8,0	N.D.
CR	19,0	N.D.
NR	16,0	N.D.

* N.D. = No Detectable

Tabla 2.- Valores de digitoxina suérica y en LCR, en pacientes tratados con digitoxina.

B. GENETICA

B. 1. Pruebas genéticas con BHT y rayos X en esperma maduro de Drosophila melanogaster

B. Mazar Barnett y E.R. Muñoz.

Dado que se conocen antioxidantes fenólicos que inhiben la propagación de las reacciones en cadena iniciadas por los radicales libre y la significación que se ha dado a estos últimos en la inducción de daño por radiaciones, se ha pensado que algunos de dichos compuestos podrían actuar como radioprotectores.

El hidroxitolueno butilado (BHT) es un agente antioxidante ampliamente utilizado como conservador en la industria alimentaria y su acción ha sido estudiada en distintos sistemas biológicos con resultados variables. En Drosophila melanogaster ha sido señalado como protector (1) y como sensibilizador (2) al daño genético inducido por radiaciones. Debido a que los datos publicados son escasos y conflictivos y el uso del BHT muy difundido, fue encarado un estudio más amplio sobre la acción de esta droga en daños genéticos radio-inducidos en esperma maduro de Drosophila que incluye letales dominantes, letales recesivos ligados al sexo y translocaciones II-III.

En todos los casos fueron utilizados machos salvajes Samarkand de 7 días y la dosis de irradiación fue de 2.000 rads de rayos X (150 kV, 10 mA, 1 mm de Al). En los tratamientos combinados, el BHT fue administrado por inyección intraabdominal, inmediatamente antes de la irradiación, en solución al 0,05% en ClNa al 0,4%. Para la detección de letales recesivos los machos tratados fueron cruzados masivamente durante 3,30 horas (lo que asegura el muestreo exclusivo de esperma que en el momento del tratamiento era maduro y móvil), con hembras vírgenes de 5 días, de la cepa "Basc". Para la detección de translocaciones II-III los machos fueron cruzados masivamente por el mismo período de tiempo con hembras de la cepa "cn bw, e" de 5 días. Para la detección de letales dominantes, los machos fueron apareados individualmente con hembras "cn bw, e" y a continuación las hembras fueron puestas en cámaras de ovoposición por 24 horas y la eclosión de los huevos fue controlada a las 24 y 48 horas siguientes, a fin de asegurar la detección de huevos de eclosión tardía. Para la corrección de las frecuencias obtenidas en las series tratadas respecto de los controles, fue utilizada la fórmula usada por Sankaranarayanan (3), realizando una prueba de significación de medias, adaptada a distribuciones normales y binomiales.

Los resultados obtenidos en la inducción de letales recesivos y translocaciones II-III están indicados en la Tabla 1 y los letales dominantes en la Tabla 2. En todos los casos los resultados de los distintos experimentos han sido sumados, ya que las frecuencias no diferían significativamente entre sí. De los datos presentados resulta evidente que en las condiciones de experimentación señaladas el BHT no modifica el efecto de los rayos X con respecto a ninguno de los daños genéticos analizados.

La diferencia en metodología (muestreo celular, cepas, etc.) no parece justificar por sí misma la diferencia entre los datos presentados aquí y la potente acción radiosensibilizadora del BHT comunicada por Prasad y Kamra (2), quienes con una solución más diluida (0,001%) obtuvieron un incremento en la frecuencia de letales recesivos del 5,5% con 2,4 Krads, a 9,1% en los tratamientos combinados, frecuencia esta que se halla por encima de la obtenida por los mismos autores con 3,6 Krads (8,8%), es decir, una dosis 1,2 Krads mayor. También existe discrepancia con los datos de Guzmán et al (1), quienes encontraron

que el BHT es un radioprotector. En efecto, la frecuencia de 3,6% de letales recesivos encontrada por estos autores, con 2.500 rads, cayó a 0,70% en tratamientos combinados, resultando evidente la magnitud del efecto si se considera que la relación entre el tipo de daño estudiado y la dosis es lineal.

- 1.- Guzmán, J. et al., Dros. Inform. Ser., 50:140, 1973.
- 2.- Prasad, O., y Kamra, O.P., Int. J. Radiat. Biol., 25:67, 1974.
- 3.- Sankaranarayanan, K., Mutation Res., 4:641, 1967.

TABLA 1

Tratamiento	Letales recesivos ligados al sexo			Translocaciones II-III		
	cromosomas probados	número de letales	%	cromosomas probados	número de translocaciones	%
2.000 rads	1.146	74	6,45	1.782	77	4,32
BHT + 2.000 rads	1.117	73	6,53	1.521	62	4,07

Frecuencia de letales recesivos ligados al sexo y translocaciones II-III inducidos por 2.000 rads y BHT (0,05%) + 2.000 rads.

TABLA 2

	Control			2.000 rads			BHT + 2.000 rads		
	Huevos totales	Huevos no ecl.	%	Huevos totales	Huevos no ecl.	%*	Huevos totales	Huevos no ecl.	%*
Serie I	511	63	12,33	1.220	551	37,45	770	365	40,00
" II	1.856	243	13,09	2.067	1.127	47,67	1.913	1.049	48,04
" III	2.367	306	12,93	3.287	1.678	43,78	2.683	1.414	45,68

* Por ciento corregido según la fórmula: $\frac{Pt - Pc}{1 - Pc}$ (3). Pt: proporción de huevos no eclosionados en el tratamiento; Pc: proporción de huevos no eclosionados en el control.

Frecuencia de letales dominantes inducidos por 2.000 rads y BHT (0,05%) + 2.000 rads.

B. 2. Pruebas de letales recesivos ligados al sexo con 1-Bencil-3- (2,3-dihidroxi)propoxi-indazol y 2N-butil-malon di (dimetilamina propil) diamida, en Drosophila melanogaster

B. Mazar Barnett y E.R. Muñoz.

El aumento incesante de nuevos compuestos lanzados al mercado por la industria química y farmacéutica, hace necesario verificar su potencial efecto mutagénico en distintos sistemas. Esto es de gran importancia, tanto para la industria como para los consumidores, dada la creciente preocupación por el aumento del riesgo genético a que pueden conducir los contaminantes ambientales en general. La importancia de los resultados negativos o positivos en este campo es obvia.

A tal fin se estudió el posible efecto mutagénico en Drosophila melanogaster de dos sustancias de marcada acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética recientemente sintetizadas por un laboratorio farmacéutico local: 1-Bencil-3-(2,3-dihidroxi)propoxi-indazol (Benzidol) (1) y 2n-butil-malon di (dimetilamina propil) diamida. Con tal objeto se realizaron pruebas de letalidad recesiva ligada al sexo, que, de acuerdo con estudios comparativos recientes, es uno de los métodos más eficientes para detectar actividad mutagénica en Drosophila (2).

El Benzidol fue administrado "per os" a machos Samarkand de 7 días, mediante papeles de filtro saturados con la droga en Tween 20 y glucosa por períodos de 24 y 48 horas. No pudo ser inyectado intraabdominalmente (forma ideal que permite asegurar la incorporación de la droga y su dosificación correcta) debido a la insolubilidad del liofilizado como succinato de sodio disponible. Después del tratamiento los machos fueron cruzados masivamente con hembras vírgenes "Basc" de 5 días, durante 24 horas, con el fin de estudiar esperma tratado en los últimos estados de maduración. Se hicieron 5 sub-cultivos de dos días cada uno y con las hembras de la Filial primera fueron realizados cruzamientos individuales para la detección de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo.

La 2n-butil-malon di (dimetilamino propil) diamida fue administrada por inyección intraabdominal en solución al 3,75% llevada a pH 8,5, con ClH 1N. Los machos tratados fueron cruzados masivamente con hembras vírgenes "Basc", proveyéndoles nuevas hembras cada 24 horas con el fin de estudiar células que en el momento del tratamiento se encontraban en distintos estados de desarrollo y realizando pruebas de letalidad con hembras fecundadas en el primero, segundo y quinto día.

Debido a que las frecuencias obtenidas en los distintos sub-cultivos y crías sucesivas no mostraron diferencias entre sí, los datos han sido sumados y los resultados son presentados en la Tabla 1. Como se puede ver, en las condiciones experimentales descriptas, las tasas de mutaciones letales obtenidas en las series tratadas con ambos compuestos, no difieren significativamente de la del control, que mostró la frecuencia de letales espontáneos, habitual en la cepa utilizada.

1.- Propker, M. et al., Arzneim.-Forsch., 26:1393, 1976.

2.- Vogel, E. y Leigh, B., Mutation Res., 29:383, 1975.

Se agradece a Laboratorios Szabo Hnos., Kessler y Cía. S.R.L., la provisión de drogas.

TABLA 1

Prueba de letales recesivos ligados al sexo en machos de Drosophila melanogaster, con 1-bencil-3-(2,3-dihidroxi-propoxi)-indazol y 2N-butil-malon di (dimetilamina propil)-diamina

Tratamiento	Cromosomas analizados	Número de letales	% de letales
Compuesto I	11.207	22	0,20
Compuesto II	6.328	15	0,24
Control	1.464	4	0,27
Compuesto I : 1-bencil-3-(2,3-dihidroxi-propoxi)-indazol			
Compuesto II : 2n-butil-malon di (dimetilamina propil) diamida			

B. 3. Influencia de la retención de huevos sobre la frecuencia de letales dominantes en *Drosophila melanogaster*

E.R. Muñoz y B. Mazar Barnett.

Algunos compuestos radiomiméticos (alquilantes) que han sido considerados poco eficientes para inducir rupturas cromosómicas, son en realidad muy activos, pero para poner de manifiesto su acción, las células tratadas deben ser almacenadas por períodos variables. Esto se conoce como "efecto de almacenamiento" y la técnica habitual para ponerlo de manifiesto consiste en tratar espermatozoides en el macho o en hembras inseminadas y mantenerlas en un medio deficiente (4% de agar y 2% de glucosa), que previene la deposición de huevos. Terminado el período de almacenamiento, las hembras son pasadas a medio de cultivo común para las pruebas genéticas.

Ha sido sugerida una conexión entre la nutrición insuficiente de las hembras y el "efecto de almacenamiento", ya que la privación de proteínas podría alterar los mecanismos de reparación de los daños genéticos. Los intentos para determinar si la magnitud del "efecto de almacenamiento" en letales dominantes inducidos por Etil Metano Sulfonato diferían cuando las hembras eran almacenadas en medio de cultivo común o deficiente no son concluyentes (1).

Otros factores que pueden alterar la tasa final de daño genético recuperado, deben ser considerados cuando es estudiado el almacenamiento, entre ellos el envejecimiento del espermatozoides y de los huevos cuando las hembras son mantenidas en medios que previenen la ovoposición. El envejecimiento del espermatozoides no parece afectar la tasa final de daño recuperado (2). Para estudiar la influencia de la retención de huevos en la frecuencia de letales dominantes espontáneos, hembras de 5 días, de la cepa "Oregon K", después de fertilizadas, fueron mantenidas durante 5 días con comida común a 17°C y en medio deficiente a 25°C. Luego fueron puestas en cámaras de ovoposición con comida completa a 25°C, contando los huevos de dos posturas sucesivas de 24 horas cada una, llamadas de aquí en adelante 1ra. y 2da. postura. La eclosión de los huevos fue verificada a las 24 y 42 horas siguientes a fin de detectar los de eclosión tardía. Paralelamente, fueron llevadas a cabo pruebas similares con hembras de 5 días, mantenidas vírgenes, con comida común y puestas en las cámaras de ovoposición inmediatamente después de fecundadas.

La Tabla 1 muestra que la frecuencia de huevos no eclosionados es significativamente mayor cuando las hembras son almacenadas en medio deficiente. En este mismo grupo la frecuencia de letales en la primera postura fue significativamente mayor que en la segunda, no ocurriendo lo mismo con las hembras almacenadas en medio completo. La Tabla 2 muestra tres series experimentales, con hembras no almacenadas y se ve que en todos los casos la frecuencia de letales en la primera postura es significativamente mayor que en la segunda.

Del análisis general de los datos surge que independientemente de la influencia del estado de nutrición de las hembras, la frecuencia de letales dominantes se ve afectada por el almacenamiento de los huevos. En la Tabla 1 se ve que cuando las hembras son almacenadas en medio deficiente y retienen los huevos, éstos, luego, son incapaces de proseguir su desarrollo. En la segunda postura muchos de los huevos maduros y retenidos ya han sido eliminados y la frecuencia cae. Parece dudoso que esa disminución de la frecuencia se deba a la mejor alimentación que reciben las hembras en las cámaras de ovoposición, dado el corto tiempo transcurrido entre ambas posturas y a que los huevos se encuentran en la últimas etapas de maduración. Nada de esto ocurre con la comida común, donde las hembras no retienen los huevos, ya que los depositan durante todo el período de almacenamiento. Esto

es más claro aun en la Tabla 2, en donde a pesar de que las hembras habían sido bien alimentadas antes del apareamiento, la primera postura muestra mayor letalidad dominante, debido a que esta postura incluye aquellos huevos que las hembras normalmente retienen antes de ser fecundadas. Resulta claro que los estudios en los cuales son comparados la influencia del "efecto de almacenamiento" sobre rupturas cromosómicas y las mutaciones de punto, deben tener en cuenta las alteraciones fisiológicas que sufren los huevos almacenados, cuyo caso extremo conduce a la muerte de los mismos, ya que dichos cambios pueden influir en forma diferente sobre la recuperación de los distintos tipos de daño genético inducido.

- 1.- Ratnayake, W.E., Mutation Res., 5:271, 1968.
- 2.- Srám, R.J., Molec. Gen.Genetics, 106:286, 1970.

TABLA 1
Frecuencia de letales dominantes en hembras de Drosophila melanogaster almacenadas durante cinco días

	A) Medio deficiente			B) Medio completo		
	Huevos			Huevos		
	Total	No eclos.	% no eclos.	Total	No eclos.	% no eclos.
1ra. postura	552	235	42,57	843	39	4,63
			$p < 0,0001$			$p = 0,08$
2da. postura	654	137	20,97	449	31	6,90
Total	1.206	372	30,85	1.292	70	5,42

Total A) vs. Total B) : $p < 0,0001$

TABLA 2
Frecuencia de letales dominantes en hembras de Drosophila melanogaster
no almacenadas

		Huevos			p
		Total	No eclos.	% no eclos.	
I	1ra. postura	1.414	93	6,58	0,00010
	2da. postura	577	13	2,25	
II	1ra. postura	745	78	10,47	< 0,00010
	2da. postura	440	13	2,95	
III	1ra. postura	1.194	88	7,37	< 0,00010
	2da. postura	742	14	1,89	
Total	1ra. postura	3.353	259	7,72	< 0,00010
	2da. postura	1.759	40	2,27	

B. 4. Influencia de la temperatura sobre la recuperación de daño genético inducido por rayos X en machos de *Drosophila melanogaster*

B. Mazar Barnett.

Con el fin de obtener información sobre la naturaleza del daño genético radioinducido y su reparación, fue considerado de interés estudiar el efecto de la baja temperatura en espermatozoides irradiados de *Drosophila melanogaster*. La investigación fue restringida a espermátidas tardías y espermatozoides móviles, estados muy próximos de la espermiogénesis, que presentan sin embargo, diferente respuesta a la acción de las radiaciones ionizantes (2, 5, 3) y que constituyen un excelente sistema para estudiar la influencia de agentes externos sobre los efectos de la radiación.

El efecto de la baja temperatura (0°C) y la radiación X fue investigado en la inducción de letales recesivos ligados al sexo y de translocaciones entre los cromosomas II y III.

El procedimiento experimental fue el siguiente: condiciones de irradiación: 10 mA, 150 kV, 1mm Al, DFO 26 cm, dosis 1.000 y 2.000 rads. Los machos fueron irradiados en recipientes de poliestireno de doble pared, con una mezcla frigorífica constituida por hielo granizado y una solución de NH_4Cl . Esta última fue reemplazada por arroz para las irradiaciones a temperatura ambiente. En los tratamientos a baja temperatura, la exposición a 0°C comenzó 5 minutos antes de la irradiación, prolongándola después de la misma hasta completar un período de 40 minutos. Se usaron dos métodos distintos para estudiar los estados de maduración del espermatozoides mencionados, con resultados completamente concordantes. Las hembras fecundadas fueron mantenidas 12 días, haciendo 3 sub-cultivos. Para los experimentos de letalidad recesiva ligada al sexo, fueron tratados machos silvestres de la cepa "Samarkand" cruzándolos con hembras vírgenes de la cepa "Basc". Con las hembras de la filial primera se hicieron las pruebas de letalidad recesiva. Los resultados figuran en la Tabla 1.

Para los experimentos de translocación, se trataron machos "Samarkand" que fueron cruzados con hembras vírgenes "cn bw, e". Con los machos de la filial primera fueron hechas las pruebas de translocación II-III, cuyos resultados figuran en la Tabla 2.

De los resultados obtenidos en las dos series de experimentos realizadas, surgen los siguientes hechos: a) a temperatura ambiente, el espermatozoides es más radiosensible que las espermátidas tardías, para los dos parámetros considerados. A 0°C, la frecuencia de letales recesivos inducidos por la radiación en espermátidas tardías aumenta significativamente, hasta alcanzar la frecuencia observada a temperatura ambiente en espermatozoides móviles. En este último, no observamos variación debida a la baja temperatura. Estos resultados pueden ser tomados como una indicación de que en espermátidas tardías tiene lugar, a temperatura ambiente, una cierta medida de reparación de daño pre-mutacional, que no acontece en espermatozoides móviles. A 0°C esta reparación no podría ocurrir normalmente, de modo que la frecuencia de mutación aumenta hasta alcanzar la que es propia del espermatozoides móviles. Por otra parte, el hecho de que la frecuencia de mutación en espermatozoides móviles no aumenta con los tratamientos a 0°C, indicaría que la baja temperatura no actúa en este caso aumentando el daño por radiación.

b) la frecuencia de translocaciones aumenta significativamente en ambos estados celulares cuando se irradia a 0°C. Aquí debe ser postulado un mecanismo común para los dos estados celulares, ya sea basado en la alteración de la reparación o en el aumento del daño. Debemos tener en cuenta que el fenómeno de translocación requiere dos procesos opuestos: ruptura de cromosomas y reunión de los fragmentos, que si bien es anómala, involucra un proceso de repa-

ración. También existe una cierta medida de restitución "a novo" de las rupturas radioinducidas.. Si la baja temperatura inhibe esa restitución, en la posterior movilización de los cromosomas (luego de la fertilización) habría más fragmentos disponibles, que al interactuar, darían mayor frecuencia de translocaciones recuperadas. Los resultados obtenidos parecen apoyar la hipótesis de que la baja temperatura ejerce su acción dificultando o inhibiendo el normal funcionamiento de los sistemas enzimáticos que intervienen en la reparación del daño genético inducido por la radiación. No debería, sin embargo, ser descartada la posibilidad de que la baja temperatura produjese un aumento del daño inducido, operando a través de un aumento en la concentración del oxígeno celular (1,4).

- 1.- Baker, W.K. y Sgourakis, E. , Proc. Natl. Acad. Sci., 36:176, 1950.
- 2.- Lefevre, G. y Jonsson, U.B., Mutation Res., 1:231, 1964.
- 3.- Mazar Barnett, B., Radiat Res., 51:134, 1972.
- 4.- Rinehart, R.R., Genetics, 49:855, 1964.
- 5.- Sobels, F.H., Mutation Res., 8:111, 1969.

TABLA 1

Letales recesivos ligados al sexo, inducidos por 1.000 R de rayos X en machos de Drosophila melanogaster

	Temperatura ambiente			0°C		
	Nº cromos. analizados	Nº de letales	% de letales	Nº cromos. analizados	Nº de letales	% de letales
Esperma móvil	1.579	44	2,78	1.614	37	2,29
(1er. período: crz. 3,30 h)	1.420	34	2,39	951	27	2,84
Esperma móvil	2.943	74	2,51	1.708	45	2,63
(1 cruzam. observ.)	_____	_____	_____	_____	_____	_____
<u>Total</u>	5.942	152	2,56	4.273	109	2,55
Espermátidas t.	2.237	34	1,51	1.430	32	2,24
(2do. período: hasta 24 h)	1.899	32	1,68	1.227	33	2,69
Espermátidas t.	1.571	24	1,53	1.140	28	2,46
(de machos de 2 h de edad)	_____	_____	_____	_____	_____	_____
<u>Total</u>	5.707	90	1,58	P: 0,0020 3.797	93	2,45

TABLA 2

Translocaciones II-III inducidas por 2.000 R de rayos X en machos de Drosophila melanogaster

Tratamiento	1er. período de cruzamiento (esperma móvil)				2do. período de cruzamiento (espermatidas tardías)			
	Nº crom. analiz.	Nº de transl.	% de transl.	P	Nº crom. analiz.	Nº de transl.	% de transl.	P
Irrad. temp. ambiente	1.867	87	4,66		2.384	59	2,47	
	1.782	77	4,32		1.573	49	3,12	
	1.365	51	3,74		1.362	37	2,72	
<u>Total</u>	5.014	215	4,29		5.319	145	2,73	
				0,00006				0,00006
Irrad. a 0°C	917	56	6,11		1.676	72	4,30	
	1.204	85	7,06		1.517	63	4,15	
	1.973	128	6,49		1.725	87	5,04	
<u>Total</u>	4.094	269	6,57		4.918	222	4,51	
Un período de cruzamiento de 24 horas					Promedio de los 2 períodos de cruzamiento			
Irrad. temp. ambiente	1.981	62	3,13		10.333	360	3,48	
Irrad. a 0°C	2.614	127	4,85		9.012	491	5,45	

B. 5. Datos preliminares sobre la reversión del locus para dehidrogenasa alcohólica en *Drosophila melanogaster*

E.R. Muñoz y B. Mazar Barnett.

Resulta de interés determinar la verdadera naturaleza del daño genético inducido por radiaciones ionizantes en *Drosophila*.

Debido a las dificultades inherentes al "mapeo" fino de cromosomas en este organismo, no siempre se puede distinguir entre mutaciones génicas y pequeñas deficiencias cromosómicas. Por otra parte, la inducción de reversiones, corrientemente utilizada en bacterias y *Neurospora* sp., para este tipo de estudios, es de difícil aplicación en *Drosophila*, por el elevado número de individuos que es necesario analizar para llegar a conclusiones válidas. La frecuencia de reversión de algunos loci que son considerados particularmente inestables: Killer-prune, 1×10^{-4} , inducido con 3.000 r (4); forked-3n, $6,01 \times 10^{-4}$, inducido con 4.000 r (5); yellow-2, $6,24 \times 10^{-5}$, white apricot, $2,09 \times 10^{-5}$, scute, 601×10^{-5} con 5.000 r (2); Nasobemia, 7×10^{-4} , inducido con 4.000 r (1). La mutación Adh, locus que codifica para la enzima dehidrogenasa alcohólica en *Drosophila melanogaster*, ha permitido desarrollar un método para la detección de reversiones de esta mutación, basado en el hecho de que los mutantes deficientes para la enzima mencionada son selectivamente eliminados cuando el medio de cultivo contiene etanol. Ello posibilita el análisis de gran número de individuos de un modo relativamente sencillo. Mediante este método fue encarado el estudio de la reversión de la mutación Adh por medio de rayos X y dietilsulfato.

El procedimiento experimental desarrollado es como sigue: machos adultos de una cepa deficiente para la dehidrogenasa alcohólica-Adh^{nl}, inducida por medio de etilmetanosulfonato (3) son tratados con un agente mutagénico y cruzados con hembras vírgenes también deficientes para la enzima, portadoras de marcadores genéticos que permiten el seguimiento del cromosoma investigado (en estos experimentos se los dejó aparearse durante 24 horas). La filial primera es sometida a la acción del alcohol, colocando las moscas en un medio de agar 23% y etanol 17,5%, por un período de 24 horas, luego del cual son comprobados los resultados. Se usa esa concentración de etanol - que las pruebas piloto demostraron que era óptima, ya que mata a los adultos homocigotas para la mutación Adh en pocas horas, pero no mata a los individuos normales ni a los heterocigotas para la mutación. Esto significa que en los casos en que son inducidas reversiones, los individuos tratados con alcohol deben sobrevivir. Fueron realizadas dos series de experimentos, con sus respectivos controles: a) tratando machos con 1.000 r de rayos X, fue analizada una progenie (F1) de 292.980 individuos y 77.930 del control; b) tratando machos con dietilsulfato al 0,5%, por vía oral, fueron analizados 158.000 individuos de la F1 y 137.850 del control. A fin de comprobar si los machos habían ingerido la droga, con parte de los tratados se hizo una prueba de letalidad recesiva ligada al sexo. La tasa de mutaciones fue del 31,27%. No se detectó la aparición de reversiones en el locus investigado, lo que indica que la frecuencia de reversión estaría, en el caso de los tratamientos con rayos X, por debajo de $3,4 \times 10^{-6}$ y en el caso de los tratamientos con dietilsulfato, por debajo de $6,3 \times 10^{-6}$. Asimismo podría afirmarse que no fueron inducidos supresores de la mutación en estudio. Los experimentos continúan y mantendremos la exposición a la radiación en 1.000 R, ya que dosis mayores inducen una gran cantidad de rupturas cromosómicas que tienden a confundir los resultados.

- 1.- Denell, R.E., Mutation Res., 15:221, 1972.
- 2.- Green, M.M., Genetics, 46:671, 1961.
- 3.- Grell, E.H., en "Genetic variations of Drosophila melanogaster", ed. Lindsley, D.L. y Grell, E.H., Carnegie Inst., Washington, 1968.
- 4.- Lifschytz, E. y Falk, R., Genetics, 62:353, 1969.
- 5.- Woodruff, R.C. et al., Mutation Res., 15:86, 1972.

Agradecemos al Dr. E.H. Grell la provisión de las cepas Adh.

B. 6. Frecuencia de translocaciones inducidas por rayos X en machos de *Drosophila melanogaster* pre-tratados con cloranfenicol

E.R. Muñoz

Debido a que los cambios genéticos inducidos deben atravesar una serie de etapas como condición previa para su fijación definitiva, agentes capaces de alterar dicho proceso pueden determinar variaciones en la cantidad de daño recuperado. Mediante la utilización de antibióticos, ha sido posible modificar el efecto genético inducido por radiaciones ionizantes en diversos organismos. En *Drosophila melanogaster*, pre-tratamientos con cloranfenicol pueden disminuir la frecuencia de letales recesivos ligados al sexo, inducidos por rayos X, en espermatidas (1, 4) y posiblemente en espermatoцитos (1).

Los resultados en esperma son contradictorios con relación a la inducción de este tipo de daño y como en los trabajos citados fue utilizado un cromosoma X en anillo, fueron excluidos del análisis aquellos letales conectados con aberraciones cromosómicas.

Debido a que no ha sido establecida la influencia del cloranfenicol en los procesos de reunión de fragmentos cromosómicos inducidos por radiaciones en *Drosophila*, fue llevada a cabo una prueba de translocaciones entre los cromosomas II y III con y sin inyección de este antibiótico previa a la irradiación.

Machos silvestres "Oregon R" de 7 días fueron inyectados intraabdominalmente con una solución de cloranfenicol (0,05 mg/ml) y después de 40 minutos irradiados con una dosis de 3.000 rads de rayos X (150 kV, 10 mA, 1 mm Al), machos no inyectados fueron irradiados simultáneamente. Inmediatamente después de los tratamientos los machos fueron cruzados masivamente durante 24 horas con hembras vírgenes de 5 días de edad, homocigotas para los marcadores "cn bw, e" en proporción de un macho por cada tres hembras. Con los machos de la Filial I se realizó una prueba de translocaciones entre los cromosomas II y III, controlando también la fertilidad de los mismos debido a la influencia que sobre la misma pueden tener las aberraciones cromosómicas.

La Tabla 1 muestra las frecuencias de translocaciones y de esterilidad obtenidas con el muestreo celular total de 24 horas y se puede ver que en ambos casos las series pre-tratadas con cloranfenicol muestran una tasa de daño significativamente inferior a la obtenida con 3.000 rads.

Debido a que entre la inducción de daño genético y su detección tienen lugar procesos que requieren síntesis de proteínas y que el cloranfenicol es un inhibidor de la misma, las variaciones en las frecuencias de daños encontradas con este antibiótico en otros organismos han sido interpretadas como debidas a interferencias con dichos procesos. En *Drosophila*, los resultados con dosis fraccionadas de radiación parecen indicar que los fragmentos cromosómicos inducidos en las células en estudio (esperma maduro y espermatidas tardías) interactúan después de la fertilización (2, 3). Sin embargo, si la síntesis de proteínas juega algún papel en la reunión de fragmentos en *Drosophila* y la disminución de translocaciones encontrada en los tratamientos con cloranfenicol se debe a que dicha síntesis está afectada, estos resultados indicarían que algunos fragmentos cromosómicos se reúnen antes de la fertilización. Otra posibilidad es que en las condiciones experimentales utilizadas, esta droga actúe alterando procesos metabólicos más generales, lo que al dificultar la posterior reunión de los fragmentos cromosómicos, determinaría su eliminación selectiva, disminuyendo así la cantidad de daño final recuperado.

- 1.- Denell, R.E., Mutation Res., 15:221, 1972.
- 2.- Green, M.M., Genetics, 46:671, 1961.
- 3.- Grell, E.H., en "Genetic variations of Drosophila melanogaster", ed. Lindsley, D.L. y Grell, E.H., Carnegie Inst., Washington, 1968.
- 4.- Lifschytz, E. y Falk, R., Genetics, 62:353, 1969.
- 5.- Woodruff, R.C. et al., Mutation Res., 15:86, 1972.

Agradecemos al Dr. E.H. Grell la provisión de las cepas Adh.

B. 6. Frecuencia de translocaciones inducidas por rayos X en machos de *Drosophila melanogaster* pre-tratados con cloranfenicol

E.R. Muñoz

Debido a que los cambios genéticos inducidos deben atravesar una serie de etapas como condición previa para su fijación definitiva, agentes capaces de alterar dicho proceso pueden determinar variaciones en la cantidad de daño recuperado. Mediante la utilización de antibióticos, ha sido posible modificar el efecto genético inducido por radiaciones ionizantes en diversos organismos. En *Drosophila melanogaster*, pre-tratamientos con cloranfenicol pueden disminuir la frecuencia de letales recesivos ligados al sexo, inducidos por rayos X, en espermatidas (1, 4) y posiblemente en espermatoцитos (1).

Los resultados en esperma son contradictorios con relación a la inducción de este tipo de daño y como en los trabajos citados fue utilizado un cromosoma X en anillo, fueron excluidos del análisis aquellos letales conectados con aberraciones cromosómicas.

Debido a que no ha sido establecida la influencia del cloranfenicol en los procesos de reunión de fragmentos cromosómicos inducidos por radiaciones en *Drosophila*, fue llevada a cabo una prueba de translocaciones entre los cromosomas II y III con y sin inyección de este antibiótico previa a la irradiación.

Machos silvestres "Oregon R" de 7 días fueron inyectados intraabdominalmente con una solución de cloranfenicol (0,05 mg/ml) y después de 40 minutos irradiados con una dosis de 3.000 rads de rayos X (150 kV, 10 mA, 1 mm Al), machos no inyectados fueron irradiados simultáneamente. Inmediatamente después de los tratamientos los machos fueron cruzados masivamente durante 24 horas con hembras vírgenes de 5 días de edad, homocigotas para los marcadores "cn bw, e" en proporción de un macho por cada tres hembras. Con los machos de la Filial I se realizó una prueba de translocaciones entre los cromosomas II y III, controlando también la fertilidad de los mismos debido a la influencia que sobre la misma pueden tener las aberraciones cromosómicas.

La Tabla 1 muestra las frecuencias de translocaciones y de esterilidad obtenidas con el muestreo celular total de 24 horas y se puede ver que en ambos casos las series pre-tratadas con cloranfenicol muestran una tasa de daño significativamente inferior a la obtenida con 3.000 rads.

Debido a que entre la inducción de daño genético y su detección tienen lugar procesos que requieren síntesis de proteínas y que el cloranfenicol es un inhibidor de la misma, las variaciones en las frecuencias de daños encontradas con este antibiótico en otros organismos han sido interpretadas como debidas a interferencias con dichos procesos. En *Drosophila*, los resultados con dosis fraccionadas de radiación parecen indicar que los fragmentos cromosómicos inducidos en las células en estudio (esperma maduro y espermatidas tardías) interactúan después de la fertilización (2, 3). Sin embargo, si la síntesis de proteínas juega algún papel en la reunión de fragmentos en *Drosophila* y la disminución de translocaciones encontrada en los tratamientos con cloranfenicol se debe a que dicha síntesis está afectada, estos resultados indicarían que algunos fragmentos cromosómicos se reúnen antes de la fertilización. Otra posibilidad es que en las condiciones experimentales utilizadas, esta droga actúe alterando procesos metabólicos más generales, lo que al dificultar la posterior reunión de los fragmentos cromosómicos, determinaría su eliminación selectiva, disminuyendo así la cantidad de daño final recuperado.

Nuestro conocimiento actual sobre los mecanismos de reparación de daño en Drosophila, no permite excluir ninguna de estas dos hipótesis.

- 1.- Clark, A.M., Z. Vererbungslehre, 94:121, 1963.
- 2.- Muller, H.J., en "Radiation Biology". Vol. I, p. 475. Ed. A. Hollaender. Mc Graw-Hill, New York, 1954.
- 3.- Sankaranarayanan, K. y Sobels, F.H., en "The genetic and biology of Drosophila". Ed. Ashburner M. y Novitski, E., 1976.
- 4.- Sobels, F.H. et al., en "Repair from genetic radiation damage". Ed. Sobels, F.H. Pergamon Press, Oxford, 1963, p. 179.

TABLA 1

Frecuencia de translocaciones II-III y machos estériles inducidos por 3.000 rads de rayos X, con y sin pre-tratamiento con cloranfenicol (0,05 mg/ml) en Drosophila melanogaster

Tratamiento	Translocaciones II-III				Machos de la Fl estériles			
	Nº crom. analiz.	Nº de transl.	% de transl.	P	Nº crom. analiz.	Nº de transl.	% de transl.	P
Control	2.706	-	-		2.757	51	1,84	
3.000 rads	1.358	192	14,13	0,036	1.725	367	21,27	<0,0001
Cloranfen. + 3.000 rads	871	96	11,02		1.025	154	15,02	

B. 7. Letales dominantes inducidos por dietilsulfato en *Drosophila melanogaster*
E.R. Muñoz y B. Mazar Barnett.

Al no haber encontrado translocaciones después de tratamientos con Dietilsulfato (DES) en *Drosophila melanogaster*, ha sido considerado que esta droga no induce rupturas cromosómicas en este organismo (3).

Con el objeto de establecer si la falta de translocaciones se debe realmente a incapacidad del DES de inducir rupturas o a problemas relacionados con su detección en *Drosophila*, se realizaron pruebas de letalidad dominante, debido a que este daño es en gran medida la expresión de rupturas cromosómicas y alteraciones complejas resultantes.

Machos de 7 días de la cepa silvestre "Samarkand" fueron tratados "per os" con soluciones al 0,5% y 0,75% de DES durante períodos variables de tiempo (ver tablas) y luego fueron cruzados individualmente con hembras vírgenes de la misma cepa. Con el objeto de estudiar exclusivamente esperma que en el momento del tratamiento era maduro y móvil, después de un sólo apareamiento los machos fueron descartados y las hembras puestas en cámaras de ovoposición a 25°C. Las hembras que a las 24 horas habían puesto más de 20 huevos fueron transferidas a otra cámara para un segundo período de ovoposición.

Debido a que la mayoría de los letales dominantes inducidos actúan en embriogénesis temprana, en los primeros experimentos se midió la eclosión de huevos y se controló hasta las 48 horas para incluir a aquéllos de eclosión tardía. Los resultados de estas pruebas de letalidad dominante temprana aparecen en la Tabla 1. Como se puede ver, la tasa de letalidad dominante temprana es las series con tratamiento es significativamente mayor a la del control. La diferencia encontrada en algunas series entre primera y segunda postura será discutida en otra parte. A fin de establecer una comparación, debemos mencionar que la frecuencia de letales dominantes tempranos inducidos por una solución de DES al 0,75% durante 2,30 horas es similar a la obtenida con 2.000 rads de rayos X (43,78%), dosis esta última que indujo el 4,32% de translocaciones II-III.

Dada la alta toxicidad del DES y con el fin de descartar la posibilidad de que el efecto observado hubiera sido debido a alteraciones fisiológicas del esperma, se llevó a cabo un estudio de la acción de esta droga sobre la mortalidad de larvas y pupas (letalidad dominante tardía), cuyo padre había sido tratado. Esto está justificado ya que el daño genético inducido por sustancias químicas en *Drosophila* frecuentemente permanece latente por muchas generaciones celulares, expresándose con considerable retraso como rupturas cromosómicas (2). Se contaron los huevos eclosionados y adultos nacidos y los resultados los vemos en la Tabla 2, observando un aumento significativo de la letalidad dominante tardía en las series tratadas respecto del control.

Se toman estos resultados como evidencia de que el DES induce rupturas cromosómicas en *Drosophila*. La falta de detección de translocaciones mencionada (3) podría ser debida a que: a) las rupturas inducidas por esta sustancia no pueden interactuar, de allí la falta de translocaciones y la alta frecuencia de letales dominantes, o b) el DES induce rupturas latentes que se hacen efectivas con el tiempo, durante las divisiones de desarrollo, conduciendo a la muerte del heterocigota antes de que llegue al estado adulto. Esto último parece más probable, en vista de los resultados obtenidos con otro alquilante monofuncional: la Etileneimina, que induce translocaciones en esperma de *Drosophila* en frecuencia proporcional al tiempo de almacenamiento del mismo en la espermateca de la hembra (1, 4), lo que daría lugar a que las rupturas latentes se abran y los fragmentos puedan interactuar. Experimentos en esta línea con DES se encuentran en ejecución.

- 1.- Alexander, M.L. y Glanges, E., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 53: 282, 1964.
- 2.- Auerbach, C., Science, 158:1141, 1967.
- 3.- Pelecanos, M., Nature, 210:1294, 1966.
- 4.- Srám, R.J., Mutation Res., 9:243, 1970.

TABLA 1

Letalidad dominante temprana inducida por dietilsulfato en esperma maduro de Drosophila melanogaster

Tratamiento	Control		Serie I		Serie II	
	Nº H.no ecl. NºTot. H.	% Let. Dom.	NºH.no ecl. NºTot. H.	% Let. Dom.*	NºH.no ecl. NºTot. H.	% Let. Dom.*
<u>DES 0,5%</u>						
1ra. postura	$\frac{93}{1.414}$	6,58	$\frac{481}{1.614}$	24,86	$\frac{406}{1.044}$	34,59
2da. postura	$\frac{13}{577}$	2,25	$\frac{212}{814}$	24,34	$\frac{224}{757}$	27,97
Total	$\frac{106}{1.991}$	5,32	$\frac{693}{2.428}$	24,52	$\frac{630}{1.801}$	31,33
<u>DES 0,75%</u>						
1ra. postura	$\frac{90}{1.228}$	7,33	$\frac{726}{1.232}$	55,68	$\frac{498}{660}$	73,51
2da. postura	$\frac{13}{734}$	1,77	$\frac{136}{276}$	48,37	$\frac{223}{247}$	90,10
Total	$\frac{103}{1.962}$	5,25	$\frac{862}{1.508}$	54,79	$\frac{721}{907}$	78,35

DES 0,5% : Duración del tratamiento: Serie I, 2,30 horas; Serie II, 3 horas.

DES 0,75%: Duración del tratamiento: Serie I, 2,30 horas; Serie II, 2,30 horas + 1 hora (con intervalo de 1 hora).

* : % corregido: $\frac{Pt - Pc}{1-Pc}$ Pt: proporción de huevos no eclosionados en el tratamiento; Pc: proporción de huevos no eclosionados en el control.

TABLA 2

Letalidad dominante tardía y total inducida por dietilsulfato (0,75%) en esperma maduro de Drosophila melanogaster

Período de ovoposición	Proporción de let.dom. tardía* x 100***			Proporción de let.dom. total** x 100***		
	Control	Serie I	Serie II	Control	Serie I	Serie II
1º	$\frac{24}{1.138} : 2,11$	$\frac{73}{506} : 12,59$	$\frac{21}{162} : 11,08$	$\frac{114}{1.228} : 9,28$	$\frac{799}{1.232} : 61,25$	$\frac{519}{660} : 76,46$
2º	$\frac{21}{721} : 2,91$	$\frac{18}{140} : 10,25$	$\frac{5}{24} : 18,45$	$\frac{34}{734} : 4,63$	$\frac{154}{276} : 53,65$	$\frac{228}{247} : 91,94$
Total	$\frac{45}{1.859} : 2,42$	$\frac{91}{646} : 11,96$	$\frac{26}{186} : 11,85$	$\frac{148}{1.962} : 7,54$	$\frac{953}{1.508} : 60,21$	$\frac{747}{907} : 80,93$

* Letalidad dominante tardía: $\frac{\text{Nº de huevos eclosionados} - \text{No adultos}}{\text{Nº huevos eclosionados}}$

** Letalidad dominante total: $\frac{\text{Let. dom. temprana} + \text{Let. dom. tardía}}{\text{Nº total de huevos}}$

*** % corregido: $\frac{\text{Pt} - \text{Pc}}{1 - \text{Pc}}$ Pt: proporción de tratados; Pc: proporción de controles

Serie I: duración del tratamiento: 2,30 horas

Serie II: duración del tratamiento: 2,30 horas + 1 hora (con un intervalo de 1 hora)

C. RADIOINMUNOLOGIA

C. 1. Reacción antialogeneica en cámaras de difusión.

I. Evidencia de destrucción celular

E.E. Capalbo.

Mediante la medición de la depresión del nivel de aglutininas producidas por células esplénicas inmunocompetentes de ratón de una cepa Paterna P₂, cultivada "in vivo" en ratones híbridos (P₁ x P₂) irradiados, inmunológicamente inertes, Celada y Carter (1) evaluaron el poder destructor de células esplénicas de ratón de cepa Paterna P₁ previamente sensibilizados a antígenos de la cepa P₂ e inyectados en el mismo receptor. En esta técnica observaron disminución de título de anticuerpo anti-rata, comparable con una destrucción casi total de las células esplénicas P₂.

Este resultado podría ser debido a destrucción celular o a inhibición de la producción de proteínas o a ambas cosas a la vez.

En el presente trabajo hemos investigado el primer punto, utilizando la técnica de cultivo celular de cámaras de difusión (2), para cultivar las células en estudio.

En cada cámara de difusión de 0,1 micrón de porosidad fueron colocadas 24×10^6 células C3H previamente sensibilizadas a antígeno C57BL, más células esplénicas C57BL previamente inmunizadas con hematíes de rata, más hematíes de rata.

En una experiencia fue marcado cada dador de cepa C3H mediante la inyección intraperitoneal de 5 μ Ci de timidina tritiada y en una segunda experiencia marcamos de la misma manera cada dador de la cepa C57BL. Mediante radioautografía fue determinado a intervalos variados, el número de células linfoides marcadas y el número de granos por célula marcada.

Las cámaras fueron implantadas en la cavidad peritoneal de ratones subletalmente irradiados de cepa C3H. La figura 1 ilustra sobre el tiempo de duplicación de células esplénicas C57BL (antígeno alogeneico) marcadas con timidina tritiada cultivadas en presencia o en ausencia de células C3H pre-sensibilizadas a antígenos C57BL.

En ausencia de células pre-sensibilizadas, curva superior, las células C57BL (células blanco, células alogeneicas) proliferan con un tiempo de duplicación normal (24 hs.), mientras que en presencia de células pre-sensibilizadas a ellas, curva inferior, la capacidad proliferativa de las mismas fue altamente deprimida y su número disminuyó progresiva y significativamente durante el mismo tiempo de observación.

La figura 2 ilustra sobre el promedio de granos de plata (Ag) y el índice mitótico de las células C3H pre-inmunizadas con antígeno C57BL y cultivadas en cámaras de difusión con células esplénicas C57BL.

Según observamos, el número promedio de granos por célula disminuye progresivamente, indicando para estas células un tiempo máximo de duplicación de 12 horas.

El número de mitosis durante este mismo tiempo aumentó de acuerdo con el tiempo de duplicación observado.

Estos dos últimos datos indicarían que la inhibición de proliferación y

desaparición de células alogeneicas marcadas con tritio se debería a la acción de las células C3H sensibilizadas, las cuales a su vez aumentarían su proliferación.

- 1.- Celada, F., y Carter, R.J., J. Immunol., 89:161, 1961.
- 2.- Capalbo, E.E., Albright, J.F. y Bennet, W.E., J. Immunol., 92:243, 1964.

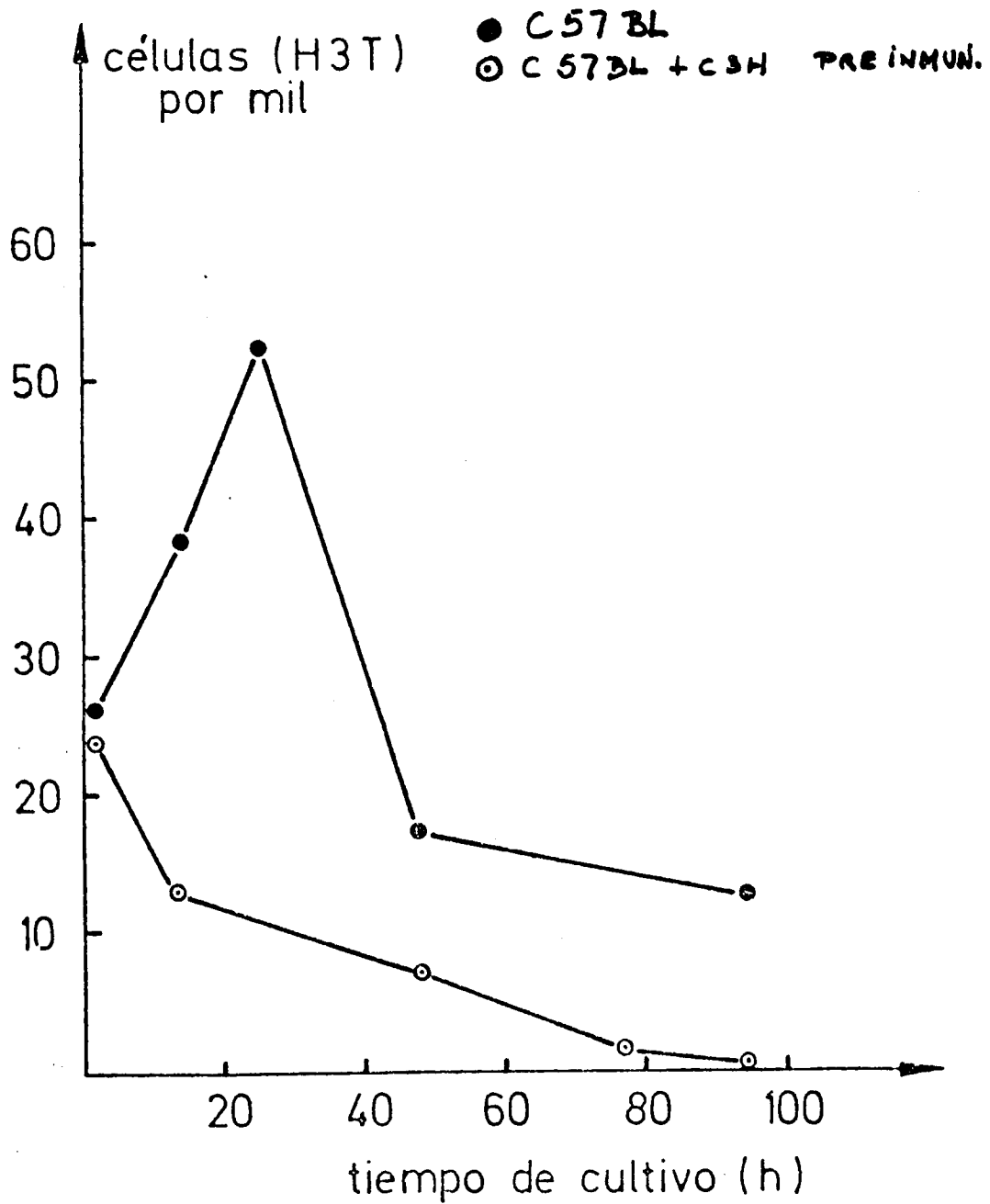


Figura 1

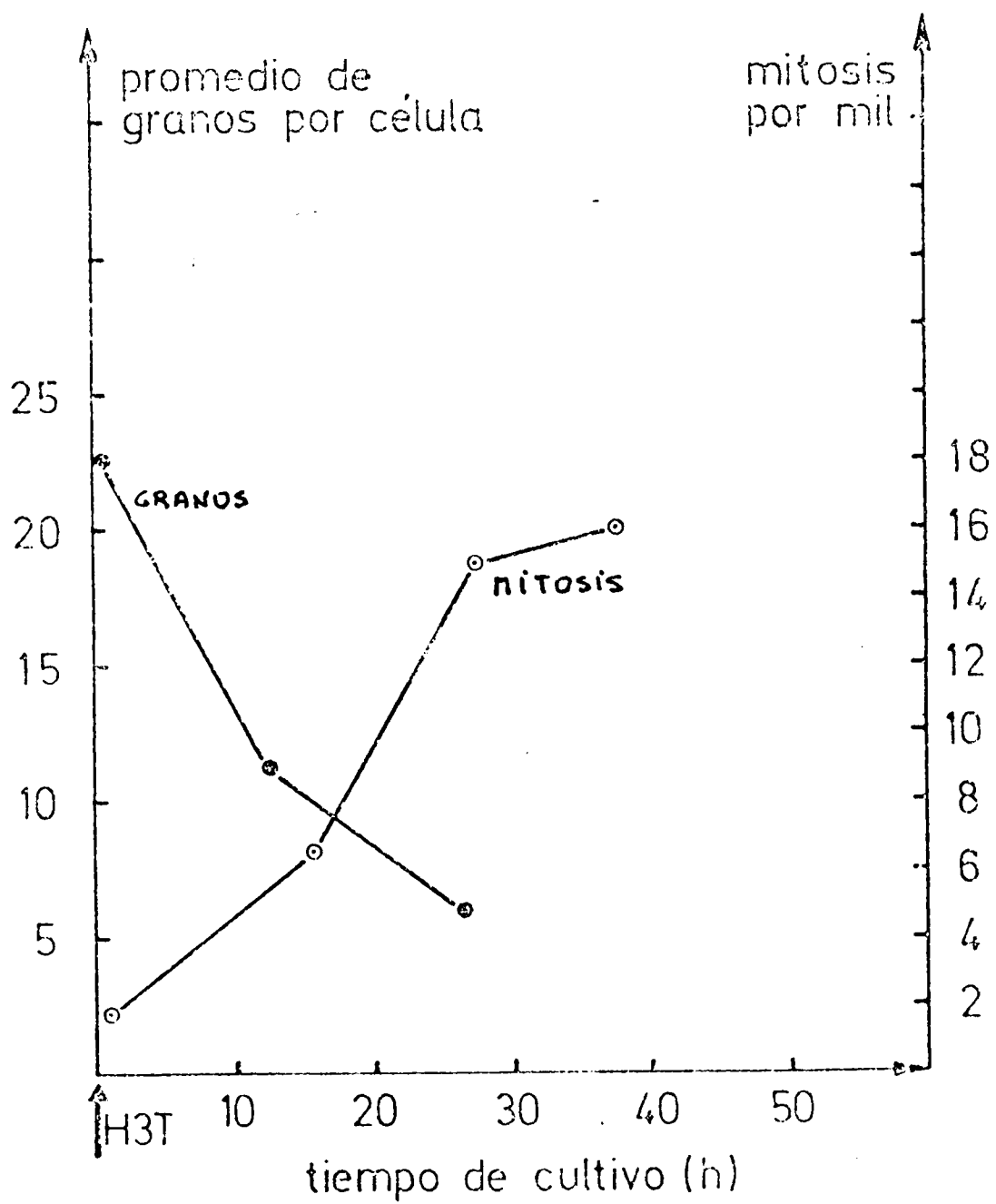


Figura 2

C. 2. Reacción anti-alogeneica en cámaras de difusión

II. Demostración de la existencia de un anticuerpo humoral

E.E. Capalbo.

En experiencias previas, mediante la utilización de la técnica de cultivo celular en cámaras de difusión, marcación celular con timidina tritiada y radioautografía, observamos que durante la reacción por injerto alogeneico en el cual células esplénicas de ratón de una cepa dada eran cultivadas con células esplénicas provenientes de dadores alogeneicos pre-inmunizados contra la primera cepa, aquéllas eran destruidas en el término de 24 a 48 horas en su casi totalidad.

Esta destrucción celular fue debida probablemente a un proceso inmunológico mediando la existencia de un anticuerpo sesil.

Para investigar la existencia de un anticuerpo móvil, humoral, difusible y utilizando la misma técnica de cultivo y de marcación celular, realizamos varias experiencias con células esplánicas de ratón, pertenecientes a cepas con diferencias en el locus H-2 de histocompatibilidad. En estas experiencias, la técnica de cámaras de difusión fue modificada con el objeto de cultivar ambas poblaciones esplénicas alogeneicas separadas entre sí.

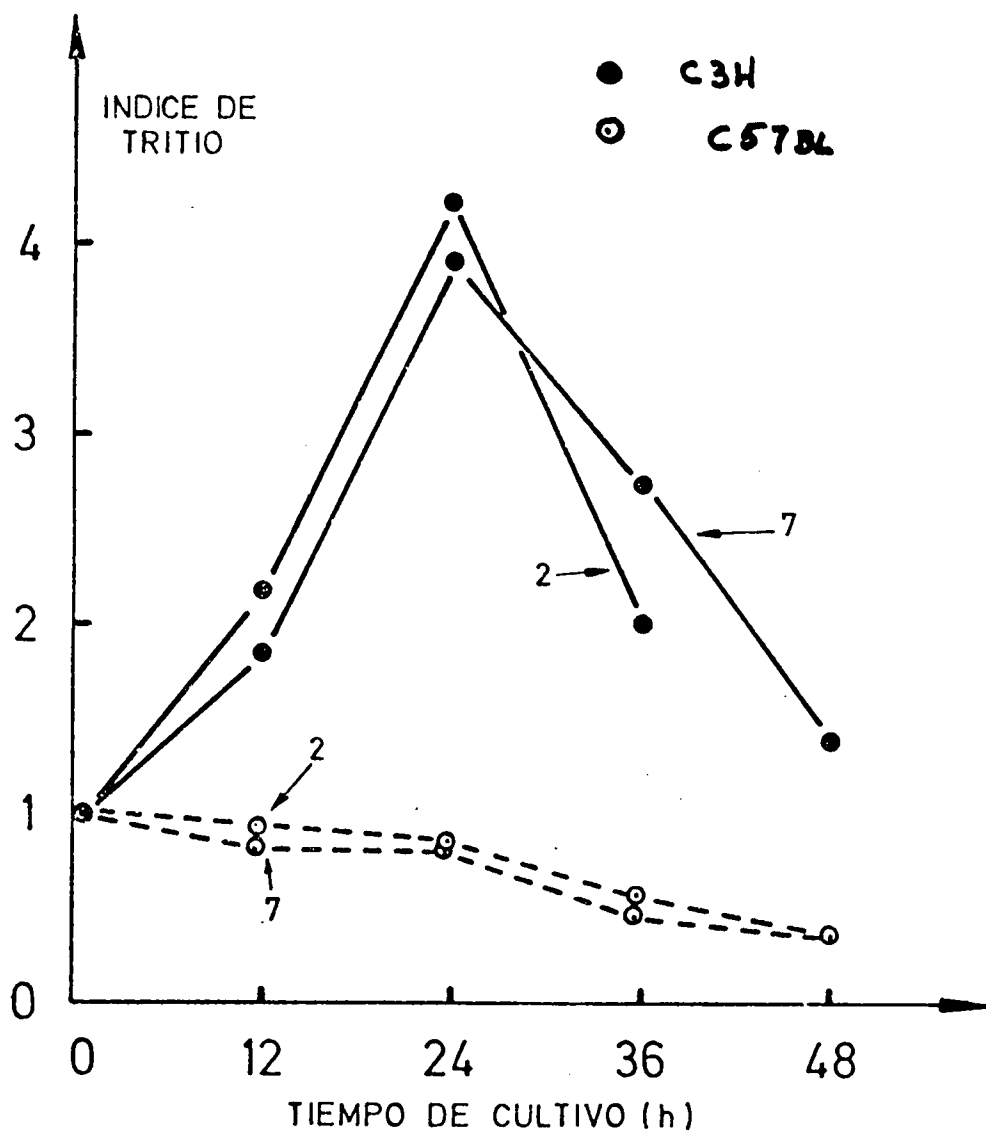
Para evitar la acción del anticuerpo fijo, el contacto célula a célula, fueron construídas cámaras de difusión de doble compartimiento, separadas entre sí por una membrana Millipore de 0,1 micrón de porosidad. En uno de los compartimientos fueron inoculadas células esplénicas de ratón C3H (H-2^{kk}) inmunizados 2 ó 7 días antes con antígeno C57BL (H-2^{bb}) y en el segundo inoculamos células esplénicas C57BL. Ambas poblaciones celulares esplénicas fueron marcadas inyectando al receptor por vía intraperitoneal 5 μ Ci de timidina tritiada.

Mediante radioautografía en muestras celulares obtenidas a intervalos variados luego de su implantación y marcación, fue determinado el grado de proliferación de la serie linfoide de ambas poblaciones celulares mediante la determinación del índice de tritio, lo cual aparece en la figura 1.

La proliferación de las células C57BL, línea discontinua, fue altamente inhibida cuando fueron cultivadas con células C3H transferidas a los 2 ó 7 días de la inmunización.

Las células activas C3H, por el contrario proliferaron aceleradamente con un tiempo máximo de duplicación de 12 horas aproximadamente, línea continua, siendo el tiempo de duplicación normal de 24 horas.

Esta disminución de la proliferación celular alogeneica indicaría la acción de un factor C3H anti-alogeneico humoral, difusible a través de la membrana impermeable a las células.



C. 3. Efecto de la fitohemaglutinina sobre el bazo, el ganglio linfático y el timo de ratón

E.E. Capalbo.

No obstante los numerosos trabajos publicados acerca del efecto de la fitohemaglutinina sobre las células nucleadas de la sangre periférica, no ha sido aclarado todavía si la blastogénesis atribuida a la misma sobre los linfocitos se debe a un estímulo directo sobre la capacidad mitótica de los mismos o a otros mecanismos. El primero de ellos, a pesar de ser aceptado por la mayoría de los investigadores, no ha sido fehacientemente probado. Entre los otros mecanismos de acción, creemos que debe figurar el que atribuye a la fitohemaglutinina propiedades antigenéticas especiales que hacen de ella un particular antígeno capaz de estimular la formación de blastos a partir de elementos maduros o al menos aparentemente maduros.

Creemos que esta proliferación o aparición de células blásticas un cierto tiempo después de la incubación con fitohemaglutinina, es debida a lo que se ha dado en llamar modulación celular, mecanismo mediante el cual células maduras, en este caso linfoides, regresan o involucionan al estadio previo, inmaduro, transformándose en blastos. La aparición de células blásticas sería debida entonces a un mecanismo distinto al de la proliferación mitótica. Más aun, esta proliferación blástica tendría lugar sin intervención de mitosis alguna.

Como primera aproximación, a fin de investigar si la fitohemaglutinina se comporta como antígeno, realizamos una experiencia "in vivo", con la cual fueron obtenidos resultados que demostrarían su cualidad de inmunógeno y que la blastogénesis sucede con mitosis.

En el experimento fueron utilizados ratones machos de la cepa C31F1 o sea (C3H x 101) F1 de 10 a 12 semanas de edad y la droga usada fue la fitohemaglutinina P Difco diluida en 10 ml de solución 0,15 M de Cl Na.

Alícuotas de la suspensión de fitohemaglutinina fueron inyectadas intraperitonealmente a cada uno de los ratones y luego, tres por vez, fueron sacrificados mediante incisión transversal del cuello, inmediatamente después de la inyección y a las 24, 48, 96 y 216 horas siguiente.

En cada oportunidad fue determinado el peso corporal y el peso del ganglio mesentérico, el del bazo y el del timo, separadamente.

Los ratones fueron agrupados de a tres y colocados en cajas apropiadas, permitiéndoles consumir agua y alimento con libertad.

La inyección intraperitoneal de 0,4 mililitros de la suspensión de fitohemaglutinina P produjo modificaciones en el peso del ganglio mesentérico, del bazo y del timo, según podemos verlo en la figura 1. En ella aparece un aumento significativo del peso de los dos primeros órganos a las 72 horas después de la inyección, siendo más acentuado el incremento sufrido por el bazo con respecto al del ganglio.

En la figura 2 apreciamos los valores en relación con el valor inicial, a las 72 horas post-inyección, en que fue observado un aumento del 175,2% en el peso del bazo y un aumento del 151,1% en el peso del ganglio mesentérico.

Con respecto al peso del timo, observamos una disminución significativa del mismo, lo que sugiere migración de células tímicas a otros órganos linfoides. En preparados citológicos de bazo y ganglio hemos observado un aumento en el número de mitosis a partir de las 12 horas aproximadamente post-inyección de fitohemaglutinina.

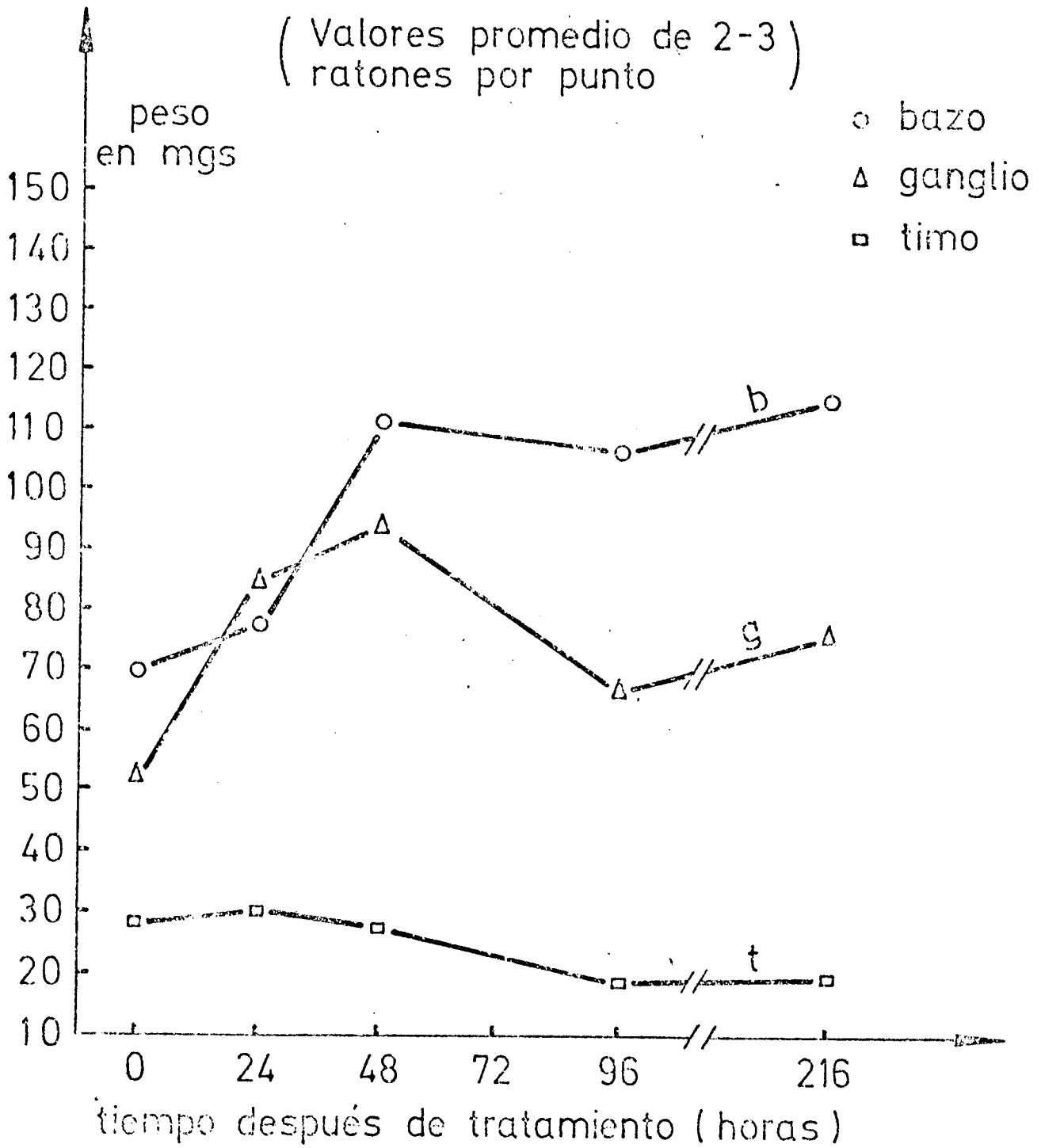


Figura 1

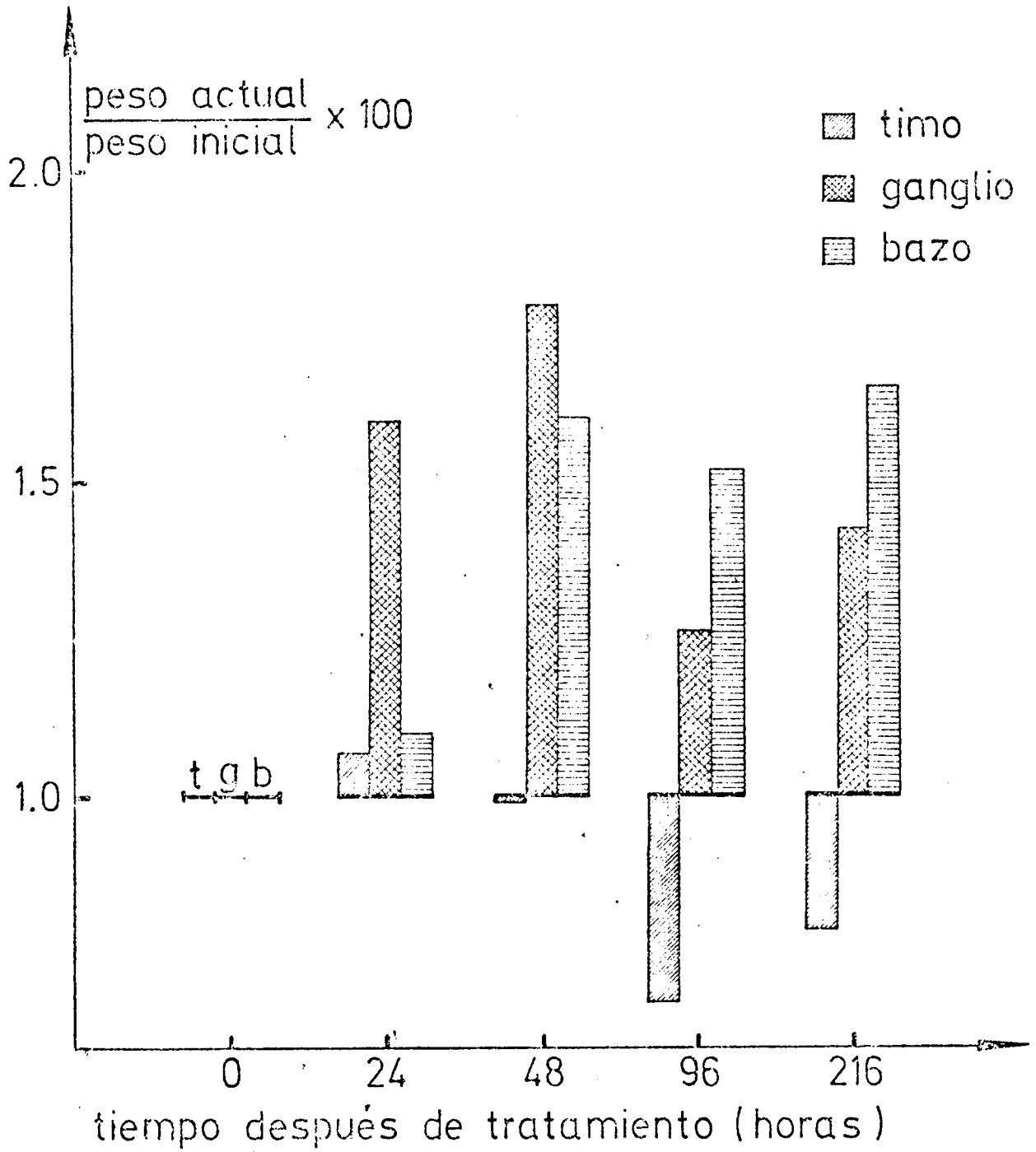


Figura 2

C. 4. Bocio familiar con bloqueo parcial de la incorporación de iodo y eutiroidismo debidos al defecto peroxidasa deficiente

H. Niepomnische,* O.J. Degrossi,* L.M. Scavini y H.P. Curutchet*

Varias anormalidades a nivel de peroxidasa tiroidea han sido determinadas como una causa de bocio congénito, con defectos de incorporación de iodo. Uno de ellos, el llamado "peroxidasa deficiente" parece ser una falla cuantitativa de la actividad enzimática. En este trabajo presentamos el primer caso en el cual este tipo de deficiencia de peroxidasa estuvo asociado con eutiroidismo y con la presencia de una iodoproteína sérica no-butanol extraíble. El caso que motiva este estudio es una joven (NR) de 22 años de edad. Ella y su hermana (SR) de 30 años de edad, son las dos únicas hijas de un matrimonio entre una mujer bociosa eutiroides (MN) de 53 años de edad y un hombre normal, quien tiene una hermana con enfermedad de Graves.

SR es eutiroides y ha tenido un bocio desde su primera infancia; tiene tres hijos, dos varones normales y una mujer eutiroides (MC) de 7 años de edad, con un pequeño bocio difuso. La paciente NR fue sometida a irradiación del cuello por agrandamiento del timo, a la edad de ocho meses. Problemamente recibió 300 rads a nivel de su tiroides; en el momento en que fue vista por nosotros encontramos un pequeño bocio difuso y un nódulo muy pequeño en el lóbulo derecho. En la tabla 1 aparecen los resultados de las determinaciones del laboratorio clínico y de los estudios cinéticos de iodo efectuados a la misma. Debido a su pasada irradiación y a sus antecedentes familiares le efectuamos la tiroidectomía total. Durante los estudios de cinética del iodo intentamos identificar la radioiodo proteína no-butanol extraíble (NBE 1251), la cual no pudo ser distinguida de la iodo albúmina por medio de la electroforesis en gel de agar.

La glándula tiroides de la paciente fue dividida en varios trozos inmediatamente después de la operación, a fin de efectuar el examen histológico y estudios enzimáticos y de iodoproteína. Como controles obtuvimos la glándula tiroides de dos pacientes, uno con enfermedad de Graves y otro con bocio coloide multinodular.

La actividad peroxidásica estuvo marcadamente disminuida en el bocio congénito (Tabla 2). Las dos glándulas usadas como controles tuvieron actividades normales hacia los límites menor y mayor, respectivamente. La preincubación de las preparaciones de peroxidasa con hematina al 5×10^{-5} M aumentó la actividad enzimática del bocio de la paciente en un 30%, lo que ocurre comunmente con tiroperoxidasas normales (Niepomnische et al., 1972). La actividad específica más alta de preparaciones de peroxidasa del bocio se encuentra en la fracción microsomal obtenida a $105.000 \times g$.

Estudios iodoproteicos: de la radioactividad total del homogeneizado del bocio el 82,5% fue hallado en la fracción sobrenadante, 2,5% como iodo libre y 80% restante como iodo proteína (5% del iodo 125 fue encontrado en la tiroglobulina por electroforesis en gel de poliacrilamida. El 5% estaba superpuesto con el marcador de albúmina).

En este trabajo presentamos un nuevo ejemplo del defecto peroxidasa deficiente. Este error congénito parece estar caracterizado por: 1) pequeña o ninguna actividad peroxidásica; 2) respuesta normal de la enzima a la hematina; 3) comportamiento normal de la peroxidasa para cuando es analizada en lo referente a propiedades cualitativas. La paciente NR aparece como el primer caso en el cual este defecto está asociado con eutiroidismo y una iodoproteína sérica no-butanol extraíble, la cual se comporta como una iodoalbúmina en agar-gel-electroforesis.

* Centro de Medicina Nuclear, Buenos Aires

- 1.- Niepomniscze, H., Altschuler, M., Korob, M. y Degrossi, O., Acta Endocrinol., 62:193, 1969.
- 2.- Niepomniscze, H., De Groot, L. y Hagen, G., J. Clin. Endocrinol., 34: 607, 1972.
- 3.- Valente, L. et al., J. Clin. Endocrinol., 36:830, 1973.

TABLA 1
Parámetros de laboratorio, funcionales y de cinética
de iodo de la familia bociosa

Prueba	Unidades	Paciente				Normales
		NR	SR	MM	MC	
T ₄ suero total (por C.P.B.)	µg/100 ml	5,5	7,6	7,9	8,4	5,5-13,7
T ₃ suero total (por RIA)	µg/100 ml	80	-	-	-	75-120
TSH suero (por RIA)	µU/100 ml	69	0,9	10,8	0,7	<1-8
Anticuerpos antitiroglobulina (por TRC)	título	negat.	negat.	negat.	negat.	<1/30
RAIU-24-hr (donc.basales)	%	19	35	30	18	20-40
Descarga de perclorato a los 60 min. (cond.basales)	%	65	9,5	negat.	negat.	negat. 0,9
Descarga de perclorato a los 60 min. (después estim. TSH)	%	-	43	negat.	negat.	negat. 0,9
RAIU-24 hr.(comenzando 24 hr. después de adm. ClO ₄ K)	% de basal	6	39	-	-	16-70
RAIU-24 hr.(comenzando 48 hr. después de adm. ClO ₄ K)	% de basal	34	110	-	-	63-101
RAIU-24 hr.(comenzando 9 días después de adm. ClO ₄ K)	% de basal	106	-	-	-	≈ 100
PBI-125 (48 hr.)	%/I	0,6	0,1	-	-	up a 0,2
NBEI-125 como % de PBI-125	%	28	34	-	-	0
Prueba de deshalogenación "in vivo" de MIT-131 I	% de deshalog.	100	-	-	-	100
Depuración yoduro Troi.(C _G)	ml/min.	57,7	-	-	-	16
Incorp. I tiroideo (AIU)	µg/d	80	-	-	-	120
Liberación iodo Tir. (H)	µg/d	54	-	-	-	120
Filtración yoduro tiroideo?	µg/d	26	-	-	-	1,2
Ioduro inorg. plasma (PII)	µg/l	1,77	-	-	-	-
Inlinación de liberación de iodo tiroides (K _G 2)	día ⁻¹	0,277	-	-	-	0,012
Contenido de ¹²⁷ I de orina de 24 hr.	µg	148	-	-	-	198
Iodo total de tiroides (anál. cinético) Q _G	µg	156	-	-	-	15.000
Iodo tiroides total (químico)	µg	650	-	-	-	-
Vida media biol. de T ₄ suero	días	2,9	-	-	-	6,5
Vida media biol. de T ₃ suero	días	0,75	-	-	-	1,5
Degradación diaria de iodo-T ₄	µg	48	-	-	-	57,7
Degradación diaria de iodo-T ₃	µg	5,94	-	-	-	19,0
"Pool" corporal de T ₄ extratiroid.	µg de I	188,3	-	-	-	483,3
"Pool" corporal de T ₃ extratiroid.	µg de I	643	-	-	-	41,0

TABLA 2

Actividad de peroxidasa de tiroides

Espécimen	Ensayo tirosina- ^{io} -* dinasa (usando en- zima particulada)	Ensayo de guayacol ** (usando enzima pseu- dosolubilizada con digitonina)
Bocio familiar (tejido fresco)	45	
Bocio familiar (tejido congel.)	65	61
Bocio multinodular (control)	214	177
Enfermedad de Graves (control)	410	260
Normales (Niepomniscze et al. 1975)	220-410	

* La actividad está expresada como nmol de I incorporado dentro de la tirosina/g de tejido.

** La actividad fue medida por espectrofotometría y expresada en Unidades. Unidad es igual a D.O. (470 nm)/10 seg/mg proteína x 1.000

C. 5. Acción de las radiaciones gamma sobre la molécula de anticuerpo.

I. Estudios inmunológicos del antisuero o tiroglobulina humana

L.M. Scavini, S.M. Rodríguez y O. Degrossi*

En trabajos anteriores hemos realizado experiencias sobre las modificaciones producidas en los determinantes antigénicos de inmunoglobulinas humanas en función como antígeno. Dichas modificaciones resultaron del efecto de las radiaciones Gamma sobre los fragmentos Fab y Fc. Esos resultados nos llevaron a investigar la influencia que podrían tener dichas radiaciones sobre el sitio de combinación del anticuerpo (Ac).

El material de estudio, antisuero a Tiroglobulina humana fue obtenido en conejos, previa purificación del antígeno. Las muestras al estado soluble y liofilizado (10 mg/ml) fueron irradiadas con una fuente externa de rayos Gamma (Co-60). Las dosis variaron entre 0,5 y 15,0 Mrad. La técnica utilizada fue la hemaglutinación pasiva con hematíes de carnero formolizados y sensibilizados con el antígeno.

Con las muestras solubles fueron necesarias las siguientes concentraciones de (Ac) para dar reacción positiva: 0,02 $\mu\text{gNac/ml}$ para 0,5 Mrad; 0,15 $\mu\text{gNac/ml}$ para 10 Mrad; 1,20 $\mu\text{gNac/ml}$ para 2,0 Mrad; 2,50 $\mu\text{gNac/ml}$ para 3,0 Mrad; 20 $\mu\text{gNac/ml}$ para 4,0 Mrad y 40 $\mu\text{gNac/ml}$ para 5,0.

En cuanto a las muestras liofilizadas comprobamos que hasta 3,0 Mrad la concentración requerida no varió, siendo de 0,02 $\mu\text{gNac/ml}$. Para 5,0 Mrad de 0,15 $\mu\text{gNac/ml}$; para 10,0 Mrad de 2,50 $\mu\text{gNac/ml}$ y para 15,0 Mrad de 10 $\mu\text{gNac/ml}$.

De acuerdo con los resultados obtenidos sugerimos el uso de radiaciones Gamma hasta los 3,0 Mrad para la conservación de antisueros liofilizados a tiroglobulina humana. Tenemos en estudio las posibles alteraciones de las funciones inmunológicas del anticuerpo frente a ciertos haptenes como T3 y T4.

* Centro de Medicina Nuclear, Buenos Aires.

C. 6. Acción de las radiaciones gamma sobre la molécula de anticuerpo.

II. Estudios inmunológicos del antisuero a albúmina sérica humana (ASH)

S.M. Rodríguez, L.M. Scavini y E.E. Capalbo.

El material de estudio fue obtenido por inmunización, en conejos, con ASH y adyuvante completo e incompleto de Freund. El mismo fue purificado por precipitación salina y cromatografía en columna de DEAE-Celulosa.

Las muestras, previamente liofilizadas, fueron sometidas a radiación Gamma. La fuente externa fue Co-60 y las dosis variaron entre 0,5 y 20,0 Mrad.

Las técnicas utilizadas para observar el comportamiento de los sitios de combinación del Anticuerpo, con los determinantes antigenicos de ASH, fueron la hemaglutinación pasiva y la precipitación cuantitativa. En esta última fue empleada ASH-I-125 con una actividad específica de 100 $\mu\text{Ci/mg}$.

En las experiencias realizadas observamos que, por hemaglutinación pasiva fueron necesarios 0,02 $\mu\text{gNac/ml}$ para dar reacción positiva cuando la dosis fue de 1,0 Mrad. Para 3,0 Mrad 0,08 $\mu\text{gNac/ml}$; para 5,0 Mrad, 0,15 $\mu\text{gNac/ml}$; para 10,0 Mrad, 0,64 $\mu\text{gNac/ml}$; para 15,0 Mrad, 1,20 $\mu\text{gNac/ml}$ y para 20,0 Mrad, 2,50 $\mu\text{gNac/ml}$.

Con la precipitación cuantitativa observamos que para 32 $\mu\text{gNac/ml}$ la afinidad con el antígeno (1,60 $\mu\text{gNac/ml}$) disminuyó en un 55% al pasar de 1,0 a 20,0 Mrad.

Además, vimos que a partir de los 10,0 Mrad queda destruido el sitio de combinación con el antígeno. Concluimos que el anticuerpo a ASH al estado liofilizado sometido a dosis de radiación de hasta 3,0 Mrad se comporta con muy buena afinidad.

D. MICROBIOLOGIA

D. 1. Aislamiento de mutantes de envoltura en Salmonella typhimurium

D. N. Antón.

Dado el bien conocido efecto de las radiaciones sobre la replicación del ADN y la división celular y teniendo en cuenta que estas dos funciones están estrechamente relacionadas con la envoltura celular, iniciamos un programa de investigación cuyo objeto es estudiar el papel de la envoltura celular en los mecanismos que regulan la respuesta de las células a las radiaciones. Dicho programa consiste en: 1º aislamiento y caracterización fisiológica y genética de mutantes de Salmonella typhimurium con alteraciones en la cubierta celular y, 2º estudio de los cambios que esas alteraciones de la envoltura producen en la respuesta normal a las radiaciones.

Hemos encontrado un sistema que selecciona positivamente mutantes con alteraciones en la cubierta en S. typhimurium. Cuando la mutación his01242 - que afecta la regulación del operón histidina - es introducida en la cepa DA78, la transducción, a diferencia de lo que ocurre con otras receptoras, produce muy pocos transductantes his01242. Estudios microscópicos han demostrado que la entrada de la mutación his0 produce en las células de DA78 graves alteraciones morfológicas tales como formación de largos filamentos, con frecuencia bifurcados, que llevan en su parte media una ampolla de gran tamaño. Estas ampollas eventualmente estallan o se lisan, provocando la muerte de la bacteria (1).

Algunas pocas bacterias DA78 son capaces de resistir la presencia de la mutación his01242 sin que sea anulada su capacidad para formar transductantes viables. Por lo tanto esas bacterias son seleccionadas positivamente, ya que son las únicas que dan colonias visibles. La mayor parte de estos transductantes muestran baja viabilidad y son inestables, segregando a lo largo de su crecimiento colonias que tienen mejor crecimiento y morfología distinta de la original. Fueron obtenidas 41 de estas colonias especiales, aparecidas en aislamientos sucesivos de 12 transductantes his01242 de DA78.

El estudio sistemático de estas 41 colonias permitió detectar en muchas de ellas alteraciones en funciones relacionadas con la envoltura celular (Tabla 1); en varios casos una misma cepa presentaba varios defectos.

Algunas características de las 11 cepas que presentaban forma alterada fueron estudiadas, entre ellas 9 hacen células esféricas y las dos restantes presentan forma atípica pero no de tipo esférico. Hay por lo menos tres genes de forma representados en este grupo de mutantes, ya que la alteración de la cepa DA82 es cotransducible con cod (min. 105) y la de la cepa DA150 es transducida conjuntamente con hisS (min. 78) (2), lo que sugiere que pertenece a un gen ya identificado en Salmonella (3). De las cepas restantes, seis no pertenecen a ninguno de los dos genes anteriores y las otras tres cepas aún no han sido estudiadas. La forma de los mutantes sin localizar es bastante irregular y parece ser modificable según las condiciones de cultivo.

La capacidad autolítica de los mutantes y de las correspondientes cepas control fue probada en buffer Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,5, a 37°C. Fueron detectados tres niveles de autólisis: normal, mostrado por 32 cepas, con un descenso de la densidad óptica del 20% en dos horas de incubación; intermedio, mostrado por tres cepas, con lisis del 30% y alto, mostrado por 6 cepas, con lisis del 40%.

Las cepas con autólisis alta pueden ser divididas en dos clases: la de los mutantes envD (DA126, DA149 y DA123, que parece ser un mutante envD puntual) que se lisan en caldo cuando el medio se torna alcalino y son incapaces de crecer

en agar nutritivo de pH 9,5 a 43°C (4); y la segunda clase, formada por las cepas DA130, DA138 y probablemente DA82, que pese a mostrar en buffer el mismo nivel de lisis que las anteriores, no lisan espontáneamente en caldo y crecen normalmente en agar alcalino.

Las cepas con nivel intermedio de lisis también crecen normalmente y sólo evidencian su alteración cuando son colocadas en buffer. Las tres cepas que presentan esta característica (DA139, DA140 y DA150) tienen además alterada la forma celular pues hacen células esféricas. En el caso de la cepa DA150 hemos podido demostrar, estudiando forma y autólisis de transductantes hisS⁺ obtenidos con fago crecido en esa cepa, que la misma mutación que origina la morfología anormal produce el aumento en autólisis.

- 1.- Antón, D.N., III Jornadas Argentinas de Microbiología. Mesas Redondas. Ed. Asoc. Argentina de Microbiología, Tucumán, 1975, págs. 37-48.
- 2.- Palermo, A.M., comunicación personal.
- 3.- Wyche, J., Kennedy, J., Hartman, Z., Hartman, P. y Diven, J., J. Bacteriol., 120:965, 1974.
- 4.- Antón, D.N. y Orce, L.V., Molec. gen. Genet., 144:97, 1976.

TABLA 1

Alteraciones encontradas en 41 cepas his01242 derivadas de la cepa DA78

Alteración	Nº de cepas que la presentan
Forma celular anormal	11
Sensibilidad a desoxicolato (3 mg/ml)	9
Sensibilidad a cicloserina (20 µg/ml)	7
Autólisis	6
Sensibilidad a novobiocina (75 µg/ml)	5
Sensibilidad a naranja de acridina (100 µg/ml)	5
Termosensibilidad (43°)	3
Sensibilidad a EDTA (5 x 10 ⁻⁴ M)	2
Sensibilidad a luz ultravioleta	1
Sensibilidad osmótica	1
.....	
Aparentemente normales	17

D. 2. Actividad autolítica de un mutante de *Salmonella typhimurium*

L.V. Orce y D.N. Antón.

Aunque hace muchos años que se conoce la actividad autolítica de las bacterias, no ha sido aclarado todavía cuál es el papel desempeñado por las enzimas autolíticas. Diversos autores han sugerido que ellas intervienen en el proceso de septación, en el alargamiento celular y en la separación de las bacterias tras la división. Recientemente ha sido aislado un mutante de *Salmonella typhimurium* que autolisa espontáneamente en caldo nutritivo. Este informe describe el comportamiento de dicha cepa.

La cepa DA126 crece normalmente en medio mínimo y en caldo nutritivo; sin embargo, en este último medio se produce una autólisis progresiva a las 2-3 horas de llegar a la fase estacionaria. Este fenómeno no ocurre cuando el caldo es suplementado con Mg^{2+} o glucosa (Fig. 1).

La autólisis parece ser independiente de la síntesis de macromoléculas puesto que cuando la síntesis de proteínas es interferida con tetraciclina o cloranfenicol, la de ARN con 5-fluoruracilo y la de ADN con ácido nalidíxico o fenetil alcohol, el proceso de autólisis no sufre modificaciones. La síntesis de proteínas, ARN y ADN, seguida por marcación con ^{14}C -L-leucina, ^{14}C -uracilo y 3H -timidina respectivamente, no presenta diferencias con el control. La degradación de esas macromoléculas es también normal.

El efecto de la glucosa sobre la lisis no parece estar relacionado con requerimientos energéticos ya que ni los inhibidores respiratorios (azida de Na) ni los que inhiben o desacoplan la fosforilación oxidativa (oligomicina, rutamicina, arseniato y 2,4-dinitro fenol) son capaces de neutralizar la protección brindada por el azúcar. Además, dichos inhibidores no evitan la aparición de lisis en cultivos en caldo sin glucosa.

La acción de la glucosa parece debida a cambios de pH. En efecto, con la excepción del Mg^{2+} , cuya actividad no parece estar conectada con el pH, la protección dada por otros agentes está determinada por el pH que alcanza el medio a las 24 horas. De acuerdo con los resultados obtenidos, la actividad autolítica de DA126 necesita pH alcalino para manifestarse.

Cuando las bacterias son suspendidas en soluciones apropiadas de buffer, la velocidad de lisis (K) es mayor. La lisis de células de DA126 incubadas en buffer a diferentes pH comienza inmediatamente y es más pronunciada cuanto mayor es el pH (Fig. 2). La expresión gráfica de la velocidad de lisis (K) en función del pH (Fig. 2, recuadro) indica que hay proporcionalidad directa entre ambos. La lisis depende también de la fuerza iónica del buffer y de la temperatura de incubación. Podemos ver en la figura 3 que hay una respuesta lineal entre velocidad de lisis y temperatura en el intervalo entre 25 y 45°C. En base a la pendiente de esa línea fue calculada una energía de activación (Ea) de 13,4 kcal por mol. La Ea varía con el pH y presenta su valor más bajo entre pH 8,5 y 9,5 (Fig. 3, recuadro).

Ni la inhibición de lisis debida al pH ácido, ni la protección dada por el Mg son permanentes, por el contrario, la actividad lítica queda anulada permanentemente si las células son hervidas durante 5 minutos o si se las trata con $HgCl_2$ o con $AgCl$ durante 30 minutos a 0°C. El tratamiento con otros reactivos de sulfhidrilos, tales como N-etilmaleimida, iodoacetamida o p-cloromercuribenzoato, no es efectivo.

Las paredes celulares parcialmente purificadas muestran en buffer el mismo comportamiento lítico que las células enteras. Las mureínas de DA126 y del ti-

po salvaje LT2 fueron extraídas y sometidas a la acción de pH crecientes. Los mismos resultados fueron obtenidos con las dos mureínas, lo que indica que la ureína "per se" no es responsable del comportamiento lítico de DA126.

Con el fin de obtener indicios acerca del tipo de autolisina actuante, fue estudiada la aparición de grupos reactivos en el sobrenadante de paredes en lisis, detectando un incremento progresivo de grupos terminales amino, en tanto que los grupos reductores se mantenían constantes. Estos resultados sugieren que la enzima lítica es una amidasa o una endopeptidasa. Para identificar el aminoácido causante del aumento en grupos aminoterminales, paredes celulares fueron sometidas a autólisis y muestras de sobrenadante fueron tratadas con 2,4-dinitro-fluorbenceno (DNF). Los DNF-aminoácidos fueron separados por cromatografía en capa fina y comparados con muestras de DNF-aminoácidos puros, comprobando que es el ácido diamino pimélico el que proporciona los grupos aminoterminales del sobrenadante de lisados de DA126. Este resultado indica que la enzima autolítica es una D-alanil-(D)-meso-diamino pimelil endopeptidasa.

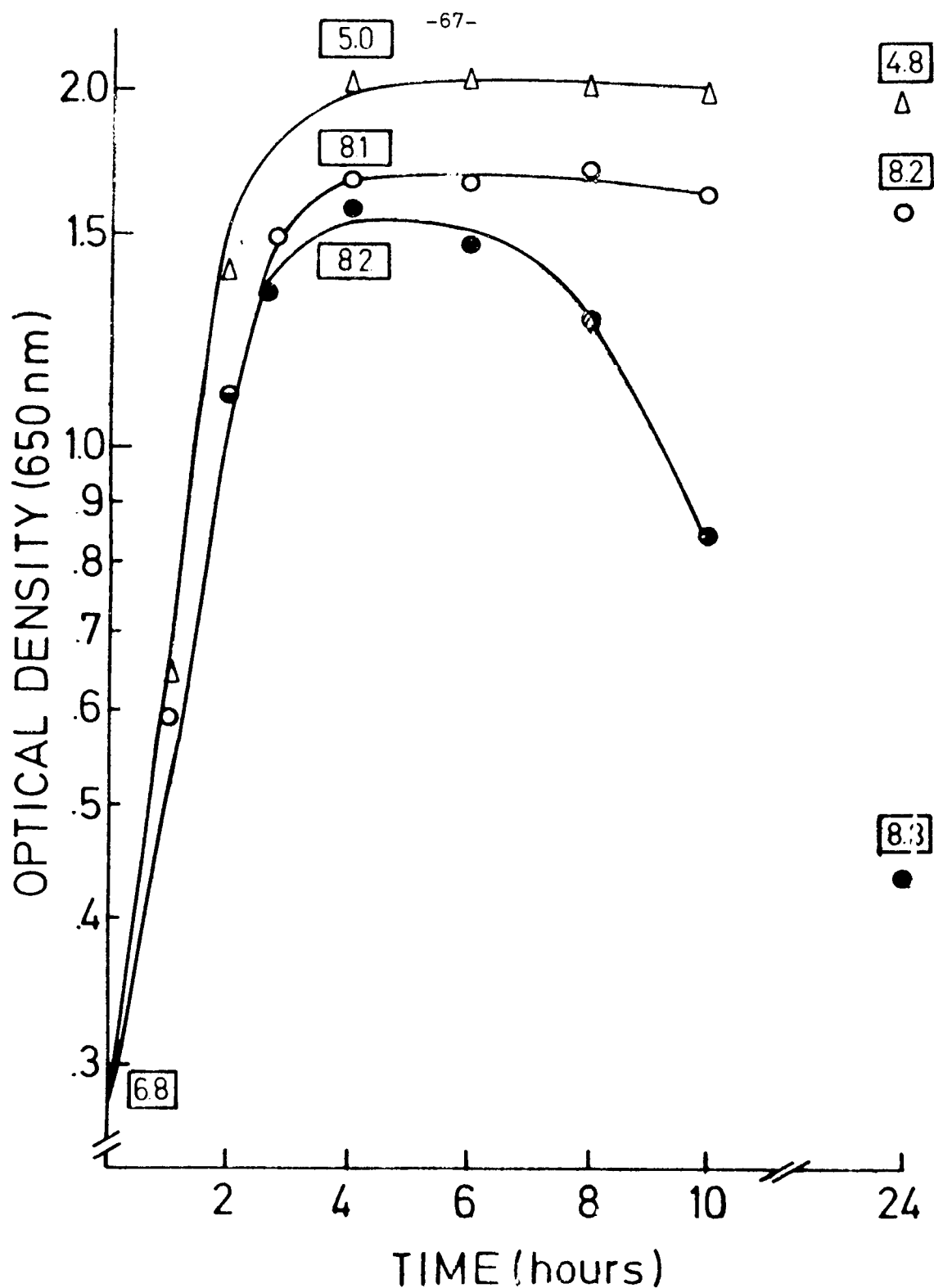


Figura 1.- Curvas de crecimiento de DA126 en caldo nutritivo (●) y caldo nutritivo con 0,05 M $MgCl_2$ (○) ó con 0,05 M glucosa (Δ). Los números en recuadro representan valores de pH.

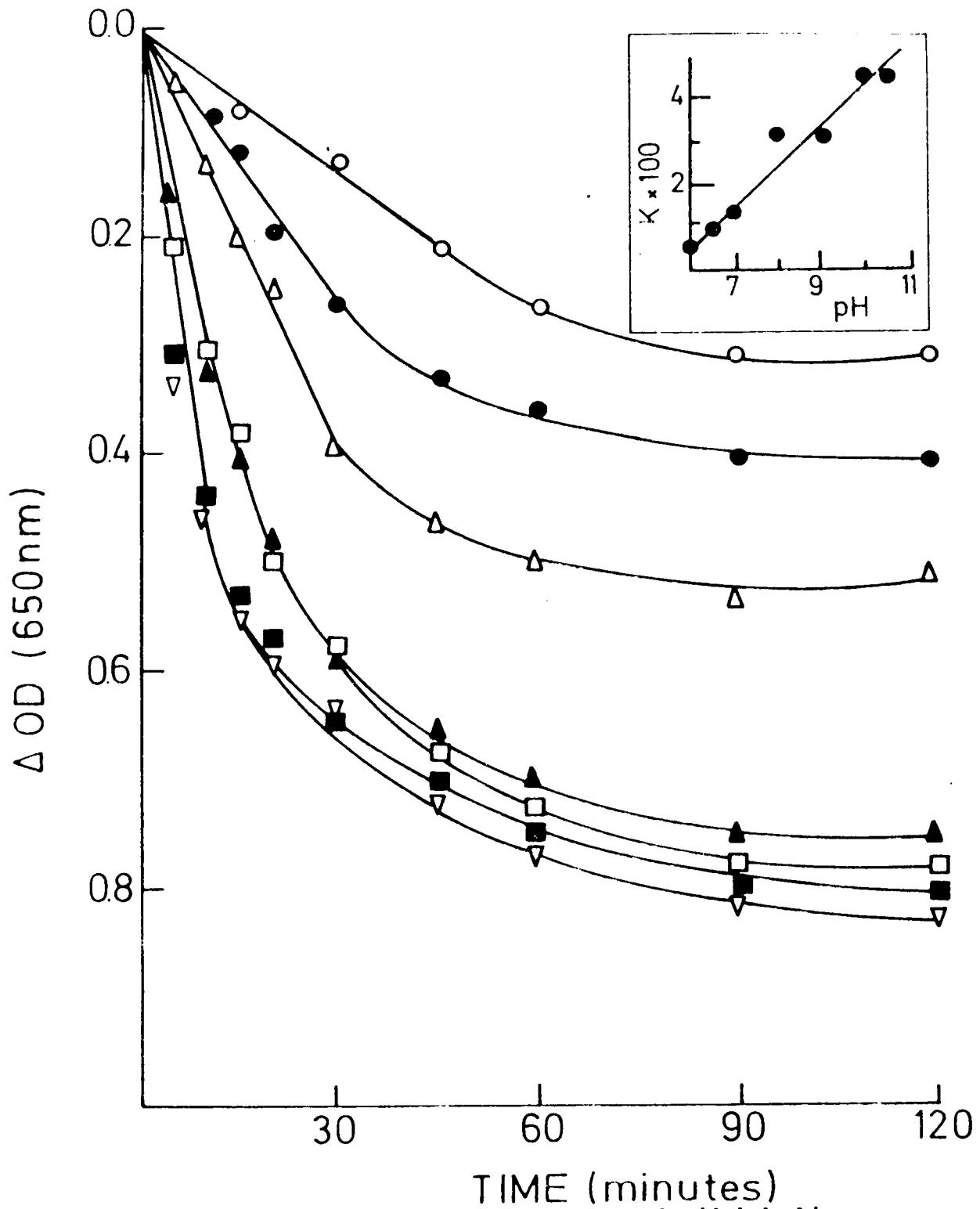


Figura 2.- Efecto del pH sobre la velocidad de lisis de DA126 a 37°C. El recuadro muestra la velocidad de lisis (K) en función del pH.
 pH 6,0 (O); pH 6,5 (●); pH 7,0 (Δ); pH 8,0 (▲);
 pH 9,0 (□); pH 10,0 (■) y pH 10,5 (▽).

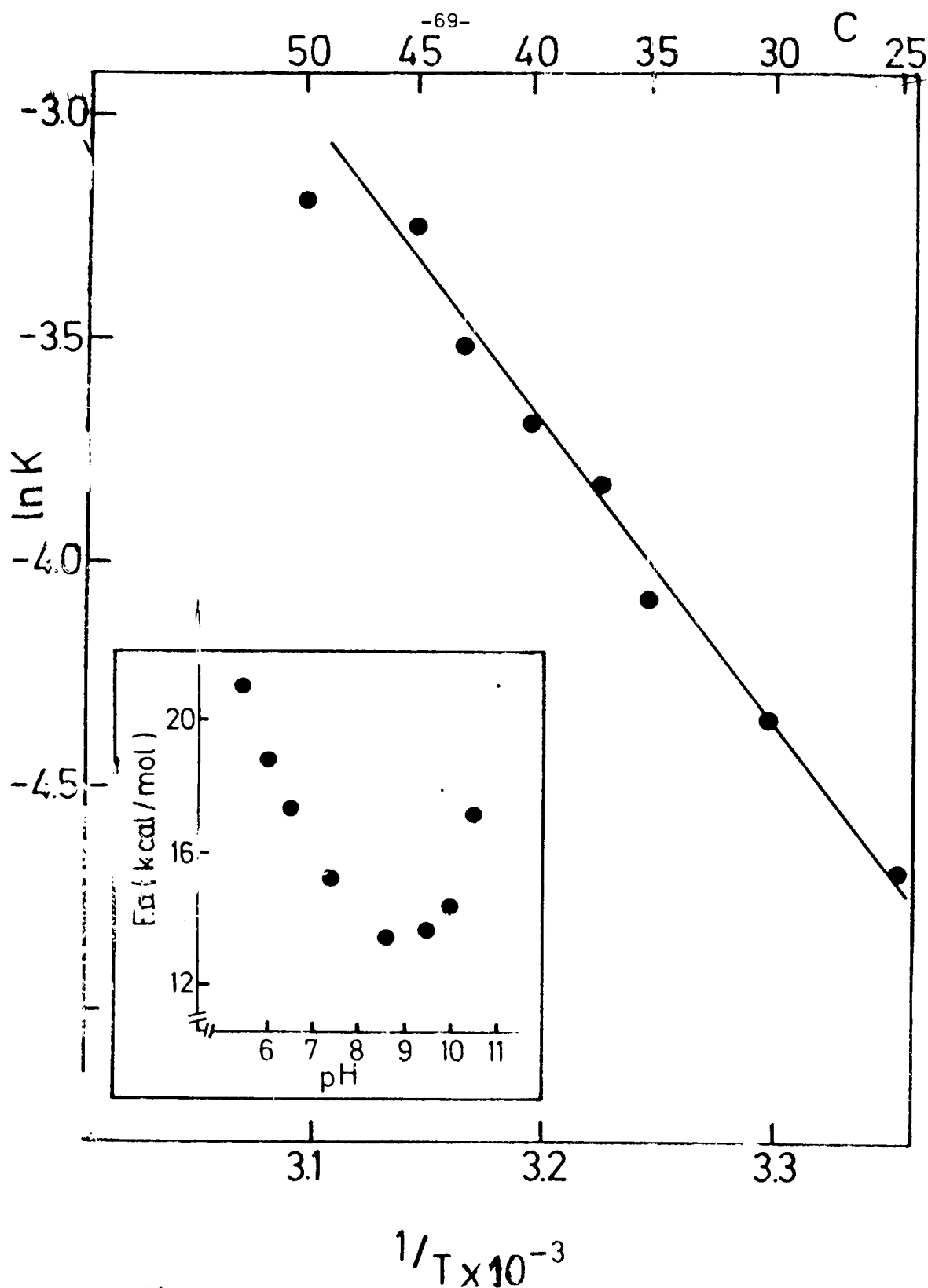


Figura 3.- Efecto de la temperatura sobre la autólisis a pH 8,6. El recuadro muestra la energía de activación (E_a) en función del pH.

D. 3. Propiedades de una mutación de envoltura que produce autólisis en

Salmonella typhimurium

D.N. Antón y L.V. Orce.

La posible participación de las enzimas autolíticas en el crecimiento y la división celular ha sido discutida ampliamente aun cuando no son muchos los datos concretos sobre el tema.

Entre los mutantes de envoltura aislados en S. typhimurium fueron detectados dos cuyas características de crecimiento indican la presencia de actividad autolítica anormal. Por ello esas dos cepas, DA126 y DA149 fueron sometidas a un estudio detallado, confiando en que podrían aportar información acerca del papel de las autolisinas en el crecimiento normal y la división y contribuirían a aclarar aspectos de la acción inhibitoria de la radiación sobre la división celular.

Ambos mutantes crecen normalmente en medio mínimo, pero los cultivos prolongados en caldo nutritivo presentan baja turbidez. Esto no es debido a mal crecimiento sino a la lenta lisis exponencial que aparece cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria. Además, las dos cepas presentan sensibilidad aumentada a desoxicolato (DOC, 2 mg/ml), dodecil sulfato de sodio (DSS, 0,8%) y EDTA ($1,0 \times 10^{-3}$ M).

Las mutaciones autolíticas de las cepas DA126 y DA149 son estables, pues no han sido observadas reversiones espontáneas ni inducidas por nitrosoguanidina o dietilsulfato capaces de crecer en agar nutritivo alcalino a 43°. El locus que controla la autólisis ha sido denominado envD, para diferenciarlo de otros locus de envoltura ya identificados en Escherichia coli.

Para localizar el locus envD fueron realizados cruzamientos entre cepas Hfr envD⁺ y derivados auxotróficos de DA126. Los resultados indicaron que el locus correspondiente se halla situado entre los minutos 20-50 del mapa convencional de Salmonella. Por medio de transducción, empleando los fagos P22 y KB1, fue detectada cotransducción de envD con el marcador gal. La frecuencia de cotransducción encontrada para la mutación autolítica de DA126 (16,8%) es similar a la de DA149 (27,8%), lo que indica que ambas mutaciones pertenecen a locus muy cercanos o, probablemente, al mismo locus, como lo sugiere el hecho de que no hay recombinación entre ellas. Fue probada la sensibilidad a DOC, DSS y EDTA de varios transductantes envD⁺ de la cepa DA126. Todos ellos habían recobrado la resistencia de la cepa normal, lo que indica que la misma mutación produce la autólisis y la sensibilidad a las drogas.

Para lograr una localización más precisa de envD, fue construída una cepa con las mutaciones nadA y aroG, que están ambas muy ligadas a gal. Un derivado gal de DA126 fue transducido con fago crecido en esta cepa; los transductantes envD⁺ fueron seleccionados y analizados para marcadores no seleccionados. Los resultados - que aparecen en la Tabla 1 - indican que envD está situado a la izquierda de nadA, muy próximo a éste, puesto que hay entre ellos más de 50% de cotransducción. Estos datos, junto con los resultados publicados para sucA (2), demuestran que envD está ubicado entre los genes sucA y nadA (Fig. 1).

Fue intentada la obtención de una cepa envD no lisógena con el objeto de descartar un posible papel del profago P22, presente en ambas cepas, en la autólisis. El procedimiento empleado constó de varios cruzamiento sucesivos y una transducción final que produjo un par de cepas sensibles a P22, no lisógenas, diferentes únicamente en el alelo de envD: DA361 (envD₁) y DA 362 (envD⁺). El

estudio de estas cepas isogénicas confirmó que el comportamiento autolítico de las cepas envD no está relacionado con la presencia del profago P22.

La mutación envD afecta también características morfológicas de las células, pues observadas por microscopía de contraste de fase se advierte una gran proporción de células más cortas que las del tipo salvaje. Aparecen, además agrupadas con frecuencia en cortas cadenas de 4 a 10 células. La cepa DA149 también muestra cadenas de células, pero el número de células pequeñas es menor que en cultivos de DA126. La introducción del alelo envD⁺, por transducción, determina que recuperen la apariencia normal.

Por medio de microscopía electrónica fue detectada otra anomalía de los mutantes envD. Murray et al. (3) demostraron recientemente que la típica división por constricción mostrada por las bacterias salvajes en las condiciones usuales, es un artefacto producido por la fijación. Sin embargo, en las mismas condiciones, el único tipo de división celular mostrado por los mutantes envD es el producido por tabicamiento.

- 1.- Antón, D.N. y Orce, L.V., Molec. gen. Genet., 144:97, 1976.
- 2.- Langley, D. y Guest., J.R., J. gen. Microbiol., 82:319, 1974.
- 3.- Guilleland Jr., H.E. y Murray, R.G.E., J. Bacteriol., 121:721, 1975.

TABLA 1

Análisis genético de 189 recombinantes envD seleccionados en una transducción entre DA236 (gal envD1) y fago crecido en DA247 (nadA13 aroG)

Tipos de recombinantes obtenidos			Nº de colonias en cada clase	Nº de "crossovers" requerido de acuerdo con el orden de genes que aparece en la fig. 1
nadA	aroG	gal		
+	+	-	81	2
-	-	-	58	2
-	-	+	26	2
-	+	-	21	2
+	-	-	1	4
+	+	+	1	4
+	-	+	1	4
-	+	+	0	4

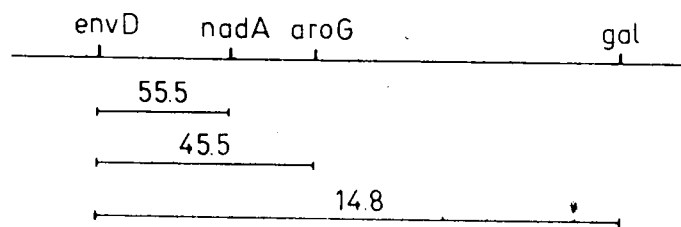


Figura 1.- Orden de los genes y frecuencias de cotransducción (%), de acuerdo con los datos de la Tabla 1.

D. 4. Estudio genético de un mutante osmosensible de *Salmonella typhimurium*
D.N. Antón.

Uno de los mutantes de envoltura celular aislados en *Salmonella typhimurium* se caracteriza por presentar múltiples anormalidades en funciones controladas por la cubierta. La cepa DA82 produce células esféricas en lugar de alargadas como ocurre en el tipo salvaje. Además, la cepa muestra alteraciones en su comportamiento osmótico, que conducen a la aparición de muerte exponencial cuando las células son transferidas de un medio de osmolalidad normal a otro con bajo contenido de sales. Estas alteraciones van acompañadas por un incremento en la sensibilidad a antibióticos que actúan sobre la síntesis de mureína, tales como penicilina y cicloserina(1).

Estamos realizando el estudio genético de la cepa DA82 con el objeto de averiguar si cada una de las alteraciones observadas es producida por una mutación independiente, determinar la localización de éstas en el mapa genético y lograr la construcción de pares de cepas isogénicas que no difieran más que en la mutación cuyos efectos deseamos estudiar.

Fueron realizados cruzamientos entre cepas normales pertenecientes a distintos tipos de Hfr con mutantes auxotróficas de la cepa DA82. Por análisis de los recombinantes producidos fue obtenida una localización aproximada para el gen que controla la forma celular y la sensibilidad osmótica (*bac*) en la región de *strA* (min. 108) del mapa genético de *Salmonella*. Por medio de cruzamientos apropiados fueron construidas donantes F^+ con el alelo *bac*⁻. Empleando estas donantes con receptoras mutadas en marcadores de la zona identificada fue delimitada la región de posible localización a los minutos 102-108, entre los marcadores *argE* y *strA*. Esos mismos resultados sugieren, con bastante certeza, que la ubicación de *bac* es entre *cod* y *strA* (min. 104-108).

Dada la pequeñez de la región involucrada y la existencia de marcadores apropiados en la zona, intentamos localizar con mayor precisión al gen *bac* por cotransducción con esos marcadores. Empleando los fagos de uso habitual en *Salmonella*: P22 y KB1, realizamos numerosos intentos, todos ellos con resultados negativos (Tabla 1). Esta incapacidad para demostrar contrasducción del gen *bac* con genes de la región en la que parece estar situado, sugiere que la distancia entre ellos es mayor que la longitud del fragmento de ADN transducido por los fagos usados (aproximadamente $2,6 \cdot 10^7$ daltons). No se conocen en *S. typhimurium* fagos que transduzcan trozos mayores, pero se sabe que el fago P1 de *Escherichia coli* transduce piezas de hasta $6 \cdot 10^7$ daltons. Recientemente ha sido demostrado que la resistencia de *S. typhimurium* al fago P1 se debe a que éste es incapaz de adsorberse sobre dicha especie y se han hallado mutantes de *S. typhimurium* en los cuales alteraciones específicas del lipopolisacárido permiten la adsorción de P1 a la célula (2). En estos mutantes la multiplicación del fago P1 se produce normalmente y el comportamiento en transducción es similar al observado en *E. coli* (3).

Para probar cotransducción de *bac* por medio del fago P1 fueron aislados mutantes sensibles a P1 en diversas cepas con la mutación *bac* y con marcadores de la zona de estudio. Realizadas las correspondientes transducciones pudimos observar cotransducción de *bac* con los genes *argE*, *aroC* y *strA*. Las frecuencias de cotransducción medidas (Tabla 1) permiten construir el mapa que aparece en la figura 1, en el cual las distancias han sido calculadas de acuerdo con la ecuación de Kemper (4).

En las transducciones mediadas por el fago P1 fueron obtenidos pares de cepas que difieren solamente en el alelo del gen *bac*. Estudios preliminares

realizados con estas cepas indican que la mutación bac⁻, aparecida en la cepa DA82, tiene amplios efectos pleiotrópicos, ya que no sólo controla la forma celular y la sensibilidad osmótica, sino que es también responsable del incremento de la sensibilidad a la penicilina y a la cicloserina, produce además, aumentos en la sensibilidad al desoxicolato (3 mg/ml) y a la novobiocina (75 µg/ml) y afecta la utilización de ciertos carbohidratos.

- 1.- Antón, D.N., J. Bacteriol., 109:1273, 1972.
- 2.- Ornellas, E.P. y Stocker, B.A.D., Virology, 60:491, 1974.
- 3.- Mojica-A, T., Molec. gen. Genet., 138:113, 1975.
- 4.- Kemper, J., J. Bacteriol., 117:94, 1974.

TABLA 1

Frecuencia de cotransducción (%)

Entre marcadores	con fago	
	KB1	P1
<u>argE</u> * - <u>bac</u>	<0,5	1,0
<u>argE</u> * - <u>cod</u>	<0,5	20,0
<u>cod</u> * - <u>bac</u>	<0,2	17,4
<u>aroC</u> * - <u>bac</u>	<0,5	11,7
<u>aroC</u> * - <u>strA</u>	4,5	56,6
<u>strA</u> * - <u>aroC</u>	-	67,2
<u>strA</u> * - <u>bac</u>	-	4,3
<u>aroC</u> * - <u>strA</u> - <u>bac</u>	-	1,8
<u>bac</u> * - <u>aroC</u>	<0,5	-

* Marcador seleccionado

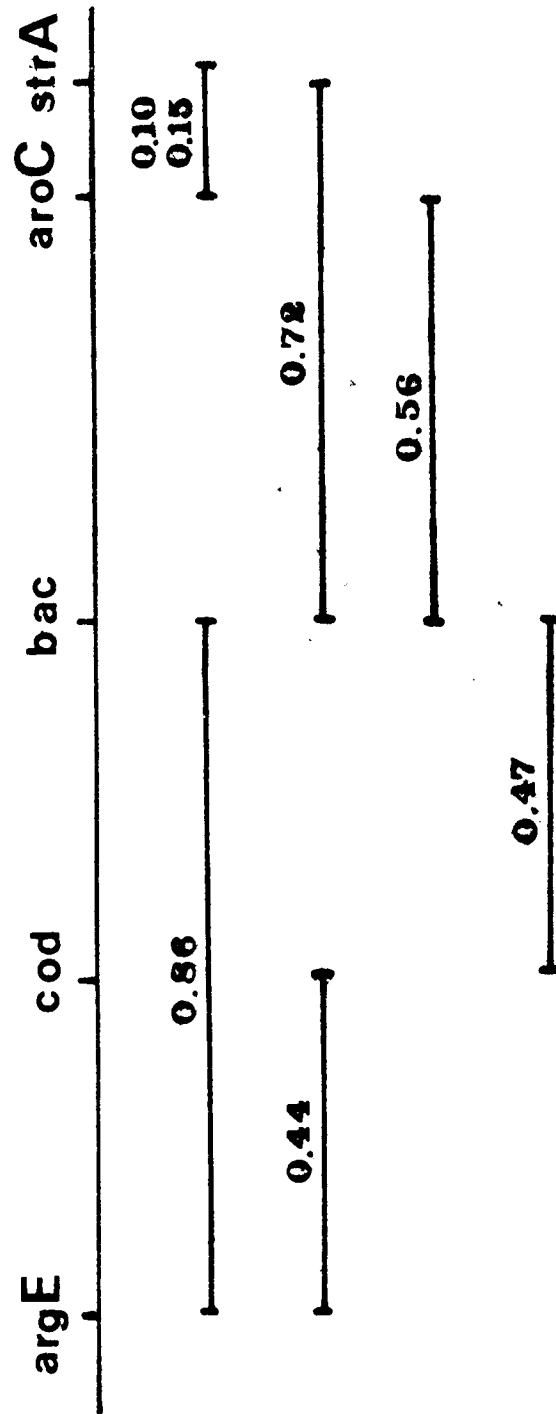


Figura 1.- Orden de genes y distancias físicas (calculadas de acuerdo con la ecuación de Kemper (4)) entre bac y marcadores vecinos.

D. 5. Efectos del "shock" osmótico sobre la síntesis de macromoléculas en un mutante osmosensible de *Salmonella typhimurium*

D.N. Antón y C.J. Quintans.

En un trabajo anterior quedó demostrado que cuando el mutante osmosensible DA82 es transferido a un medio nutritivo de baja osmolalidad ("shock" osmótico) se detiene el crecimiento y la división celular y se produce muerte exponencial de las células (1). El presente trabajo tiene por objeto describir los efectos del "shock" osmótico (S.O.) en la síntesis de macromoléculas en DA82.

El comportamiento mostrado por DA82 luego del pasaje de un medio normal a uno de baja osmolalidad, depende de la naturaleza de ambos medios. Las células de DA82 dan una supervivencia mucho más alta cuando son pasadas a un medio mínimo diluido (E-20) que cuando se las coloca en un medio rico de similar osmolalidad (caldo SIN). Por el contrario, las bacterias crecidas en medio mínimo (E), son más sensibles al S.O. que las células crecidas en caldo normal (caldo CON). Es decir, que el efecto mayor lo observamos cuando ponemos en caldo SIN células que han crecido en medio E. En algunos experimentos fueron transferidas al medio E-20 bacterias crecidas en medio E. Este tratamiento produce inhibición en el crecimiento y la división, pero no causa muerte celular; tras un lapso de aproximadamente 4 horas las células se recuperan y reinician su crecimiento.

Como observamos en la figura 1 A, la transferencia a caldo SIN de células crecidas en medio E detiene inmediatamente la incorporación de uracilo y leucina marcados en material insoluble en TCA frío. La incorporación de timidina, a pesar de ser fuertemente deprimida por el S.O., continúa durante más de 200 minutos. El agregado de NaCl a los cultivos inhibidos estimula prontamente el crecimiento y la división celular. De igual manera, la incorporación de timidina, uracilo y leucina también recomienza (Fig. 1 A).

El mismo comportamiento observamos cuando estudiamos la síntesis de ADN, ARN y proteína en células transferidas a E-20 (Fig. 1 B). Sin embargo, en este caso, el S.O. produce únicamente una disminución muy ligera de la viabilidad. Por lo tanto la muerte osmótica no sería debida a la inhibición de síntesis macromolecular que causa el "shock" osmótico.

Estudiamos la degradación de macromoléculas en cultivos de DA82 sometidos a S.O. en caldo SIN o medio E-20, no observando pérdidas significativas de los precursores radioactivos previamente incorporados en el ADN (^3H -timidina), ARN (^{14}C -uracilo) o proteína (^3H -leucina), ni siquiera en las células mantenidas en "shock" osmótico por más de 5 horas. Esto demuestra que la inhibición en la síntesis no va acompañada por un aumento en la destrucción de las macromoléculas estudiadas.

Investigamos la posible inducción de β -galactosidasa durante el S.O. con el objeto de averiguar si la inhibición en la síntesis de ARN se limita a los tipos estables o afecta también al mRNA. Como *Salmonella* no utiliza lactosa, pasamos a una derivada de DA82, un factor $\text{F}'\text{-lac}^+$ de *E. coli* K12. Hicimos crecer la cepa en medio E y la sometimos a S.O. en caldo SIN. Tomamos muestras de los cultivos en caldo SIN y CON a distintos tiempos y tratamos, unos con IPTG para inducir la síntesis de mRNA de β -gal, y otros con agua para tener los controles no inducidos. Los resultados obtenidos demuestran que la inhibición osmótica no impide la síntesis de mRNA puesto que en las muestras inducidas en caldo SIN aparece un considerable nivel de actividad de β -galactosidasa.

El comportamiento de DA82 durante el S.O. se asemeja mucho a la "respuesta estricta" mostrada por células normales cuando son privadas de algún

aminoácido. Por ello investigamos la síntesis de PPGPP y PPPGPP en cultivos inhibidos osmóticamente, ya que ha sido demostrado recientemente (2) que la respuesta estricta está caracterizada por la acumulación de esos dos nucleótidos. Los experimentos realizados demostraron que en la acción del S.O. sobre la síntesis de macromoléculas no interviene la respuesta estricta, pues en los cultivos sometidos a S.O. no hay aumento en el nivel de PPGPP ni PPPGPP.

Postulamos que la síntesis macromolecular normal requiere una conformación específica de la membrana y que los efectos del "shock" osmótico son debidos a que la defectuosa pared celular de DA82 permite un estiramiento excesivo de la membrana que resulta en la pérdida de esa conformación.

- 1.- Antón, D.N., J. Bacteriol., 109:1273, 1972.
- 2.- Cashel, M., J. Biol. Chem., 244:3133, 1969.

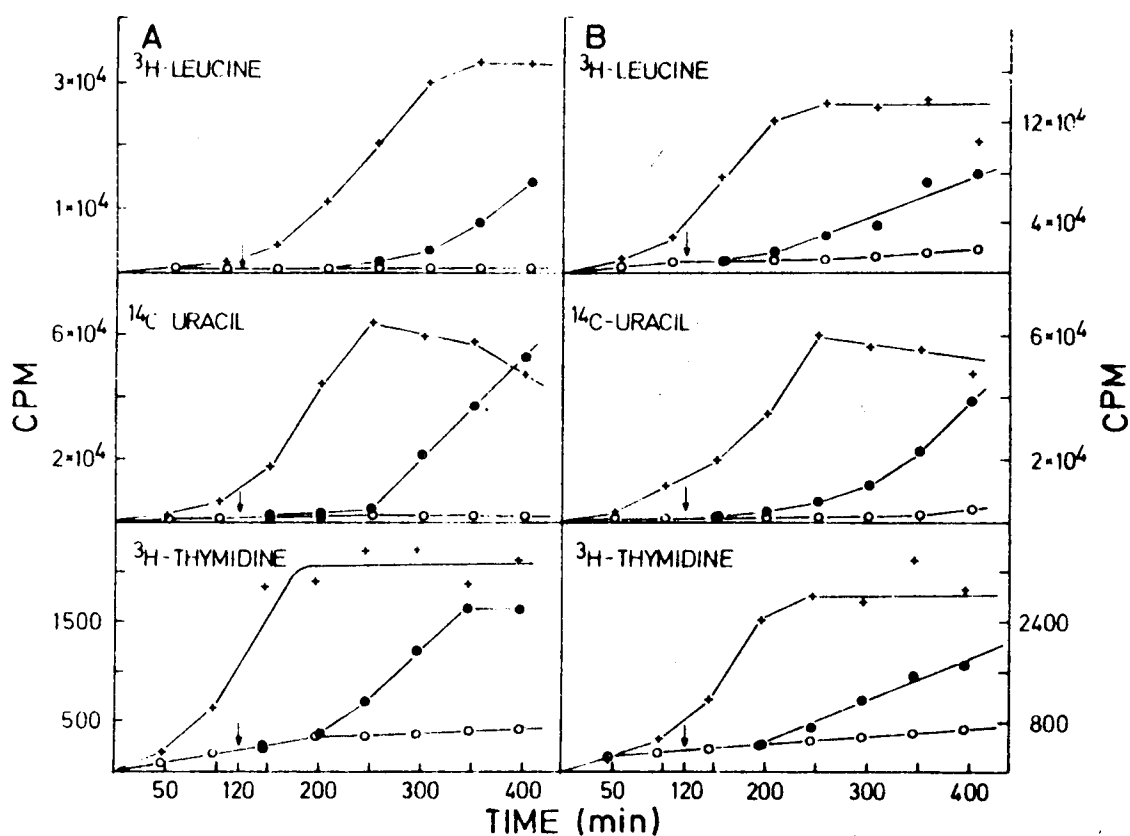


Figura 1.- Efectos del "shock" osmótico sobre la incorporación de precursores marcados en ADN, ARN y proteína. A: células crecidas en medio E, pasadas a caldo SIN (●) y caldo CON (+) a tiempo 0. B: células crecidas en medio E, pasadas a medio E-20 (○) y E (+) a tiempo 0. A los 120 minutos (flecha), NaCl 0,1 molar fue agregado a porciones de los cultivos en caldo SIN y medio E-20 (●).

D. 6. Modificaciones en la resistencia a la radiación ultravioleta de una cepa osmosensible de *Salmonella typhimurium*

C.J. Quintans.

Al estudiar la influencia de la osmolalidad del medio en la respuesta a la radiación ultravioleta (254 nm) de la cepa DA82 de *Salmonella typhimurium* (1) encontramos que la osmolalidad del medio en el momento de la irradiación no influye en la sensibilidad, pues el comportamiento no varía cuando células en fase logarítmica son irradiadas en medio mínimo M9 (2) diluido al 20% (medio SIN) o en el mismo medio adicionado con 0,1 molal NaCl (medio CON).

Sin embargo, cuando previamente a la irradiación las bacterias son incubadas en esos mismos medios, aparecen diferencias de comportamiento entre ellas. Tras 60 minutos de incubación en SIN, las células muestran un considerable aumento en su resistencia a la radiación ultravioleta, en tanto que las bacterias mantenidas por igual lapso en CON no alteran su respuesta a la irradiación (Fig' 1). La resistencia del cultivo en SIN se mantiene en incubaciones de por lo menos 5 horas. En cambio, la sensibilidad del cultivo en CON experimenta una disminución en el momento en que éste entra en fase estacionaria y alcanza el nivel de resistencia mostrado desde varias horas antes por el cultivo en SIN.

El agregado de ácido nalidíxico (15 µg/ml), un inhibidor de la síntesis de ADN, impide la adquisición de resistencia por las bacterias en SIN, pero no afecta la respuesta de las células en CON, ni modifica la respuesta del cultivo en SIN una vez que la resistencia se ha manifestado (Fig. 2).

El agregado de cloranfenicol (150 µg/ml) a cultivos en SIN no modifica en nada la respuesta de éstos, por el contrario, cuando añadimos este inhibidor de la síntesis de proteínas a cultivos en CON, a los 60 minutos se produce una subida en la resistencia a UV. hasta el nivel propio de las bacterias en SIN (Fig. 3). Este efecto del cloranfenicol es impedido por la presencia simultánea de ácido nalidíxico.

La resistencia desarrollada por DA82 durante la incubación en un medio de baja osmolalidad tiene características similares a las que se manifiestan cuando bacterias incubadas en medio de osmolalidad normal llegan a la fase estacionaria o cuando son sometidas a tratamientos que impiden la iniciación de nuevos ciclos de replicación. El ácido nalidíxico, que inhibe la elongación del ADN, impide la adquisición de esa resistencia, pero es incapaz de revertirla cuando las bacterias ya se han vuelto resistentes. El cloranfenicol, que impide la iniciación de nuevos ciclos de replicación, muestra una inducción de resistencia que en el caso de las bacterias en SIN se superpone al efecto del medio.

Es un hecho conocido que las bacterias con cromosomas en estado de reposo son más resistentes al efecto de las radiaciones que aquellas que se hallan en crecimiento. Se ha postulado que esa resistencia se debe a que la reparación del daño producido por radiaciones es más eficiente en células con cromosomas completos, o bien a que el punto de replicación es especialmente sensible a las radiaciones (3).

Los resultados experimentales aquí presentados sugieren que en medio SIN, probablemente como consecuencia de la inhibición de la síntesis de macromoléculas provocada por la baja osmolalidad (4), la cepa DA82 deja de iniciar nuevos ciclos de replicación de su ADN y al entrar su genoma en reposo adquiere mayor resistencia a la radiación ultravioleta.

- 1.- Antón, D.N., J. Bacteriol, 109:1273, 1972.
- 2.- Adams, M.H., Bacteriophages, Interscience Pub. Inc. N.Y., 1959.
- 3.- Hanawalt, P.J., Photochem. Photobiol., 5;1, 1966.
- 4.- Antón, D.N. y Quintans, C.J., El presente informe (D.5).

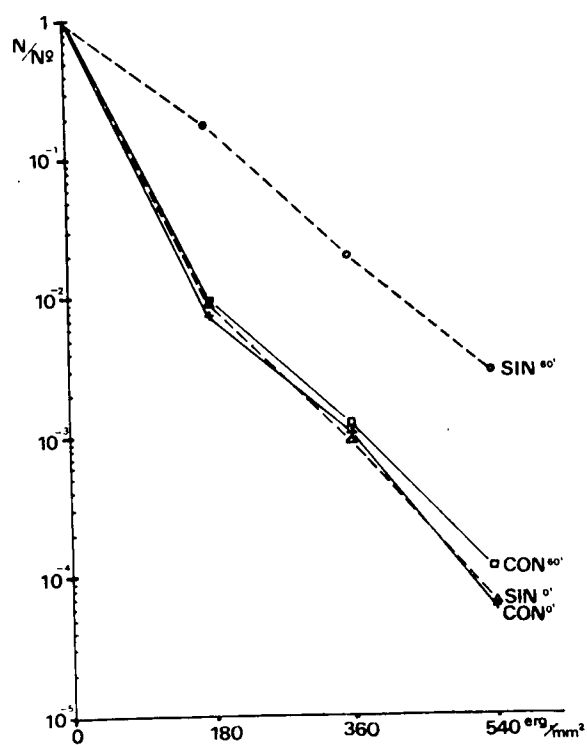
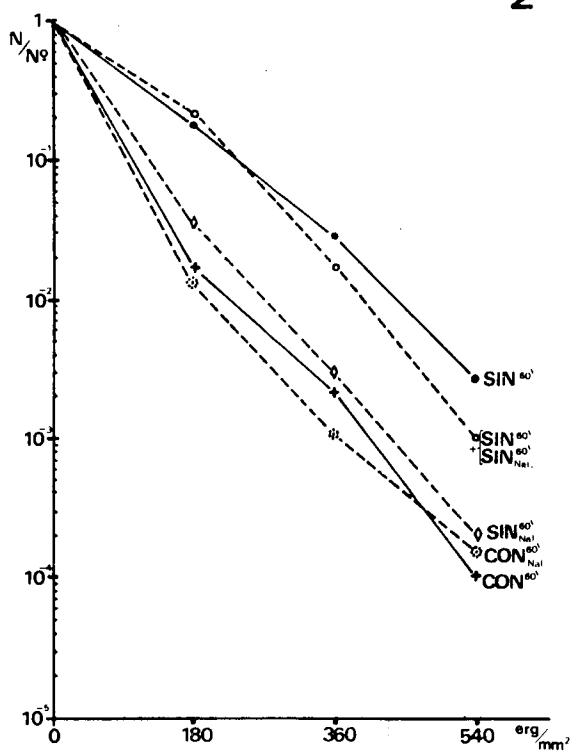


Figura 1.- Sensibilidad de DA82 a la radiación ultravioleta:

- + ——— + Suspendida en medio CON
- Δ ——— Δ Suspendida en medio SIN
- ——— □ Incubada durante 60' en CON
- ——— ○ Incubada durante 60' en SIN

2



3

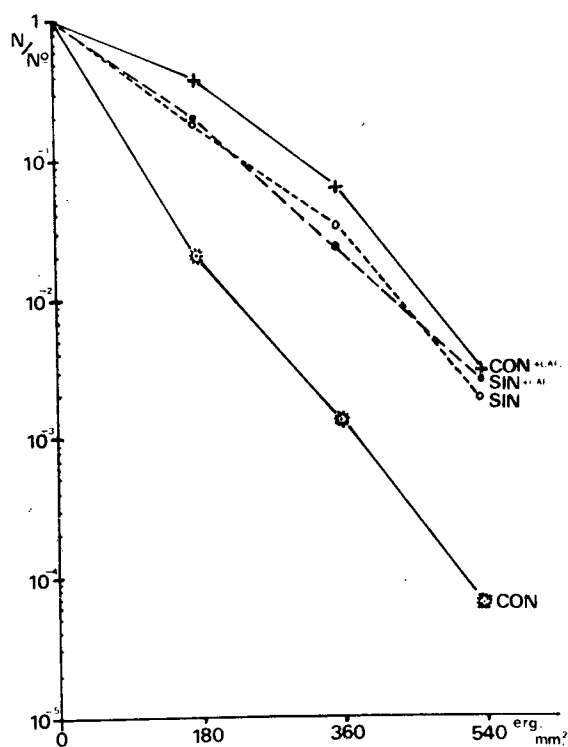


Figura 2.- Efecto del ácido nalidíxico (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en la sensibilidad a radiación ultravioleta de DA82:

- Incubada durante 60' en SIN
- ◊—◊ Incubada durante 60' en SIN con ácido nalidíxico
- Incubada durante 60' en SIN y luego tratada con ac. nalidíxico otros 60'
- +—+ Incubada durante 60' en CON
- *—* Incubada durante 60' en CON conteniendo ácido nalidíxico

Figura 3.- Efecto del cloranfenicol (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en la sensibilidad a radiación ultravioleta de la cepa DA82:

- *—* Incubada durante 60' en CON
- +—+ Incubada durante 60' en CON en presencia de cloranfenicol
- Incubada durante 60' en SIN
- Incubada durante 60' en SIN en presencia de cloranfenicol

D. 7. Recuperación por incubación en medio líquido de *Salmonella typhimurium* DA82.

I. Influencia de la composición del medio

C.J. Quintans.

La incubación en un medio líquido no nutritivo, durante un lapso más o menos prolongado, permite la recuperación parcial de suspensiones bacterianas irradiadas con luz ultravioleta. La recuperación se manifiesta como un aumento en el número de bacterias sobrevivientes con respecto al observado inmediatamente después de la irradiación. Este fenómeno, denominado recuperación por incubación en medio líquido (RIL), depende de la actividad del mecanismo enzimático de reparación por escisión, que se encarga de eliminar los dímeros de pirimidinas producidos por la radiación y reparar los huecos abiertos por ese proceso en el ADN.

Para estudiar las condiciones de tratamiento que permiten una recuperación óptima en el mutante osmosensible DA82 (1), en primer término determinamos el efecto de la composición del medio de irradiación sobre la RIL. Como podemos apreciar en los resultados que aparecen en la tabla 1, la composición del medio de irradiación tiene gran importancia en la recuperación, pues cambios en el mismo, producen grandes variaciones en la eficiencia de la RIL. La irradiación en la solución compleja M9-20% permite una recuperación muy superior a la observada con soluciones de una sola sal, aunque la osmolalidad sea igual en todos los casos. Entre las sales puras observamos también diferencias, siendo la más eficaz KCl, luego NH_4Cl , MgCl_2 y finalmente NaCl.

En segundo lugar investigamos la conveniencia de eliminar completamente del medio de irradiación los vestigios dejados por el medio empleado para hacer crecer las bacterias. Dicho medio contiene glucosa, que tiene un efecto inhibitorio sobre la reparación (2). Como podemos ver en la tabla 2, el lavado por centrifugación de las bacterias a irradiar produce dos efectos diferentes: un aumento de la resistencia a la luz ultravioleta y una disminución de la capacidad de recuperación, que queda anulada con apenas dos lavados.

Finalmente efectuamos experimentos destinados a determinar la composición más adecuada para el medio de incubación, agregando distintas sales a muestras de bacterias irradiadas en M9-20% e incubando durante 2 horas. Comparamos entonces la viabilidad en cada muestra con la observada en la suspensión no incubada. Como muestra la tabla 3 y detallamos en otra parte de este informe la osmolalidad del medio de incubación modifica fuertemente la eficiencia de la recuperación. Cuando es mantenida la misma osmolalidad observamos importantes diferencias en la efectividad de alguna de las sales usadas. En tanto que NaCl y KCl permiten recuperaciones semejantes o aun superiores a las obtenidas con el buffer M9 no diluido, la eficiencia de NH_4Cl y MgCl_2 es mucho menor.

De los resultados obtenidos podemos concluir que las condiciones para obtener una buena respuesta de RIL en la cepa DA82 son:

1) Al efectuar el cambio de las bacterias del medio de crecimiento al de irradiación, no deben ser efectuados lavados por centrifugación, ya que con ese tratamiento disminuye la capacidad de RIL. Una buena recuperación puede ser obtenida lavando el pellet, sin resuspenderlo, con el medio de irradiación.

2) La capacidad de recuperación depende ampliamente de la composición del medio de irradiación, siendo M9-20% el más adecuado entre los medios probados.

3) La composición del medio de incubación influye considerablemente en

la recuperación. En este efecto no cuenta únicamente la concentración de las sales usadas, sino también la naturaleza de las mismas.

Incubando en medio de osmolalidad normal (250 mOs) compuesto por mezclas complejas de sales (M9) o en esas mismas mezclas diluídas (M9-20%) y adicionadas de soluciones puras de NaCl o KCl 0,1 m, las recuperaciones obtenidas son óptimas.

- 1.- Antón, D.N., J. Bacteriology, 109:1273, 1972.
- 2.- Quintans, C.J., El presente informe (D'9).

TABLA 1

Composición del medio de irradiación y eficiencia de RIL

Medio de irradiación	Fracción de sobrevivientes a tiempo 0 (F ₀)	Fracción de sobrevivientes a las 2 horas (F ₂)	Relación de recuperación (F ₂ /F ₀)
M9-20%	6,2 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻¹	1.612
0,025 m NaCl	2,7 x 10 ⁻⁴	3,3 x 10 ⁻²	122
0,025 KCl	2,0 x 10 ⁻⁴	7,2 x 10 ⁻²	360
0,025 NH ₄ Cl	1,25 x 10 ⁻⁴	2,7 x 10 ⁻²	216
0,0187 MgCl ₂	8,5 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻²	176

Células creciendo en fase logarítmica con una D.O.₆₅₀ de aproximadamente 0,700 fueron divididas en alícuotas y sedimentadas por centrifugación. Cada uno de los pellets fue enjuagado, resuspendido en una de las soluciones listadas en la tabla 1, hasta una D.O.₆₅₀ de aproximadamente 0,100 e irradiadas con una dosis de 540 erg/mm². La osmolalidad fue llevada a aproximadamente 250 mOs., agregando buffer M9 concentrado y las distintas muestras fueron incubadas a 37°C con agitación durante 2 horas. La viabilidad fue determinada por recuento en agar nutritivo.

TABLA 2

Tratamiento previo a la irradiación	Medio de incubación	Tiempo de incubación (horas)	Fracción de sobrevivientes	Relación de recuperación
Las células fueron recolectadas por centrifugación. El pellet fue enjuagado con M9-20% y resuspendido en M9-20%	M9-20%	0	$1,5 \times 10^{-5}$	1
	M9-20%	2	9×10^{-4}	60
	M9-20% + 0,1 m NaCl	2	$4,5 \times 10^{-2}$	3.000
Las células fueron recolectadas por centrifugación. El pellet fue resuspendido en M9-20%, centrifugado nuevamente y resuspendido en M9-20%	M9-20%	0	$2,6 \times 10^{-5}$	1
	M9-20%	2	8×10^{-5}	3
	M9-20% + 0,1 m NaCl	2	$3,2 \times 10^{-3}$	123
Las células fueron recolectadas por centrifugación. El pellet fue resuspendido en M9-20%, nuevamente centrifugado y resuspendido en M9-20%, vuelto a centrifugar y a resuspender en M9-20%	M9-20%	0	4×10^{-5}	1
	M9-20%	2	$4,2 \times 10^{-5}$	1,05
	M9-20% + 0,1 m NaCl	2	$1,5 \times 10^{-4}$	3,75

TABLA 3

Eficiencia de RIL en diferentes medios de incubación

Composición del medio	Tiempo de incubación	Fracción de sobrevivientes	Coefficiente de recuperación
M9-20%	0	6×10^{-5}	1
M9-20%	2	$2,6 \times 10^{-4}$	4,4
M9 no diluido	2	$2,4 \times 10^{-2}$	400
M9-20% + 0,1 m Na Cl	2	$3,3 \times 10^{-2}$	533
M9-20% + 0,1 m KCl	2	3×10^{-2}	500
M9-20% + 0,1 m NH ₄ Cl	2	$3,5 \times 10^{-3}$	58
M9-20% + 0,067 m MgCl ₂	2	$1,1 \times 10^{-3}$	18

Bacterias en fase logarítmica (D.O. 650 -0,700) fueron recolectadas por centrifugación. El pellet fue enjuagado con M9-20% y resuspendido en esa solución hasta D.O.650 de aproximadamente 0,100. La suspensión fue irradiada con 540 erg/mm² de luz ultravioleta y dividida en alícuotas que recibieron los agregados detallados en la tabla. Las muestras fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con agitación. La viabilidad fue determinada por recuento en agar nutritivo.

D. 8. Recuperación por incubación en medio líquido de *Salmonella typhimurium* DA82.

II. Influencia de la osmolalidad del medio en la reparación por escisión

C.J. Quintans.

La reparación por escisión del daño inducido por la luz ultravioleta puede tener lugar durante la incubación de las bacterias irradiadas en medios no nutritivos. La eliminación de los dímeros de pirimidinas formados en el ADN por la irradiación requiere la acción de un complejo sistema enzimático que, básicamente, se cumple en varias etapas:

1) Incisión: es producida por endonucleasas específicas que efectúan la hidrólisis de una unión fosfodiéster cercana al dímero.

2) Escisión: llevada a cabo por enzimas exonucleolíticas que realizan la remoción del dímero de pirimidina y algunos nucleótidos adyacentes.

3) Reinserción: es debida a la acción de ADN-polimerasas que vuelven a llenar el espacio dejado vacante por los nucleótidos removidos en la etapa anterior.

4) Sellado: lo efectúa una nucleótido ligasa y comprende la formación de una unión fosfodiéster entre un grupo 5'fosfato y un oxhidrilo 3'.

Fue estudiada la capacidad de recuperación por incubación en medio líquido no nutritivo (RIL) de bacterias de la cepa DA82 (1) irradiadas con una dosis de 540 erg/mm² de luz ultravioleta (254 nm).

Observamos que en un medio de osmolalidad normal (medio CON, aproximadamente 250 mOs.) la recuperación producida en el número de bacterias viables por una incubación de 2 horas supera en más de 800 veces el obtenido sin incubación. La incubación en un medio análogo, pero de baja osmolalidad (SIN, aproximadamente 50 mOs) permite una recuperación de apenas 10 veces (fig. 1). El agregado de 0,1 molal NaCl al medio SIN lleva a éste al mismo nivel de osmolalidad del medio CON y permite un rápido cambio de la velocidad de recuperación que resulta similar a la de las células en CON (fig. 1). No existen antecedentes de este tipo de comportamiento, y la cepa control DA78 (1) se mostró indiferente a la osmolalidad del medio en cuanto a su capacidad para efectuar RIL.

Dado que la RIL es una manifestación del funcionamiento del mecanismo de reparación por escisión (2) fueron estudiados algunos parámetros representativos de la actividad de este sistema.

Determinando la desaparición de dímeros de pirimidina del ADN de bacterias irradiadas e incubadas en CON y SIN encontramos que existe una gran diferencia entre ambos medios en cuanto a la velocidad de eliminación de dímeros. Las bacterias en CON, escinden dímeros de su ADN mucho más rápidamente que las incubadas en SIN (fig. 2). Esta diferencia desaparece en forma aparentemente inmediata, mediante el agregado de 0,1 molal NaCl a las bacterias incubadas en SIN.

Como consecuencia de los procesos de reparación se producen cortes de una sola banda en el ADN de las bacterias irradiadas, que a su vez, producen una disminución del tamaño de las cadenas, lo que se pone de manifiesto cuando es determinado el peso molecular del ADN disociado a pH alcalino. Estudiamos la variación del peso molecular del ADN de células de DA82 irradiadas con U.V. e incubadas en CON y en SIN. Tanto en SIN como en CON comprobamos una disminución equivalente del peso molecular tras una hora de incubación (fig. 3). Sin embargo, a las dos horas de incubación observamos que el ADN de las células en CON retornaba a los valores iniciales, demostrando la finalización del proceso de reparación, en tan-

to que el ADN de las células incubadas en SIN mantenía los valores observados a la hora de la irradiación (fig. 3).

De estos resultados podemos concluir que como consecuencia de la incubación en SIN la cepa DA82 es afectada en forma reversible en su capacidad de efectuar reparación por escisión. Esta alteración, debida probablemente a cambios en las envolturas celulares producidos por la baja osmolalidad del medio, afecta la escisión presumiblemente a nivel de la etapa exonucleolítica.

- 1.- Antón, D.N., J. Bacteriol., 109:1273, 1972.
- 2.- Rupert, C.S. y Harm, W., Adv. Radiat. Biol., 2:1, 1966.

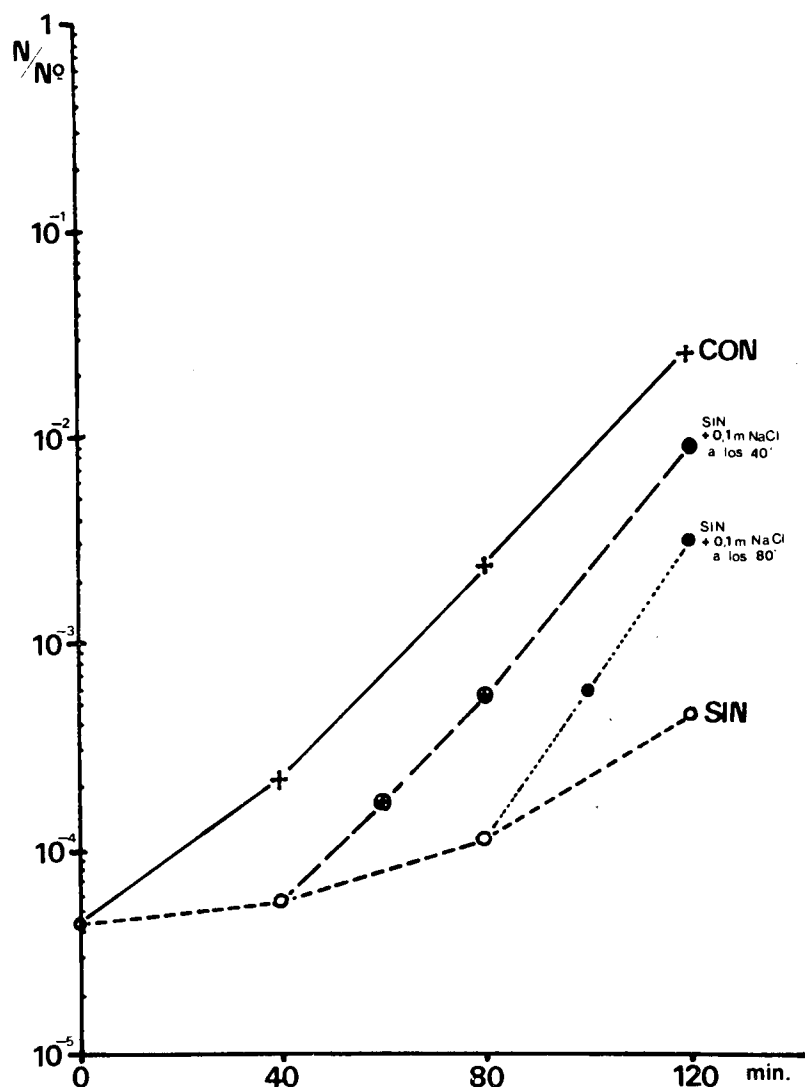


Figura 1.- Recuperación por incubación en medio líquido de S. typhimurium DA82. Bacterias irradiadas con 540 erg/mm^2 fueron incubadas en CON () o en SIN (); a los 40 y 80 min. se separaron alícuotas de SIN que se continuaron incubando previo agregado de 0,1 m NaCl. La viabilidad se determinó por recuento en agar nutritivo.

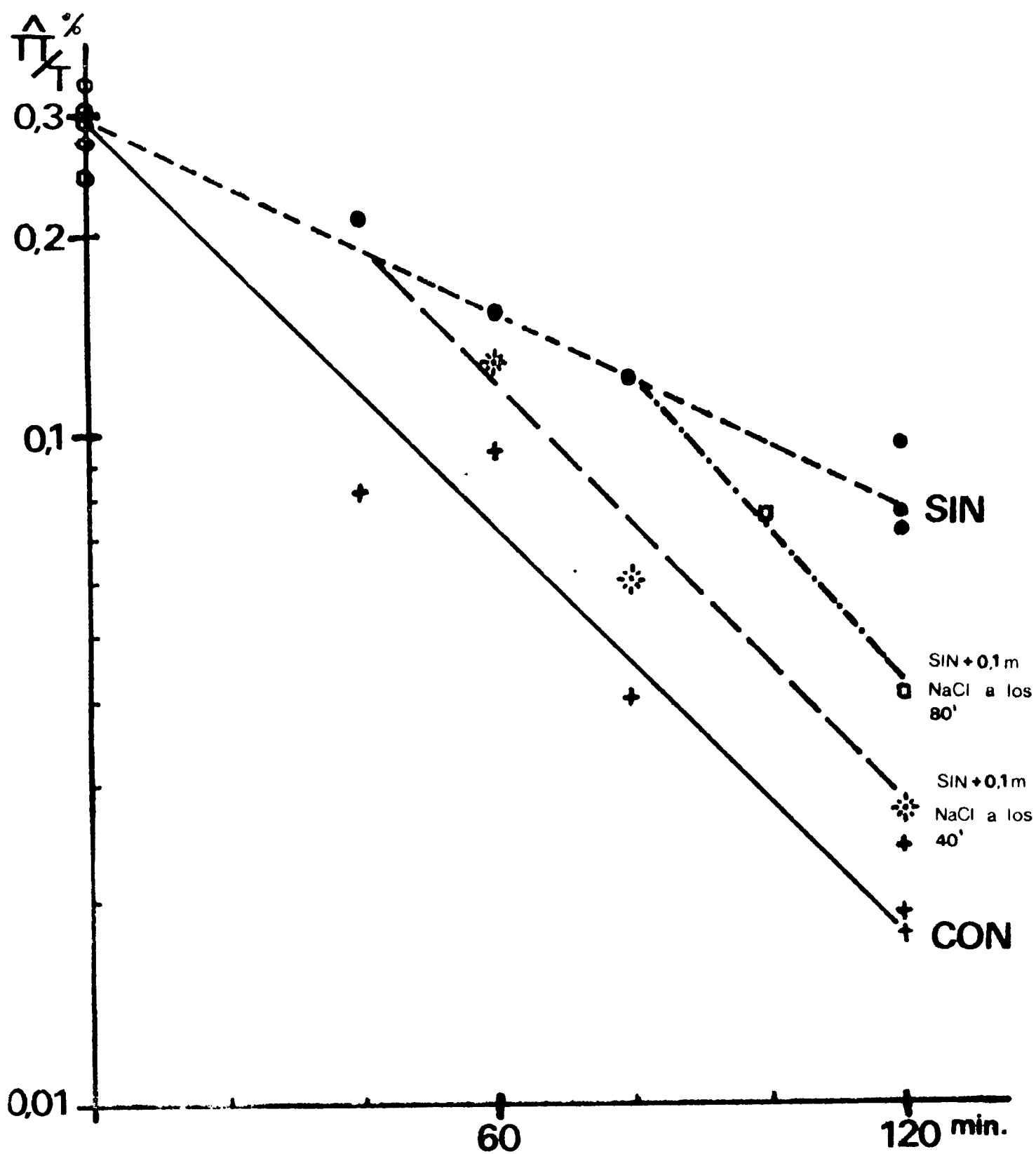


Figura 2.- Escisión de dímeros de pirimidina por DA82 irradiada con 540 erg/mm^2 e incubada en CON o SIN. Las bacterias se marcaron previamente con timidina tritiada y el contenido de dímeros se determinó por hidrólisis del ADN con ácido fórmico y cromatografía en papel. La actividad se determinó por centelleo líquido.

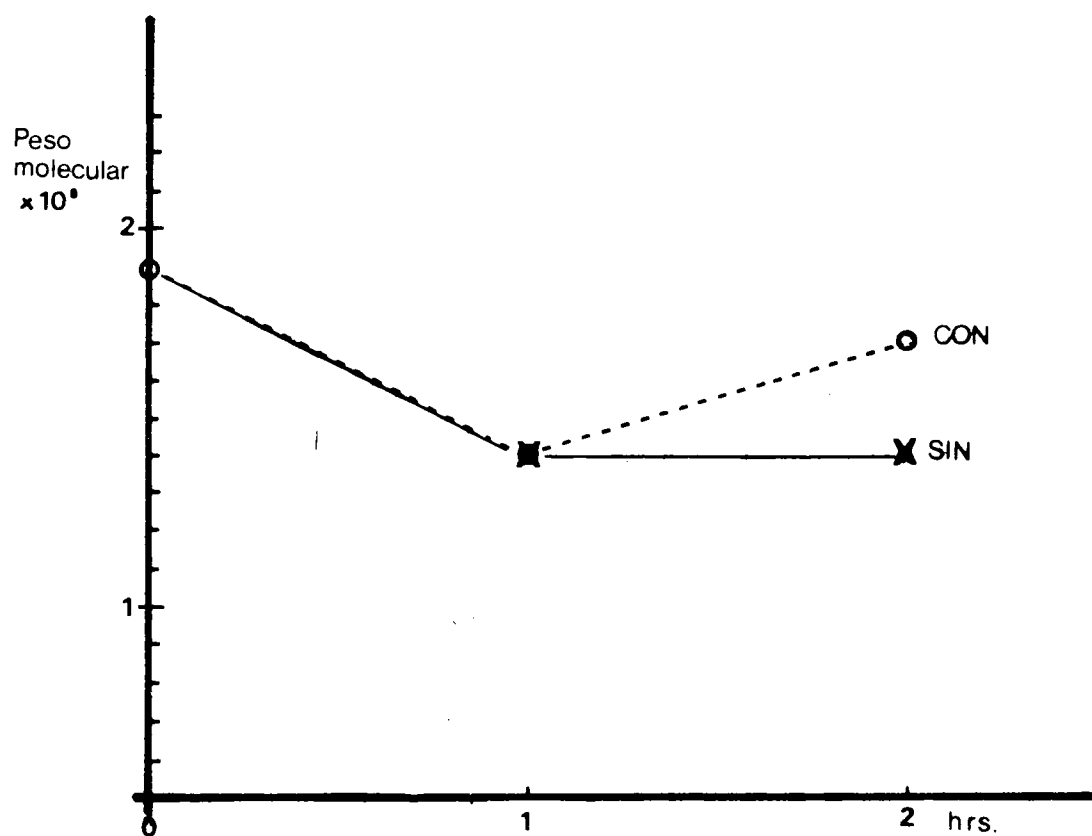


Figura 3.- Peso molecular medio del ADN de bacterias irradiadas con 540 erg/mm^2 e incubadas en CON y SIN. El ADN se marcó con timidina tritiada y se corrió en gradientes de sacarosa alcalina.

D. 9. Recuperación por incubación en medio líquido de *Salmonella typhimurium* DA82. III: Efecto de los inhibidores de la síntesis de macromoléculas.

C.J. Quintans.

La incubación de bacterias de la cepa DA82 (1) en medio SIN (2) produce, simultáneamente con la disminución de la capacidad de efectuar recuperación en medio líquido (RIL), la inhibición de la síntesis de macromoléculas (3).

Con el fin de determinar si estos dos hechos están relacionados, fueron efectuados experimentos en los que fue probado el efecto de diversos inhibidores de la síntesis de macromoléculas sobre la RIL. Como inhibidor de la síntesis de ADN fueron utilizados ácido nalidíxico (15 µg/ml) y fenetil alcohol (0,25% v/v); para ARN empleamos 5-flúor-uracilo (50 µg/ml) y para proteínas usamos tetraciclina (50 µg/ml), eritromicina (20 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml) y puromicina (67 µg/ml).

También realizamos experimentos de RIL con cada una de estas sustancias en presencia y ausencia de glucosa 0,1% en el medio. Experimentos anteriores habían demostrado que en este sistema la glucosa tiene la propiedad de anular la RIL y que este efecto puese ser revertido por algunas drogas. Dicho azúcar puede entonces servir para poner en evidencia diferencias en el comportamiento de los inhibidores estudiados.

Los inhibidores empleados pueden ser clasificados en tres grupos en base a la respuesta provocada por su acción:

1) Puromicina, 5-flúor-uracilo y ácido nalidíxico: su presencia no modifica la RIL ni en presencia ni en ausencia de glucosa (fig. 1 B).

2) Cloranfenicol: deprime la RIL en medio CON hasta niveles similares a los observados en medio SIN. Esta respuesta es similar en apariencia a la que produce el agregado de glucosa a un cultivo en CON. Sin embargo, aunque la glucosa y el cloranfenicol por separado inhiben la RIL, cuando son agregados juntos no tienen ningún efecto sobre dicha función. Esta neutralización en sus efectos muestra que el modo de acción de ambas es distinto y antagónico.

Tanto la tetraciclina como la eritromicina pertenecen a este grupo, aunque la intensidad de acción a las concentraciones empleadas es menor que la observada con cloranfenicol (fig. 1).

3) Fenetil alcohol: la incubación en presencia de esta droga inhibe la RIL en medio CON hasta llevarla a los mismos valores encontrados en medio SIN; sin embargo, a diferencia del cloranfenicol, no neutraliza la acción inhibitoria de la glucosa.

Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de la RIL observada en medio SIN no es causada por la detención de la síntesis de ADN, ARN o proteínas, separadamente. Es digna de mención la similitud observada entre la acción del fenetil alcohol y el efecto del medio SIN. Este compuesto ha sido ampliamente utilizado como inhibidor de la síntesis del ADN en estudios de replicación. Posteriormente fue demostrado que sus efectos no son tan específicos como se pretendía en un principio, ya que ejerciendo su acción primaria en la envoltura celular, afecta la permeabilidad y, en forma secundaria, inhibe la síntesis de macromoléculas, deprime la respiración, favorece el pegado de ligandos e inhibe la reparación. La incubación de DA82 en SIN provoca efectos análogos. Es pues posible que el fenetil alcohol pueda ser utilizado como una herramienta útil para facilitar la comprensión de las bases moleculares del comportamiento del mutante DA82.

- 1.- Antón, D.N., J. Bacteriol., 109:1273, 1972.
- 2.- Quintans, C.J., El presente informe, D.6.
- 3.- Antón, D.N., Quintans, C.J., El presente informe, D.5.

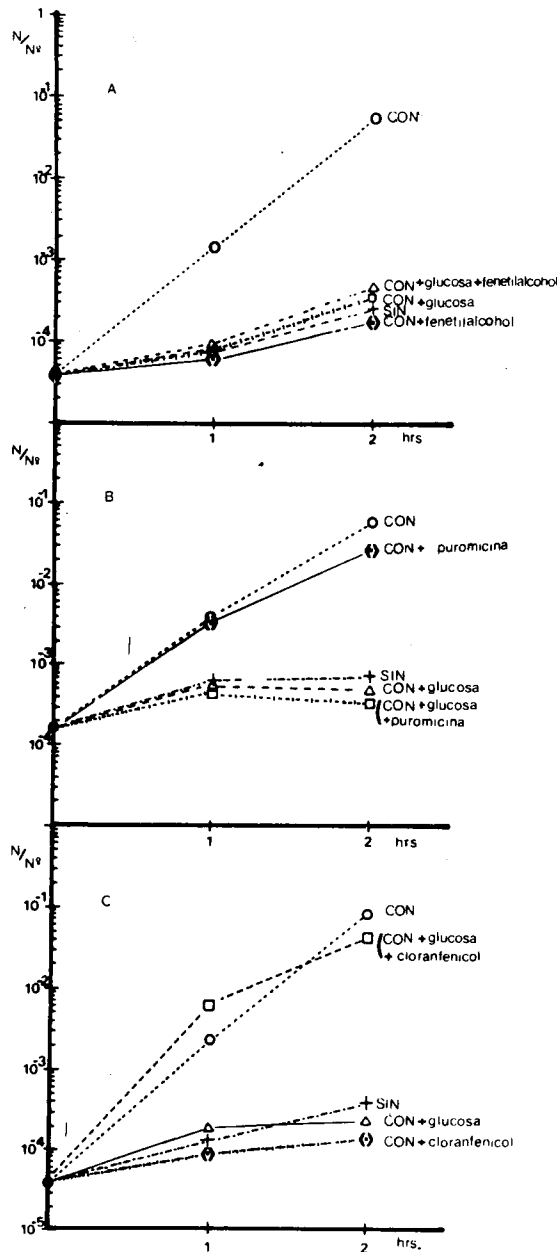


Figura 1.- Bacterias de la cepa DA82 crecieron en fase logarítmica fueron recolectadas por centrifugación. El pellet fue enjuagado con M9 20% y resuspendido en el mismo medio. la suspensión se irradió con una dosis de 540 erg/mm^2 y se dividió en alícuotas que fueron incubadas a 37°C con agitación. Las alícuotas marcadas CON contenían NaCl 0,1 m y en los casos indicados, inhibidor a la concentración dada en el texto. Las alícuotas marcadas SIN fueron incubadas directamente sin agregados. La viabilidad se determinó por recuento en agar nutritivo.

D. 10. Alteraciones de la división celular en un mutante termosensible de *Salmonella typhimurium*

A.T. De Micheli y D. N. Antón.

La cepa DA138 presenta, como mínimo, cuatro propiedades alteradas: sensibilidad a desoxicolato (DOC, 3 mg/ml), forma celular anormal, autólisis en buffer Tris-HCl (pH 8,5- 37°C) y termosensibilidad (tms).

Mediante cruzamientos entre una derivada auxotrófica de esta cepa y cepas Hfr con diferentes órdenes de transferencia, fue localizada la mutación de termosensibilidad entre meta (min. 128) y leu (min. 3) (1). Empleando dos Hfr con orígenes muy próximos pero sentidos de transferencia contrarios se pudo acotar la ubicación de la mutación tms al segmento 0-3 min. Por último, fueron analizados 254 transductantes leu⁺ obtenidos en una cepa termosensible, con fago crecido en una dadora normal ara⁻. En base a las frecuencias de cotransducción medidas entre los marcadores leu-ara (53,1%), leu-tms (11,8%) y leu-ara-tms (1,2%) establecimos que el orden de esos genes es ara-leu-tms.

Por su ubicación la mutación tms parece pertenecer al gen divC ya localizado en S. typhimurium (2). Al igual que la única mutación divC descrita hasta ahora (2), la mutación tms de DA138 es capaz de devolver el fenotipo liso a mutantes constitutivos de histidina.

En el estudio de distintos recombinantes de los cruzamientos y transducciones anteriores observamos segregación entre sensibilidad a DOC, autólisis y termosensibilidad; esto demuestra que estas tres alteraciones están determinadas por genes diferentes. No fue estudiado aún el control genético de la variación de forma.

Estudios preliminares sobre el "mapeo" de sensibilidad a DOC indican que el gen correspondiente se halla en las cercanías de meta (min. 128). Con respecto a autólisis, ha sido demostrado que la mutación que causa esta alteración en DA138 no es alélica con las mutaciones envD que producen un fenotipo parecido en otros mutantes de envoltura de S. typhimurium (3).

Dado que las otras mutaciones presentes en DA138 pueden influir en el estudio de las alteraciones producidas por la mutación tms, este alelo fue transferido a una cepa salvaje. Por medio de transducción con fago crecido en DA138 y una receptora leu⁻ apropiada, obtuvimos la cepa DA470 cuyas características de resistencia a DOC, autólisis normal, forma celular normal e incapacidad para crecer en agar nutritivo a 43°C demuestran que ha recibido de DA138 solamente la sensibilidad a temperatura. Para el estudio de los efectos de la temperatura sobre el crecimiento y la división celular fue empleada la cepa DA470.

En experimentos de cinética de crecimiento y viabilidad establecimos que cuando un cultivo crecido a 32°C es transferido a 43°C hay una detención casi inmediata de la división celular. Sin embargo no se produce inhibición del crecimiento, ya que la densidad óptica del cultivo aumenta en forma semejante a la del control a 32°C (fig. 1). Esto resulta en la formación de filamentos, aparentemente no segmentados, que pueden ser observados con microscopía de fase.

La incapacidad para dividirse a 43°C no es irreversible. Cuando los filamentos son pasados de 43°C a 32°C comienzan a dividirse muy rápidamente al principio, hasta alcanzar en 50 minutos el título correspondiente al control en el momento del cambio. Una vez alcanzado éste, siguen dividiéndose a la velocidad normal (fig. 2).

El fenómeno de recuperación producido por el pasaje a 32°C ocurre aun en

presencia de cloranfenicol (32 µg/ml), aunque el número de divisiones que se produce es menor (fig. 2).

La septación de filamentos producida por un aumento en la presión osmótica del medio ha sido descripta para varios mutantes de *E. coli* (4) y *S. typhimurium* (2). En la cepa DA470 el agregado de NaCl (concentración final 0,25 M) estimula la división de los filamentos formados a 43°C. El efecto de las sales es parcial ya que el título obtenido es menor que el alcanzado por pasaje a 32°C y la pendiente del aumento no es tan pronunciada.

Los resultados obtenidos sugieren que durante el crecimiento a 43°C se acumula alguna sustancia cuya concentración determina la aceleración de la división observada tras el pasaje a 32°C. Algunas de esas divisiones pueden producirse sin que haya síntesis de proteínas. Concluimos entonces que la alteración presente en DA470 afecta uno de los pasos finales del proceso de división celular.

- 1.- Sanderson, K.E., *Bacteriol. Rev.*, 36:558, 1972.
- 2.- Cieřla, Z., Bagdasarian, M., Szczurkiewicz, W., Przygořska, M. y Kłopotowski, T., *Molec. gen. Genet.*, 116:107, 1972.
- 3.- Ant3n, D. y Orce, L., *Molec. gen. Genet.*, 144:97, 1976.
- 4.- Ricard, M. e Hirota, Y., *C.R. Acad. Sci.*, 268:1335, 1969.

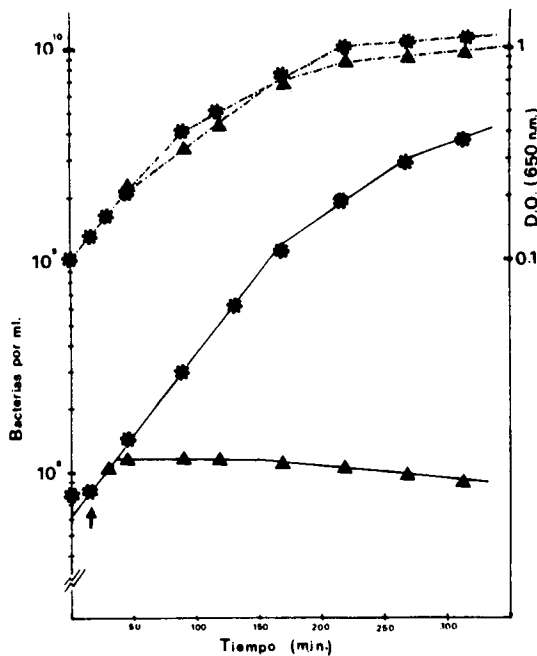


Figura 1.- Comportamiento de Da470 en caldo nutritivo a 32°C (*) y a 43°C (▲). La flecha indica el momento en que una alícuota del cultivo creciendo a 32°C fue transferida a 43°C.

Densidad óptica (650 nm)
Número de células viables.

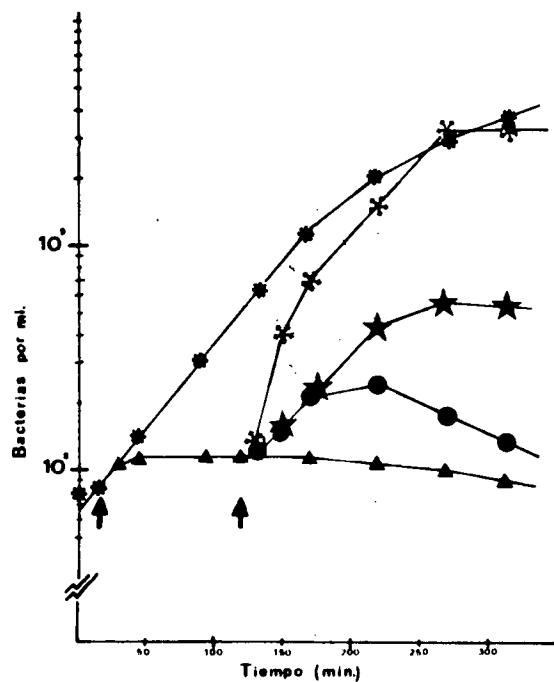


Figura 2.0 Crecimiento de DA470 en caldo nutritivo a 32°C (●). A los 30 minutos (primera flecha) una alícuota del cultivo creciendo a 32°C es transferida a 43°C (▲). A los 120 minutos (segunda flecha), alícuotas del cultivo de 43°C son pasadas a (✱) 32°C, (●) 32°C con 32 µg de cloranfenicol y a (✱) 43°C con 0,25 M de ClNa.

EFFECTOS SOMATICOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES (ONCOLOGIA)

E. 1. Evolución de la infección viral en animales totalmente irradiados.

Virus aparentemente pasajeros

J. Mayo, y J.H. Lombardo.

Como uno de los efectos inmediatos de la irradiación total del cuerpo en seres humanos y animales de experimentación es la infección por agentes bacterianos (1), particularmente de origen endógeno, fue iniciada una línea de investigación para establecer la importancia de los agentes virales como causa de infección.

Fue demostrado que animales naturalmente inmunes morían como resultado de la infección viral, si eran inoculados con este agente luego de irradiados (2). El virus utilizado (aftosa) fue adaptado por pasaje en animales irradiados a los animales normales, constituyendo un nuevo factor de enfermedad (3).

Estos estudios fueron hechos extensivos a virus con la propiedad de transformar células normales en neoplásicas dada su importancia como agentes oncogénicos de efectos inmediatos y alejados pos-irradiación (1).

Los trabajos realizados demostraron que un virus sin actividad biológica demostrable, existente en una línea celular BHK 21 cl 13, manifestó sus propiedades infectantes y oncogénicas luego de su pasaje por animales totalmente irradiados con dosis de 600 rads (4, 5, 6, 7).

Estas células portadoras del virus, denominado BHK por su origen, producen en el Hamster un sarcoma indiferenciado, del cual fue obtenida una línea celular. De ambos materiales obtuvimos suspensiones acelulares conteniendo el virus BHK, al cual investigamos sus propiedades, particularmente la oncogénica (7).

El sedimento y el líquido sobrenadante obtenido por centrifugación de la suspensión acelular fue separado en diversas fracciones por cromatografía en columna, analizada químicamente y por marcación radioisotópica y determinada su propiedad oncogénica por transformación de células normales en el animal y en cultivos celulares.

Para verificar la producción de estas fracciones por parte de las células neoplásicas fueron utilizadas células de la línea cultivada "in vitro", obtenida a partir del tumor del animal. Las células del cultivo en el orden de $2 \cdot 10^7$ fueron alojadas en cámaras de difusión de paredes con poros de 220,50 y 10 nm de ϕ . Estas cámaras fueron implantadas en la cavidad peritoneal del Hamster adulto e investigada la producción de un tumor. Igual procedimiento seguimos "in vitro" colocando las cámaras de difusión en contacto con cultivos primarios de células del contenido peritoneal del Hamster adulto y células embrionarias de Hamster.

Mediante los procedimientos antes mencionados fue demostrada una fracción de P.M. $>15 \cdot 10^7$ correspondiente al agente viral y otra fracción de aproximadamente $3 \cdot 10^6$, individualizada como el ARN viral. Ambas fracciones producen la transformación de cultivos primarios de células embrionarias de Hamster y originan un sarcoma en este animal cuando las células tumorales son alojadas en cámaras de difusión implantadas en la cavidad abdominal del Hamster.

"In vitro" fue observada la transformación de las células del contenido peritoneal del Hamster adulto por el virus BHK.

Fue demostrado que el virus original, considerado inactivo, produce luego de su pasaje por animales totalmente irradiados la transformación de la línea BHK

21 cl 13, indicando una modificación en la expresión del genoma viral original.

Estas experiencias demuestran las propiedades oncogénicas de un coronavirus existente en la línea BHK 21 cl 13, que se manifiestan con claridad luego del pasaje de las células portadoras del virus por animales totalmente irradiados.

Fueron demostradas las propiedades oncogénicas del genoma del virus, el cual actuaría aisladamente como uno de los mecanismos naturales de transformación de células normales en neoplásicas, tanto en el animal como en cultivos "in vitro" sin necesidad del virus completo.

Cabe hacer notar que las células BHK 21 cl 13 son utilizadas en uno de los métodos de elaboración de vacunas antiaftosas en animales que proveen carne para el consumo humano y en la experimentación virológica y oncológica.

- 1.- Bacq, Z.M. y Alexander, P., Fundamentos de Radiobiología. Edit. Acribia, Zaragoza, España, 1964.
- 2.- Mayo, J., Rivenson, S., Lombardo, J.H., Abadie, G.E. y Smolko, E.E., Proceedings of the Nuclear Society. Topical Meetings. San Juan, Puerto Rico, PRINC, 135:215, 1969.
- 3.- Lombardo, J.H., Mayo, J., Abadie, G., Rivenson, S. y Smolko, E.E., Rev. Onvest. Agrop. I.N.T.A., Serie A. Patol. Anim., 5:87, 1969.
- 4.- Bernard, W. y Tournier, P., Ann. Inst. Pasteur, 107:447, 1964.
- 5.- Klein-Szanto, A.J.P., Conti, C.J. y Mayo, J., Z. Krebsforsch., 80:277, 1973.
- 6.- Mayo, J., Moreira, J.L., Lombardo, J.H., Conti, C.J. y Rivenson, S., Archiv fur Experim. Veter. Med., 5:853, 1971.
- 7.- Mayo, J., Lombardo, J.H., Klein-Szanto, A.J.P., Conti, C.J. y Moreira, J.L., Cancer Res., 33:2273, 1973.

E. 2. Evolución de la infección viral en animales totalmente irradiados.

Virus con actividad oncogénica demostrada

J. Mayo.

En la misma línea de una investigación anterior (1) está en estudio el comportamiento de virus de actividad oncogénica demostrada y de sus células portadoras en animales totalmente irradiados (2, 3).

Para este fin fueron transplantadas en ratones C3H/Ep por vía intraperitoneal 10^7 células de un carcinoma mamario espontáneo de la misma cepa. Los animales fueron previamente irradiados con 400 rads (irradiación total del cuerpo).

Al quinto pasaje en animales totalmente irradiados fue observada una modificación del desarrollo del tumor. Los nódulos aislados intraperitoneales observados previamente fueron reemplazados por nódulos múltiples pequeños, implantados en el peritoneo, ascitis hemorrágica y numerosas células neoplásicas en suspensión. Actualmente estamos efectuando 11 pasajes en animales totalmente irradiados, conservando el tumor las mismas características. Las células de los nódulos peritoneales son fácilmente cultivables "in vitro" como cultivo primario y a partir de éstas están siendo efectuados los repiques a fin de obtener una línea celular que permitirá estudiar el comportamiento de estas células y su contenido viral luego del pasaje por animales totalmente irradiados.

- 1.- Mayo, J., Lombardo, J.H., Klein-Szanto, A.J.P., Conti C.J. y Moreira, J.L., Cancer Res, 33:2273, 1973.
- 2.- Sarkar, N.H. y Moore, D.H., Virology, 61:38, 1974.
- 3.- Nandi, S. y McGrath, C.M., in Advances in Cancer Research, 17:353, 1973.

F. PATOLOGIA

F. 1. Efectos de la irradiación en la epidermis de la rata: grupos sulfidrilos y disulfuros.

A.C.C. Frasch, M.E. Itoiz, H.E. Volco y R.L. Cabrini

Los efectos de las radiaciones sobre los grupos SH y SS constituye actualmente un tema controversial. Csermely, Panfilis y Santini (1) no encontraron ninguna variación con dosis entre 100 y 1.000 rads, mientras que Guerrier, Catayée y Varenne (2) hallaron una disminución de los mismos después de 7.000 rads aplicados por cobaltoterapia en epidermis humana.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método para la evaluación cuantitativa de grupos SH y SS, mediante el barrido microespectrofotométrico de secciones coloreadas con Mercury-Orange (3).

La piel dorsal de siete ratas Wistar recién nacidas fue irradiada a través de colimadores de plomo de 300 y 1.200 μ de ancho. La fuente de rayos X fue un difractor Philips PW, a 30 kV y 20 mA, con un tubo con ánodo de cobre y filtro de níquel del que se obtiene un haz de rayos X prácticamente monocromático de 1,54 Å y 8 kV de energía.

Fue aplicada una dosis única de 16 Krads durante 5 minutos, realizando luego cortes seriados, que fueron coloreados con las siguientes técnicas: 1) hematoxilina-eosina (H-E); 2) Mercury-Orange para la demostración de grupos SH y 3) Mercury-Orange con reducción previa en ácido tioglicólico 0,4 M para la demostración de grupos SH y SS. El espesor de las capas basal, espinosa, granulosa y córnea fue medida en los cortes de H-E. Los cortes fueron cuantitados mediante barridos microespectrofotométricos en un Cytoscan Zeiss con platina movable automáticamente.

La mayor concentración de grupos SH fue encontrada en el estrato basal, disminuyendo paulatinamente hacia la superficie. En cambio, los grupos SH y SS cuantitados juntos llegan a sus máximos valores en el estrato córneo.

Grupos sulfidrilos: el contenido total de grupos SH aumenta con respecto a sus valores normales, siendo este incremento más marcado a nivel de la capa espinosa (Fig. 1 A). Por el contrario, la concentración media de dichos grupos disminuye en los estratos basal y espinoso, donde la mayor concentración de grupos SH fue encontrada en el epitelio normal.

Grupos sulfidrilos + disulfuros: el contenido total de grupos sulfidrilos y disulfuros aumenta en la epidermis irradiada. La relación irradiado/control obtenida, es similar a la hallada para los grupos SH demostrados aisladamente. La concentración media de los grupos SH + SS disminuye sin embargo en los estratos basal y espinoso, encontrando menores variaciones en los estratos superficiales.

Relevantes variaciones de ambos grupos estudiados fueron encontradas en las capas granulosa y córnea a los 4 días post-irradiación. Las células epiteliales de las ratas recién nacidas tardan 3 días en llegar del estrato basal al córneo. Esto implicaría que las nuevas células germinales formadas poseen un metabolismo alterado o que la lesión en la dermis sub-epidérmica impide la correcta nutrición de las células basales.

Las alteraciones metabólicas, junto con las variaciones en los grupos estudiados en la epidermis irradiada y las alteraciones ultraestructurales halladas en el estrato córneo indicarían una aceleración en el proceso de la querati-

nización y una alteración cualitativa y cuantitativa de la queratina formada.

- 1.- Csermely, E., Panfilis, G y Santini, R. G. ital. Derm. 109: 175, 1968.
- 2.- Guerrier, Y., Catayée, G. y Varenne, D. Société de Biologie de Montpt-
llier, p. 942, 1965.
- 3.- Volco, H.E., Frasc, A.C.C., Itoiz, M.E. y Cabrini, R.L. (en prepara-
ción).

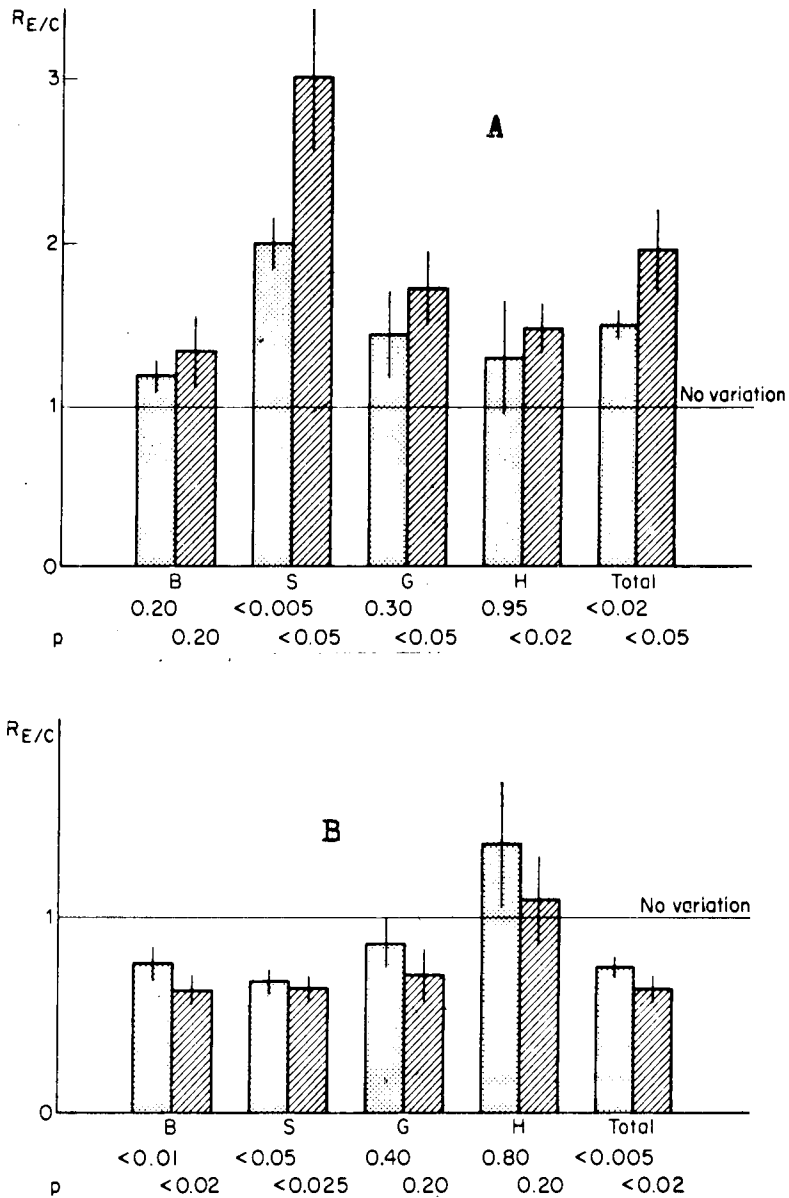


Figura 1.- Valores totales (A) y medios (B) de grupos SH.

R e/c: relación experimental/control.

Los resultados corresponden a los animales irradiados con una ranura de 300 (...) y 1.200 μ (///) de ancho.

B: basal; S: espinosa; G: gránulos; H: córnea; p: probabilidad usando el "test" de Student para datos apareados.

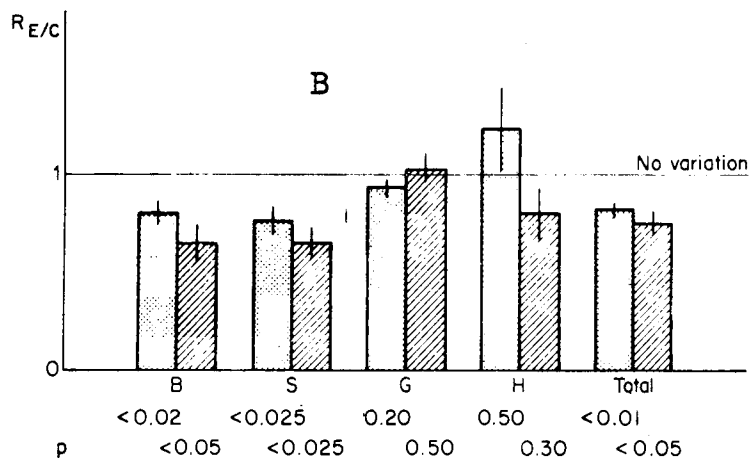
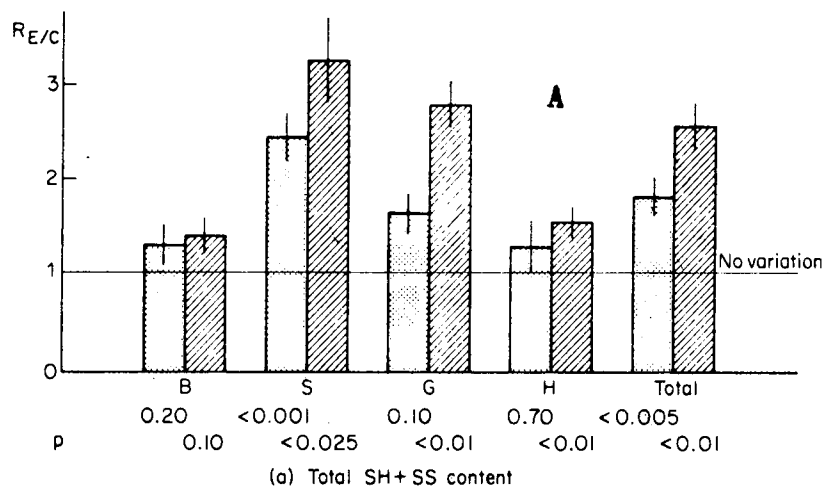


Figura 2.- Valores totales (A) y medios (B) de grupos SH + SS.
Abreviaturas iguales a las utilizadas en la figura 1.

F. 2. Efectos de la irradiación en la epidermis de rata: variación de la succinato deshidrogenasa, láctico deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en función de la zona y edad del animal irradiado.

M.E. Itoiz y A.C.C. Frasch.

En varias comunicaciones previas se ha hecho referencia a los variados aspectos que presenta la epidermis a las altas dosis de rayos X en la cola de la rata recién nacida.

Además, se ha hecho hincapié en los cambios del metabolismo glucolítico con disminuciones de la actividad de enzimas que forman parte del ciclo de Krebs y un aumento de las enzimas asociadas al ciclo de las pentosas (1-3).

Por estos motivos pareció de interés estudiar la influencia de otros factores como la edad y la estructura de la epidermis irradiada, los que podrían modificar el grado de la respuesta enzimática.

Diez ratas Wistar, de 3 y 12 días de edad fueron irradiadas en la planta derecha (zona desprovista de folículos pilosos) y en la porción distal de la cola. La planta izquierda y los 2/3 proximales de la cola fueron utilizados como controles en el respectivo animal. El total de animales fue sacrificado a los 4 días post-irradiación.

Los cortes fueron coloreados con las técnicas histoquímicas para la demostración de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G1-6-P Dh), succinato deshidrogenasa (SDh) y láctico deshidrogenasa (LDh). (4, 5).

Las actividades enzimáticas fueron medidas microespectrofotométricamente.

El contenido enzimático total (CET) de SDh y LDh aumentó en todos los casos estudiados, excepto en la planta de los animales de 7 días de edad. La concentración media (CEM) disminuyó, indicando una menor actividad enzimática por unidad de tejido. En todos los casos las mayores variaciones ocurrieron en la cola y en los animales de menor edad.

La G1-6-P Dh mostró un aumento en los valores de CET y CEM en todas las condiciones utilizadas (Fig. 1). Tal como ocurre con las otras enzimas estudiadas, las mayores variaciones fueron encontradas en los animales de menor edad.

A pesar de que el contenido total de esta enzima es mayor en la cola que en la planta, la menor acantosis reaccional de esta última zona es responsable de los mayores valores obtenidos por unidad de volumen (CEM) en la región plantar.

La presente comunicación confirma resultados anteriores con respecto a la disminución de SDh y LDh y el incremento de G1-6-P Dh en la epidermis irradiada.

Los animales de menor edad sufrieron mayores alteraciones morfológicas y enzimáticas en la epidermis irradiada.

La diferencia obtenida entre la planta y la cola parecería indicar que la presencia de folículos pilosos en la cola irradiada aumenta el grado del daño producido.

Referencias

- 1.- Cabrini, R.L., Itoiz, M.E., Mayo, J., Smolko, E.E. y Klein-Szanto, A. J.P., Int. J. Radiat. Biol., 18:415, 1970.
- 2.- Klein-Szanto, A.J.P. y Cabrini, R.L., Int. J. Radiat. Biol., 18:235, 1970.
- 3.- Klein-Szanto, A.J.P., Cabrini, R.L., Itoiz, M.E. y Volco, H.E., Int. Radiat. Biol., 26:285, 1974.
- 4.- Nachlas, M.M., Tsou, K.C., De Souza, E., Chang, S. y Seligman, M.A., J. Histochem. Cytochem., 5:420, 1957.
- 5.- Hess, R., Scarpelli, D.G. y Pearse, A.G.E., Nature, 181:1931, 1958.

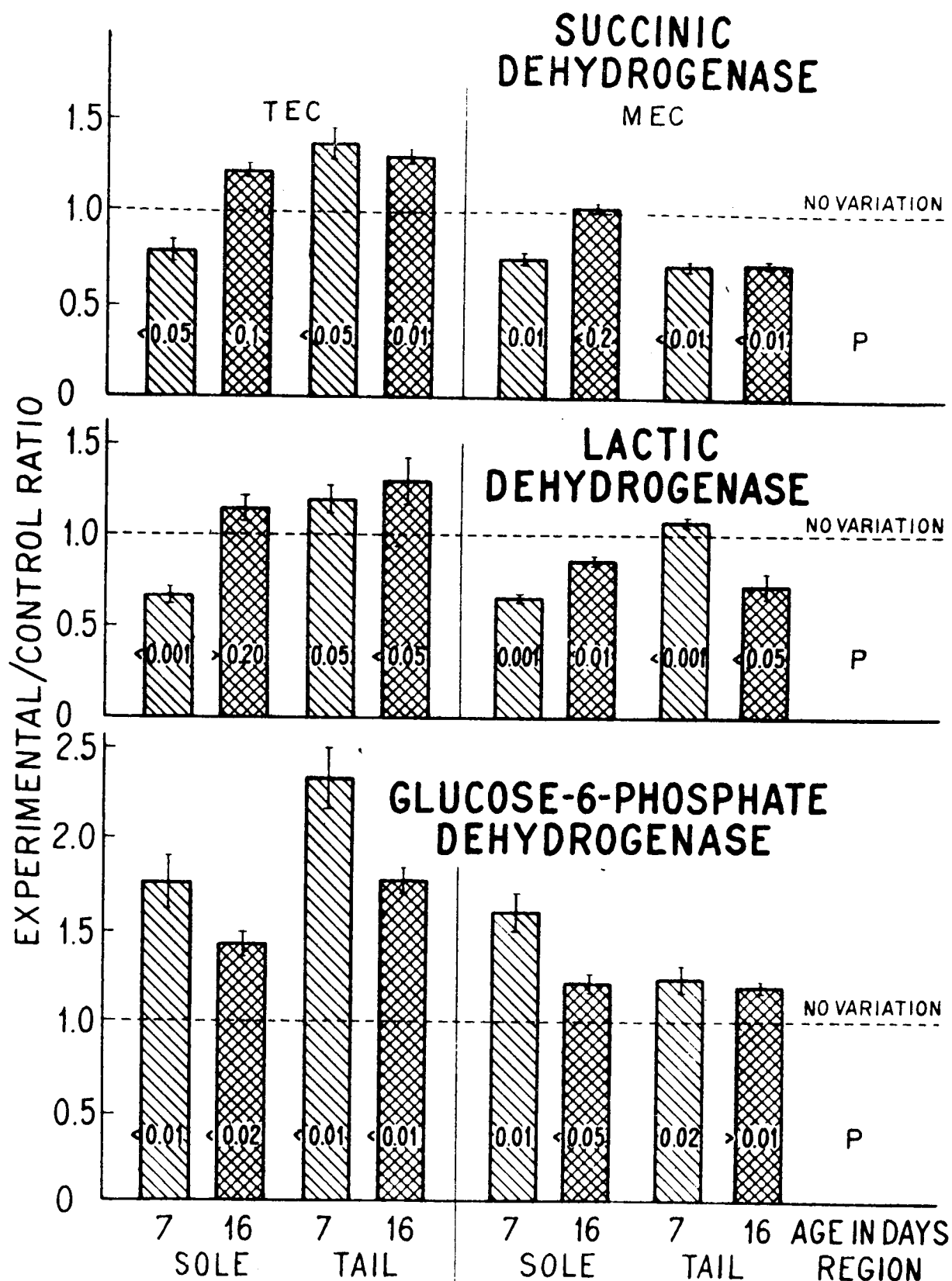


Figura 1.- Contenido enzimático total y concentración enzimática media de SDh, LDh y Gl-6-F Dh. La ordenada muestra la relación entre los valores irradiados y controles.

p: probabilidad usando el "test" de Student para datos apareados.

F. 3. Cambios histoenzimáticos en la epidermis de heridas irradiadas.

I.B. Giménez, M.E. Itoiz y R.L. Cabrini.

El estudio del proceso de cicatrización de heridas experimentales ofrece la oportunidad de analizar el comportamiento de un epitelio en activa proliferación cuando es sometido a diferentes tipos de injuria.

En trabajos anteriores, nuestro laboratorio y algunos otros grupos de trabajo, analizaron la actividad metabólica del borde acantósico de las heridas de piel normal encontrando que en el epitelio disminuye la actividad enzimática del ciclo de Krebs a valores que están en relación inversa a los valores del espesor epitelial alcanzado. Estas disminuciones son coincidentes con un incremento de las actividades del "shunt" de las pentosas (1-2).

Tomando el mismo modelo utilizado para estas experiencias, hemos analizado la respuesta epitelial en heridas irradiadas, en ratas Wistar a las que se les efectuó en la zona dorsal y lumbar dos heridas de 1 x 1 cm. La herida de la zona lumbar fue irradiada con rayos X y la de la zona dorsal, adecuadamente blindada, fue tomada como control. Cada herida recibió una dosis de 6.000 rads. La irradiación fue efectuada a los pocos minutos de producir la herida. Los animales, en lotes de 5, fueron sacrificados a los 7 y 14 días post-irradiación. Fueron estudiadas la Succinato Deshidrogenasa y la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa demostradas histoenzimológicamente en cortes de criostato sin fijar, según la técnica de Nachlas et al. (3) y Hess et al. (4). Las heridas dorsal y lumbar de cada animal fueron cortadas y procesadas en un mismo bloque. Las medidas microespectrofotométricas de la reacción histoquímica de las dos enzimas citadas fueron efectuadas con un Cytoscan Zeiss, con platina automática. En cada herida fueron efectuados 6 barridos desde la basal hacia la superficial en la zona del borde acantósico, obteniendo los siguientes datos: cantidad total de enzimas (CTE) y espesor epitelial (EE). Dividiendo estos dos valores obtuvimos el contenido enzimático medio (CEM). La relación entre los valores del sector irradiado y el de control de cada espécimen fueron graficados.

A los 7 días observamos en las heridas irradiadas una caída de la actividad enzimática, tanto para la SDh como para la Gl-6-F Dh, unida a una débil respuesta proliferativa (Fig. 1-2). En cambio, a los 14 días la Gl-6-F Dh aumentó el CET, pero el CEM a pesar de que aumentó con respecto a los 7 días, no llegó a alcanzar los niveles normales (Fig. 1-2).

Los valores obtenidos indican que la irradiación produce un retardo en las variaciones metabólicas que normalmente se cumplen en el epitelio en cicatrización de heridas, dado que en las heridas irradiadas el cuadro enzimático de los 14 días fue similar al observado a los 7 días en las heridas sin irradiar. Este retardo puede haber sido causado en parte por daño en la nutrición epitelial, ya que ha sido demostrado en el mismo modelo experimental una menor cantidad inicial de vasos en las heridas irradiadas que luego va compensándose a medida que transcurre el proceso de cicatrización (5).

Estos datos nos han inducido a estudiar el comportamiento epitelial durante tiempos más prolongados de cicatrización, a fin de observar si la dosis utilizada modifica solamente el ritmo de los procesos o bien si éstos sufren modificaciones tardías que impiden la completa reparación.

- 1.- Im, M.J.C. y Hoopes, J.E., J. Surg. Res., 10:173, 1970.
- 2.- Itoiz, M.E., Giménez, I.B, y Cabrini, R.L., Arch. Der. Fersch., 249: 227, 1974.
- 3.- Nachlas, M.M., Tsou, K.C., Souza, E., De Chang, C.S. y Seligman, A.M., J. Histochem. Cytochem., 5:420, 1957.
- 4.- Hess, R., Scarpelli, D.G. y Pearse, A.G.E., J. biophys. biochem. Cytol. & Obstet., 4:753, 1958.
- 5.- Dotto, C.A., Mayo, J., Cabrini, R.L., Itoiz, M.E. y Carranza, F.A., Surg. Gynecol. & Obstet., 130:875, 1970.

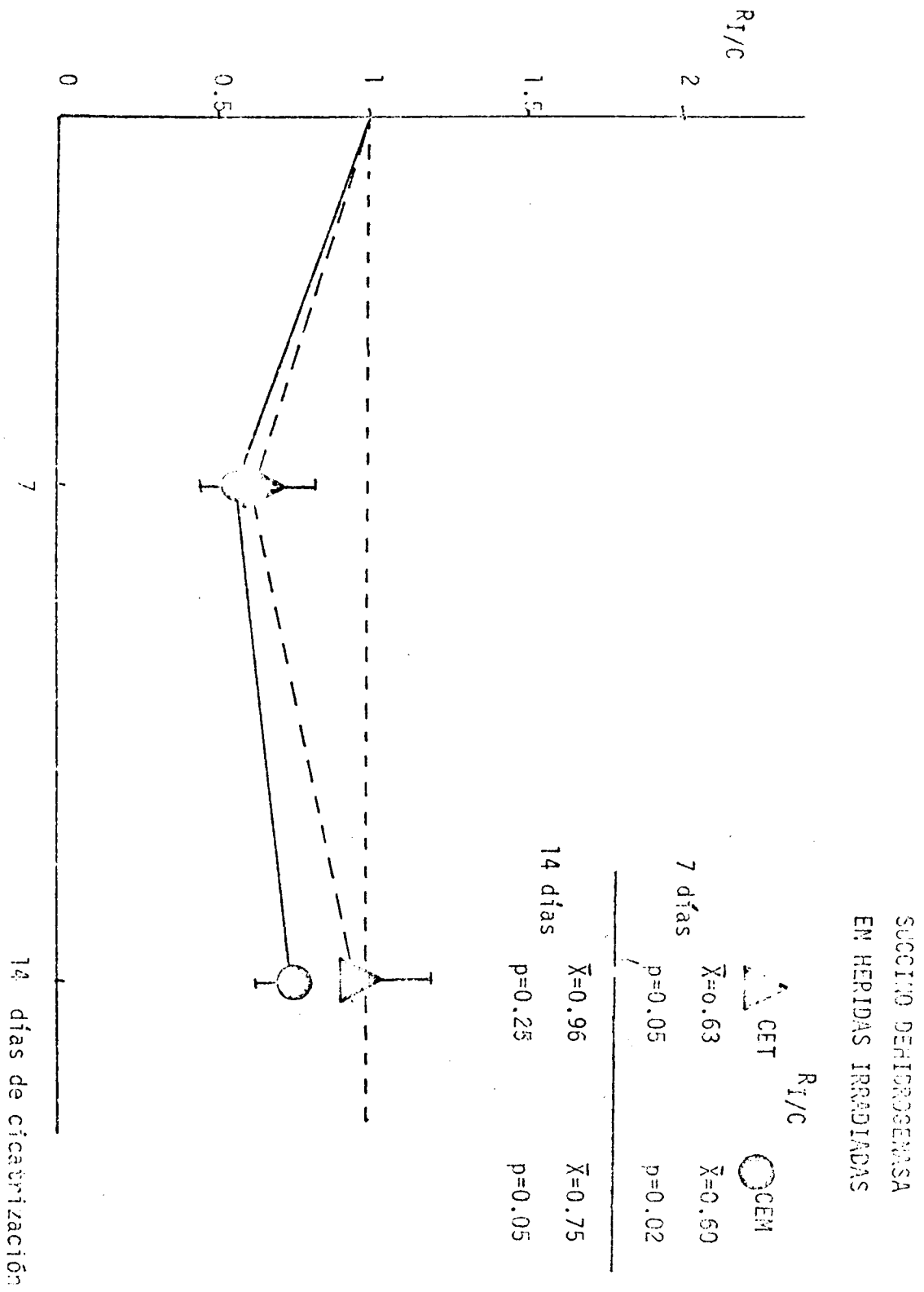


Figura 1

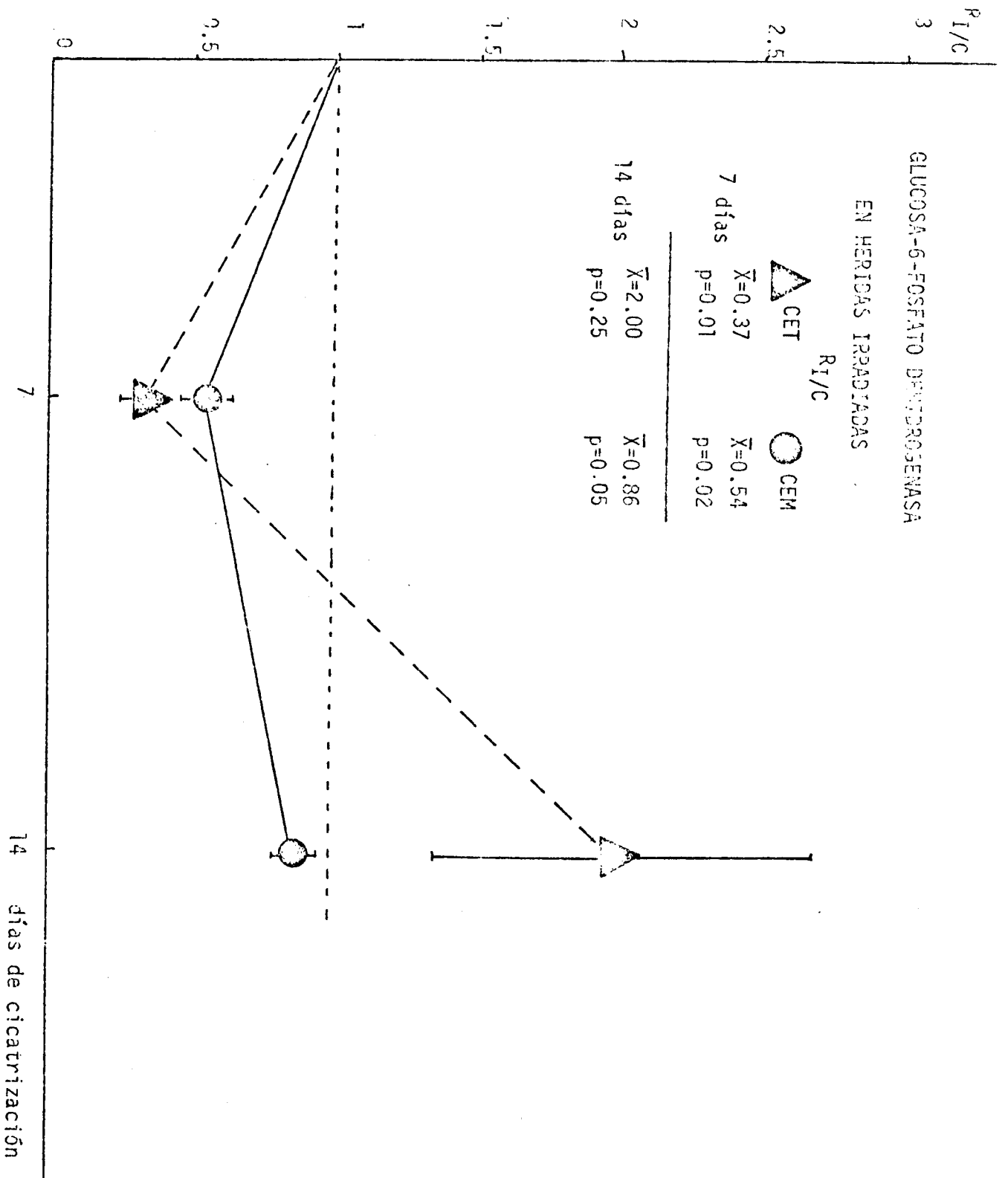


Figura 2

F. 4. Localización ultraestructural de la fosfatasa ácida en epidermis normal e irradiada.

B.M. de Rey, M.E. Itoiz, A.C.C. Frasch y R.L. Cabrini.

Clásicamente, la fosfatasa ácida, así como otras enzimas hidrolíticas han sido localizadas en la epidermis y descritas como enzimas lisosomales (1, 2). Sin embargo su localización está aún en discusión. Itoiz et al. (3) han descrito que la fosfatasa ácida en la epidermis irradiada muestra un marcado incremento en la capa granulosa. Este modelo ya analizado con microscopía óptica fue utilizado para el estudio a nivel ultraestructural de epidermis normal e irradiada.

En la epidermis normal la mayor concentración de actividad eszimática fue hallada a nivel de la capa granulosa; la zona espinosa más profunda no presentaba reacción, pero en la zona superficial de esta capa fue observado un fino precipitado intracitoplasmático.

En la capa granulosa el producto de la reacción fue encontrado en grandes cantidades en el citoplasma. En la zona de transición hacia el sector queratinizado fue observado un frente de reacción extracelular que en algunas zonas mostraba una estriación similar a la de los queratinosomas. Una reacción importante fue hallada en los espacios extracelulares de la capa córnea así como también zonas reactivas intracelulares que fueron interpretadas como invaginaciones de la membrana de las células córneas (4).

Si bien la reacción enzimática fue similar en epidermis normal e irradiada, hubo un marcado incremento en esta última. Los precipitados de la capa granulosa eran mucho más abundantes que en los controles. Lo mismo fue observado en las capas granulosa y córnea. No fueron encontrados lisosomas en la capa basal del epitelio irradiado. Por otro lado, fueron observadas claramente las vacuolas lipídicas perinucleares radioinducidas, ya descritas previamente (4).

Aunque es posible observar algunos lisosomas en las capas espinosa y granulosa del epitelio, su escaso número no justifica la marcada actividad de la fosfatasa ácida encontrada en estas capas. Los lisosomas participan en la destrucción de las membranas intracelulares a medida que se avanza en la diferenciación celular hacia la célula queratinizada. Aunque este proceso comienza en los estratos inferiores, es más evidente hacia las capas más superficiales de la piel, lo que coincide con la zona de gran incremento en la actividad de fosfatasas ácidas. Presumiblemente esta enzima participa en los mecanismos de digestión intracelular (5). Los numerosos queratinosomas encontrados en las capas subcórneas han sido considerados como un tipo especial de lisosoma y relacionados con el proceso de queratinización. Numerosas estructuras estriadas reaccionantes han sido encontradas en nuestro material.

La actividad de fosfatasa ácida ha sido relacionada también con actividad fagocítica.

En nuestro modelo experimental la irradiación origina un aumento en la queratinización, ligado a un incremento en la actividad enzimática. Incrementos similares han sido descritos en células que aumentan su catabolismo o sufren una regresión. Se puede inferir que bajo estas condiciones experimentales la respuesta epitelial a la radiación es una hiperqueratosis coincidente con una aceleración de los mecanismos de destrucción celular.

- 1.- Ellis, R.A. In "The epidermis", ed. Montagna, W. & Lobitz, W.C., pp. 135-144, New York. Academic Press, 1964.
- 2.- Wolff, K. y Schreiner, E., Archives of Dermatology, 101:276, 1970.
- 3.- Itoiz, M.E., Frasc, A.C., Volco, H.E. y Klein-Szanto, A.J.P., Strahlen-therapie, 147:643, 1974.
- 4.- de Rey, B.M. y Cabrini, R.L., J. Submicroscopic Cytol., 5:157, 1973_a.

F. 5. Alteraciones cuantitativas de proteínas y ácidos nucleicos en la acantosis reaccional de la epidermis irradiada.

C.J. Conti, I.B. Giménez y R.L. Cabrini.

El incremento en el espesor epitelial ha sido descripto como uno de los fenómenos más sobresalientes en la piel sometida a irradiación aguda. Este incremento que depende de la dosis y el tiempo post-irradiación, ha sido atribuido al edema y degeneración hidrópica del tejido epidérmico.

El propósito del presente trabajo fue determinar modificaciones cuantitativas de proteínas y ácidos nucleicos, con el fin de evaluar la posibilidad de obtener patrones de referencia en el estudio cuantitativo de enzimas para diferenciar modificaciones reales de aquellas producidas por dilución durante la de generación hidrópica.

Areas de dos centímetros del tercio medio de la cola de ratas de 4 a 5 días fueron expuestas localmente a irradiación X de 250 kV.

Para la determinación de proteínas y ácidos nucleicos fueron utilizadas las técnicas de Amarillo Naftol S y Gallocianina cromo-Alumbre, respectivamente. Para la determinación de ADN fue empleada la técnica de Feulgen usando un tiempo de hidrolisis predeterminado de 35 minutos a 28° en ClH 5N. Las determinaciones fueron llevadas a cabo mediante un microespectrofotómetro Cytoscan Zeiss, barriendo los epitelios desde la capa basal hasta la superficie en cada sección. A fin de evitar variaciones, ya sea en el espesor de los cortes o en las reacciones histoquímicas, el área irradiada y el área de control de cada caso fueron medidos en el mismo corte, siendo utilizado el cociente entre los dos valores.

La cantidad de proteínas y ácidos nucleicos totales en las epidermis irradiadas con 8 Krads se incrementó concomitantemente con la acantosis reaccional. Sin embargo la concentración de esas sustancias decreció desde el tercer día post-irradiación (Figs. 1-2); la epidermis irradiada con 4 Krads tuvo un comportamiento similar.

En la epidermis irradiada con 8 Krads la concentración de ADN decreció a partir del 2° día, llegando a un mínimo el día 4° y permaneciendo en ese valor hasta el día 6° (Fig. 3). La disminución en la concentración de ADN fue menos evidente para la epidermis irradiada con 4 Krads. En lo referente a la cantidad total de ADN, el comportamiento fue diferente para 4 y 8 Krads (Fig. 4).

Las correlaciones y significaciones estadísticas para los distintos parámetros de este estudio son dadas en la Tabla siguiente.

Proteínas			Acidos nucleicos			ADN		
Concentra- ción	Conte- nido total	Espe- sor	Concentra- ción	Conte- nido total	Espe- sor	Concentra- ción	Conte- nido total	Espe- sor
Tiempo								
post-irrad.	r=-0,61 p 0,05	r=0,41 p 0,05	r=0,68 p 0,01	r=-0,80 p 0,01	r=0,44 p 0,05	r=0,71 p 0,01	r=-0,79 p 0,01	r=-0,63 p 0,01
Espe- sor	r=-0,57 p 0,05	r=0,83 p 0,01	r=-0,69 p 0,01	r=0,85 p 0,01	r=-0,73 p 0,01	r=-0,31 p 0,05		

Estudios histológicos, histométricos y ultraestructurales (1-3) de la piel irradiada han mostrado que la acantosis reaccional es debida a un incremento en el volumen celular, probablemente originado en una imbibición acuosa. Esta, a su vez, se debería a un incremento en la permeabilidad vascular, ya que proteínas plasmáticas fueron detectadas en la epidermis (4). Sin embargo, estudios realizados en piel irradiada con 28.000 rep no han mostrado un considerable incremento de agua (5); incluso para dosis de 3.000 rads fue observada una disminución de la misma. También para las mismas dosis ha sido publicada una disminución de hasta un 45% en las concentraciones de DNA y RNA, mientras que en nitrógeno proteico total no evidenció cambios importantes (6).

Nuestros datos han ilustrado el problema desde un punto de vista histológico. La cuantificación de las reacciones ha sido realizada mediante un sistema de barrido unidireccional, sistema este que ha sido empleado exitosamente en nuestro laboratorio para la cuantificación de la actividad enzimática.

Para dosis de 4 y 8 rads fue obtenida una disminución en la concentración de proteínas y ácidos nucleicos, lo que fue estimado como una lógica consecuencia de la imbibición acuosa. Sin embargo la cantidad total de estas sustancias manifiesta un incremento considerable. Considerando que el incremento del espesor epitelial es producido por un incremento del volumen celular, sin alteraciones significativas en el número de células (1, 3), una interpretación tentativa de nuestros resultados apunta hacia una gigantización de la célula epidérmica, causada no sólo por una imbibición acuosa sino por un real incremento del protoplasma celular.

La respuesta del ADN fue diferente en las dos dosis empleadas: el ADN total incrementó en la epidermis irradiada con 4 Krads, pero disminuyó con 8 Krads. Este fenómeno requeriría una elaborada interpretación, ya que el contenido en ADN en un dado volumen celular está determinado por el número y actividad de los núcleos, por los núcleos en proceso de degeneración, etc.

La técnica utilizada en este trabajo para el estudio de proteínas y ácidos nucleicos es, en nuestra opinión, un adecuado instrumento para evaluar respuestas celulares citoplasmáticas.

- 1.- Jadassohn, W.E., Bujard, R., Paillard, R., Wenger, P. y Gaudins, P., Acta Radiol. (Stockh), 34:469, 1950.
- 2.- Rey, B.M. de y Klein-Szanto, A.J.P., Strahlentherapie, 143:699, 1972.
- 3.- Rey, B.M. de y Cabrini, R.L., J. Investig. Derm., 60:137, 1973.
- 4.- Song, Ch.W., Anderson, R.S. y Tabachnick, J., Radiat. Res., 27:604, 1966.
- 5.- Lushbaugh, C.C. y Hale, D.B., Cancer, 6:683, 1953.
- 6.- Tabachnick, J. y Weiss, Ch., Radiat. Res., 11:634, 1959.

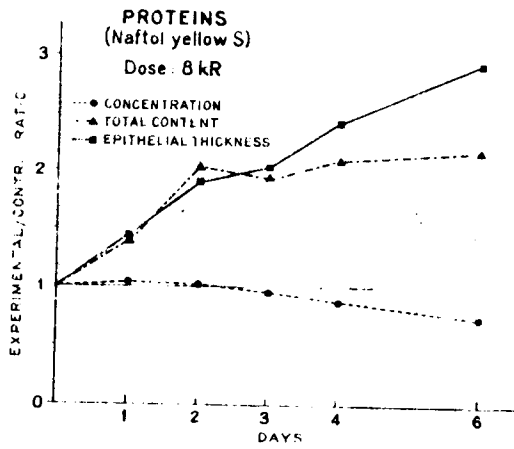


Figura 1. Determinación microespectrométrica de proteínas en epidermis irradiada. Cada punto representa el promedio de cuatro casos.

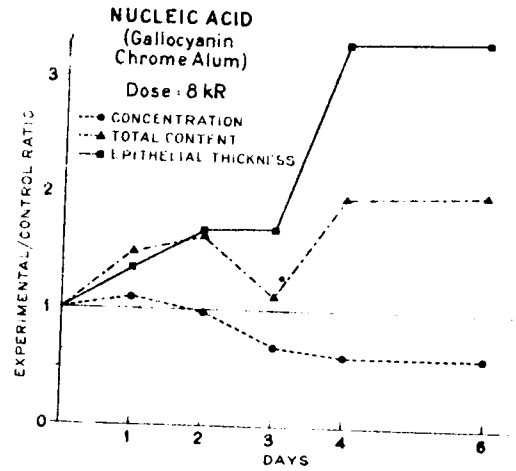
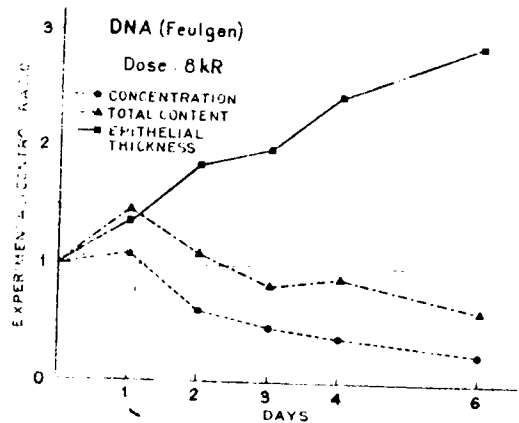
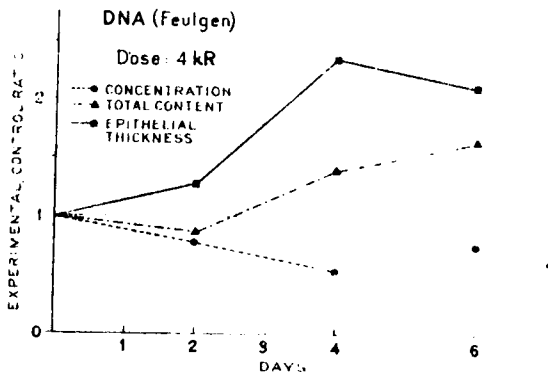


Figura 2. Determinación microespectrométrica de ácidos nucleicos en epidermis irradiada. Cada punto representa el promedio de cuatro casos.



Figuras 3 y 4. Determinación microespectrofotométrica de DNA en epidermis irradiada. Cada punto representa el promedio de cuatro casos.

F. 6. Respuesta del DNA de la epidermis irradiada a distintas dosis de rayos X.

C.J. Conti, I.B. Giménez y R.L. Cabrini.

Uno de los principales efectos de las radiaciones ionizantes sobre los tejidos en proliferación es la disminución o pérdida de la capacidad reproductiva (1). Este efecto, que fue originalmente atribuido a la inhibición de la síntesis de DNA, parece ser producido por una serie de factores, siendo probablemente el bloqueo mitótico el más importante (1).

La microespectrofotometría del DNA en núcleos individuales, a pesar de ser un método adecuado para estudiar estos fenómenos, no ha sido empleado tan frecuentemente para este fin, siendo además, la mayoría de los trabajos publicados, estudios en tejidos neoplásicos irradiados (2,3).

En un trabajo previo habíamos encontrado que el contenido de DNA en la epidermia irradiada varía de acuerdo con la dosis empleada (4). El propósito del presente, fue determinar los patrones de DNA en núcleos individuales de epidermis irradiada, con el fin de ampliar la información sobre metabolismo del DNA en células no neoplásicas irradiadas.

Con tal propósito fue usado el tercio medio de la cola de ratas de 4-5 días, irradiadas con rayos X de 230 kV; el tercio proximal debidamente protegido sirvió como control. Después de dos horas de fijación en Carnoy, el material irradiado con su respectivo control fueron procesados juntos, siguiendo las técnicas comunes de inclusión en parafina. Para la determinación del contenido de DNA fue utilizada la reacción de Feulgen, empleando un tiempo de hidrólisis predeterminado de 35 minutos a 20° C en ClH 5N. Las determinaciones microespectrofotométricas fueron llevadas a cabo con un microespectrofotómetro Cytoscan Zeiss. Los datos obtenidos expresados en unidades arbitrarias fueron graficados en histogramas de frecuencia.

La epidermis irradiada con 2 Krads mostró un incremento del contenido en DNA de alguna de sus células. Este efecto pudo ser visto claramente en el 4° día, pero en el 7° día post-irradiación la distribución del ADN pareció retornar a los valores normales (Fig. 1).

La alteración de los patrones de DNA en los especímenes irradiados con 4 Krads fueron más espectaculares; en este caso un segundo valor modal (aproximadamente 4n) fue encontrado a partir del 4° día; en el 9° día el pico diploide fue menor que el nuevo valor modal (Fig. 2).

Hasta el 3° día los patrones para 8 Krads recuerdan a los de 4 Rads, pero posteriormente un importante número de células incrementó su cantidad de ADN desplazando el histograma hacia la derecha y desdibujando los picos modales (Fig. 3).

Varios autores han encontrado diferencias en el comportamiento del DNA nuclear en tejidos de mamíferos. Caspersson en 1958 estudiando el tumor de Ehrlich irradiado con rayos X, encontró un considerable incremento de células que poseían 4c valores de DNA (2). Esos resultados pudieron ser considerados consistentes con la hipótesis del bloque premitótico. Sin embargo, después de los trabajos de Caspersson, otros estudios arrojaron resultados diferentes. En tumores uterinos y en líneas de cultivo de tejidos, la mayoría de las células irradiadas mostraron valores de DNA mayores que el rango 2c, con un importante número de células, que excedía valores de 4c y aun de 8c (probablemente células gigantes) (3-5). Por otra parte, un incremento del número de células en el rango diploide-tetraploide fue la principal alteración encontrada en cultivos primarios y células de la médula ósea (6).

En el presente trabajo hemos podido reproducir en un tejido normal los

diferentes patrones de DNA descriptos en la bibliografía, modificando la dosis de irradiación.

Los efectos de las radiaciones sobre la reproducción celular son bien conocidos: retardo del movimiento de las células a través del ciclo celular (especialmente fase S), inhibición mitótica, formación de células gigantes, etc.) (1). Siendo relativamente fácil correlacionar estos efectos con las curvas de distribución del DNA para las distintas condiciones de irradiación, una interpretación tentativa de nuestros resultados sugiere que diferentes niveles de radiosensibilidad para esos parámetros causaría patrones de DNA característicos para las diferentes dosis estudiadas.

- 1.- Trowull, O.A., En "Cells and tissues in culture". Ed. E.N. Willmer, vol. 2, cap. 2. Academic Press, 1966.
- 2.- Caspersson, T., Klein, E. y Ringerts, N.R., Cancer Res., 18:857, 1958.
- 3.- Richards, B.M. y Atkin, N.B., Brit. J. Cancer, 13:788, 1959.
- 4.- Conti, C.J., Giménez, I.B. y Cabrini, R.L., Strahlentherapie, 151:236, 1976.
- 5.- Nias, A.H.W. y Paul, J., Int. J. Rad. Biol., 3:431, 1961.
- 6.- Uyeki, E.M., Leuchtenberger, C. y Salerno, P.R., Exp. Cell Res., 17:405, 1959.

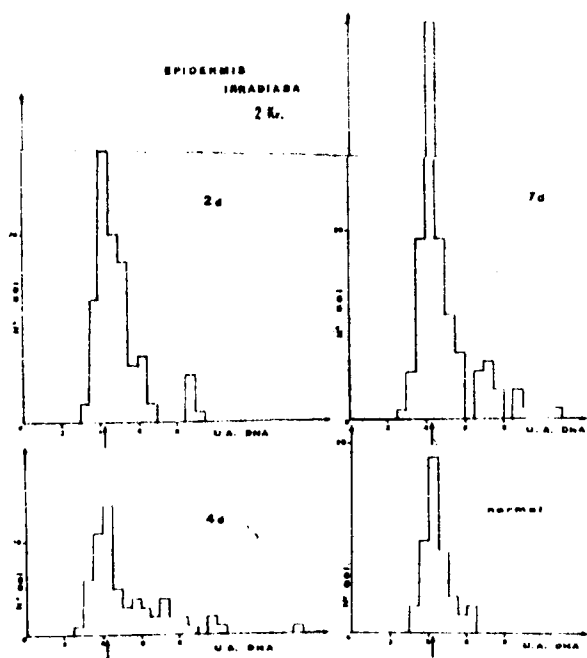


Figura 1. Histogramas de Feulgen.
DNA de epidermis irradiada con
2 Kr.

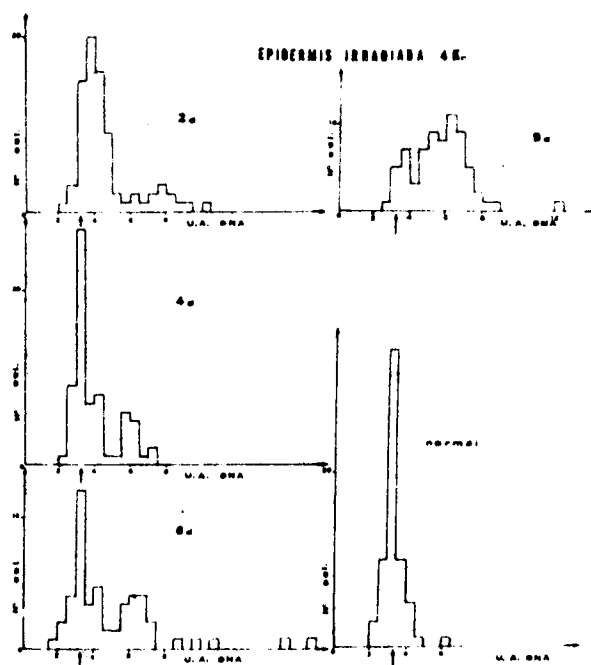


Figura 2. Histogramas de Feulgen.
DNA de epidermis irradiada con
4 Kr.

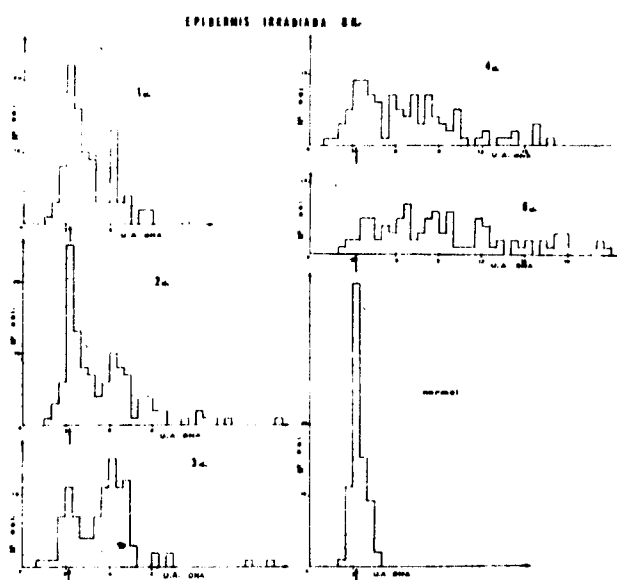


Figura 3. Histogramas de Feulgen.
DNA de epidermis irradiada con
8 Kr.

diferentes patrones de DNA descriptos en la bibliografía, modificando la dosis de irradiación.

Los efectos de las radiaciones sobre la reproducción celular son bien conocidos: retardo del movimiento de las células a través del ciclo celular (especialmente fase S), inhibición mitótica, formación de células gigantes, etc.) (1). Siendo relativamente fácil correlacionar estos efectos con las curvas de distribución del DNA para las distintas condiciones de irradiación, una interpretación tentativa de nuestros resultados sugiere que diferentes niveles de radiosensibilidad para esos parámetros causaría patrones de DNA característicos para las diferentes dosis estudiadas.

- 1.- Trowall, O.A., En "Cells and tissues in culture". Ed. E.N. Willmer, vol. 2, cap. 2. Academic Press, 1966.
- 2.- Caspersson, T., Klein, E. y Ringerts, N.R., Cancer Res., 18:857, 1958.
- 3.- Richards, B.M. y Atkin, N.B., Brit. J. Cancer, 13:788, 1959.
- 4.- Conti, C.J., Giménez, I.B. y Cabrini, R.L., Strahlentherapie, 151:236, 1976.
- 5.- Nias, A.H.W. y Paul, J., Int. J. Rad. Biol., 3:431, 1961.
- 6.- Uyeki, E.M., Leuchtenberger, C. y Salerno, P.R., Exp. Cell Res., 17:405, 1959.

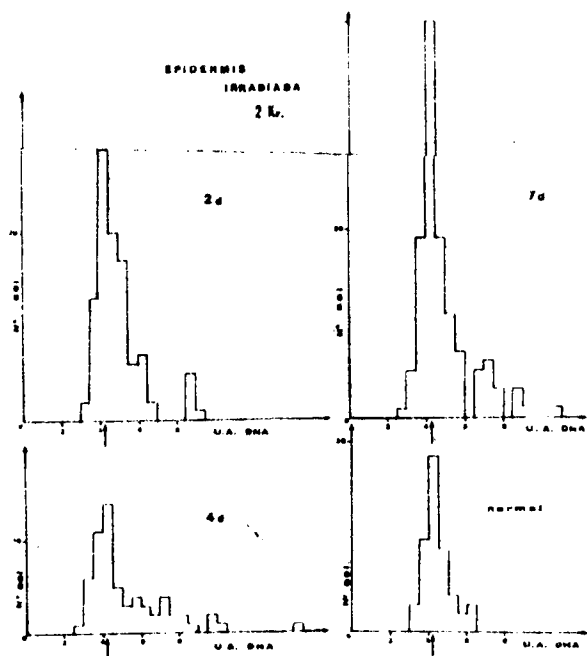


Figura 1. Histogramas de Feulgen.
DNA de epidermis irradiada con
2 Kr.

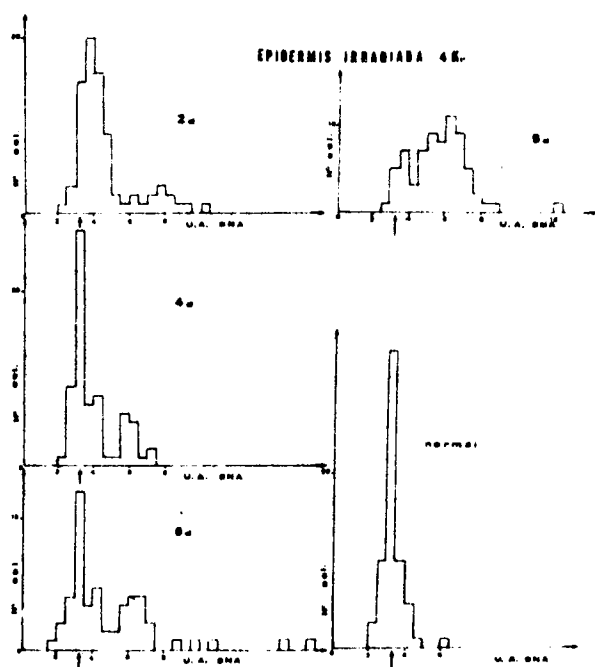


Figura 2. Histogramas de Feulgen.
DNA de epidermis irradiada con
4 Kr.

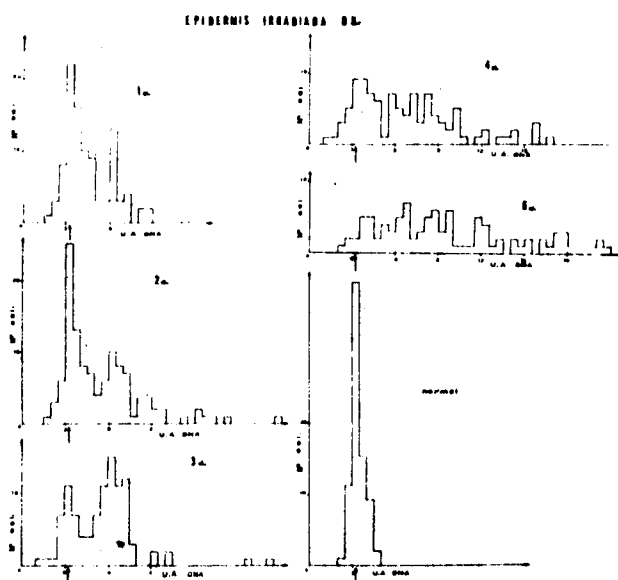


Figura 3. Histogramas de Feulgen.
DNA de epidermis irradiada con
8 Kr.

F. 7. Estudio morfométrico de los cambios volumétricos en los queratinocitos irradiados.

A.J.P. Klein-Szanto, B.M. de Rey y R.L. Cabrini.

Con el fin de aclarar el mecanismo acantogénico de las radiaciones ionizantes y al mismo tiempo proveer datos basales cuantitativos que permitan el posterior análisis morfométrico a nivel ultraestructural, fue realizado un estudio morfométrico a nivel de microscopía óptica que nos permitió obtener la densidad numérica (N_v) de los queratinocitos (número de células por unidad de volumen) por mm^3 de estrato epidérmico. Además de este parámetro, fue determinado el volumen relativo que ocupan los estratos en la epidermis (V_v) y luego, realizando un simple cálculo se pudo obtener el volumen individual absoluto de las células epidérmicas. Esto fue realizado utilizando técnicas de esteología citológica (1) que ya fueron ampliamente utilizadas en la evaluación cuantitativa de una serie de epitelios malpighianos (2).

La irradiación con 16 Krads de rayos X de 230 Kv fue realizada en las colas de ratas Wistar de 4 días de edad, estudiando la epidermis a las 24, 48, 72 y 96 horas post-irradiación. El conteo estereológico fue llevado a cabo en cortes de Epon de 2 micrones de espesor, previamente coloreados con PAS y azul de toluidina. El N_v de los estratos basal y espinoso disminuyeron durante el período estudiado (Tabla 1), lo que correspondió con un gradual aumento en el volumen absoluto de las células (Figura 1). En el estrato basal las células llegaron a un volumen máximo de aproximadamente 3 veces el valor control a las 96 horas después de la irradiación. Las células espinosas mostraron modificaciones volumétricas del mismo orden de magnitud en función del tiempo post-irradiación transcurrido.

Un análisis de variancia en el que fueron comparados los animales controles y los experimentales, demostró que la radiación modifica significativamente el volumen celular. Otro análisis de este mismo tipo, en donde fueron contrastados los grupos de animales irradiados solamente, reveló que el volumen celular varía significativamente en función del tiempo post-irradiación. El V_v del estrato basal disminuyó en un 20% durante los primeros 4 días después de la irradiación, mientras que el V_v del estrato espinoso aumentó alrededor de un 40% (Tabla 2).

Los cambios volumétricos encontrados en las células epidérmicas habían sido anteriormente descriptos como ocasionados por una imbibición acuosa a nivel celular (3). Estudios recientes en los cuales fueron determinadas cuantitativamente ciertas enzimas, proteínas, ácidos nucleicos y grupos sulfidrilos (4), como asimismo estudios estereológicos a nivel ultraestructural (5), demostraron que las células irradiadas, a pesar de haber sufrido un daño letal o sub-letal, son capaces de sintetizar nuevos componentes que pasan a incrementar el volumen absoluto de los elementos celulares y contribuyen juntamente con la imbibición acuosa a la producción de una célula hipertrófica que en ciertas condiciones de irradiación es capaz de intervenir exitosamente en un proceso de reparación.

- 1.- Weibel, E.R. y Bolender, R.P., "Stereological techniques for electron microscopic morphometry." In "Principles and techniques of electron microscopy." Vol. 3. Ed. Hayat, M.E., pp. 237-296. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1973.
- 2.- Klein-Szanto, A.J.P., Banoczy, J. y Schroeder, H.E., Pathologia Europea, 11:189, 1976.
- 3.- Rey, B.M. de y Klein-Szanto, A.J.P., Strahlentherapie, 143:699, 1972.
- 4.- Klein-Szanto, A.J.P. y Cabrini, R.L., Int. J. Radiat. Biol., 18:235, 1970.
- 5.- Rey, B.M. de, Klein-Szanto, A.J.P., Cabrini, R.L., El presente Informe Bianual, F.8.

TABLA 1

Número de células epidérmicas por 1 mm³ de volumen epidérmico (N_v)

	Estrato basal		Estrato espinoso	
Control	2.549 x 10 ³	± 1.172 x 10 ³	560 x 10 ³	± 187 x 10 ³
1 día post-irrad.	1.586 x 10 ³	± 656 x 10 ³	428 x 10 ³	± 57 x 10 ³
2 días post-irrad.	503 x 10 ³	± 161 x 10 ³	252 x 10 ³	± 40 x 10 ³
3 días post-irrad.	620 x 10 ³	± 351 x 10 ³	225 x 10 ³	± 49 x 10 ³
4 días post-irrad.	374 x 10 ³	± 195 x 10 ³	182 x 10 ³	± 30 x 10 ³

TABLA 2

Densidad de volumen de los estratos epidérmicos, expresados en mm³ de estrato epidérmico por 1 cm³ de epidermis

	Estrato basal **		Estrato espinoso **	
Control	204 ± 53	(n = 20)	581 ± 72	(n = 20)
1 día post-irrad.	165 ± 27	(n = 5)	642 ± 34	(n = 5)
2 días post-irrad.	171 ± 28	(n = 5)	751 ± 46	(n = 5)
3 días post-irrad.	158 ± 32	(n = 5)	735 ± 53	(n = 5)
4 días post-irrad.	168 ± 44	(n = 5)	746 ± 66	(n = 5)
Razón F***	4,05		23,52	
F.99 (35)	3,91		3,91	

** Media desvío estandar (n = número de animales)

*** Análisis de variancia de los grupos controles e irradiados

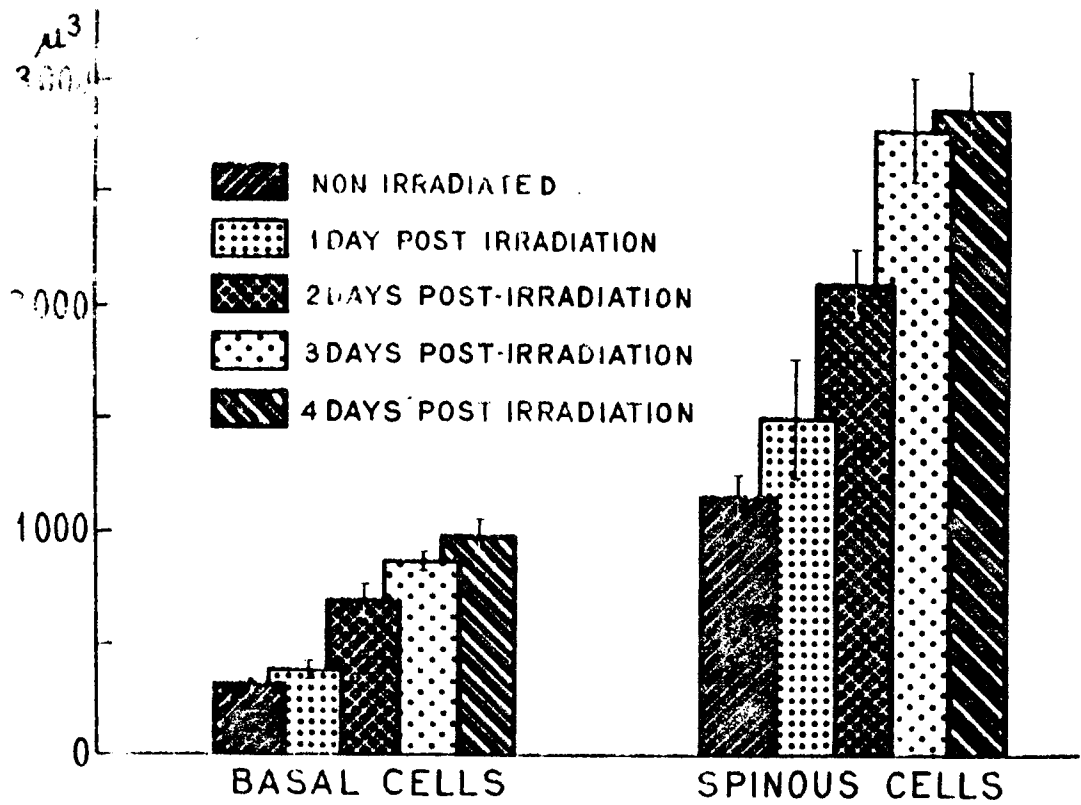


Figura 1

F . 8 Estereología de la epidermis irradiada

B.M. de Rey, A.J.P. Klein-Szanto y R.L. Cabrini.

En trabajos anteriores hemos descripto las alteraciones morfológicas ultraestructurales de epitelios malpighianos sometidos a altas dosis de radiación (1,2). Sin embargo estos estudios morfológicos - si bien son indispensables - deben ser complementados con un análisis cuantitativo que ofrezca resultados objetivos y reproducibles y que posibiliten las comparaciones estadísticas de los mismos.

El propósito de este trabajo es analizar la respuesta epitelial a la radiación por medio de métodos estereológicos que permitan delinear la secuencia de sucesos que, a nivel subcelular, caracterizan la reacción de una población celular heterogénea en distintas etapas de diferenciación.

La porción distal de la cola de ratas Wistar, de 5 días de edad, fue irradiada según la descripción hecha en un trabajo previo(1). El muestreo del material fue realizado de acuerdo con las especificaciones detalladas por Klein-Szanto et al. (3). Las medidas para evaluar los parámetros estereológicos fueron realizadas sobre una grilla coherente multipropósito de 567 puntos, que cubría $45 \mu^2$ de tejido. Los métodos usados fueron: conteo de puntos e intersecciones de líneas y de número de organelas, según las especificaciones de Weibel et al. (4). Todos los datos fueron sometidos al "test" de análisis de varianza.

Los resultados del análisis morfométrico aparecen resumidos en las figuras 1 a 7. Los parámetros están expresados por unidad de volumen de tejido epitelial y por unidad celular espinosa o basal.

Del análisis de la información así obtenida surge la posibilidad de considerar el procesos post-irradiación como una reacción a la injuria a nivel tisular y a nivel celular. En el primer caso los datos expresados por unidad de volumen epitelial nos informan sobre un proceso en el cual, luego de transcurridas 48 y 72 horas desde la irradiación, predomina un estado de dilución de los componentes tisulares, resultando así que 1 cm^3 de epitelio irradiado tiene cuatro veces menos células basales y dos veces y media menos células espinosas que los respectivos controles no irradiados (5). Además, en ese volumen hay menos mitocondrias, menos volumen nuclear, menos membranas nucleares y plasmáticas que en igual volumen de tejido no irradiado. Por el contrario, el volumen de los filamentos citoplasmáticos sufre un considerable incremento.

Cuando los datos son expresados por célula, el proceso muestra un desarrollo distinto. Si bien las células de ambos estratos han aumentado gradualmente de volumen absoluto (5), también se ha incrementado el volumen que ocupan las distintas entidades contenidas en ellas. Podemos entonces delinear las características de una célula irradiada como una célula hipertrófica cuyos núcleos son hasta seis veces más grandes, con membranas nucleares que acompañan el crecimiento nuclear y que en algunas condiciones experimentales lo superan, explicando las imágenes de invaginación nuclear post-irradiación (1, 2). Esta célula llega a duplicar el número de sus mitocondrias, cuyo volumen absoluto también aumenta significativamente y a cuadruplicar el volumen de tonofilamentos.

Las células irradiadas han sido tradicionalmente consideradas como elementos con distinto grado de alteración, sin embargo, a la luz de estos resultados podríamos más bien interpretarlas como una unidad funcional adaptada a nuevas condiciones fisiológicas y en la cual los mecanismos homeostáticos operan efectivamente para restituir un estado de equilibrio estable que, de tener éxito, resultará en la recuperación del tejido. El fracaso de los mecanismos

adaptativos llevará al sistema a un punto de no retorno que conducirá indefectiblemente a la muerte celular. La declinación obtenida en algunos parámetros entre las 48 y las 72 horas, podría indicar la entrada de la célula en una fase degenerativa que conducirá a la necrosis del tejido.

- 1.- Rey, B.M. de y Cabrini, R.L., J. Invest. Dermatol., 60:173, 1973.
- 2.- Rey, B.M. de y Cabrini, R.L., J. Submicr. Cytol., 5:157, 1973.
- 3.- Klein-Szanto, A.J.P., Banoczy, J. y Schroeder, H.R., Pathol. Europ., 11:189, 1976.
- 4.- Weibel, E.R. y Bolender, R.P., "Stereologic techniques for electron microscopic morphometry". In "Principles and techniques of electron microscopy". Vol. 3. Ed, Hayat, M.E., p. 237. Van Nostrand Reinhold Co. New York, 1973.
- 5.- Klein-Szanto, A.J.P., Rey, B.M. de y Cabrini, R.L., El presente informe Bianual, F. 7.

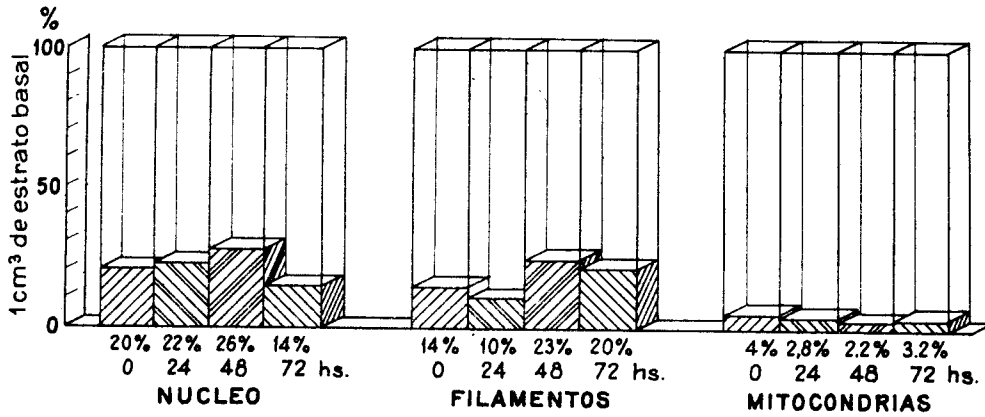


Figura 1.- Modificaciones inducidas por 16 Krads de rayos X en el volumen de material nuclear, filamentos y mitocondrias contenidos en 1 cm³ de estrato basal.

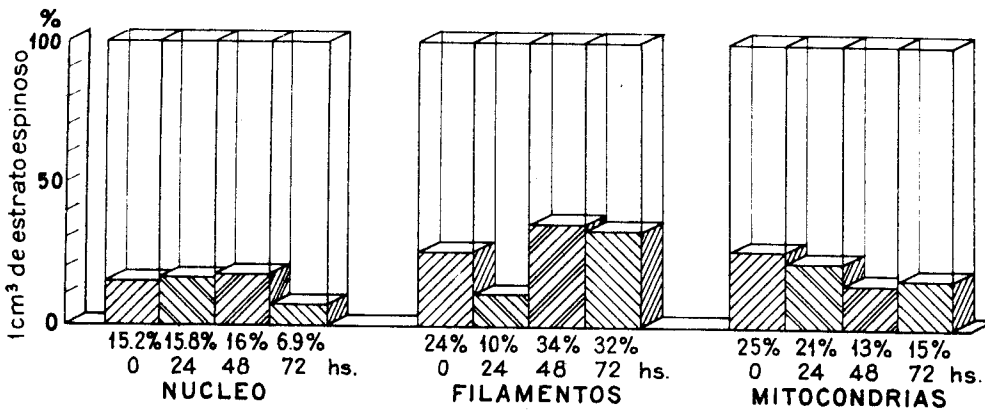


Figura 2.- Modificaciones inducidas por 16 Krads de rayos X en el volumen de material nuclear, filamentos y mitocondrias contenidos en 1 cm³ de estrato espinoso.

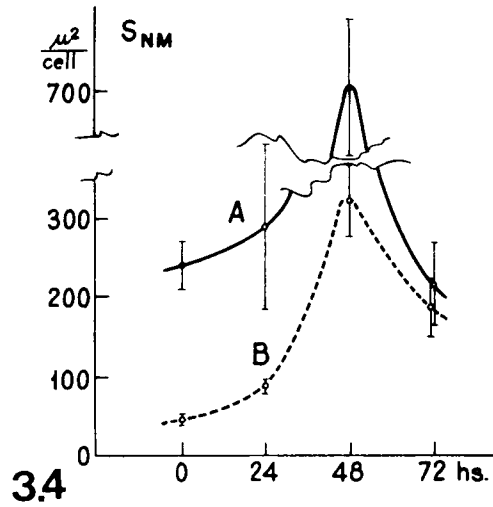
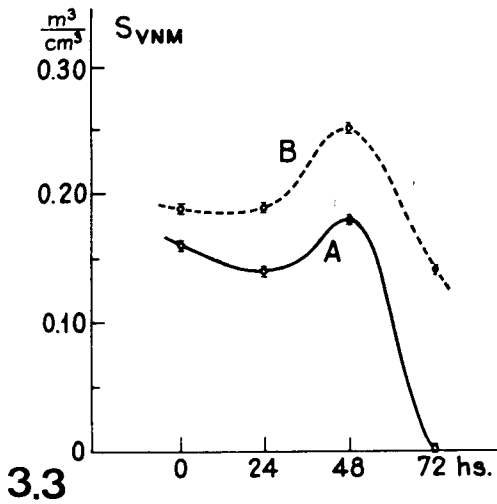
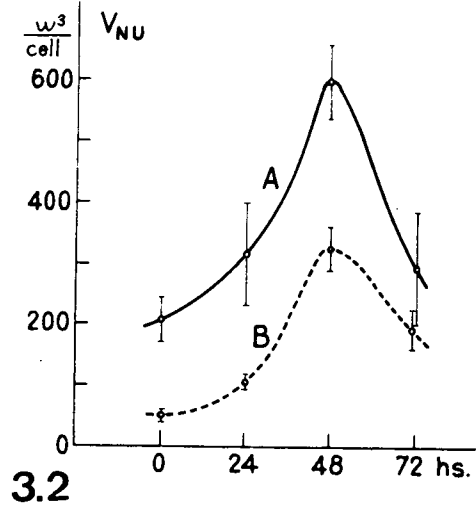
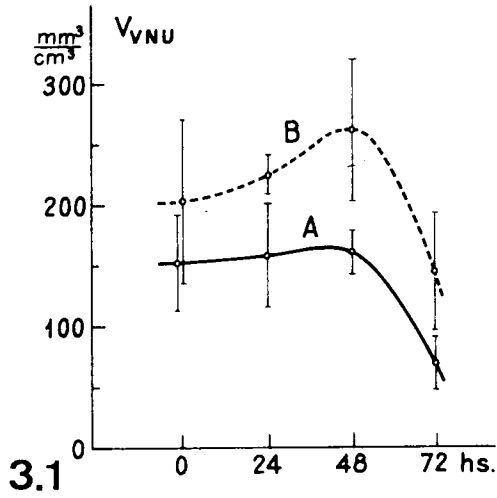


Figura 3.- Cambios inducidos en los núcleos de las células epidérmicas entre 0 y 72 horas post-irradiación con rayos X.

3.1 En la densidad de volumen de los núcleos (V_{vnu}).

3.2 En el volumen absoluto de los núcleos (V_{nu}).

3.3 En la densidad de superficie de la membrana nuclear (S_{vnu}).

3.4 En la superficie de las membranas nucleares por célula (S_{nm}).

B: estrato basal

A: estrato espinoso.

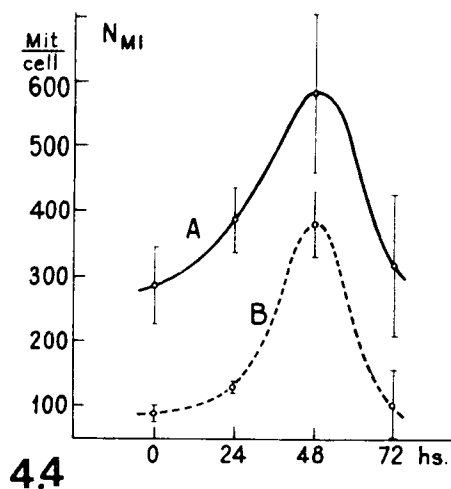
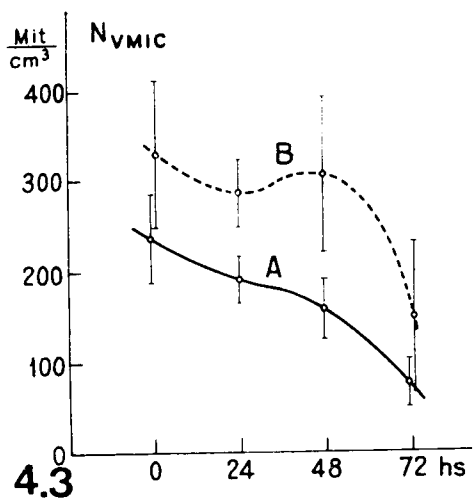
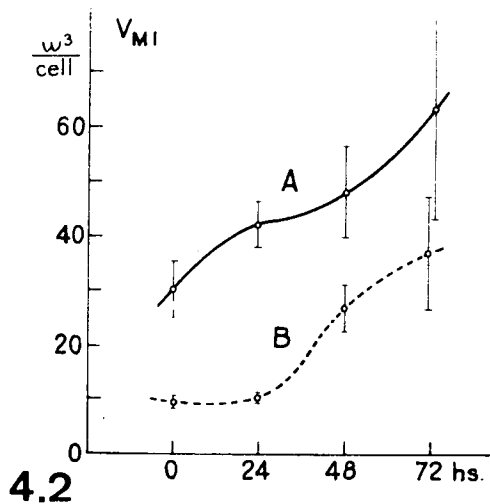
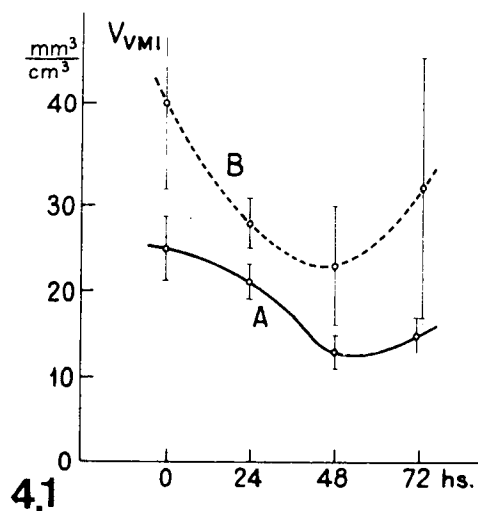


Figura 4.- Cambios en los parámetros mitocondriales inducidos por 16 Krads de rayos X.

- 4.1 En la densidad de volumen de las mitocondrias (V_{vmi}).
- 4.2 En el volumen de la fracción mitocondrial de las células (V_{mi}).
- 4.3 En el número de mitocondrias por cc de estrato (N_{vmic}).
- 4.4 En el número de mitocondrias por célula (N_{mic}).

B: estrato basal

A: estrato espinoso

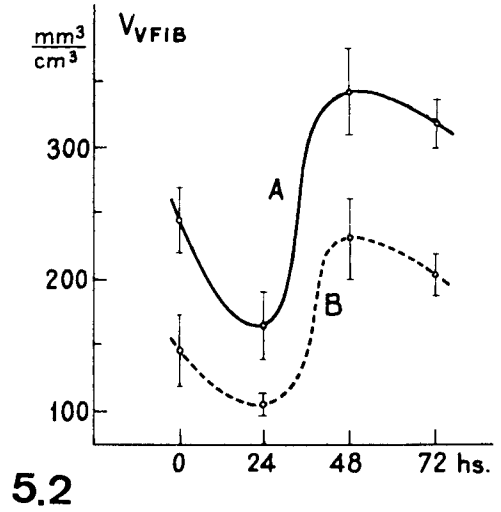
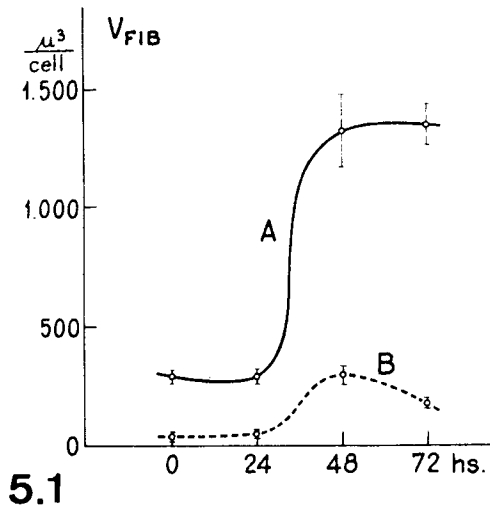


Figura 5.- Cambios en los filamentos citoplasmáticos.

5.1 En la densidad volumétrica (V_{vfib}).

5.2 En el volumen de los filamentos en cada célula (V_{fib}).

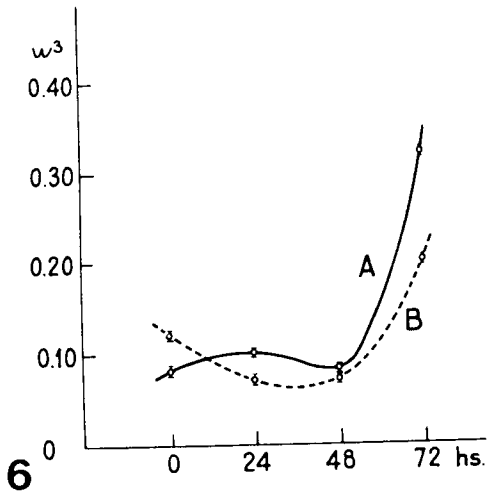
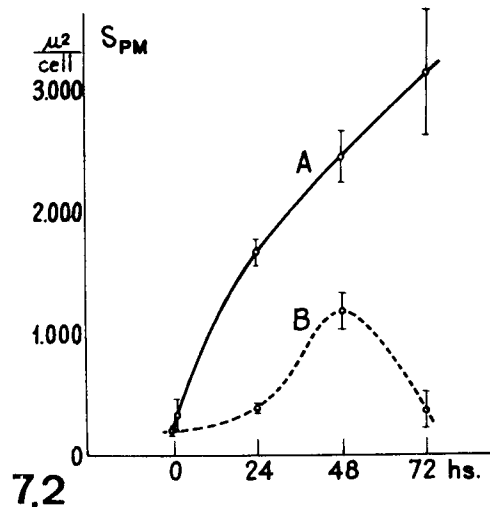
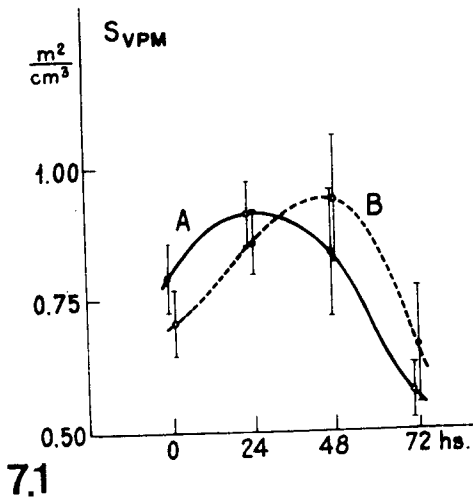


Figura 6.- Aumento de volumen absoluto de las mitocondrias de la capa basal (B) y espinosa (A) de la epidermis irradiada. Los valores a las 72 horas son estadísticamente significativos ($p < 0,01$) con respecto a los controles.

Figura 7.- Cambios en la membrana plasmática.

7.1 En la densidad de superficie (S_{vpm}).

7.2 En la superficie de las membranas plasmáticas por célula (S_{pm}).



B: estrato basal

A: estrato espinoso

F. 9. Efectos de la irradiación local (cabeza y molares) en ratas sometidas a movimientos ortodóncicos.

A.M. Ubios, A.C.C. Frascch, R. López Otero y R.L. Cabrini.

La reabsorción del hueso constituye uno de los problemas biológicos más interesantes. Un método para provocar reabsorción ósea por medios puramente mecánicos es la aplicación de una fuerza ortodóncica, la que al ser aplicada sobre un diente produce la reabsorción de la superficie ósea alveolar, especialmente en las zonas de presión.

En trabajos anteriores hemos demostrado que una vez aplicada la fuerza, comienza un rápido y progresivo incremento de las superficies óseas en reabsorción, en tanto que los osteoclastos aumentan en número luego de un intervalo de varias horas (1).

En animales sometidos a irradiación total (900 r.) hemos encontrado un progresivo aumento de la superficie de reabsorción y del número de osteoclastos, siempre siguiendo la cronología observada en animales no irradiados (2).

El objeto de este trabajo es comprobar los efectos que provoca la irradiación local sobre la reabsorción ósea, en las condiciones antes mencionadas. Para ello hemos utilizado ratas Wistar de 200 gr de peso, según las siguientes condiciones:

Irradiación de la cabeza	dosis	1.200 rads
" de un molar	"	6.000 "
" " " "	"	20.000 "
" " " "	"	40.000 "

La mitad de los animales irradiados fue sometido, 48 horas después, a la acción de una fuerza ortodóncica durante 48 horas. A otro grupo de animales no sometidos a irradiación les fue colocado el aparato ortodóncico y fueron sacrificados 48 horas después. Por último, utilizamos un grupo de animales no sometidos a condición experimental alguna.

Los resultados fueron obtenidos mediante métodos histológicos e histométricos (3).

La irradiación local en la cabeza y en los molares con 3.000 y 6.000 rads, no produjo cambios significativos al ser comparados con los animales sometidos a irradiación total. En cambio, al aumentar la dosis de radiación a 20.000 rads, fueron apreciados, tanto en el porcentaje de reabsorción como en el número de osteoclastos, incrementos similares a los obtenidos con dosis totales de 900 rads, especialmente en el caso en que los animales fueron sometidos también a la fuerza ortodóncica (Figs. 1 y 2). En animales sometidos a 40.000 rads de irradiación X en el molar y a fuerza ortodóncica, apareció un porcentaje menor de reabsorción (54,12%), en tanto que el número de osteoclastos se elevó al 30%.

Estos datos nos permitirían pensar que la irradiación no afecta los mecanismos que desencadenan los procesos de reabsorción por la aplicación de una fuerza ortodóncica.

Es evidente que las dosis empleadas en la irradiación total son mucho más efectivas que las empleadas localmente para provocar cambios semejantes. Este hecho resulta razonable ya que en la irradiación total intervienen factores generales que influirían sobre la respuesta. En cuanto a las células que intervienen en este proceso, los osteoclastos, hemos comprobado una vez más que siguen en comportamiento observado en animales no irradiados. Es decir, que sin negar una

intervención en el proceso de reabsorción, es evidente que éste no es iniciado por los osteoclastos, como lo demuestra el hecho de su retrasado incremento respecto a la reabsorción. Por otra parte, es claro que la irradiación no impide la formación de los osteoclastos, con ninguna de las dosis empleadas por nosotros, especialmente cuando provocamos su formación por la aplicación de la fuerza ortodóncica. Este hecho confirma nuestros hallazgos en el sentido de la formación de los osteoclastos. En efecto, hemos comprobado en un trabajo previo que no se forman por la división mitótica de sus núcleos, ya que no sintetizan DNA. Este hecho indica que la radiación ha actuado sobre un proceso de formación celular en el que no participa la división mitótica.

El gran incremento del número de osteoclastos en los animales sometidos a dosis de 40.000 rads en el molar y sometidos a fuerza ortodóncica, podría deberse a una mayor necesidad en el proceso de eliminación de detritus.

- 1.- López Otero, R., Parodi, R.J., Carranza (Jr.), F.A. y Cabrini, R.L., J. Period. Res., 8:327, 1973.
- 2.- Parodi, R.J., Ubios, A.M., Mayo, J. y Cabrini, R.L., J. Oral Path., 2:1, 1973.
- 3.- Ubios, M.A. y Cabrini, R.L., J. Dent. Res. Suppl. N° 5, 50:1160, 1972.

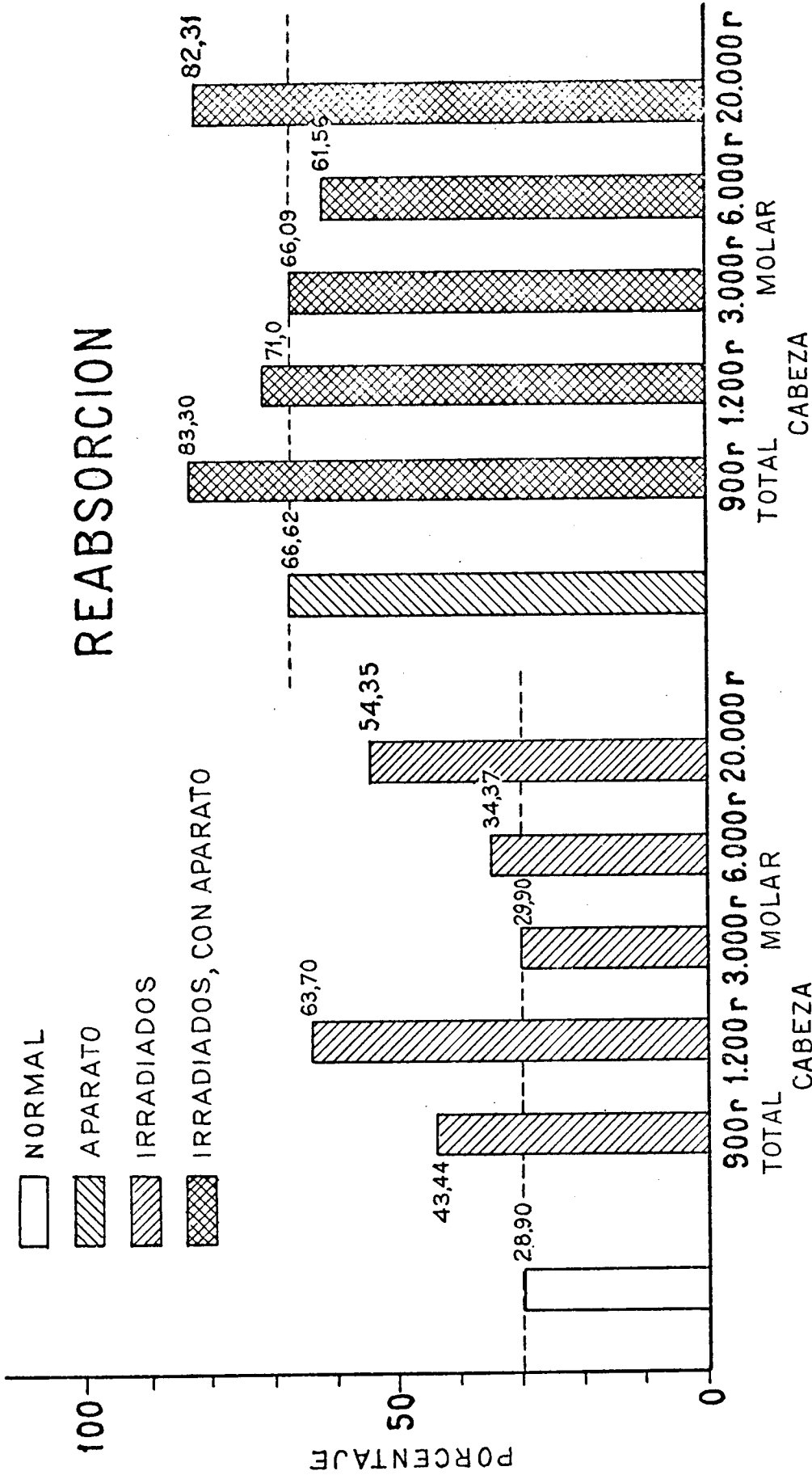


Figura 1.- El porcentaje de la superficie de resorcion está representado en ordenadas. La línea de trazo interrumpido representa el valor normal. Una de las columnas los valores obtenidos por la aplicación de la fuerza ortodónica durante 48 horas. Las otras columnas representan los valores obtenidos con o sin aparato ortodónico, bajo diferentes condiciones de irradiación. La diferencia fue significativa para la irradiación total, pero no para la irradiación local en la cabeza o en los molares (3.000 y 6.000 rads) entre los animales irradiados solamente y aquellos sometidos a irradiación y a la acción de la fuerza ortodónica. La irradiación de 20.000 rads en molares, arrojó resultados similares a los obtenidos con irradiación total.

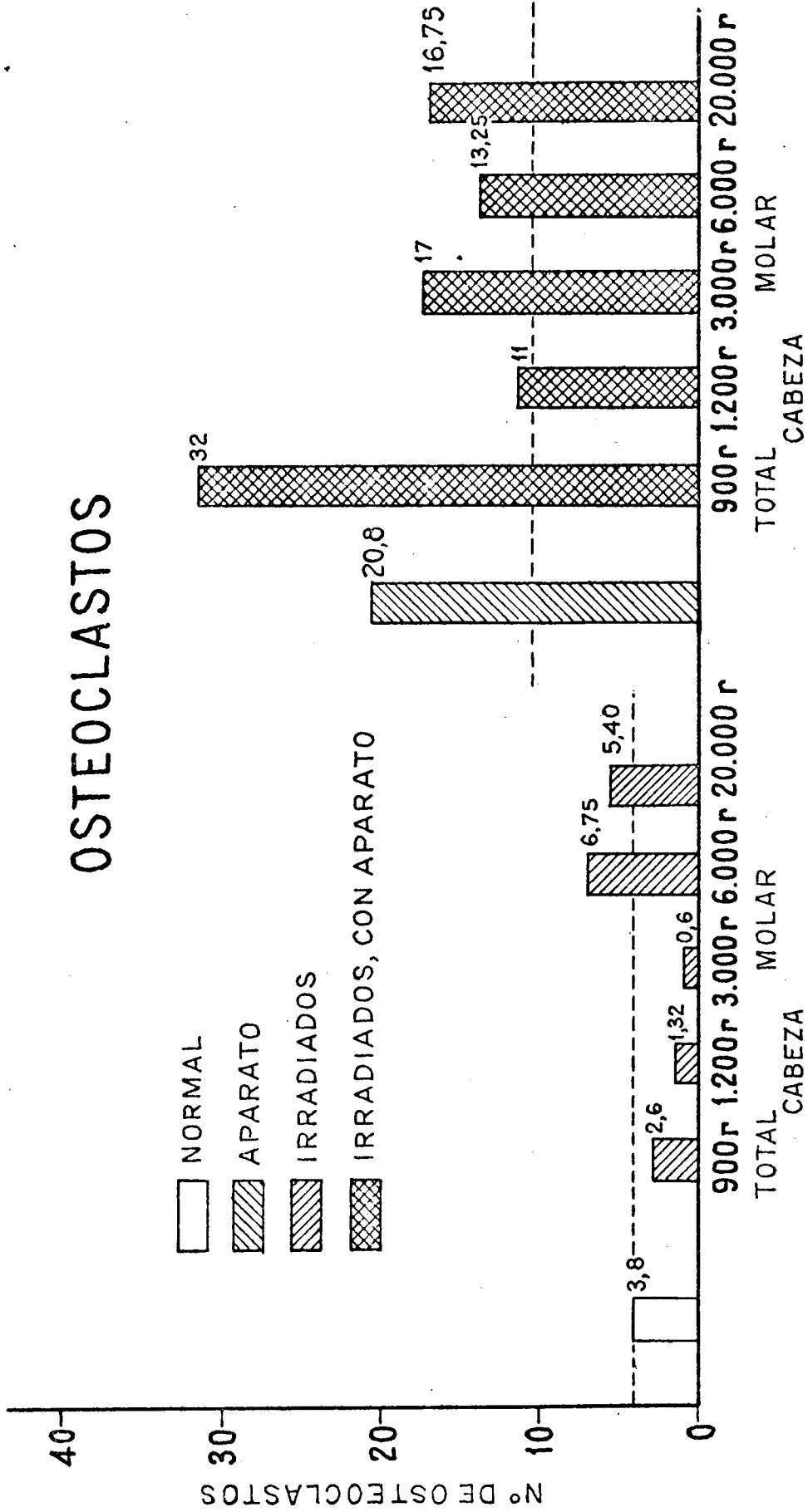


Figura 2.- El número de osteoclastos no sufrió cambios significativos en los animales sometidos a irradiación total. En los animales irradiados y sometidos a fuerza ortodóncica fue observado un notable incremento. En cambio los animales sometidos a irradiación local no mostraron cambios significativos en el número de osteoclastos.

F. 10. Análisis morfométrico comparativo de la semimucosa del labio y de la piel

H.E. Lanfranchi y B.M. de Rey.

El epitelio oral posee características particulares de acuerdo con su ubicación en la cavidad bucal.

La semimucosa, por ser un epitelio situado entre la piel y la mucosa presenta características morfológicas particulares que la diferencian de dichos epitelios.

Varios autores (1, 2, 3) han utilizado diversos métodos morfométricos para caracterizar la mucosa oral en distintas zonas, pero carecemos de datos cuantitativos sobre el epitelio de la semimucosa del labio.

La aplicación de técnicas esterológicas en diversos epitelios nos permitió el conocimiento de sus estructuras morfológicas y la descripción cuantitativa de los mismos. Es de nuestro interés la caracterización del epitelio de la semimucosa del labio por tratarse de un epitelio de transición entre la piel y la mucosa. Es por ello que hemos realizado la comparación de tres especies distintas de mamíferos, en donde las características morfológicas de dicho tejido son ostensiblemente diferentes, con el fin de relacionar los distintos estratos que conforman dichos epitelios y compararlos con sus homólogos de la piel.

A tales fines fueron utilizados 10 labios de vacas y ratas Wistar de 250 gramos de peso y 10 labios humanos.

Todas las muestras fueron fijadas en formol al 20% e incluidas en parafina, cortadas con un espesor de 7 μ aproximadamente y coloreadas con Hematoxilina-Eosina.

La utilización de los principios estereológicos nos proporcionan una rápida evaluación de los volúmenes relativos de las estructuras estudiadas en los cortes histológicos. La densidad de volumen (V_v) puede ser estimada mediante el conteo de los puntos proyectados sobre los diversos estratos, con relación a los puntos totales del sistema utilizado por Weibel (4).

Los valores dados por la V_v (densidad de volumen), fueron obtenidos a partir de la fracción de puntos proyectada sobre los estratos epiteliales. En esta forma fueron obtenidas las densidades de volumen de cada uno de los estratos epiteliales.

Conociendo el volumen de la grilla utilizada y la densidad de volumen de los estratos epiteliales, es factible establecer su relación para obtener el volumen relativo de cada una de ellas.

El volumen epitelial relativo puede ser relacionado con los parámetros fijos del sistema utilizado para obtener el espesor de dicho epitelio y de cada una de las capas que lo componen.

Los datos obtenidos (que figuran en la Table 1), muestran los volúmenes relativos de los estratos epiteliales en semimucosa y piel de las especies estudiadas y en ella podemos apreciar que los estratos de los epitelios de la vaca presentan valores mayores que en el hombre y que en la rata.

La Tabla 2 expresa las alturas de las distintas capas epiteliales en la piel y en la semimucosa de las tres especies estudiadas y es dable observar que la semimucosa de la vaca mide más de 1 mm de espesor, la del hombre 150 μ y la

de la rata 100 μ

La Tabla 3 nos muestra el porcentaje de los distintos estratos epiteliales, manteniendo la semimucosa una relación similar en las tres especies estudiadas.

El interés principal de nuestro estudio fue evaluar los volúmenes relativos de los distintos estratos epiteliales. Mediante el método de conteo de puntos fue posible caracterizar los epitelios en estudio, ya sea en lo que respecta a sus volúmenes como a sus espesores así como al volumen relativo de cada uno de los estratos.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que el volumen y el espesor de la semimucosa duplica los valores encontrados en la piel. Este incremento tiene lugar a expensas del estrato espinoso, lo que indicaría una especialización funcional que caracteriza a un epitelio intermedio entre la mucosa y la piel.

Los datos de nuestro estudio muestran que a pesar de que los volúmenes epiteliales de la semimucosa de cada una de las especies estudiadas son significativamente diferentes entre sí, la relación porcentual de las capas constituyentes de dichos epitelios se mantiene constante, lo que indicaría la acción de mecanismos que actuarían como reguladores de la relación de volúmenes entre los estratos epiteliales.

- 1.- Amakiri, S.F., Brit. Vet. J., 129:227, 1973.
- 2.- Hashimoto, K., Arch. Oral Biol., 16:397, 1971.
- 3.- Meyer, M. y Schroedes, H.E., Cell Tiss. Res., 158:177, 1975.
- 4.- Weibel, E.R., Kistler, G.S. y Scherle, W.F., J. Cell. Biol., 30:24, 1966.

TABLA 1

Densidad de volumen ocupado por los estratos epiteliales en semimucosa y piel

Estratos	Parámetros	Unidades	Semimucosa*			Piel*		
			Vacas	Ratas	Hombres	Vacas	Ratas	Hombres
Córnea	Vv	$\frac{\text{mm}^3}{\text{cm}^3}$	93±14	14±2	16±3	60±22	14±3	16±4
Granulosa	Vv	$\frac{\text{mm}^3}{\text{cm}^3}$	-	7±0	-	57±14	4±1	8±2
Espinosa	Vv	$\frac{\text{mm}^3}{\text{cm}^3}$	527±6	44±11	91±8	222±47	14±5	30±9
Basal	Vv	$\frac{\text{mm}^3}{\text{cm}^3}$	54±7	7±2	11±3	47±10	6±2	10±0

* El análisis de la varianza indicó que las diferencias entre estratos son estadísticamente significativas, con un $p < 99\%$.

TABLA 2

Altura de los estratos epiteliales en piel y semimucosa

Estratos	Parámetros	Unidades	Semimucosa*			Piel*		
			Vacas	Ratas	Hombres	Vacas	Ratas	Hombres
Córnea	Altura	mm	0,122	0,019	0,020	0,077	0,019	0,021
			±0,018	±0,002	±0,003	±0,028	±0,005	±0,009
Granulosa	Altura	mm		0,010		0,075	0,005	0,005
				±0,001		±0,019	±0,000	±0,001
Espinosa	Altura	mm	0,687	0,066	0,121	0,289	0,019	0,039
			±0,098	±0,026	±0,005	±0,062	±0,004	±0,011
Basal	Altura	mm	0,071	0,010	0,039	0,061	0,008	0,013
			±0,009	±0,001	±0,011	±0,013	±0,001	±0,005

* El análisis de la varianza indicó que las diferencias entre estratos son estadísticamente significativas, con un $p < 99\%$

TABLA 3
Relación porcentual entre estratos epiteliales

Estratos	Parámetros	Unidades	Semimucosa*			Piel**		
			Vacas	Ratas	Hombres	Vacas	Ratas	Hombres
Córnea	%		14	19	13	16	36	25
			±2	±1	±1	±5	±8	±1
Granulosa	%			11		15	11	11
				±1		±2	±1	±1
Espinosa	%		78	59	78	58	37	48
			±3	±10	±2	±5	±8	±2
Basal			8	11	9	11	16	16
			±1	±1	±1	±2	±1	±4

* El análisis de la varianza indicó que las diferencias entre estratos no son estadísticamente significativas, con un $p < 99\%$.

** El análisis de la varianza indicó que las diferencias entre estratos son estadísticamente significativas, con un $p < 99\%$.

F. 11. Datos morfométricos basales de la epidermis humana normal

A.J.P. Klein-Szanto*

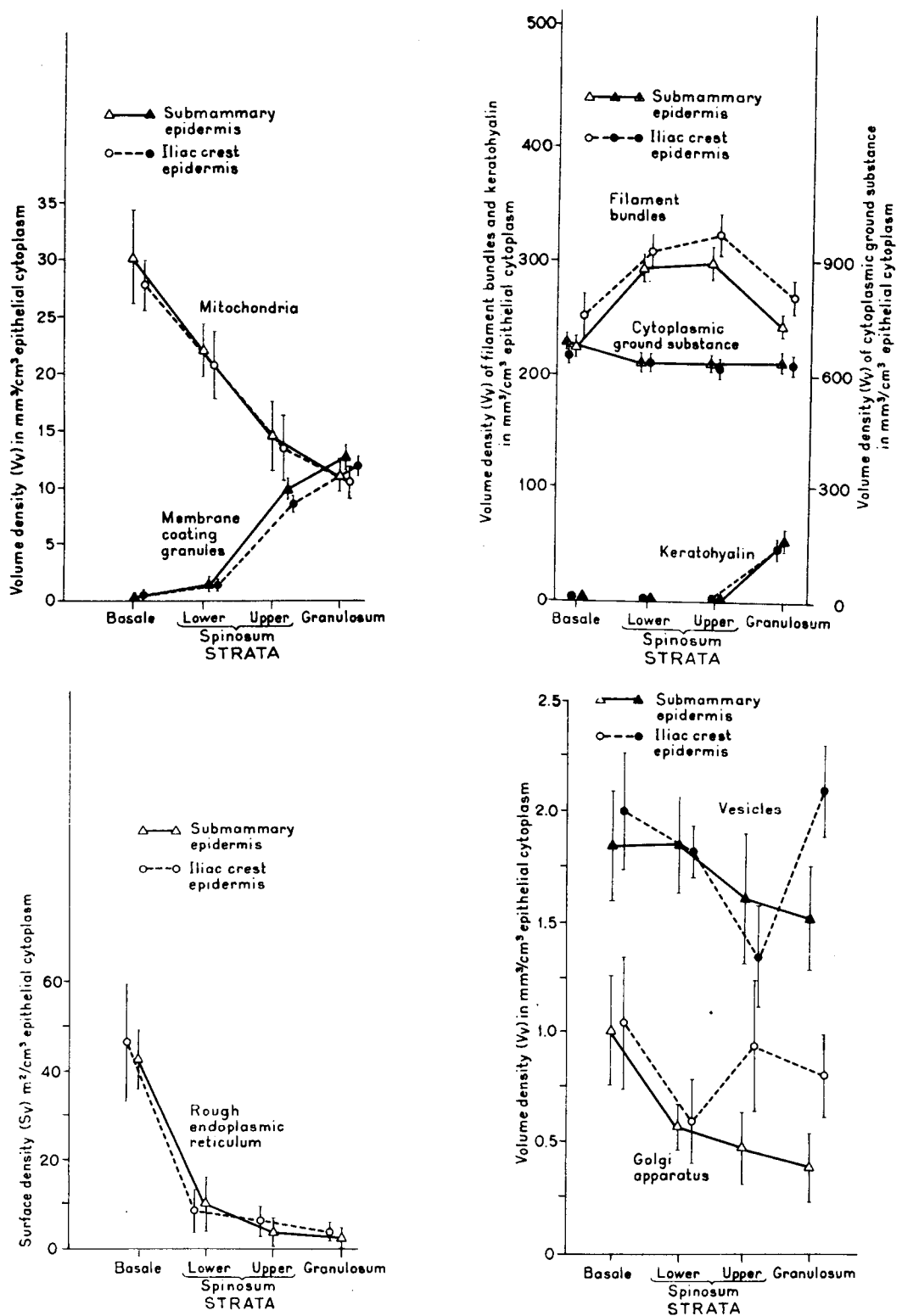
Mediante la aplicación de técnicas estereológicas de microscopía electrónica (1) fueron determinados los valores basales que caracterizan la composición de la epidermis humana normal a nivel ultraestructural.

Los resultados, expresados en densidad de volumen (V_v) y densidad de superficie (S_v) de las organelas y componentes más importantes de los queratinocitos de la piel pueden ser gráficamente visualizados en las figuras que acompañan el presente informe.

Los dos sitios que fueron elegidos para efectuar este análisis no mostraron diferencias significativas y fueron, en general, similares a los datos encontrados en otros epitelios malpighianos (1, 3). Los datos obtenidos sirven de referencia para estudios de epidermis en donde este tejido se encuentra alterado en forma experimental o espontánea.

- 1.- Weibel, E.R., Int. Rev. Cytol., 26:235, 1969.
- 2.- Meyer, M. y Schroeder, H.E., Cell Tiss. Res., 158:177, 1975.
- 3.- Klein-Szanto, A.J.P., Banoczy, J. y Schroeder, H.R., Pathol Europ., 11:189, 1976.

* Este trabajo fue realizado en parte en el Departamento de Biología Estructural Oral de la Universidad de Zurich, Suiza.



Gradientes de los parámetros estereológicos de las organelas y componentes celulares más importantes de los queratinocitos, en cuatro estratos de la epidermis de la región de la cresta ilíaca y de la región submamaria (10 casos de personas del sexo femenino, de alrededor de 21 años de edad).

F. 12. Estudio estereológico de los queratocitos claros y oscuros de la epidermis humana

A.J.P. Klein-Szanto.*

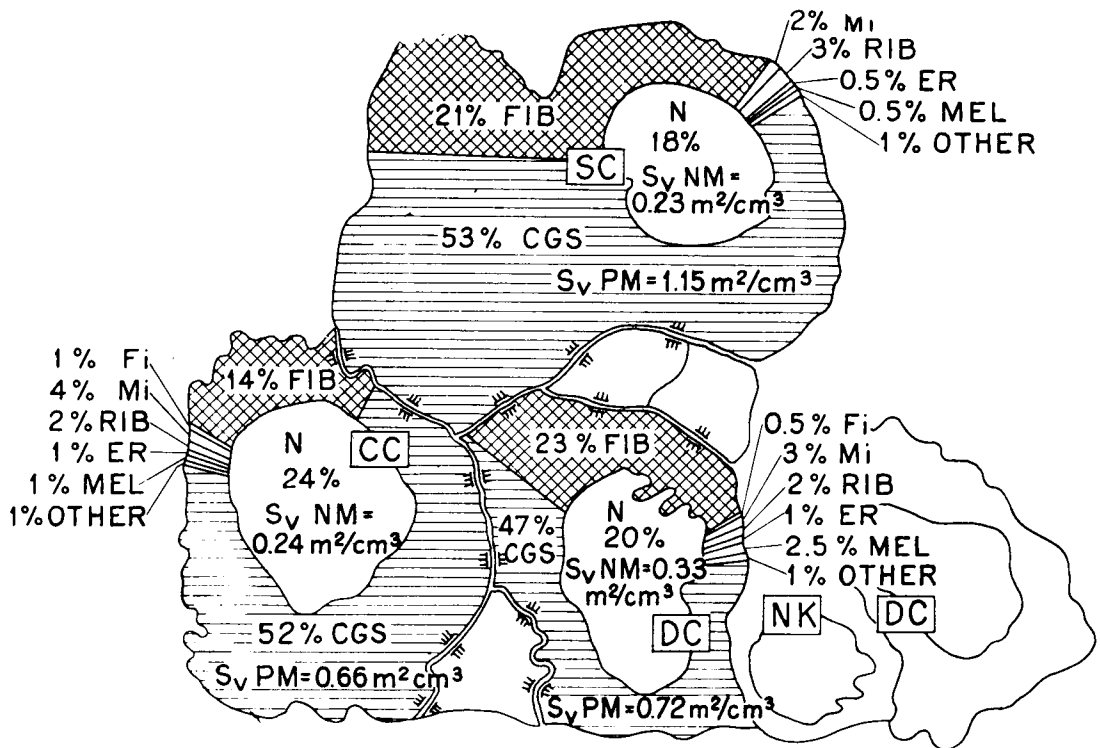
Aplicando técnicas estereológicas de morfometría a nivel ultraestructural, fue estudiada la composición submicroscópica de las células epiteliales de los estratos basal y espinoso de la epidermis humana normal (1). Esto permitió la evaluación comparativa de los queratocitos oscuros y claros del estrato basal (2), con las células suprabasales del estrato espinoso.

Los resultados, resumidos en la figura adjunta y expresados en densidades de volumen y densidades de superficie de los componentes celulares más importantes, indican que las células basales oscuras presentan valores intermedios entre los obtenidos para las células basales claras y los de las células suprabasales.

Esto indicaría que los queratocitos basales oscuros son células ya diferenciadas a pesar de estar localizadas en la capa basal, en la cual pueden permanecer un lapso indefinido de tiempo, para luego ascender a la capa espinosa.

- 1.- Weibel, E.R., Int. Rev. Cytol., 26:235, 1969.
- 2.- Breathnach, A.S., An atlas of the ultrastructure of skin. J.A. Churchill, London 1971, pag. 108.

* Este trabajo fue realizado en parte en el Departamento de Biología Estructural Oral de la Universidad de Zurich, Suiza.



Fracciones de volumen ocupados por los distintos componentes celulares en función del volumen individual de cada tipo celular.

SC	: célula suprabasal
CC	: célula basal clara
DC	: célula basal oscura
NK	: célula no epitelial
N	: núcleo
Fi	: filamentos citoplasmáticos
Fib	: tonofilamentos
Mi	: mitocondrias
RIB	: ribosomas
ER	: retículo endoplásmico rugoso
MEL	: melanosomas
CGS	: matriz intracelular
$S_v NM$	: densidad de superficie de la membrana nuclear
$S_v PM$	: densidad de superficie de la membrana citoplasmática

F . 13. Ultraestructura de la epidermis inyectada con Actinomicina D

B.M. de Rey y Cabrini, R.L.

Distintas alteraciones que involucran la organización nuclear y citoplasmática, así como modificaciones marcadas en los mecanismos de queratinización han sido descriptos en la epidermis irradiada con rayos X y β (1, 3).

Con el objeto de analizar las causas íntimas de estos procesos fueron usadas drogas cuya acción a nivel molecular es perfectamente conocida, para lo que fueron inyectados 0,04 ml de Actinomicina D en forma subcutánea a ratas de 5 días de edad, sacrificándolas a las 40 horas post-inyección.

El material procesado para microscopía electrónica con las técnicas de rutina mostró a nivel de la epidermis, células basales y espinosas con edema intracelular y una leve acantosis. Células claras alternaban con otra de mayor densidad electrónica. Numerosas células mostraban mitocondrias alteradas con crestas modificadas. Eran muy conspicuos grupos de vacuolas lipídicas densas, de ubicación perinuclear. Manojos de tonofilamentos rodeaban el núcleo. Los núcleos mostraban un tamaño algo mayor y sus membranas aparecían intactas. No fue observada lobulación ni fragmentación del material nuclear y aparecieron muy escasas inclusiones nucleares.

El rasgo más llamativo de la acción de la Actinomicina D es la alteración nucleolar observada en todas las capas epiteliales. La segregación de los componentes del nucleolo es diferente según el estrato que sea analizado. Imágenes de total segregación fueron observadas a nivel de la capa granulosa y espinosa superior, mientras que en otras células de la misma zona los elementos granulares desaparecían y sólo permanecían regiones fibrilares.

El estudio a nivel ultraestructural de los efectos de la Actinomicina D sobre la epidermis nos permitió caracterizar morfológicamente un proceso bien conocido a nivel molecular. Esta droga inactiva los "templates" de DNA involucrados en la síntesis de precursores ribosomales (2).

A nivel ultraestructural esta droga afecta la organización mitocondrial y el retículo endoplásmico y sus cambios morfológicos recuerdan en parte a los producidos por irradiación con rayos X (1, 3). La presencia de células claras con baja densidad de tonofibrillas y ribosomas reflejarían a nivel citoplasmático las alteraciones moleculares experimentadas por los precursores del DNA ribosomal. Es interesante señalar las modificaciones sufridas por los nucleolos en los distintos estratos epiteliales, que podrían ser comparadas con una cronología similar descrita por Simard y Bernhard (4). En las capas basal y espinosa proximal la segregación nucleolar caería dentro de la definición de microsegregación (5), en la cual es posible identificar áreas más claras y más densas de componentes granulares y fibrilares.

Referencias

- 1.- Rey, B.M. de y Cabrini, R.L., J. Invest. Dermatol., 60:137, 1973.
- 2.- Perry, R.P., Natl. Cancer Inst. Monograph., 18:325, 1965.
- 3.- Rey, B.M. de y Cabrini, R.L., J. Submicr. Cytol., 5:157, 1973.
- 4.- Simard, R. y Bernhard, W., Int. J. Cancer, 1:463, 1966.
- 5.- Svoboda, D., Racela, A. y Higginson, J., Biochem. Pharmacol., 16:651, 1967.

F. 14. Tiamino pirofosfatasa y fosfatasa ácida. Su localización ultraestructural en piel de rata,

M.E. Itoiz, B.M. de Rey y R.L. Cabrini.

En este trabajo describimos la localización de la tiamino-pirofosfatasa (TPPase) enzima que cataliza la hidrólisis de la cocarboxilasa, en la piel normal de ratas Wistar. La actividad de esta enzima ha sido detectada a nivel ultraestructural en otros tejidos (1), pero no hemos encontrado datos sobre su actividad en la epidermis. Se trató además, de correlacionar la existencia de TPPase con la actividad de la Fosfatasa Ácida (Ac Pase).

Fueron usados trozos de 1 x 2 mm de la piel de la cola de rata Wistar de 10 a 15 días de edad, los cuales fueron fijados en glutaraldehído al 2% durante 15 minutos. Luego de cortarlos por congelación, fueron incubados para demostración de TPPase y Ac Pase, de acuerdo con la técnica de Goldfisher et al. (2) y Gomori-Barka (3) respectivamente. Fueron realizados controles con cortes de hígado y riñón y con piel incubada sin sustrato y con agregado de fluoruro de sodio. Luego de la reacción, los cortes fueron fijados en osmio e incluidos en Epon para obtener cortes ultrafinos (13), los cuales fueron observados en microscopio Philips 330.

La localización de la TPPase fue observada en las estructuras dérmicas y epidérmicas. Las vesículas pinocitósicas de los endotelios mostraron una intensa reacción. También reacciona muy intensamente el aparato de Golgi de las células endoteliales y fibroblastos. En la epidermis la mayor parte de las células basales, espinosas y granulosas reaccionan únicamente en su aparato de Golgi. Esta actividad fue detectada en los sáculos internos de dictiosoma, dejando sin reacción la porción central de las vesículas.

En la capa córnea observamos cuerpos intensamente reaccionantes de aproximadamente 100-300 Å de diámetro; en algunos de ellos pudimos detectar estriaciones laminares. Observamos también elementos reaccionantes estriados o membranosos dentro de las células córneas, con diámetros que llegan a los 580 Å. En los cortes incubados con FlNa todos los elementos descriptos mantienen su actividad TPPásica, aunque en algunos casos algo disminuida.

La Ac Pase mostró actividad en todos los estratos celulares. En la capa basal se ve un pequeño número de lisosomas reaccionantes. Los queratinosomas son más abundantes en las células granulosas y están localizados cerca de la membrana celular.

En los espacios intercelulares de las capas granulosa y córnea fueron observados abundantes gránulos estriados con reacción positiva. Además, dentro de las células granulosas aparece un intenso precipitado difuso. En la capa córnea las células que poseen este tipo de precipitación difusa alternan con otras cuyo citoplasma está totalmente libre de reacción. Los elementos membranosos intracelulares de la capa córnea, que son TPPase positivos poseen también actividad de fosfatasa ácida. Los controles incubados con FlNa mostraron una total inactivación de todas las zonas Ac Pase positivas.

En general, los patrones de distribución de la Ac Pase encontrados en la piel de rata son similares a los ya descriptos en piel humana o de otros animales de laboratorio (4, 5). La localización de la TPPase en el aparato de Golgi de células dérmicas y epidérmicas es también similar a la descripta en otros tejidos. La utilidad, repetidamente sugerida, de esta reacción como marcadora del aparato de Golgi, aparece particularmente evidente a nivel de la epidermis, dada la dificultad para localizar esta organela en las preparaciones de rutina.

La presencia de elementos TPPase y Ac Pase positivos en las capas superficiales, que pueden ser identificados como queratinosoma o como producto de descarga de estas organelas en el espacio intercelular es un hallazgo de interés. Cabe hacer notar que en las células espinosas no hay gránulos TPPase positivos, pero observamos, en cambio, queratinosomas con Ac Pase.

La persistencia de gránulos con actividad TPPásica en las preparaciones tratadas con FlNa sugiere la coexistencia de ambas enzimas en los queratinosomas de las capas más superficiales. Hashimoto (6) demostró la presencia de fosfolípidos dentro de estos gránulos que él llamó "cementosomas". Este hecho, juntamente con el hallazgo de las actividades enzimáticas aquí descritas, permiten suponer que estos gránulos no son solamente "estructuras cubiertas por una membrana que contienen fosfatasa ácida", sino elementos más complejos, ya que en el curso de los diferentes estadios de la diferenciación celular aparecen en ellos diferentes actividades enzimáticas. Queda aún por investigar si estos queratinosomas están involucrados en el proceso de muerte celular y descamación o en la formación de una sustancia cementante de las células córneas.

Las zonas activas de gran tamaño encontradas dentro de las células córneas podrían corresponder a invaginaciones de la membrana celular.

- 1.- Goldfischer, S., Essner, E. y Schiller, B., J. Histochem. Cytochem., 19: 349, 1971.
- 2.- Goldfischer, S., Essner, E. y Novikoff A.B., J. Histochem. Cytochem., 12:72, 1964.
- 3.- Borgers, M., Schaper, J. y Schaper, W., J. Histochem. Cytochem., 19: 526, 1971.
- 4.- Olson, R.L. y Nordquist, R.E., J. invest. Derm., 46:431, 1966.
- 5.- Rowden, G., J. Investig. Derm., 49:181, 1967.
- 6.- Hashimoto, K., Arch. Derm. Forsch., 240:349, 1971.

F. 15. Diferencias adaptativas de la superficie de las células córneas

B.M. de Rey y C.C. Conti,

La posibilidad de investigar superficies celulares que brinda el microscopio de barrido, evidenció el hecho de que varios epitelios queratinizados normales y patológicos muestran una arquitectura peculiar sobre la superficie de sus células córneas.

Numerosos autores han descripto estructuras especiales sobre las células córneas de palmas normales y en ciertas entidades patológicas de la piel (1). En este trabajo es analizada la organización de las superficies superior e inferior de las células córneas de epitelios queratinizados de ratas y humanos en distintas partes del organismo y a diferentes edades del individuo, buscando la posible relación entre la estructura de las uniones de las células córneas y la interacción de este estrato con el medio ambiente.

La epidermis de pata y palma de rata Wistar de 16 a 35 días de edad, muestra estructuras organizadas sobre la superficie de las células córneas. Estas estructuras son morfológicamente diferentes, según se trate de la superficie superior o inferior de la célula córnea. La superficie inferior muestra vellosidades muy abundantes, con un diámetro medio de $1,5 \mu$. En la superficie superior de las células córneas aparecen poros de aproximadamente 1μ de diámetro. Tanto las microvellosidades como las depresiones son más regulares y están más desarrolladas en las zonas más profundas de la capa córnea. Por otra parte, la piel de planta y palma de animales recién nacidos, así como la de animales adultos no muestra estructura alguna en la superficie de sus células córneas. Experiencias similares realizadas con la técnica de "stripping" de la capa córnea en seres humanos demostraron una distribución similar de estas estructuras en función de la edad del individuo. Otras zonas del cuerpo, como el abdomen, las extremidades, etc., no muestran estructuras en la superficie de las células córneas, independientemente de la edad del individuo.

Estos resultados nos permiten postular que la citoarquitectura superficial encontrada en la capa córnea de las superficies plantares de ratas y hombres, serían especializaciones adaptativas que caracterizarían a epidermis que están sometidas a un gran desgaste mecánico. El estrato córneo es sumamente resistente a la tracción mecánica (2), aun cuando las capas superficiales sean naturalmente descamantes; si la erosión mecánica es muy intensa, como ocurre en palmas y plantas, las sustancias cementantes - aparentemente mucopolisacáridos - (3), no serían suficientes para evitar una excesiva descamación y se desarrollaría consecuentemente una estructura de "anclaje" entre las células. Esta estructura se desarrollaría en animales de experimentación cuando comienzan a desplazarse por las jaulas y en los sitios más expuestos a la erosión. En humanos el tiempo equivalente sería cuando comienzan a caminar y tomar objetos con la mano, es decir, entre los 12 y 15 meses de edad.

Especializaciones de las células córneas semejantes a las aquí descriptas fueron observadas en mucosa oral, piel soriática, líquenes, etc., todos caracterizados como tejidos con un alto "turn over" y una gran descamación. La presencia de estas estructuras superficiales caracterizaría epitelios de alto índice de recambio celular y de acuerdo con Christophers(4), epitelios cuyas células no están organizadas en columnas. Por otro lado, las otras células córneas estudiadas aquí - las pertenecientes a zonas del cuerpo no sometidas a fuerte desgaste - no presentan estas modificaciones superficiales, lo que estaría de acuerdo con datos previos (4) que caracterizan a estos epitelios como de bajo índice mitótico y ordenamiento columnar de sus células.

- 1.- Montagna, W. y Parakkal, F.F., "The epidermis". In "Structure and function of skin". Academic Press, New York, 1974.
- 2.- Mentos, D.N. y Eisen, A.Z., J. Invest. Dermatol, 56:165, 1971.
- 3.- Bonnsville, M.E., Weinstock, M. y Wilgram G., Ultrastr. Res., 23:15, 1068.
- 4.- Christophers, E., Z. Zellforsch Mikrosk Anat., 114:441, 1971.

F. 16. Efecto de la descalcificación sobre la microespectrofotometría de Feulgen

I.B. Giménez, C.J. Conti y R.L. Cabrini.

Los métodos convencionales de descalcificación (solubilización del Ca en medio ácido) tienen una activa acción despolimerizante sobre los ácidos nucleicos. Esto constituye un serio impedimento para realizar estudios microespectrofotométricos sobre contenido de DNA en tejidos calcificados.

En el presente trabajo hemos usado distintos descalcificadores con el fin de valorar el uso de los mismos en estudios microespectrofotométricos del DNA de tejidos calcificados.

Hígado, bazo y hueso maxilar de rata Wistar adulta fueron expuestos a la acción del ácido nítrico al 7 %, al ácido pícrico (solución de Bouin) y al EDTA tris pH 7; 9, 12, 24 y 72 hs. fueron los tiempos que fueron mantenidos los tejidos bajo la acción del ácido nítrico. En ácido pícrico fueron dejados 3 días y en EDTA 15 días. Realizamos la técnica de Feulgen con distintos tiempos de hidrólisis (1,2). Las medidas microespectrofotométricas fueron realizadas con un Cytoscan marca Zeiss con platina automática, bajo las condiciones descritas en un trabajo previo (3).

El material tratado con ácido nítrico y ácido pícrico mostró una considerable pérdida en el contenido de DNA, llegando en la mayoría de los casos a una negatividad total de la reacción de Feulgen. Los materiales sometidos a la acción del EDTA mostraron curvas de hidrólisis similares a los controles (Gráfico 1), conservando la relación de ploidía de los tejidos estudiados (Tablas I y II).

Los presentes resultados, obtenidos en células de distintos tejidos, parecen demostrar que la relación estequiométrica de la reacción de Feulgen no es modificada por el tratamiento con EDTA tris pH 7. De acuerdo con lo expuesto, consideramos que la descalcificación por este método puede ser usada como técnica de rutina para el estudio microespectrofotométrico del DNA en tejidos calcificados.

- 1.- De Cosse, J.J. y Aiello, N., J. Histochem. Cytochem., 14:601, 1966.
- 2.- Deitch, A.D., Wagner, D y Richart, R.M., J. Histochem. Cytochem, 16: 371, 1967.
- 3.- Giménez, I.B. y Conti, C.J., J. oral Surg. (En prensa).

TABLA I

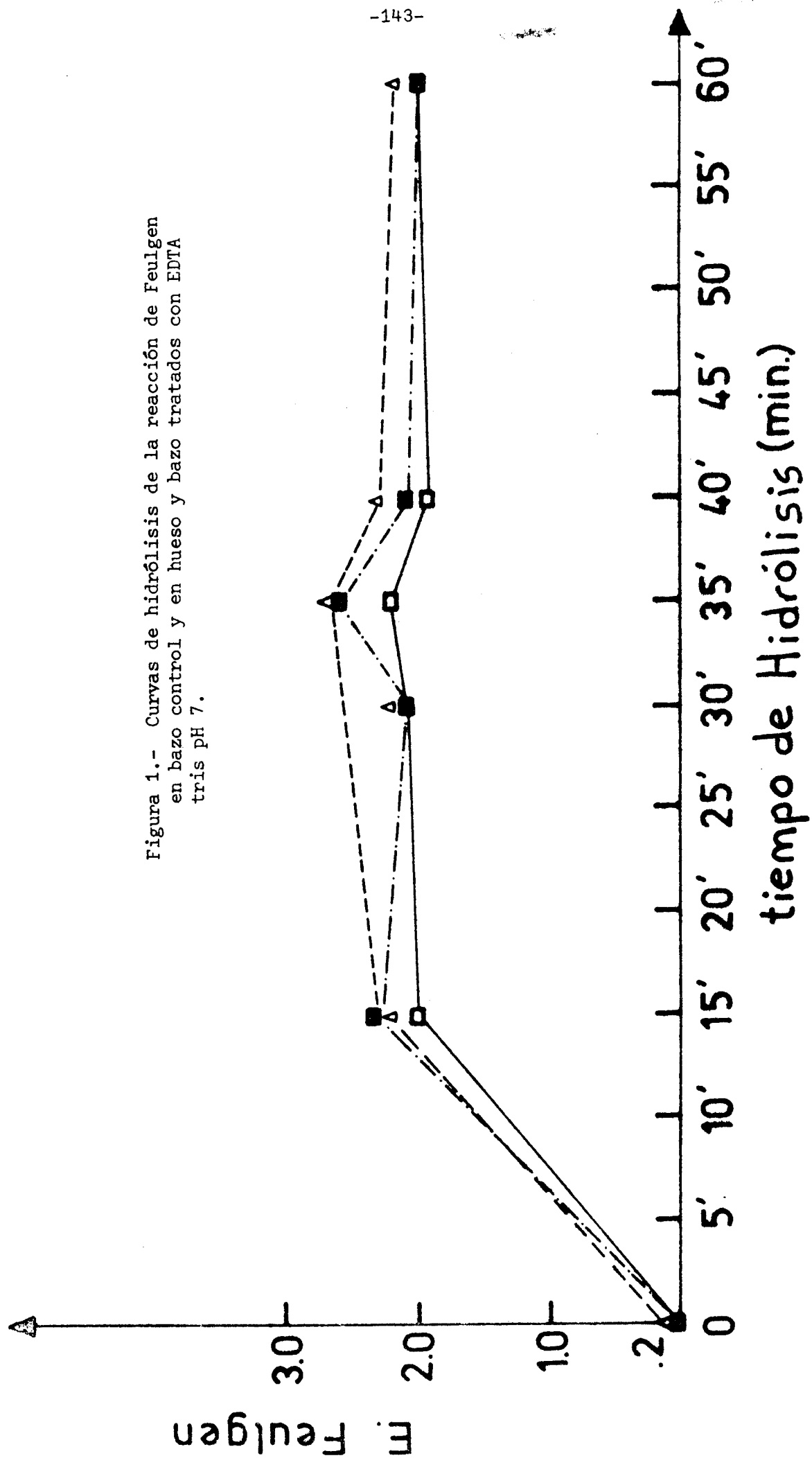
	N		Contenido de DNA	
Hepatocitos	50	diploide	2,61	0,20
	40	tetraploide	5,59	0,34
Linfocitos	50	diploide	2,52	0,17
Células conectivas	50	diploide	2,59	0,19

Valores citofotométricos en diferentes tipos celulares sometidos a técnicas convencionales para el estudio del DNA por medio de la reacción nuclear de Feulgen.

TABLA II

	N		Contenido de DNA	
Hepatocitos	50	diploide	2,65	0,29
	40	tetraploide	5,63	0,44
Linfocitos	60	diploide	2,66	0,26
Células conectivas	40	diploide	2,74	0,30
Osteocitos	60	diploide	2,75	0,28
Células epiteliales	30	diploide	2,83	0,32
Odontoblastos	30	diploide	2,81	0,29

Valores citofotométricos del DNA en distitos tipos celulares sometidos a técnicas de descalcificación con EDTA tris pH 7 y posterior reacción nuclear de Feulgen.



F. 17, Aplicación del método microespectrofotométrico para cuantitación del DNA en patología humana

I.B. Giménez, C.J. Conti, R.L. Cabrini, F. Schajowicz*, M. Solanot** y B. Lema**

El Laboratorio de Patología del Departamento de Radiobiología se ha dedicado a la descripción de alteraciones y entidades patológicas por medio de datos cuantitativos a nivel histológico. De esta forma fue integrado un grupo de trabajo especializado en técnicas microespectrofotométricas (1,2). Estas técnicas han sido usadas en patología a fin de obtener información que permita un diagnóstico rápido y precoz de lesiones pretumorales y tumorales (3).

En este informe presentamos una serie de trabajos realizados conjuntamente con centros de patología, interesados en la utilización de este tipo de técnica.

Todo el material presentado fue procesado de la misma manera: fijación en formol, inclusión en parafina siguiendo las técnicas rutinarias y la reacción nuclear de Feulgen para visualizar el DNA. Las determinaciones cuantitativas fueron realizadas en un microespectrofotómetro Cytoscan, marca Zeiss, con una longitud de onda de 560 mμ.

Lesiones orales (Figura 1)

Por medio de la microespectrofotometría del Feulgen fueron determinados los patrones de distribución del DNA de las células basales del epitelio de cuatro lesiones orales: quiste radicular, queratoquistes, leucoplasia y carcinoma epidermoide.

Los histogramas de los quistes radiculares presentaron un pico bien definido en el rango diploide y una pequeña desviación hacia la derecha. Los queratoquistes presentaron, además del pico en el rango diploide, otra población de células, definiendo un segundo pico en el rango tetraploide.

En las leucoplasias de la cavidad oral fueron encontradas dos distribuciones diferentes. Las leucoplasias, que tanto clínica como histológicamente eran lesiones no agresivas, presentaron un pico bien definido en el rango diploide y un porcentaje de células en el rango diploide-tetraploide. Las leucoplasias diagnosticadas como lesiones más agresivas, presentaron un pico modal con valores más altos.

En los carcinomas orales los patrones de distribución fueron semejantes a los presentados en la bibliografía para otros tumores: picos modales mal definidos y dispersión de los valores.

Tumores de la serie cartilaginosa (Figura 2)

Con el fin de evaluar la posibilidad de establecer el grado de malignidad de tumores de la serie cartilaginosa por medio de la microespectrofotometría del DNA, fueron estudiados cuatro condromas y seis condrosarcomas con diferente grado de malignidad, comparando los resultados con el análisis histopatológico.

* Registro Latinoamericano de Patología Osea, Hospital Italiano, Capital Federal.

** Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Rivadavia, Capital Federal.

Los condromas presentaron un pico modal, coincidente con el pico modal de los linfocitos tomados como control diploide y poca dispersión de valores.

Los condrosarcomas, agrupados según el grado de malignidad histológica presentaron: los de bajo grado (grado I), un pico modal igual al de los linfocitos controles, pero a diferencia de los condromas, los histogramas presentaron asimetría hacia la derecha, es decir, células en rango diploide-tetraploide (células de proliferación). Los de grado II (mediano grado) presentaron un valor modal diferente al de los linfocitos, manteniendo la asimetría hacia la derecha. Por último, los condrosarcomas de grado III (alto grado) presentaron dos picos modales bien definidos, uno en el rango tetraploide con respecto a los linfocitos y el otro en el valor doble con respecto al primero.

Metaplasia pavimentosa de cuello de útero (Figura 3)

Fueron estudiados siete casos de metaplasia pavimentosa completa e incompleta, con el fin de establecer posibles alteraciones en los patrones de DNA y correlacionarlos con las displasias y carcinomas de cuello uterino. El material fue obtenido de biopsias y piezas quirúrgicas (histerectomías). En cada caso fueron medidas 100 células pavimentosas.

Los valores obtenidos fueron graficados en histogramas de frecuencia. La figura 1 muestra el histograma correspondiente a células pavimentosas normales; se observa una distribución unimodal, con un pico localizado próximo al determinado por los linfocitos. En la figura 2 se observa la distribución del DNA en células metaplásicas. El pico modal es similar al encontrado en los epitelios normales, pero, además, presenta una pequeña asimetría hacia la derecha, determinando un segundo pico en el rango tetraploide.

Diversos estudios del DNA nuclear en varios tumores han mostrado aneuploidia y dispersión de los valores (4). Por otra parte, fueron realizados intentos de correlacionar las alteraciones del DNA con la evolución de los tumores (5). En nuestro estudio esta correlación pudo ser observada en las leucoplasias orales y los tumores cartilaginosos. En éstas fueron encontrados varios patrones de DNA, desde la distribución normal y unimodal de los condromas hasta la distribución aneuploide y bimodal de los condrosarcomas de grado III.

En las leucoplasias orales encontramos un comportamiento similar. En aquellos casos donde el cuadro histológico indicaba un pronóstico benigno, el patrón de DNA se caracterizó por presentar valores diploides y poca dispersión de éstos. En cambio en aquellos casos donde el cuadro histológico presentaba lesiones más agresivas, el valor modal de los histogramas se encontró desplazado hacia la derecha.

Los quistes radicales y los queratoquistes son dos lesiones orales que tienen un cuadro histológico semejante, pero sus evoluciones son distintas. En el presente estudio los patrones de distribución del DNA de cada lesión presentaron características particulares.

La metaplasia pavimentosa de cuello de útero presentó una distribución semejante a la normal, con un pico diploide bien definido, pero con más células en actividad (asimetría hacia la derecha). Las pequeñas diferencias encontradas entre el pico modal de los linfocitos y el pico modal del epitelio del cuello uterino, probablemente es causado por modificaciones en la estequiometría del Feulgen entre los diferentes tipos celulares.

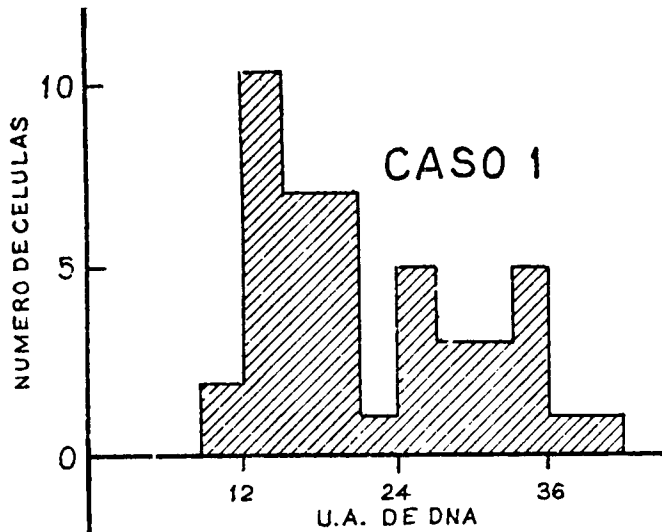
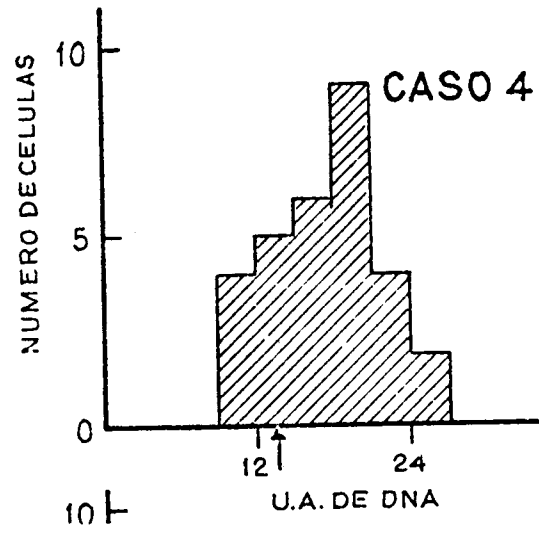
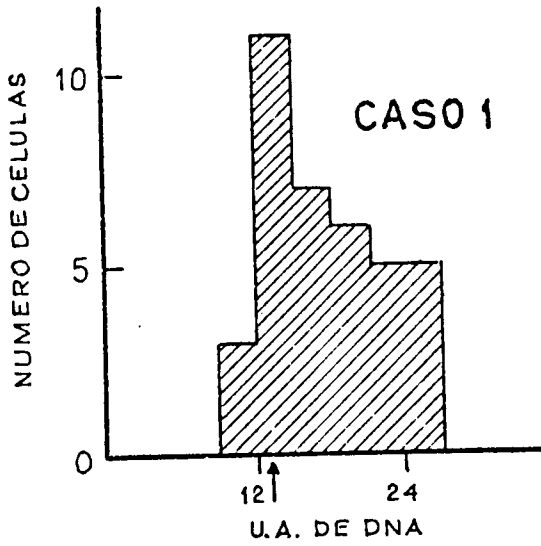
Del análisis de estos datos se desprende la posibilidad de poder usar la microespectrofotometría del DNA como un eventual método en patología, para el diagnóstico diferencial de lesiones que, teniendo un cuadro histológico semejante, evolucionan en forma diferente, como se evidencia en el análisis de los quistes orales y los condromas y condrosarcomas de bajo grado. Además, se

vislumbra la aplicación del método para el diagnóstico precoz de lesiones precancerosas y cancerosas.

- 1.- Giménez, I.B. y Conti, C.J., J. oral Surg. (en prensa).
- 2.- Schajowicz, F., Giménez, I.B., Conti, C.J. y Cabrini, R.L., Bol. Soc. Arg. ort. Traum., 2:148, 1976.
- 3.- Atkin, N.B. y Baker, M.C., Brit. J. Cancer, 23:329, 1969.
- 4.- Sandritter, W., Carl, M. y Ritter, N., Acta Cytol., 10:26, 1966.
- 5.- Atkin, N.B., Richards, B.M. y Ross, A.J., Brit. J. Cancer, 13:773, 1959.

Para la realización de este trabajo se contó con la colaboración de la Cátedra de Patología, Facultad de Odontología, U.B.A., del Registro Latinoamericano de Patología Osea, Hospital Italiano y del Servicio de Patología, Hospital Rivadavia, Buenos Aires.

LEUCOPLASIAS ORALES



CARCINOMAS EPIDERMOIDES ORALES

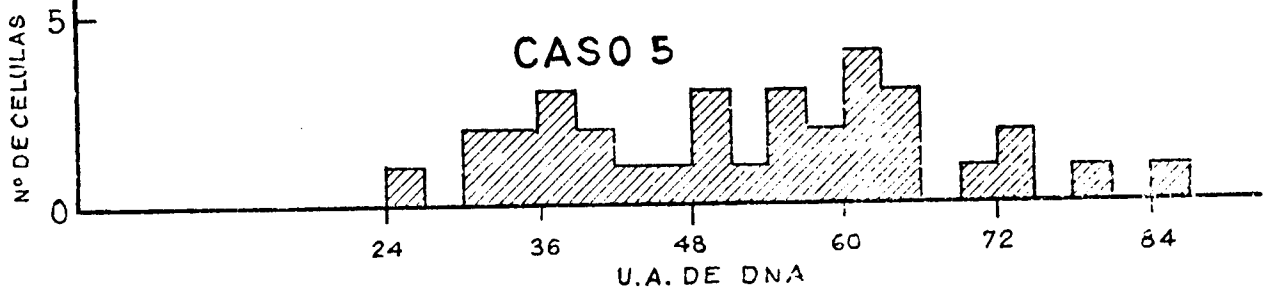


Figura 1

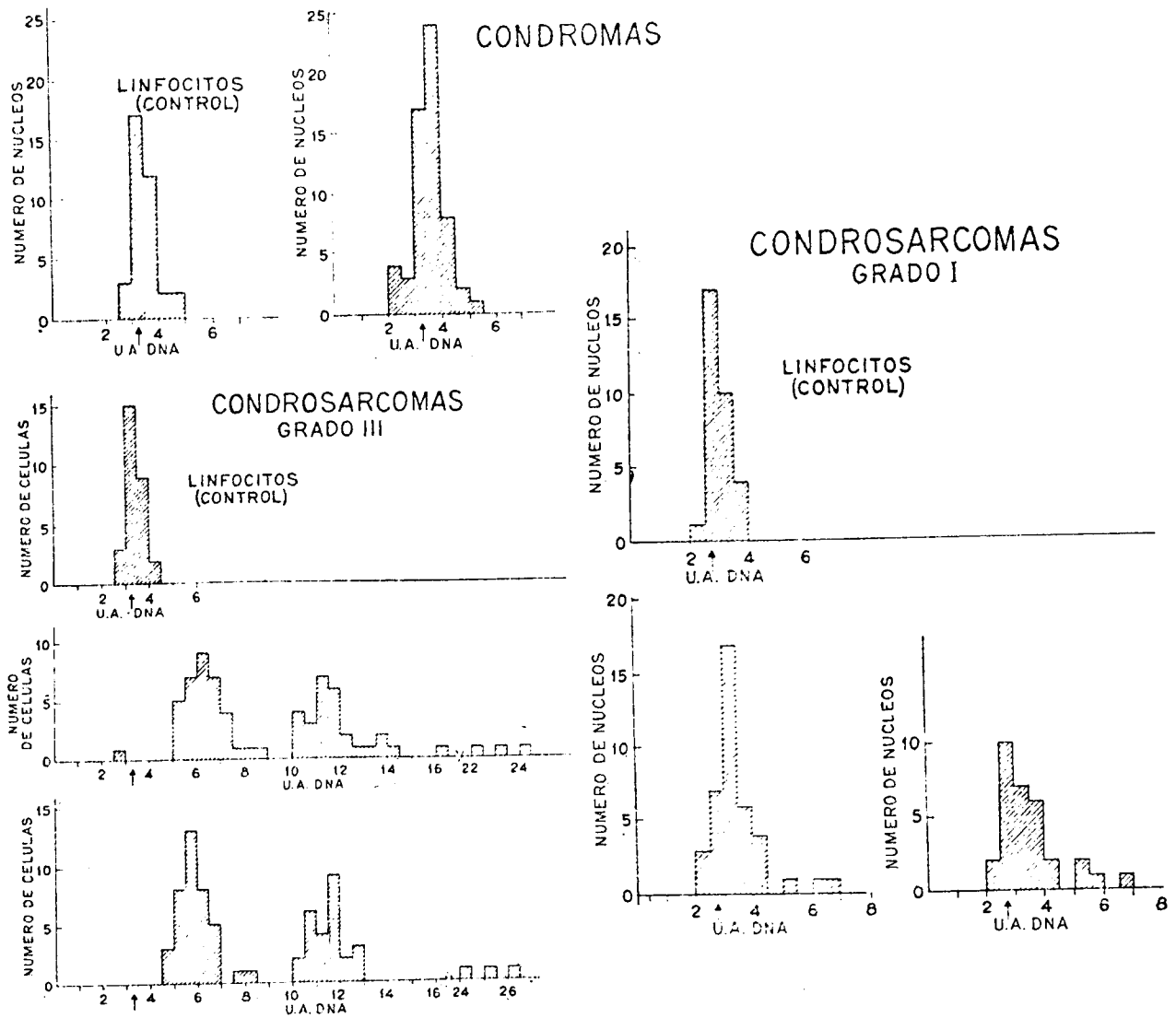


Figura 2

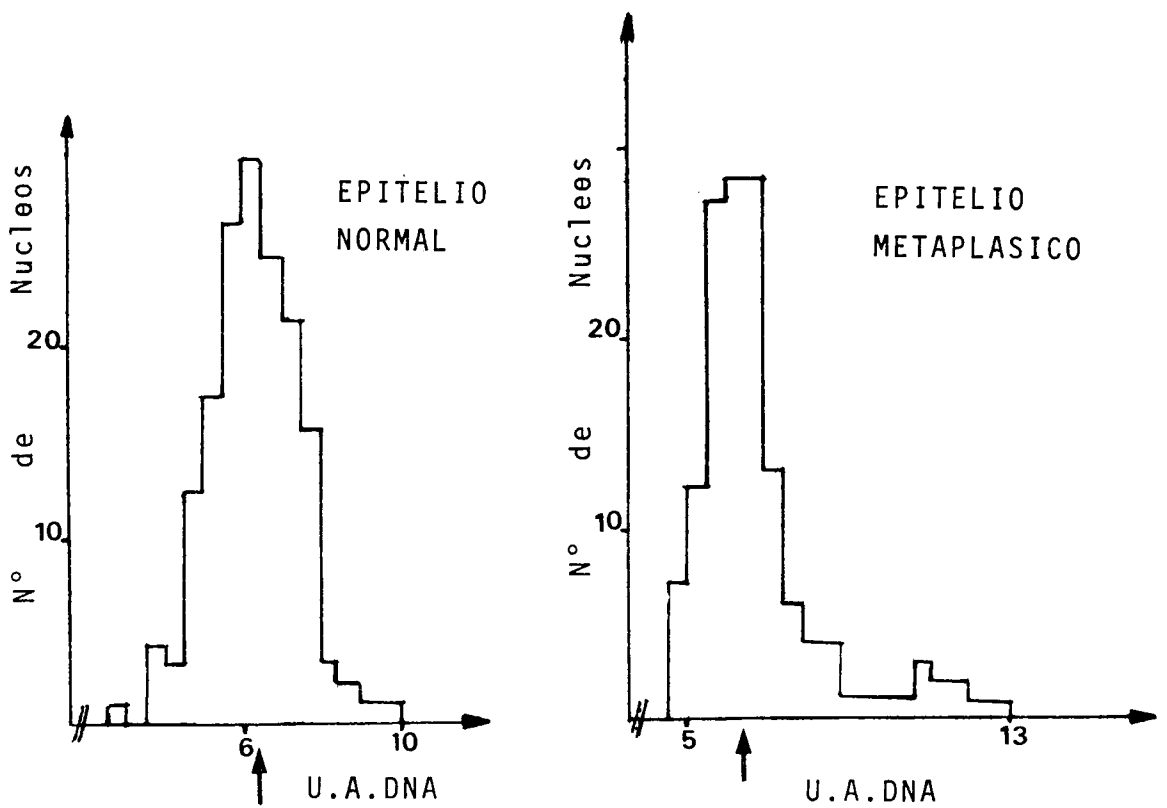
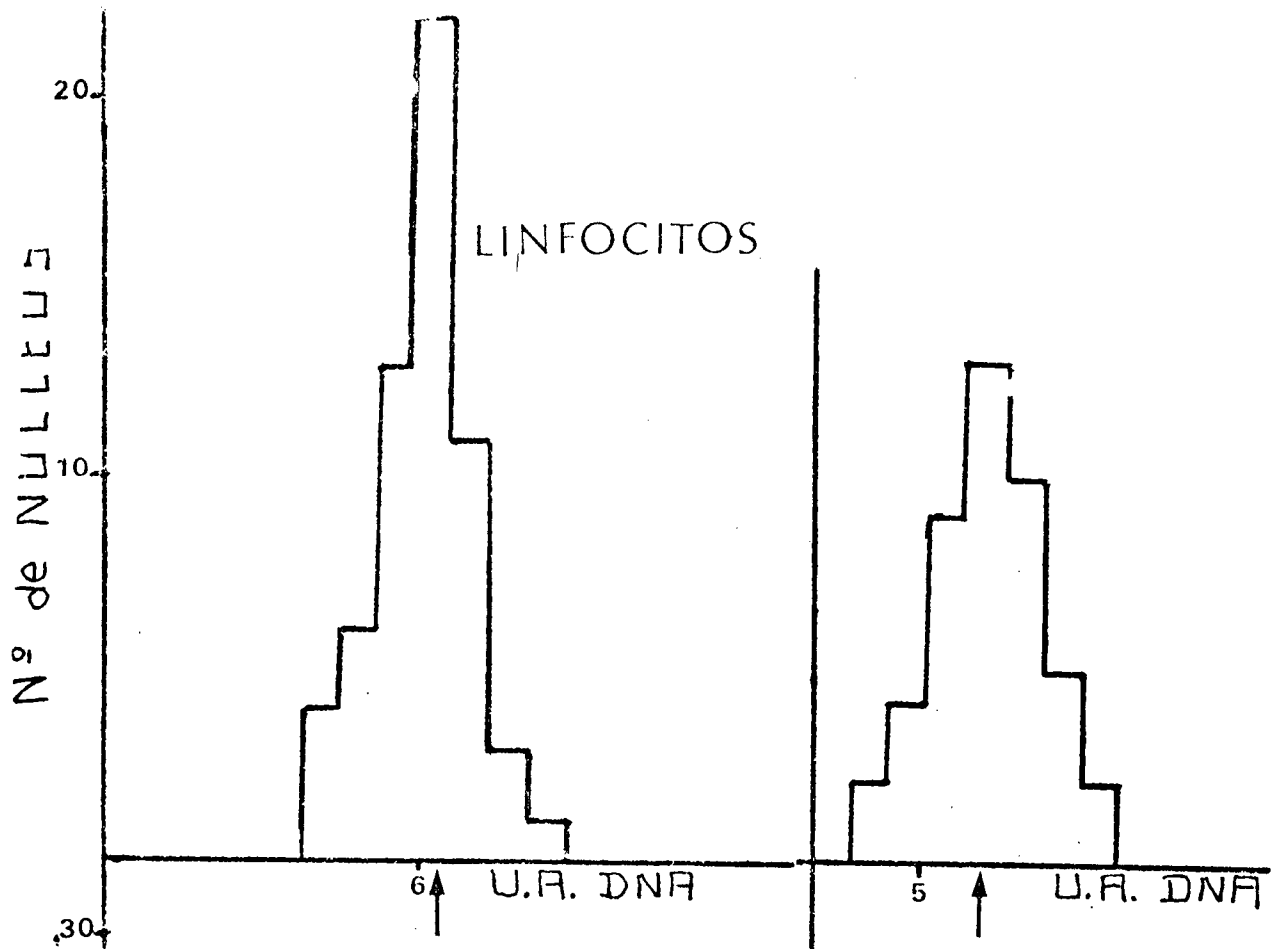


Figura 3

F, 18. Estudio microespectrofotométrico sobre la cuantitación de la reacción de plomo para la demostración histoquímica de la fosfatasa ácida.

R.L. Cabrini, A.C. Frasch y M.E. Itoiz

El uso de la microespectrofotometría en la cuantitación de reacciones histoquímicas se ha extendido en los últimos años debido a su practicidad, luego que fueron determinadas las condiciones para su validez. Habiendo sido desarrollada para la cuantitación de ácidos nucleicos (1), está siendo ahora aplicada a la histoquímica enzimática. Usando este método han sido determinadas ya actividades de enzimas hidrolíticas y oxidativas en diferentes condiciones experimentales (2-5).

No hemos encontrado en la literatura, información sobre la aplicabilidad de la microespectrofotometría a la cuantitación de la actividad de la fosfatasa ácida demostrada mediante la reacción de precipitación de plomo, de tipo Gomori. Este método ha sido últimamente muy utilizado debido a la facilidad de su aplicación al nivel ultraestructural. Por ello resulta interesante determinar las condiciones bajo las cuales esta técnica puede ser aplicada al análisis microespectrofotométrico.

En este trabajo fueron usados dos tipos de modelos: a) cortes de congelación de riñón de rata Wistar y próstata humana; b) poliacrilamida a la cual le fueron incorporadas cantidades variables de homogeneizado de próstata humana como fuente enzimática.

Los riñones de rata fueron fijados en formol neutro durante 24 horas a 4° C y cortados en un criostatao. Luego fueron incubados durante, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 minutos en el medio de Gomori (1950).

Los cortes de próstata humana fueron incubados durante períodos de 6, 9 y 12 minutos.

La actividad enzimática del homogeneizado fue determinada bioquímicamente mediante el método de Andersh (6), usando un "kit" comercial de Boehringer-Mannheim C.

La poliacrilamida fue preparada según el método utilizado por van Duijn et al (7), mezclando acrilamida y bis-acrilamida con los activadores y aceleradores para su polimerización. El homogeneizado de próstata sin diluir y diluido al 6, 12, 18, 24 y 30% en agua destilada, fue mezclado con la preparación de poliacrilamida antes de agregar el acelerador. Luego de agregar éste, la mezcla fue comprimida entre dos vidrios separados entre sí por cubreobjetos de 145 μ de espesor. Todos los filmes de cada espécimen fueron preparados sobre el mismo vidrio, a fin de evitar errores debidos a diferencias de espesor. Después de la polimerización, los modelos de poliacrilamida fueron incubados en el medio de Gomori durante períodos variables, con la misma técnica que la utilizada para los cortes de tejidos.

Reacciones de control: a) modelos de poliacrilamida sin homogeneizado que fueron incubados simultáneamente con los modelos enzimáticos para comprobar la ausencia de precipitados de plomo inespecíficos.

b) Modelos de poliacrilamida con homogeneizado, inhibidos inespecíficamente con ácido tricloroacético al 1% durante 10 minutos antes de la incubación.

c) Incorporación de fluoruro de sodio, 0,01 M en el medio de incubación, para inhibir específicamente la fosfatasa ácida.

Microespectrofotometría: las medidas fueron realizadas en un Cytoscan Zeiss con platina de barrido. Con uno de los modelos de poliacrilamida fue realizado previamente un espectro de absorción entre 470 y 660 nm. Como vemos

en la figura 1, no hay un pico definido de absorción, por lo que decidimos efectuar las medidas a 550 nm. Las determinaciones microespectrofotométricas fueron efectuadas por medio de barridos programados en meandro, sobre áreas de $150 \times 150 \mu$. La magnificación total fue de 60 x. Los valores finales fueron registrados como la integral de las densidades ópticas obtenidas durante el barrido. En la corteza renal fueron medidas zonas tomadas al azar, mientras que en los cortes de próstata fueron medidas las zonas de los acinos. Todos los experimentos fueron repetidos 5 veces, tomando un filme o un corte diferente cada vez y barriendo en él una sola área de $150 \times 150 \mu$. Cada punto de las curvas obtenidas correspondieron a los valores automáticamente integrados durante el barrido del "spot" luminoso sobre el área elegida. Para cada experimento fue calculado el coeficiente de correlación lineal.

Fue encontrada una correlación lineal entre las medidas microespectrofotométricas y los tiempos de incubación en todos los modelos. En la figura 2 aparecen los valores obtenidos de la corteza renal y la próstata. En los modelos de poliacrilamida la relación lineal fue demostrada usando una cantidad fija de homogeneizado incorporado, incubado durante diferentes períodos. Esta correlación fue mantenida hasta los 60 minutos de incubación. Después de este tiempo, las densidades ópticas se hacen demasiado altas para ser registradas sin error por el microfotómetro.

La posibilidad de que el tiempo de incubación intensificara la tinción inespecífica de la poliacrilamida fue investigada incubando simultáneamente modelos con y sin homogeneizado incorporado. En los modelos sin homogeneizado fue obtenida una lectura de fondo constante en todos los tiempos de incubación (Fig. 3).

Bioquímicamente, las determinaciones de la extinción (actividad de fosfatasa ácida) en función de la concentración del homogeneizado de próstata en volúmenes fijos de agua destilada, indicaron una relación lineal (Fig. 4). Del mismo modo, las medidas microespectrofotométricas de la reacción histoquímica de los filmes de poliacrilamida fueron proporcionales a las cantidades de homogeneizado incorporado a los mismos (Fig. 4 b). El coeficiente de correlación lineal fue $r = 0,996 - 0,999$; $p \neq 0,001$ en todos los casos.

Finalmente, el agregado de fluoruro de sodio al medio de incubación evitó la coloración de los filmes de poliacrilamida, obteniendo de ellos medidas fotométricas constantes, independientes de los tiempos de incubación (Fig. 5).

En estos experimentos la relación lineal entre densidades ópticas y concentraciones enzimáticas parecen suficientes para justificar las lecturas microespectrofotométricas directas del precipitado de sulfuro de plomo. En nuestra opinión, la especificidad de la reacción para la fosfatasa ácida queda probada por la inhibición del fluoruro de sodio y por las determinaciones bioquímicas, para las cuales fue empleado un método corrientemente utilizado en la práctica médica. Los equipos que pueden barrer áreas extensas con un pequeño "spot" luminoso son muy útiles para la eliminación del error distribucional, que es una de las fuentes de error más importantes en la medición de precipitados no homogéneos, como el del sulfuro de plomo, ya que es imposible aplicar el método de la doble longitud de onda, debido a que las extinciones son similares en un rango amplio del espectro.

- 1.- Ris, H. y Mirsky, A., J. Gen. Physiol., 33:125, 1949.
- 2.- Abrahamson, D. et al., J. Histochem. Cytochem., 17:107, 1969.
- 3.- Cabrini, R.L. et al., Acta Histochem., 34:287, 1969.
- 4.- Itoiz, M.E. et al., J. Periodont. Res., 7:14, 1972.
- 5.- Klein-Szanto, A.J.P. y Cabrini, R.L., Arch. Dermatol. Res., 243:226, 1972.
- 6.- Andersh, M. y Szczpanski, A., Am. J. Clin. Path., 17:571, 1947.
- 7.- van Duijn, P. et al., J. Histochem. Cytochem., 15:631, 1967.

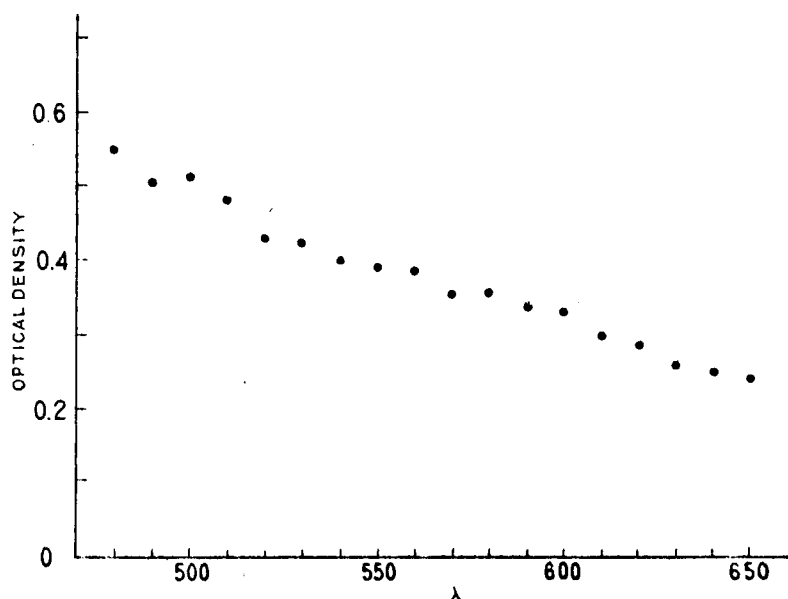


Figura 1.- Espectro de absorción de la reacción para fosfatasa ácida (20' de incubación) en un filme de poliacrilamida a la cual le fue incorporado igual cantidad de homogeneizado de próstata, antes de la polimerización.

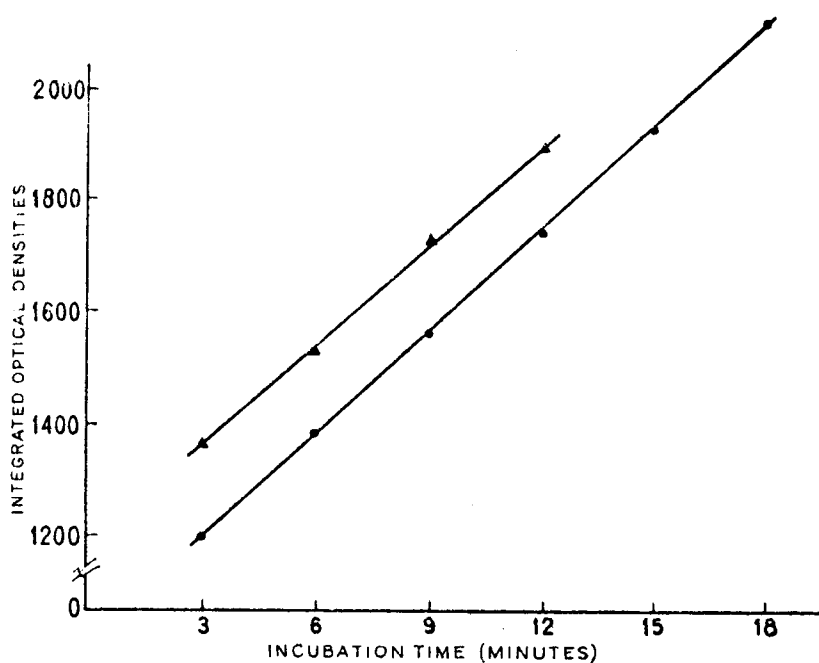


Figura 2.- Fosfatasa ácida en cortes de próstata (▲) y riñón (●). Valores integrados de densidad óptica en función de los tiempos de incubación.

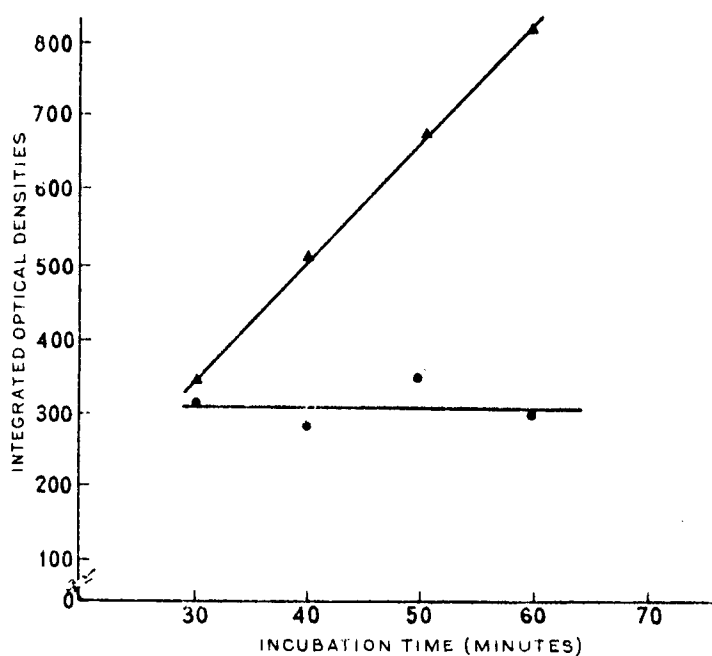


Figura 3.- Reacción para fosfatasa ácida en modelos de poliacrilamida, incubados entre 30 y 60 minutos. Las medidas microespectrofotométricas muestran una relación lineal entre densidades ópticas y tiempos de incubación en los filmes con homogeneizado incorporado (▲). Los controles sin homogeneizado (●) dan una lectura de fondo constante.

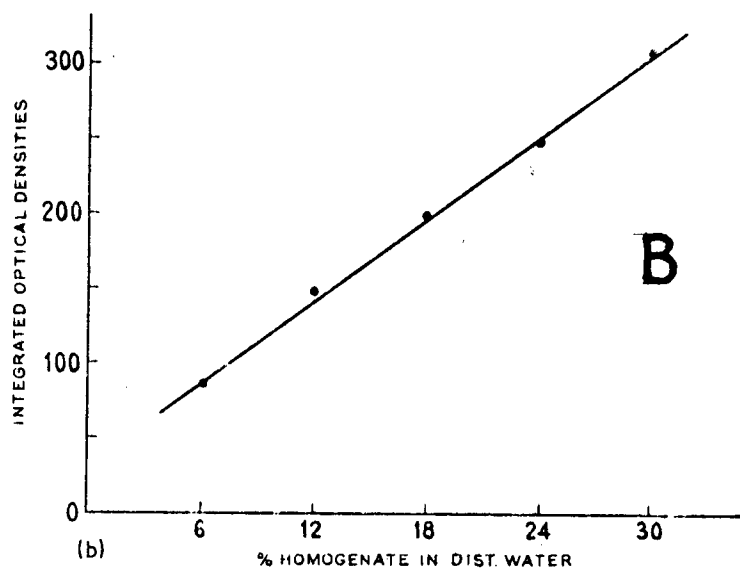
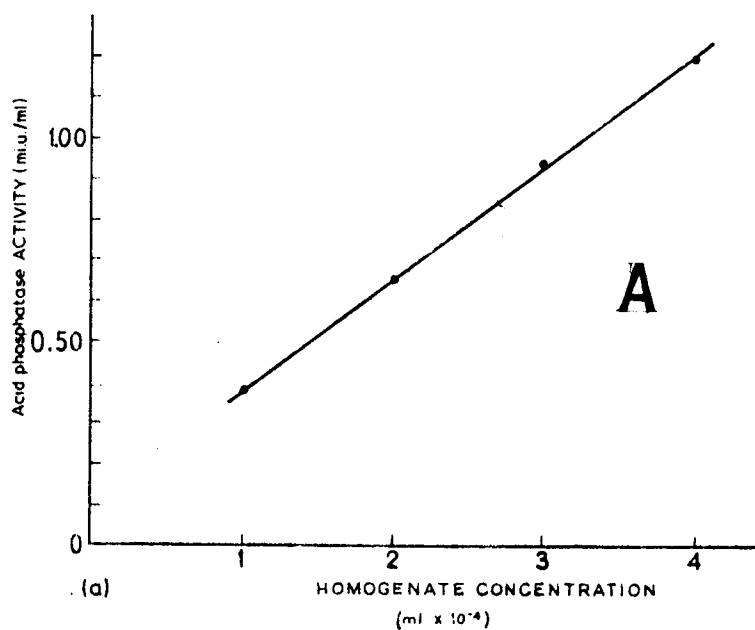


Figura 4.- A: Análisis bioquímico de la fosfatasa ácida en concentraciones crecientes de homogeneizado en agua destilada.

B: Valores microespectrofotométricos obtenidos de los modelos de poliacrilamida con concentraciones variables de homogeneizados de próstata.

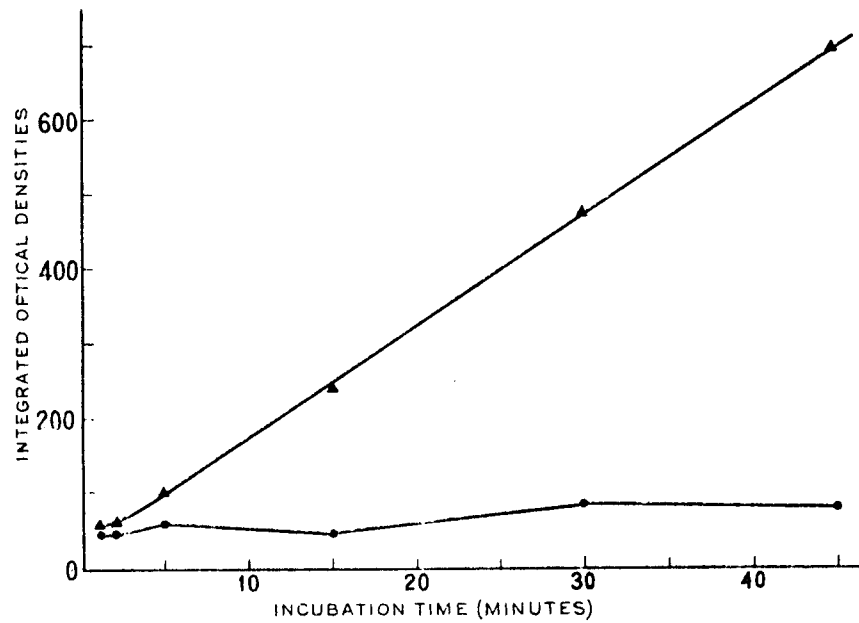


Figura 5.- Reacción para fosfatasa ácida en modelos de poliacrilamida con la misma actividad, incubados durante 1 a 45 minutos. La linealidad de las medidas se observan después de los 5 minutos de incubación (▲). Los modelos incubados con cloruro de sodio dan lecturas constantes en todos los tiempos (●).

F. 19. Cuantitación de esterasas inespecíficas "in situ"

R.L. Cabrini, A.C. Frasch y M.E. Itoiz.

Suero bovino no hemolizado, conservado a -20°C fue utilizado como fuente de enzima y para demostrar la presencia de arilesterasa y aliesterasa en el mismo (3650 IU) fue usado el método bioquímico de Burlina y Galzigna (1).

Los modelos usados para la demostración histoquímica estaban compuestos por una solución con diferentes concentraciones de suero, de acrilamida al 7,5 % en buffer fosfato 0,1 M pH 7,2. Esta solución fue polimerizada entre dos vidrios con espaciadores de $240\ \mu$ de espesor y a continuación fue aplicada la técnica histoquímica de Gomori para la demostración de esterasas inespecíficas (2).

Las medidas microespectrofotométricas fueron realizadas en un Cytoscan Zeiss a una magnificación total de $\times 14,5$ y a una longitud de onda de 540 nm, previamente determinada mediante un espectro de absorción.

La figura 1 muestra el producto formado en función del tiempo de incubación para cada una de las concentraciones de suero utilizadas, mientras que la figura 2 muestra la relación lineal existente entre las concentraciones de suero usadas y la velocidad de la reacción. Estos resultados indican la validez de la cuantitación microespectrofotométrica de esta reacción. El método histoquímico dio una respuesta lineal entre los 9 y 22 minutos de incubación en nuestras condiciones experimentales. Tiempos de incubación menores producen reacciones no lineales debido probablemente a la dificultad en la penetración del sustrato en los modelos de poliacrilamida.

En el método histoquímico utilizado fue calculada la velocidad de la reacción por minuto entre los 9 y 22 minutos.

- 1.- Burlina, A. y Galzigna, L., Clin. Chim. Acta, 39:255, 1972.
- 2.- Gomori, G., Microscopic histochemistry, principles and practice. The University of Chicago Press, Chicago, 1952.

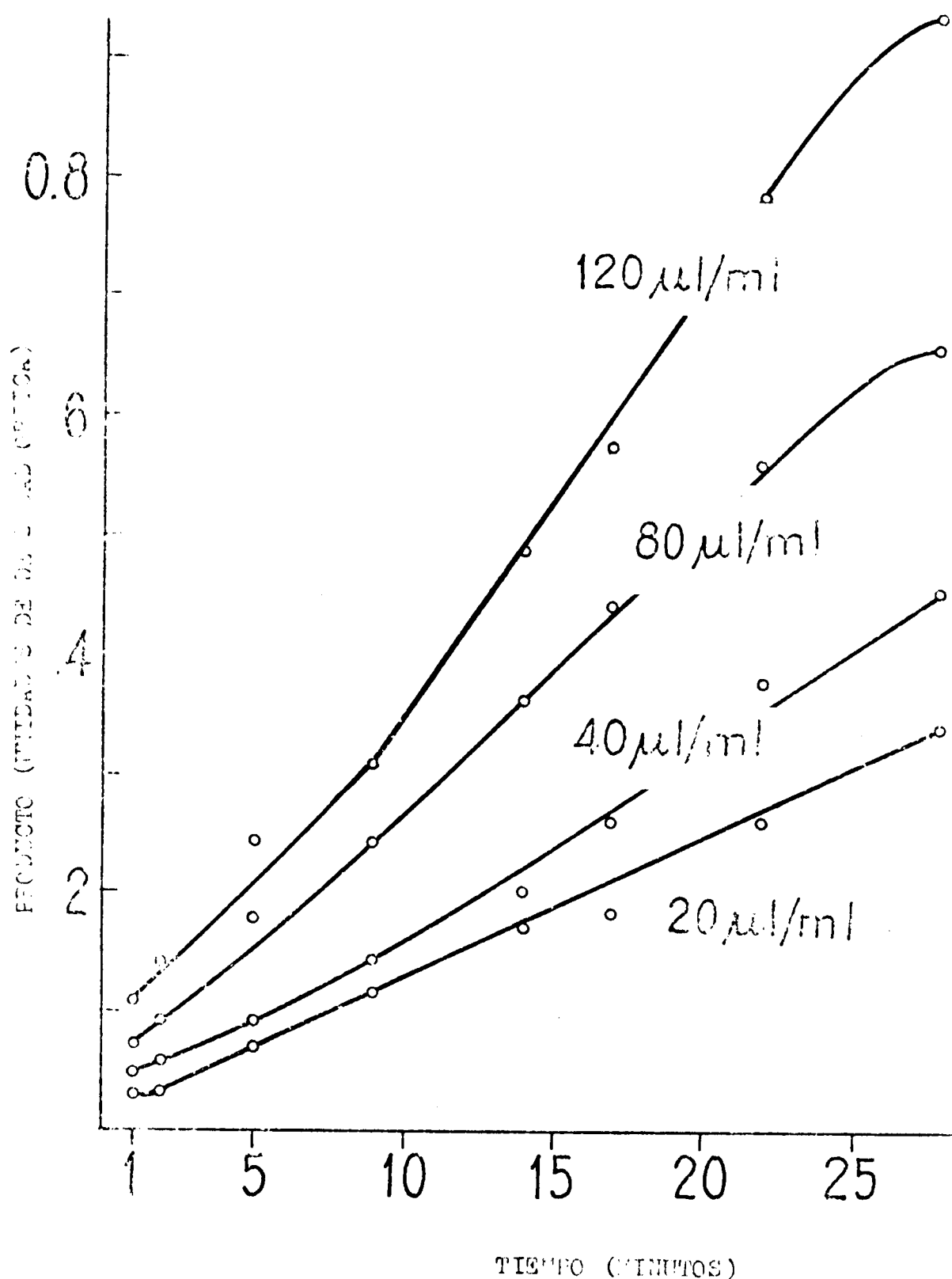


Figura 1.- Medidas microespectrofotométricas del producto formado en función del tiempo de incubación. Modelos de poliacrilamida con diferentes concentraciones de suero, en los que fue realizada la técnica de Gomori para la demostración de esterasas inespecíficas.

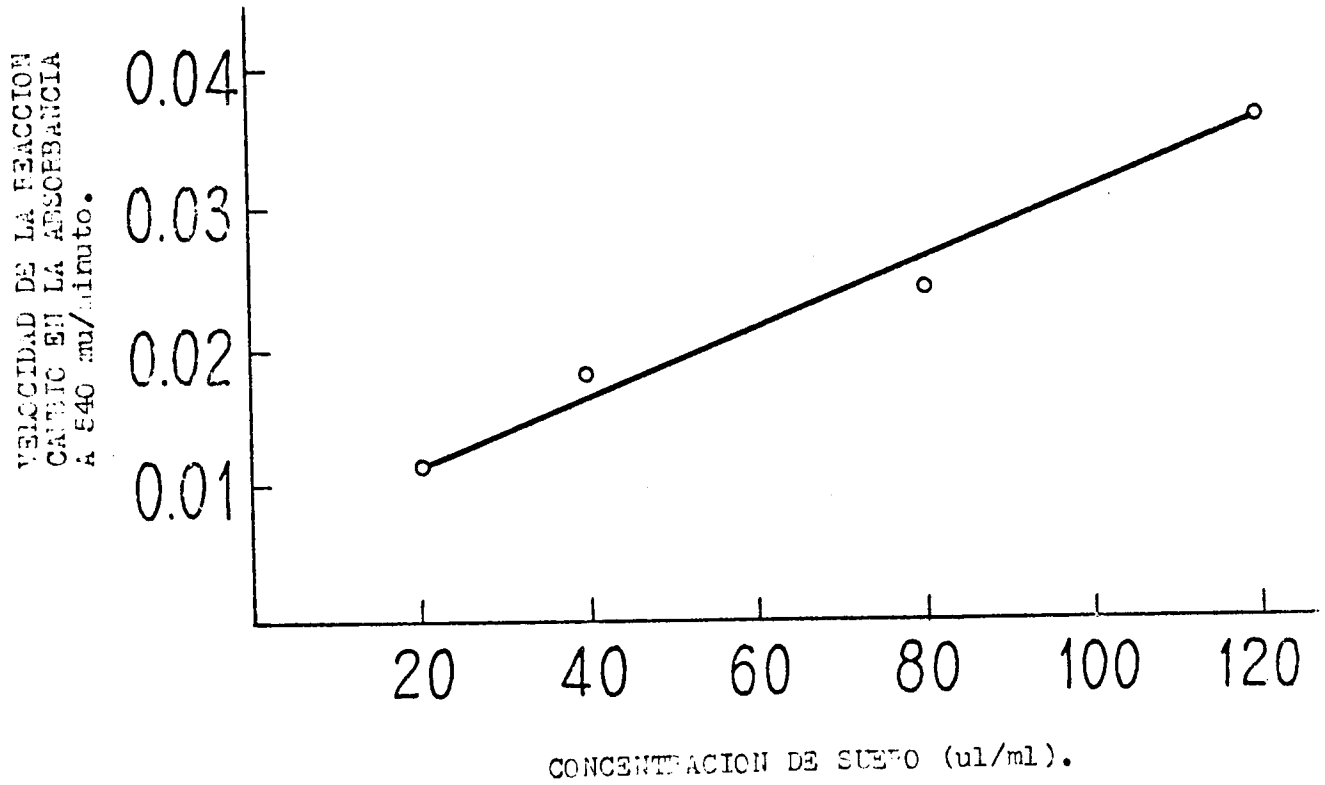


Figura 2.- Velocidad de la reacción histoquímica en función de la concentración de suero utilizado en los modelos de poliacrilamida.

F. 20. Cuantitación autorradiográfica por métodos microfotométricos.

A.M. Ubios y R.L. Cabrini,

La evaluación cuantitativa de las imágenes autorradiográficas es de particular importancia para la interpretación de las mismas. Dado que los métodos tradicionales de cuantitación autorradiográfica son imprecisos y tediosos (1), hemos adaptado el uso del microespectrofotómetro Cytoscan Zeiss a tales fines.

Fueron utilizados tres tipos diferentes de material sensible: Stripping Film ARIO, Emulsión NTB3 y película fotográfica positiva, determinando el tamaño de los granos de cada una de ellas. Para las mediciones microfotométricas fue utilizado el microespectrofotómetro Cytoscan Zeiss. En cada área medida fue hecho el recuento del número de granos, calculando la correlación entre el número de granos respecto a las medidas obtenidas con el aparato. También fueron utilizados microautorradiografías de cortes de piel, coloreados con hematoxilina-eosina, provenientes de animales inyectados con diferentes actividades iniciales de timidina tritiada: 1 - 5 - 10 y 30 $\mu\text{C/gr}$ de peso. En todos los casos el tiempo de exposición fue de 14 días. Condiciones de medida: longitud de onda 450 μ ; objetivo de inmersión; diagrama de salida.

El tamaño de los granos resultó ser de uniformidad aceptable para cada uno de los materiales sensibles investigados: Stripping Film $0,5 \mu \pm 0,1$; emulsión $0,6 \mu \pm 0,1$ y película fotográfica $0,6 \mu \pm 0,1$. Para un área de medida de $64 \mu^2$ con objetivo de inmersión, el aparato comienza a discriminar a partir de la presencia de 8 granos por campo, haciendo entonces las medidas proporcionales al número de granos para cada uno de los materiales estudiados: Film fotográfico $r = 0,963$ $p < 0,001$; Stripping Film $r = 0,951$ $p < 0,001$; emulsión $r = 0,975$ $p < 0,001$. Las medidas obtenidas de corte de piel, para un mismo tiempo de exposición, demostraron ser proporcionales a la actividad inicial inyectada, tanto en las medidas fotométricas como en el recuento de gránulos (Tabla 1).

La regularidad del tamaño de los granos avala la fidelidad de respuesta de la medida microfotométrica. Los métodos autorradiográficos cuantitativos se han apoyado en la respuesta de cada grano revelado en relación a la radioactividad presente (2). Las medidas obtenidas de radioautografías de cortes de piel han demostrado la proporcionalidad de la medida microfotométrica respecto a la actividad inicial inyectada. Estos resultados están de acuerdo con los de un trabajo anterior (3), en el que fue comparada la respuesta autorradiográfica (recuento de granos) con medidas obtenidas en un contador de centelleo líquido. La proporcionalidad de la medida microfotométrica respecto al número de granos presentes en el mismo campo, asegura la validez del método propuesto, que, además, cuenta con la ventaja de ser rápido y sensible. Resulta muy interesante la posibilidad que brinda el microfotómetro de medir autorradiografías, donde las características de localización del compuesto marcado (como ^{32}P , ^{18}F e histidina tritiada) hace muy difícil otro tipo de cuantitación. Dado que con el método propuesto se elimina el factor personal, la medida además de más rápida se hace más confiable, por lo que lo postulamos como método de rutina, estableciendo en cada caso previamente las condiciones óptimas de medición.

- 1.- Rogers, A.W., Technique of autoradiography. Elsevier Publishing Co., pág. 137, Amsterdam, 1969.
- 2.- Herz, R.H., Lab. Invest., 8:71, 1959.
- 3.- Ubios, A.M. y Cabrini, R.L., Int. J. Appl. Rad. Isotopes., 24:311, 1973.

TABLA 1
Tiempo de exposición : 14 días

	1 C	5 C	10 C	30 C
% Transm.	86,45 ± 5,83	79,25 ± 8,02	68,20 ± 7,69	49,30 ± 12,57
Nºde granos	5,83 ± 2,40	12,65 ± 3,85	17,20 ± 4,12	25,20 ± 5,30

Las medidas obtenidas de cortes de tejidos provenientes de animales marcados con diferentes actividades iniciales de timidina tritiada, demostraron que para un mismo tiempo de exposición, la marcación es proporcional a la actividad inyectada y que las medidas obtenidas con el microfotómetro, expresadas en % de transmitancia están en relación al número de granos presentes sobre cada núcleo.

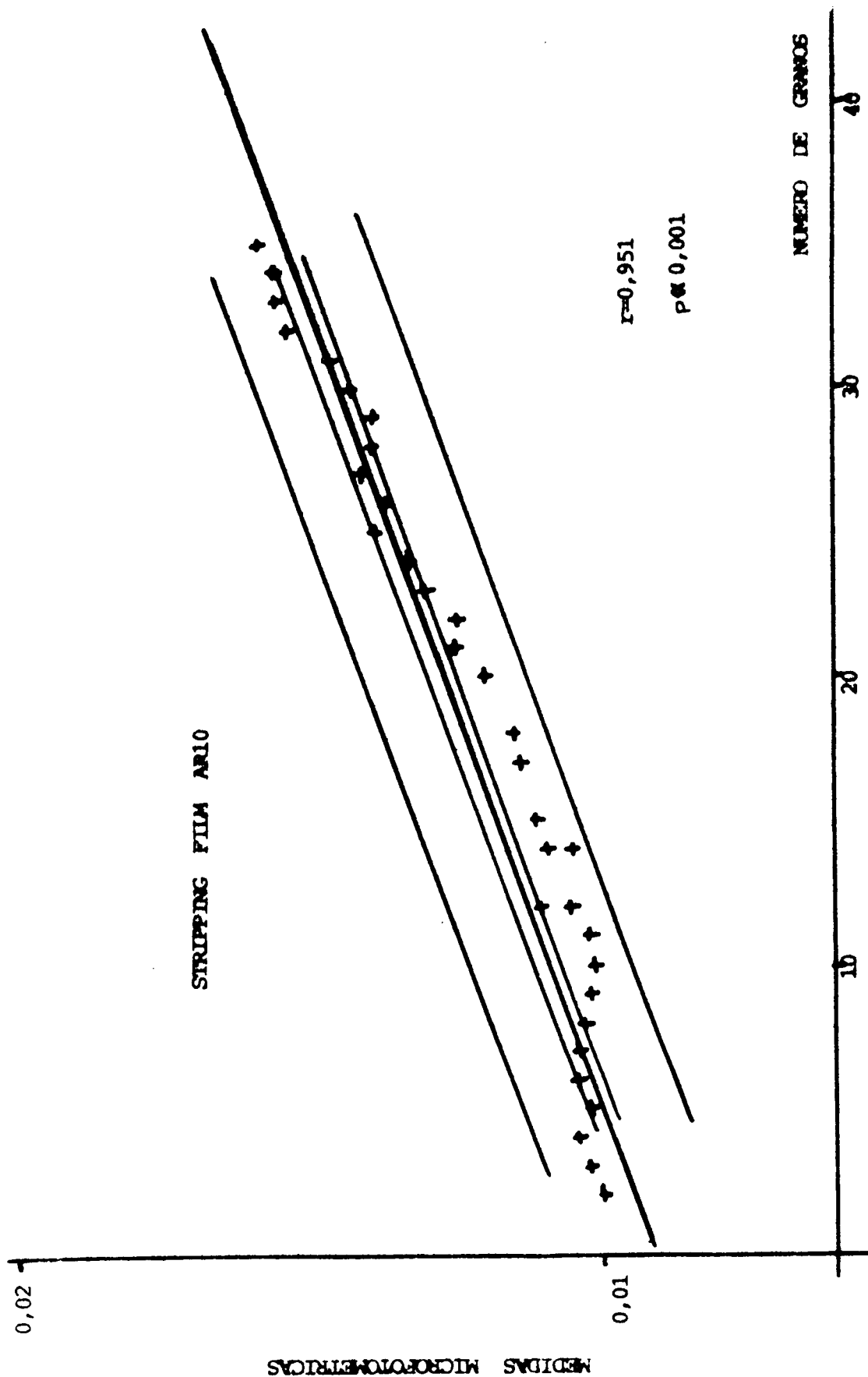


Figura 1.- Representación gráfica de la correlación entre las medidas microfotométricas (expresadas como la inversa de la transmitancia) y el número de granos, correspondiente a un área de medida de $64 \mu^2$. En este caso corresponde a Stripping Film AR 10, Emulsión NTB3 y filme fotográfico positivo, que mostraron valores de correlación semejantes.

F. 21. Localización de ^{32}P mediante métodos autorradiográficos.

A.M. Ubios, F.S. Silberman*, R.L. Cabrini, F.F. Miranda** y O. Degrossi**

Entre los numerosos isótopos radioactivos utilizados con fines terapéuticos, el ^{32}P en forma de fosfato crómico coloidal (CROP) (1), ha sido propuesto para el tratamiento de las osteoartritis humanas, razón por la cual consideramos de importancia el conocimiento de la real localización del isótopo en las diferentes zonas de la superficie articular.

A tal fin fueron utilizadas ratas Wistar de 300 gr de peso, a las cuales les fue inyectado ^{32}P en la cavidad articular de sus rodillas, sacrificándolas en grupos, luego de 1, 14 y 28 días. También fueron usados perros, uno de cuyos grupos había sido operado, para provocar artrosis experimental, en una de sus rodillas, inyectándoles a los 30 días post-operación 1 mC de ^{32}P . A otro grupo de perros considerados como controles, también les fue inyectado 1 mC de ^{32}P . En ambos casos los animales fueron sacrificados 14 días después de haberles sido aplicada la inyección.

En muestras equivalentes de sinovial, menisco y cartílago de platillo y cóndilo, fueron efectuadas mediciones de actividad en un contador de pozo. Fueron tomadas macroautorradiografías de las ratas y microautorradiografías de las ratas y los perros, efectuando medidas microfotométricas con un Cytoscan marca Zeiss.

Las medidas de actividad de sinovial, menisco, platillo y cóndilo, demostraron la prevalencia de la captación de ^{32}P por la sinovial respecto de las otras piezas medidas, tanto en los perros artrósicos como en los normales (Tabla I).

En las ratas fueron observados algunos cambios histológicos aislados: cuadros inflamatorios crónicos, presencia de vasos neoformados, células xantomatosas en la sinovial y degeneración mixoide de la médula. En los perros testigos no fueron encontrados cambios histológicos atribuibles a la acción del ^{32}P (CROP); los perros operados mostraron las alteraciones típicas de la artrosis.

Las macroautorradiografías evidenciaron la presencia de isótopos dentro de la cavidad articular, tanto en los animales sacrificados el día de la inyección, como los sacrificados a los 14 y 28 días después de la misma.

Las microautorradiografías de los animales normales (perros y ratas) mostraron el depósito del ^{32}P (CROP), prácticamente en toda la superficie sinovial y con menor intensidad en los macrófagos del interior del tejido (Fig. 1). Las microautorradiografías de los perros artrósicos evidenciaron una muy intensa marcación a nivel de la superficie sinovial, en forma de depósitos irregulares y en células macrofágicas del interior de las vellosidades cercanas a los vasos. Sobre las superficies cartilaginosas dañadas también pudo ser visto el depósito del isótopo. Medidas microfotométricas demostraron una relación 3:1 entre las medidas efectuadas en la sinovial con respecto a las del cartílago.

Los hallazgos histológicos indican que la dosis de ^{32}P empleadas en perros producen daño histológico al cabo de 14 días. En las ratas, probablemente debido a que las dosis inyectadas son mayores, hemos encontrado algunos cuadros histológicos atribuibles a la acción del isótopo radioactivo.

Las medidas de actividad realizadas con el centelleador de pozo demostraron la mayor captación del ^{32}P por la sinovial, respecto a las otras zonas estudiadas, tanto en los animales operados como en los que sirvieron como control.

* Cátedra de Traumatología y Ortopedia, Fac. de Medicina, U.B.A.

** Centro de Medicina Nuclear.

El método autorradiográfico nos ha permitido determinar con adecuada precisión la localización del isótopo, ya que fue detectado no sólo sobre la superficie de la membrana sinovial, sino en los macrófagos del interior del tejido. Es interesante señalar la menor intensidad de la marcación de los macrófagos a medida que se alejan de la superficie, imágenes equivalentes en perros y ratas. Un hallazgo significativo por las posibles implicancias de su uso en la terapéutica, es la presencia del isótopo sobre la superficie cartilaginosa, encontrada en los animales artrósicos y la gran cantidad de células marcadas dentro de las vellosidades.

Nuestras experiencias podrían llegar a permitir determinar el grado de confianza o peligro (2) que pueda ofrecer el uso del ^{32}P (CROP) y su transferencia en el tratamiento de las osteoartritis humanas, como así también el probable mecanismo de acción sobre las mismas.

- 1.- Anghileri, L.J., "La distribución del fosfato crómico coloidal (P-32) en ratones. Influencia del tamaño de las partículas". Informe C.N.E.A.: pág. 158, 1965.
- 2.- Dyson, E.D., Health Phys., 12:1521, 1966.

TABLA I

	Sinovial	Menisco	Cóndilo	Platillo
	porcentajes			
Animales no operados	53,11	15,97	18,46	16,33
Animales operados	68,43	3,98	2,38	24,31

F. 22. Puesta a punto de técnicas de cultivos de piel para uso radiobiológico
C.J. Conti y C. Pardini,

En los últimos años han sido realizados en nuestro departamento una serie de trabajos sobre la morfología y fisiología de epitelios irradiados, utilizando en todos los casos modelos "in vivo".

Con el fin de diferenciar los efectos directos de las radiaciones ionizantes sobre la piel, de aquellos efectos que pudieran haberse producido indirectamente (a través de daño vascular, edema, etc.) hemos considerado la posibilidad de introducir sistemas de cultivo de piel "in vitro" en nuestros laboratorios.

Técnicas de cultivo: tres técnicas fundamentales fueron utilizadas:

a) explantes libres; b) explantes fijados mediante coágulo y c) células libres.

a) Explantes libres (cultivo de órgano): fueron usadas diferentes técnicas, pero todas ellas fueron llevadas a cabo manteniendo -mediante diferentes procedimientos - los explantes en la interfase gas-medio, con el fin de lograr una buena oxigenación de las células epidérmicas.

b) Explantes fijados mediante coágulo: pequeños trozos de piel fueron fijados en el fondo del frasco de cultivo mediante un coágulo (los coágulos se forman mezclando 50:50 de plasma de pollo y extracto embrionario). El coágulo fue cubierto con el medio de cultivo. Las células migran desde los márgenes del explante y se fijan en la superficie del frasco.

c) Células libres: la epidermis fue separada de la dermis mediante incubación con tripsina; posteriormente los queratinocitos fueron liberados de la epidermis mediante un tratamiento mecánico. Las células libres fueron sembradas en un frasco apropiado y cubiertas con el medio de cultivo.

Resultados:

a) Explantes libres: este tipo de cultivo tuvo un comportamiento muy diferente, que dependió del material empleado (humano, rata, etc.). La mayoría de las experiencias fueron realizadas en ratas teniendo en cuenta que este fue el animal utilizado en las experiencias "in vivo". Sin embargo esta no fue una buena elección, debido a que los explantes de piel de rata mostraron cambios degenerativos después de algunas horas de incubación, que no pudieron ser retrasados usando diferentes medios de cultivo, distintos sueros, ni mediante sobreoxigenación del cultivo. Tampoco la adición de corticoides fue efectiva.

Por otra parte, este tipo de cultivo desarrolla una rápida migración de células epidérmicas, las cuales rápidamente engloban todo el explante, lo que reduce su intercambio de gas y nutrientes. Este fenómeno llamada epibolia, pudo ser visto aún antes de 24 horas.

Los explantes de ratón tuvieron un comportamiento similar al de la rata. Los cultivos humanos y de pollo embrionario fueron más resistentes, mostrando pocos cambios degenerativos después de varios días de cultivo.

b) Explantes fijados mediante coágulo: los explantes de rata y ratón mostraron una importante migración celular; sin embargo las células epidérmicas fueron rápidamente desplazadas por fibroblastos dérmicos.

c) Células libres: las células epidérmicas de rata tienden a confluir, formando "monolayer" de células poliédricas después de 24-48 horas "in vitro". Los fibroblastos - cuando estuvieron presentes - fueron fácilmente

identificados dado sus características morfológicas.

En el laboratorio han sido mantenidos queratinocitos en cultivo durante varias semanas, en buen estado y mostrando figuras mitóticas en la mayor parte de los casos.

El suero fetal parece ser un factor esencial en este tipo de cultivo, ya que con suero bovino o equino fueron obtenidos resultados muy pobres. Por otra parte, no hemos encontrado diferencias entre cultivos realizados sobre superficies de vidrio o plásticas.

F . 23. Microscopía electrónica de cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*

W. F. Kirschbaum

El estudio de cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster* mediante microscopía electrónica con fines citogenéticos, estaba condicionado a que antes fuera ideada y desarrollada una técnica que reuniera las siguientes características:

- 1.- Que con un extendido de cromosomas politénicos incluidos en material seccionable, pueda ser obtenido el material suficiente para estudiar un caso determinado, con una cantidad suficiente de reserva que permita repetir el estudio o efectuar otros, posteriormente.
- 2.- La posibilidad de seleccionar con microscopía óptica el cromosoma o región de cromosomas incluidos.
- 3.- Que permita obtener cortes (seccionados en su totalidad) paralelos al eje, de por lo menos un brazo bien estirado, de cromosoma o de una región que contenga parte de varios cromosomas.

M. Sorsa (1) y D. Berendes (2) obtuvieron cortes extendidos de cromosomas politénicos, pero que abarcaban únicamente parte de los mismos, estando éstos sólo parcialmente estirados. Por lo tanto, para la finalidad perseguida dichas técnicas no pudieron ser utilizadas. La técnica desarrollada por nosotros consiste en obtener extendidos de cromosomas entre dos cubre-objetos siliconados, utilizando orceína lacto acética. Luego los cubre-objetos son despegados con nitrógeno líquido, efectuando una nueva fijación, deshidratando con alcohol metílico y coloreando con acetato de uranilo en solución alcohólica en bloque. Después de la inclusión en resina Epon, el cubre-objeto debe ser pegado con la misma resina sobre una placa de varios milímetros de espesor de Epon; una vez polimerizado separamos el vidrio del cubre-objeto con nitrógeno líquido, quedando los cromosomas extendidos pegados sobre la placa de Epon. Finalmente, con microscopía óptica, pueden ser elegidos los cromosomas bien estirados que se deseen, que se mantienen visibles por conservar la coloración de la orceína, recortándolos y confeccionando tacos con ellos. Los cortes ultrafinos deben ser realizados con sumo cuidado puesto que únicamente los 6 primeros cortes contienen cromosomas, debido a la extrema delgadez de los mismos. Montando los cortes efectuados sobre grillas para cortes seriados pueden ser obtenidas imágenes que abarcan la totalidad del brazo del cromosoma, manteniendo la continuidad ininterrumpida de las estructuras, lo que permite un análisis sin confusión de zonas y de secuencia de bandas.

Anteriormente había sido desarrollada una técnica colocando sobre el cubre-objeto una capa de carbón (3) para facilitar el despegue del cubre de la placa de Epon, pero el carbón impedía un buen extendido de los cromosomas a pesar de que el mismo era realizado con porta-objetos siliconados y solamente el cubre llevaba una capa de carbón con el cual era seguido el proceso. Los cromosomas estirados en un máximo son los que muestran una mejor resolución de bandas de los mismos.

El resultado del análisis submicroscópico, comparado con los esquemas patrón obtenidos por microscopía óptica, demuestran que solamente la tercera parte de las bandas dobles puede ser considerada como tales, en el brazo del cromosoma 2R y la décima parte en el cromosoma 4. Ello es debido a que por microscopía electrónica únicamente pueden ser considerados dobles las bandas que además de encontrarse separadas, mantienen zonas de contacto entre sí, no pudiendo

ser clasificadas como tales por su mayor o menor grosor. A su vez, no se encuentra una coincidencia completa de bandas entre los esquemas patrón y los resultados del análisis con microscopía electrónica. Por ejemplo, encontramos una banda adicional a nivel submicroscópico en la zona 60F del brazo de cromosoma 2R.

Referencias

- 1.- Sorsa, M., Ann. Acad. Sci., fenn., Ser. A, IV Biol., 151:1, 1969.
- 2.- Berendes, H.D., Chromosoma, 29:118, 1970.
- 3.- Kirschbaum, W.F. y Fromme, H.G., Drosoph. Inf. Serv., 50:, 171, 1973.

SECCION IRRADIACION Y DOSIMETRIA

G. 1. Actividades - Años 1975-1976

E.J. de Aisenberg y D. Prahic.

La tarea de esta Sección fue irradiar material biológico de interés para distintos grupos de investigación con dosis pre-fijadas de radiación X y Beta, mediante un equipo de radioterapia profunda "Philips" 250/15 y una fuente emisora Beta de ^{90}Sr .

Durante el período mencionado fueron realizadas los siguientes tipos de irradiaciones:

A) Total de animales

a) Hamsters: # Condiciones: 200 Kv/8 mA/D.F.O.: 49 cm/0,5 mmCu-1,0 mmAl/
H.V.L. = 1,4 mmCu/E.E. = 87 keV.

Dosis solicitada: 600 rad a 800 rad.

Nº de animales: 290

Finalidad: los Hamster fueron totalmente irradiados con el objeto de obtener la inmunodepresión e investigar en los animales su comportamiento frente a la infección viral y transplante de células heterólogas.

b) Ratas Wistar:

Condiciones: 200 Kv/8 mA/49 cm/0,05 Cu-1,0 Al/1,3 keV.
220 Kv/ 10 mA/49 cm/0,25 Cu-1,0 Al/83 keV.

Dosis solicitadas: 500 rad a 1.000 rad.

Nº de animales: 100.

Finalidad: Irradiación efectuada con el objeto de obtener la inmunodepresión. Uno de los estudios pos-irradiación está dirigido a determinar diferentes parámetros del metabolismo de ^{131}I o ^{125}I .

c) Ratones:

Condiciones: 200 Kv/15 mA/55,5 cm/0,5 Cu-1,0 Al/H.V.L. =
1,4/87 keV.

200 Kv/8 mA/36,5 cm/0,5 Cu-1,0 Al/H.V.L. = 1,4/87 keV.

Dosis solicitadas: 175/400/500/700 rad.

Nº de animales: 730

Finalidad: Cepas C3H, B.A.L.B. y C.F.W. fueron irradiadas para inmunodeprimir. La cepa C57/Bl fue irradiada con el objeto de investigar los mecanismos de la leucemia radioinducida, con dosis fraccionadas de 175 rad una vez por semana, durante 4 semanas.

B) Local de animales

a) Lengua de rata Wistar:

Condiciones: 230 Kv/13 mA/D.F.O.: 24 cm/0,25 Cu/1.041-90 keV.

Dosis solicitada: 4.000 rad.

Nº de animales: 11

Finalidad: Investigar el comportamiento del epitelio irradiado.

b) Planta de pata y colas de ratas Wistar recién nacidas y jóvenes:

Condiciones: 230 Kv/14 mA/D.F.O.: 24 cm/50 keV.
230 Kv/14 mA-0,25 Cu-1,0 Al/23,5 cm/83 keV.

Dosis solicitada: 4-8-16-32 Krad.

Nº de animales: 420

Finalidad: investigar el comportamiento de la epidermis irradiada.

c) Cabeza y columna de Hamster:

Condiciones: 200 Kv/8 mA/D.F.O.: 28,5 cm/0,5 Cu-1,0 Al/
H.V.L. 1,4 mmCu/EE:87 keV.

Dosis solicitada: 800 rad

Nº de animales: 8

Finalidad: ver punto d).

d) Timo de ratones recién nacidos:

Condiciones: 220 Kv/12 mA/D.F.O.: 30 cm/0,25 Cu-1,0 Al/
1,2 mm Cu H.V.L./EE: 83 keV.

Dosis solicitada: 600-800-2.000-4.000 rad.

Nº de animales: 72

Finalidad: Timectomizar por irradiación ratones de la cepa C.F.W. e investigar su efecto al transplante de tejidos. La misma finalidad tuvo la irradiación de médula ósea de Hamsters.

e) Tiroides de ratas Wistar adultas:

Condiciones: 220 Kv/10 mA/D.F.O.: 21 cm/0,25 mmCu-1,0 Al/
H.V.L.: 1,2 mmCu/EE: 83 keV.

Dosis solicitada: 10 Krad

Nº de animales: 120

Finalidad: Con el objeto de estudiar el efecto de la irradiación sobre parámetros bio-químicos y fisiológicos tiroideos, fueron irradiadas ratas Wistar con localización tiroidea, con dosis de 10 Krad y tiroides de ratas y cortes de tiroides bovina con 1 Krad (ver punto b). Los estudios "in vivo" están dirigidos a determinar $\neq$ parámetros del metabolismo del ^{131}I y ^{125}I .

f) Herida de lomo de ratas Wistar adultas:

Condiciones: 230 Kv/15 mA/D.F.O.: 19 cm/0,25 Cu-1,0 Al/
H.V.L.: 1,50 mm Cu/EE:90 keV.

Dosis solicitada: 6 Krad.

Nº de animales: 37

Finalidad: Investigar el comportamiento de la epidermis en heridas irradiadas.

C) Insectos:

a) Drosophila:

Condiciones: 200 Kv/10 mA/D.F.O.: 37 cm/1,0 mm Al/H.V.L.: 7,6 mmAl/EE:50 keV.

Dosis solicitadas: 1-2 y 3 Krad

Cantidad: 43 recipientes

Finalidad: I) Irradiación a temperatura ambiente con 2 Krad: machos con pre-tratamientos de hidroxitolueno butilado (B.H.T.) para determinar el posible efecto protector, estudiando translocaciones letales recesivos ligados al sexo y muerte embrionaria.

II) Machos con pre-tratamiento con cloranfenicol para estudiar la influencia de este antibiótico en la tasa final de aberraciones cromosómicas recuperadas. Temperatura ambiente; 3 Krad.

III) Temperatura ambiente y frío (0°C): irradiación de machos para estudiar la influencia de la temperatura en los procesos de ruptura y reunión cromosómica y del daño pre-mutacional.

D) Material biológico "in vitro":

a) Frascos Carrel:

Condiciones: 220 Kv/15 mA/D.O.F.: 29/0,25 mm Cu-1,0 mm Al/H.V.L.: 1,2 mmCu EE:83 keV.

Dosis solicitadas: 3 Krad y fracción de 175-150-300 rad.

Nº de Carrel: 24

Finalidad: I) Fue irradiado cultivo de tejido embrionario en monocapa, de embriones de Hamster y diferentes cepas de ratones ("feeder layer"). Las mismas estuvieron destinadas a facilitar la clonación de células de diferentes líneas celulares utilizadas en la experimentación radiobiológica.

II) Fueron irradiadas líneas celulares con dosis fraccionadas para investigar el efecto de las radiaciones ionizantes a nivel celular.

b) Vaso de precipitado con tiroides bovina y de rata:

Condiciones: 220 Kv/10 mA/D.O.F.: 24 cm/0,25 Cu-1,0 Al/H.V.L.: 1,2 mmCu EE: 83 keV.

Dosis solicitada: 1-10 y 20 Krad.

Nº de vasos: 16

Finalidad: (ver punto B e). Los estudios "in vitro" fueron realizados para determinar la captación de ^{131}I , así como de precursores de la síntesis de proteínas (Leucina 3H).

E) Vegetales

a) Plantas y semillas de cebada:

- # Condiciones: 120 kV/15 mA/D.O.F.: 60 cm/sin filtro/
EE: 33 keV.
- # Dosis solicitada: 750 rad.
- # Finalidad: Irradiadas para inducir mutaciones, con el objeto
de mejorar las especies estudiadas.

b) Citrus:

- # Condiciones: 230 Kv/15 mA/D.O.F.: 38 cm/1,0 Al/H.V.L.: 8,4
m Al/EE: 52 keV.
- # Dosis solicitada: 3-6 y 12 Krad.
- # Finalidad: Idem a)

c) Polen de maíz:

- # Condiciones: 200 Kv/8 mA/D.F.O.: 48 cm/1,0 Al/H.V.L.: 7,6
mm Al/50 keV.
- # Dosis solicitada: 1 Krad.
- # Finalidad: Idem a)

F) Varios

a) Dosímetros de emulsión fotográfica y
dosímetros termoluminiscentes (T.L.D.
de 4°F)

- # Condiciones: Varias.
- # Dosis solicitadas: Placas: 50 mR a 2 R.
Discos: 100 mR a 800 mR.
- # Cantidad: 200 placas y 80 discos
- # Finalidad: Calibración de películas y discos destinados a
dosimetría personal.

Cómputo de horas de irradiación con rayos X

Año	Horas de irradiación	Nº total de irradiaciones
1975	347	178
1976*	272	144

* Hasta el 16 de noviembre

Otras instituciones que usan el Servicio de irradiación

(Años 1975-1976)

Facultad de Odontología, U.B.A.

Facultad de Medicina, U.B.A.

I.N.T.A., Castelar

Saneamiento ambiental. Salud Pública.

Instituto Fitotécnico de La Plata.

Academia Nacional de Medicina.

Instituto de Investigaciones Leprológicas de Rosario (S. Fe).

SECCION BIOTERIO

H. 1. Actividades- Años 1975-1976

El Departamento de Radiobiología cuenta con un bioterio convencional que provee las necesidades de animales a los laboratorios de investigación bio-médica de la CNEA. Para estos fines cuenta en la actualidad con las cepas consanguíneas: A2G/Lab, A/5, Hairless, BALB/eDe, BALB/Ep, BB/Ep, C57BL/Ep, CE/Lab, CF#1/ep, CFW/Ep, C3H/He, DBA/20e, y 101/Re. Además de estas cepas de ratones existen en el bioterio dos cepas híbridas para estudios de histocompatibilidad. En los ratones de cepas consanguíneas se efectúan registros de pedigree, índices de productividad, sexado, destete y marcado.

Además se crían ratas Wistar y hamsters, estos últimos con un escaso porcentaje de animales albinos parciales.

A los efectos de mantener la colonia en óptimas condiciones de experimentación se efectúan los controles sanitarios correspondientes. Estos controles para evitar contaminaciones internas y externas se realizan de acuerdo con las recomendaciones del International Committee for Laboratory Animals y serán también aplicados al control sanitario del Bioterio Libre de Gérmenes Patógenos de la CNEA a habilitarse próximamente.

Aunque el Bioterio no ha sido diseñado con fines comerciales los excedentes de la producción de estos 2 últimos años han sido utilizados por los siguientes Institutos: CITEFA, Hospital Militar Central, CONYCET, Universidad de Buenos Aires, Universidad de Tucumán, Universidad del Litoral, Universidad de La Plata, Gobierno de la Provincia del Chaco, Municipalidad de la Ciudad de Buenos Aires, y numerosas instituciones privadas.

La producción anual del Bioterio durante este período ha sido la siguiente:

Ratones cepas puras(colonia primaria):	15.000
Ratones (colonia multiplicación)	16.000
Ratas Wistar	6.000
Hamsters	1.100

APENDICE

PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE RADIOBIOLOGIA

A. Investigadores

Aisenberg, E.
Altschuler, N.
Antón, D.
Barmach, M.
Cabrini, R.L. (Gerente de Investigaciones)
Capalbo, E.
Cartagenova, R.
Conti, C.J.
Gordon, M.
Kirschbaum, W.F.
Klein-Szanto, A.P.J.
Lombardo, J.H.(*)
Mayo, J.
Mazar Barnett, B.
Muñoz, E.
Orce, L.V. (Jefe de Departamento)
Quintans, C.
Rivelis, G.
Rey, B.M. de
Rodriguez, S.
Scavini, M.
Smolko, E.E.
Valmaggia, R.
Valsecchi, R.
Volco, H.E.

B. Investigadores Asociados (C.O.N.Y.C.E.T.)

Itoiz, M.E.
Giménez, I.B.
Pisarev, M.
Ubios, A.M.

C. Investigadores becados

Bonaba, R. (C.N.E.A., Uruguay)
De Micheli, A. (C.N.E.A.)
Juvenal, G. (C.N.E.A.)
Lanfranchi, H. (Consejo Invest. de la Prov. de Bs. Aires)
Navarreti, H. (C.N.E.A., Uruguay)

(*) Hasta abril de 1976 en el Departamento.

D) Personal Técnico

Alluz, M.Z.
Campaña, E.
Cabaleiro, E.
Defillipe, L.
Díaz, P.
Fava, P.
Fernández, V.
Flores, A.M.
Latrichina, J.
Pardini, C.
Paz, C.
Pereyra, R.
Prahic, D.
Tignanelli, M.

E) Personal Auxiliar

Bertuzzi, M.
Caliva, M.
Dursi, F.
Echegaray, C.
Fernández, L.
Ghiotti, L.
Gómez, C.
Llacer, M.
López, M.
Martínez, C.
Michelin, S.
Nicolao, E.
Piantoni, M.
Quevedo, M.
Taborda, E.

F) Secretaria

De Luca, M.T.

INDICE DE AUTORES

Aiello, L.O.	A-1, A-2
Aisenberg, E.	G-1
Altschuler, N.	A-4, A-5, A-6, A-8
Antón, D.	D-1, D-2, D-3, D-4, D-5, D-10
Barmach, M.	A-5, A-8
Bergada, C.	A-6
Cabrini, R.L.	F-1, F-3, F-4, F-5, F-6, F-7, F-8, F-9, F-13, F-14, F-16 F-20, F-21
Capalbo, E.E.	C-1, C-2, C-3, C-6
Caro, R.A.	A-5
Ciscato, V.A.	A-5
Conti, C.J.	F-5, F-6, F-16, F-17, F-22
Curutchet, H.P.	C-4
Dahl, V.	A-6
Degrossi, O.J.	A-6, C-3, F-21
De Micheli, A.T.	D-10
Frasch, A.C.C.	F-1, F-2, F-4, F-9, F-18, F-19
Figueiras, H.D.	A-7
Gagliardi, R.	A-4
Giacomini, S.V.	A-5
Giménez, I.B.	F-3, F-5, F-6, F-16, F-17
Itoiz, M.E.	F-1, F-2, F-3, F-4, F-14, F-18, F-19
Kirschbaum, W.	F-23
Klein-Szanto, A.J.P.	F-7, F-8, F-11, F-12
Kleinman de Pisarev, D.L.	A-2, A-3
Kramar de Val- maggia, E.P.	A-4
Kurchart, H.	A-5
Lanfranchi, H.	F-10
Lantos, C.P.	A-6
Lema, B.E.	F-17
Lombardo, J.H.	E-1
López Otero, R.	F-9
Marcilese, N.A.	A-7
Mayo, J.	E-1, E-2
Mazar Barnett, B.	B-1, B-2, B-3, B-4, B-5, B-7
Miranda F.F.	F-21
Muñoz, E.	B-1, B-2, B-3, B-5, B-6, B-7
Niepomniszce, H.	C-4
Orce, L.V.	D-2, D-3
Pardini, C.	F-22
Pisarev, M.A.	A-1, A-2, A-3, A-4
Pérez, L.N.	A-8
Prahic, D.	G-1
Quintans, C.J.	D-5, D-6, D-7, D-8, D-9
Quiroda, S.E.	A-5
Rey, B.M. de	F-4, F-7, F-8, F-10, F-13, F-14, F-15
Rodríguez, S.E.	A-5
Sala, G.	A-6
Santalla de Piro- vano, M.C.	A-4

Scavini, L.M.	C-4, C-6
Schajowicz, F.	F-17
Silberman, F.S.	F-21
Solanot, M.E.	F-17
Ubios, A.M.	F-9, F-20, F-21
Valsecchi, R.	A-4, A-6, A-7
Volco, H.E.	F-1

PUBLICACIONES

- Ultrastructure of an odontogenic myxoma. Simes, R.J., Barros, R.E., Klein-Szanto, A.J.P. y Cabrini, R.A. Oral Surg., 39:640-646, 1975.
- Thyamine pyrophosphatase and acid phosphatase, their ultrastructural localization in rat skin. Itoiz, M.E., Rey, B.M. de y Cabrini, R.L. Arch. Derm. Forch., 252:131-138, 1975.
- Aplicación del método microespectrofotométrico al estudio de membranas quísticas. Giménez, I.B., Itoiz, M.E. y Albano, H., Rev. Asoc. Odont. Arg., 63: 101-103, 1975.
- A quantitative microspectrophotometric study of the lead precipitation reaction for the histochemical demonstration of acid phosphatase. Cabrini, R.L., Frasc, A.C.C. e Itoiz, M.E., Histochem. J., 7:419-426, 1975.
- Análisis histométrico de la microfluorescencia ósea. Strate, F.G.E., Dotto, A.L., López Otero, R. y Cabrini, R.L., Ortodoncia, 39:20-25, 1975.
- Ultrastructural response of epidermis to actinomycin D. Rey, B.M. de y Cabrini, R.L., Dermatologica, 151:89-95, 1975.
- Iodized oil in the prophylaxis of endemic goiter in Argentina. Watanabe, T., Morán, D., El Tamer, E., Stoneloni, L., Salvaneschi, J., Altschuler, N., Degrossi, O.J. y Niepomnicsze, H. PAHO Scient. Publ., 292:231, 1975.
- The effects of iodized salts on iodine metabolism endemic goiter and cretinism: continuing threats to world health. Degrossi, O.J., Watanabe, T., Altschuler, N., Oñativia, A. y Salvaneschi, J. PAHO Scient. Publ., 292:251, 1975.
- Molecular basis for the action of KI on thyroid protein biosynthesis. Pisarev, M.A. y Aiello, L.O. Excerpta Med. Endocrinol. Ser. p.94, 1975.
- Familial goiter with partial iodine incorporation block and euthyroidism due to the deficient peroxidase defect. Niepomnicsze, H., Degrossi, O.J., Scavini, L.M. y Curutchet, H.P. Excerpta Med. Int. Congress Ser. N°378. Proc. Seventh Int. Thyroid Conference, Boston, Mass., June 9-13, pp 470-473, 1975. Excerpta Med., Amsterdam.
- Microspectrophotometric quantitation of nucleic acid and protein in irradiated epidermis. Conti, C.J., Giménez, I.B. y Cabrini, R.L. Strahlentherapie, 151: 236-239, 1976.
- Ultrastructural localization of acid phosphatase in normal and irradiated epidermis. Rey, B.M. de, Itoiz, M.E., Frasc, A.C.C. y Cabrini, R.L., Cutaneous Pathol., 3:25-34, 1976.
- Sulphydryl and disulphide groups in normal and irradiated epidermis. Frasc, A.C.C., Itoiz, M.E., Volco, H.E. and Cabrini, R.L. Int. J. Radiat. Biol., 29: 301-309, 1976.
- Envelope mutation promoting autolysis in Salmonella typhimurium. Antón, D.N. y Orce, V.L. Molec. Gen. Genet., 144:97-105, 1976.
- Studies on the mechanism of action of potassium iodide on thyroid protein biosynthesis. Pisarev, M.A. y Aiello, L.O. Acta Endocr. (Kbh) 82:298-305, 1976.
- Action of KI thyroxine and cyclic AMP on ³H-uridine incorporation into the RNA of thyroid slices. Pisarev, M.A., Aiello, L.O. y Pisarev, D.L.K. de. Acta Endocr., 83:313-320, 1976.

- Action of cyclic nucleotides on protein and RNA synthesis in the thyroid. Pisarev, M.A. y Pisarev, D.L.K. de, Acta Endocr. En prensa, 1976.
- Metaplastic conversion of the differentiation pattern in oral epithelium affected by leukoplakia simplex. A stereologic study. Klein-Szanto, A.J.P., Banoczy, J. y Schroeder, H.E., Pathol. Europ., 11:189-210, 1976.
- Graded alterations of epithelial differentiation pattern in buccal mucosa affected by lichen planus. Klein-Szanto, A.J.P., Andersen, L. y Schroeder, H.E. Virchows Arch. B. Cell Pathol., 22:245-261, 1976.
- Architecture and density of connective tissue papillae of the human oral mucosa. Klein-Szanto, A.J.P. y Schroeder, H.E. J. Anat. (Lond.). En prensa, 1976.

Resúmenes

- Estudios de parámetros tiroideos en un primate Alouatta caraya, utilizando ^{131}I y moléculas marcadas. Valsecchi, R., Degrossi, O.J. y Altschuler, N. Rev. Biol. Med. Nuclear, 7:8, 1975.
- Valoración radioinmunológica de fármacos de la digoxina. Pérez, L.N., Barmasch, M. y Altsschuler, N. Rev. Biol. Med. Nuclear, 7:42, 1975.
- Metabolismo de ^{131}I en ratas nacidas de madres tratadas con antitiroideos. Valmaggia, E.K. de, Valsecchi, R., Defilippe, A.L., Pisarev, M.A. y Altschuler, N. Rev. Biol. Med. Nuclear, 7:42, 1975.
- Cambios de actividad enzimática en la epidermis irradiada en función de la edad y la zona de lesión. Frasch, A.C.C., Itoiz, M.E., Volco, H.E. y Cabrini, R.L. Rev. Biol. Nuclear, 7:162, 1975.
- Estudio microespectrofotométrico del ADN en epidermis sometida a distintas dosis de radiación X. Conti, C.J., Giménez, I.B. y Cabrini, R.L. Rev. Biol. Med. Nuclear, 7:163, 1975.
- Evaluación cuantitativa a nivel óptico y electrónico del daño por radiación en epidermis irradiada. Rey, B.M. de, Klein-Szanto, A.J.P. y Cabrini, R.L. Rev. Biol. Med. Nuclear, 7:163, 1975.
- Ultrastructure of X irradiated lingual epithelium. Rey, B.M. de y Klein-Szanto, A.J.P. J. Dent. Res., 54:631, 1975.
- Processing of ultrathin oriented sections. Cabrini, R.L. y Cabaleiro, E.B., J. Dent. Res., 54:631, 1975.
- Mitochondria in irradiated epithelium. Ultrastructural and stereological analysis. Rey, B.M. de y Cabrini, R.L. J. Dent. Res., 54:632, 1975.
- Ultrastructural analysis of epidermis injected with actinomycin D. Relation to irradiated epidermis. Rey, B.M. de. J. Dent. Res., 54:632, 1975.
- Microspectrophotometric determination of proteins and nucleic acids in irradiated skin spithelium. Conti, C.J., Giménez, I.B. y Cabrini, R.L. J. Dent. Res. 54:633, 1975.
- Effect of local irradiation on the periodontal area of animals subjected to orthodontic movements. Ubios, A.M., Parodi, R.J., López Otero, R. y Frasch, A.C.C., J. Dent. Res., 54:633, 1975.
- A technique for localized irradiation of maxillar bone in laboratory animals. Costa, R.O. y Frasch, A.C.C., J. Dent. Res., 54:633, 1975.

- Acid phosphatase activity in irradiated epithelium. Itoiz, M.E., Frasch, A. C.C., Klein-Szanto, A.J.P. y Cabrini, R.L., J. Dent. Res., 54:633, 1975.
- Principles for quantitation of mineral content in microradiographies. Frasch, A.C. y Cabrini, R.L., J. Dent. Res., 54:634, 1975.
- Effect of localized X-irradiation on the growth rate of a rat incisor. Costa, O.R., Frasch, A.C.C. y Cabrini, R.L., J. Dent. Res., 54:634, 1975.
- Microspectrophotometry in the quantitation of acid phosphatase activity in tissue sections. Frasch, A.C., Cabrini, R.L. e Itoiz, M.E., J. Dent. Res., 54:638, 1975.
- Acción de las radiaciones gamma sobre la molécula de anticuerpo. I. Estudios inmunológicos del antisuero a tiroglobulina humana. Scavini, L.M., Rodríguez, S.M., Degrossi, O. y Mariano, E., Rev. Biol. y Med. Nuclear, 7:161, 1975.
- Acción de las radiaciones gamma sobre la molécula de anticuerpo. II. Estudios inmunológicos del antisuero a albúmina sérica humana (ASH). Rodríguez, S.M., Scavini, L.M. y Capalbo, E.E., Rev. Biol. y Med. Nuclear, 7:161, 1975.
- Reparación del daño genético radio-inducido a distintas temperaturas en *Drosophila melanogaster*. Mazar Barnett, B., Rev. Biol. y Med. Nuclear, 7:163, 1975.
- Quantitative changes in ultrastructural architecture and in protein and nucleic acid contents of irradiated epidermis. Rey, B.M. de, Conti, C.J., Cabrini, R. L. and Klein-Szanto, A.J.P., Radiat. Res. (en prensa), 1976.

