

C.	Biblioteca
A.	EDICIONES
Nº	AÑO
1	1982

W.82.18
(06.82.00)

CNEA NT - 1/82

Departamento de Radiobiología

Informe de Actividades

1977 - 1980

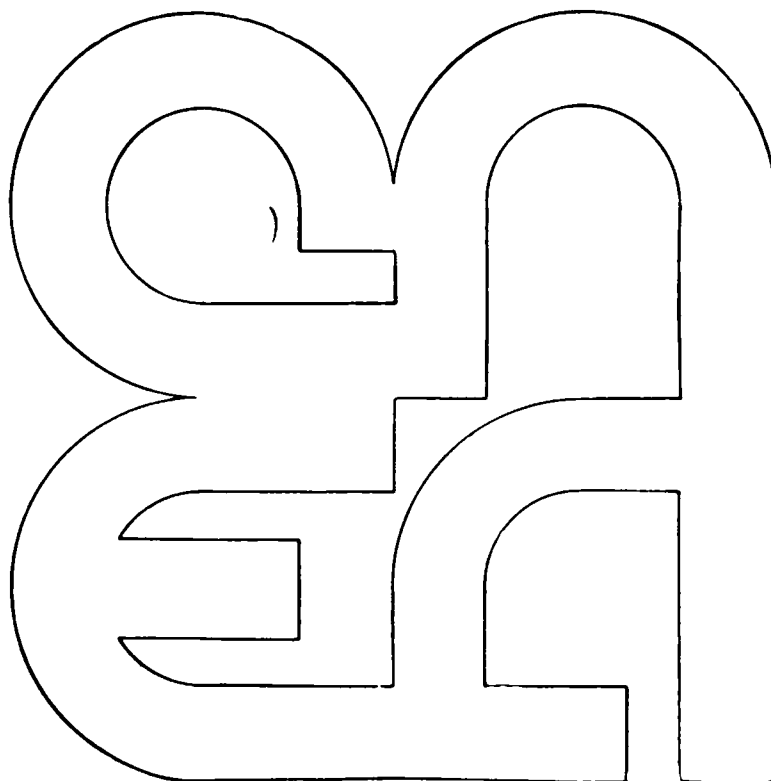
Comisión Nacional
de Energía Atómica

Dirección de
Investigación y Desarrollo

Gerencia de
Investigaciones

República Argentina

Buenos Aires



Departamento de Radiobiología
Informe de Actividades
1977 - 1980

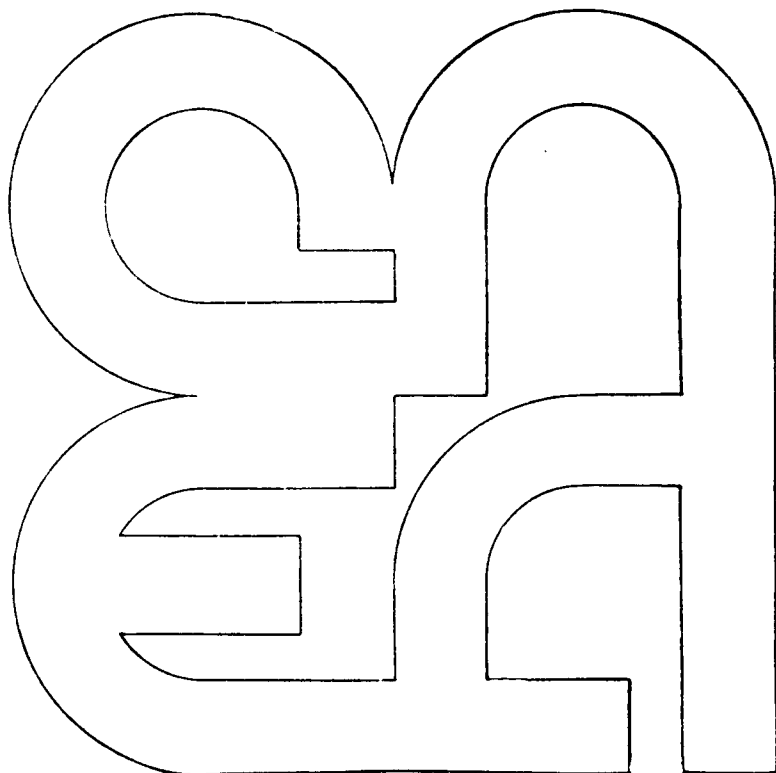
Comisión Nacional
de Energía Atómica

Dirección de
Investigación y Desarrollo

Gerencia de
Investigaciones

República Argentina

Buenos Aires



INTRODUCCION

El Departamento de Radiobiología presenta en este volumen su segundo Informe de Actividades. A pesar de nuestra intención, las circunstancias no permitieron cumplir con el propósito de ofrecer una publicación bianual, por lo cual reunimos aquí el trabajo de los últimos cuatro años. Afirmamos la decisión de retornar al plan original.

Las líneas de trabajo ya tradicionales en el Departamento ofrecen en este Informe interesantes avances, sumándose a ellas nuevos desarrollos experimentales que abren otras posibilidades. Destacamos los comienzos de investigaciones sobre la incorporación de sales de uranio en animales y microorganismos, y nos sentimos complacidos por la exitosa consolidación en nuestro Bioterio-CAE de la primera colonia de ratones libres de gérmenes patógenos específicos (SPF).

Las perspectivas futuras son promisorias. Se ha concluido con la ingeniería de detalle del edificio que albergará en el Centro Atómico Constituyentes a nuestros nuevos laboratorios, como parte del complejo TANDAR, donde esperamos realizar investigaciones radiobiológicas con el acelerador que hoy se encuentra en etapa de construcción avanzada.

El párrafo final está dedicado a la Dra. Angela M. Ubios. Su silenciosa, pero firme labor como editora de este Informe merece nuestro profundo y afectuoso reconocimiento.

Vicente Luis Orce
Jefe Departamento Radiobiología

RESUMEN

El presente Informe representa un resumen de las líneas de investigación realizadas, en el Departamento de Radiobiología en un lapso de cuatro años. Es de destacar que la mayor parte de los trabajos que aparecen aquí han sido publicados total o parcialmente en revistas científicas nacionales o extranjeras, como puede constatarse en el listado de Publicaciones, y a las que se podrá recurrir si se deseara una información más detallada.

Las investigaciones llevadas a cabo en este período han sido orientadas al estudio de los efectos de irradiación en distintos sistemas biológicos, a la búsqueda de modelos experimentales adecuados y al desarrollo de técnicas que hagan posible la correcta evaluación de la información a obtener.

Los trabajos han sido ordenados según las Divisiones actualmente en vigencia en el Departamento. Además se han agregado los informes de los servicios prestados por las Secciones Radiación y Dosimetría, y Bioterio. Finalmente se ha presentado un listado de Publicaciones, Resúmenes y Presentaciones a Congresos que representan la proyección extra-mural de las investigaciones del Departamento.

Como editora deseo agradecer a todos los autores por su colaboración en la redacción de los trabajos, al Gerente de Investigaciones Dr. R.L. Cabrini por su apoyo para la realización de este Informe, al Jefe del Departamento de Radiobiología, Dr. L.V. Orce por el constante intercambio de ideas. Deseo hacer una mención especial para la Srta. M.T. De Luca por su gran dedicación y cooperación en la preparación de la versión final. Agradezco también al Sr. Binda, responsable de la impresión.

Angela M. Ubios

INDICE

A. GENETICA	página
A. 1 Translocaciones II-III inducidas por Dietilsulfato en esperma maduro de <i>Drosophila melanogaster</i> . E.R. Muñoz y B. Mazar Barnett.....	1
✓ A. 2 Modificación del daño genético radioinducido en células germinales masculinas de <i>Drosophila melanogaster</i> por hidroxitolueno butilado. B. Mazar Barnett y E.R. Muñoz.....	5
X A. 3 Influencia de deficiencias en la sección 20 del cromosoma X de <i>Drosophila melanogaster</i> sobre la frecuencia de letales embrionarios y translocaciones II-III. E.R. Muñoz y B. Mazar Barnett.....	12
✓ A. 4 Efecto del etanol en la recuperación de daño genético radioinducido en <i>Drosophila melanogaster</i> . E.R. Muñoz.....	17
✓ A. 5 Inducción de letalidad dominante con glioxal en <i>Drosophila melanogaster</i> . B. Mazar Barnett y E.R. Muñoz.....	22
A. 6 Ensayo de letalidad dominante con p-hidroxibenzoato de metilo en <i>Drosophila melanogaster</i> . B. Mazar Barnett y E.R. Muñoz.....	25
✓ A. 7 Pruebas genéticas con Metotrexato y rayos X en <i>Drosophila melanogaster</i> . E.R. Muñoz y B. Mazar Barnett.....	27
B. MICROBIOLOGIA	
B. 1 Caracterización y purificación parcial de murein-hidrolasas de mutantes de <i>Salmonella typhimurium</i> . R.A. Pizarro, R.O. Fernández y L.V. Orce	32
B. 2 Mutantes de <i>Salmonella typhimurium</i> con forma celular esférica. D.N. Antón y A.T. De Micheli.....	40

II

	página
B. 3 <i>rodA</i> un nuevo locus que controla la forma celular en <i>Salmonella typhimurium</i> . A.T. De Micheli y D.N. Antón.....	45
✓ B. 4 Efectos de la mutación <i>envB</i> en la respuesta de <i>Salmonella typhimurium</i> a la radiación ultravioleta. D.N. Antón.....	51
✗ B. 5 Promoción de la división celular en mutantes <i>divC</i> de <i>Salmonella typhimurium</i> . A.T. De Micheli y D.N. Antón.....	57
✓ B. 6 Efecto de iones uranilo en <i>Salmonella typhimurium</i> expuesta a irradiación ultravioleta. G.O. Boselli y L.V. Orce.....	64
 C. EFECTOS SOMATICOS	
✗ C. 1 Propiedades oncogénicas de un virus endógeno ARN de Hamster. Activación de las propiedades oncogénicas del virus por irradiación total del huesped. J. Mayo y S.C. Michelin.....	68
✗ C. 2 Cultivos de tejidos transformados <i>in vitro</i> por radiación ultravioleta: características morfológicas, oncogénicas y citogenéticas. C.P. de Gersberg.....	71
 D. PATOLOGIA	
D. 1 Desarrollo de metodologías microfotométricas para cuantificación de reacciones histoquímicas. M.E. Itoiz y R.L. Cabrini.....	74
✓ D. 2 Aplicación de los métodos microfotométricos a la cuantificación de alteraciones metabólicas producidas por la irradiación y otras variaciones patológicas. M.E. Itoiz, B.M. de Rey, I.B. Giménez y R.L. Cabrini.....	78
✓ D. 3 Efectos de drogas radiopotenciadoras sobre la epidermis. B.M. de Rey, H.E. Lanfranchi, A.J.P. Klein-Szanto y M.E. Itoiz.....	84

III

	página
✓ D. 4 Microscopía electrónica de barrido de folículos pilosos irradiados. A.J.P. Klein-Szanto y B.M. de Rey.....	87
✓ D. 5 Captación epidérmica de cistina tritiada e histidina tritiada. B.M. de Rey y A.M. Ubios.....	89
✓ D. 6 Modificación volumétrica de los queratinocitos basales expuestos a diferentes dosis de irradiación X. H.E. Lanfranchi, A.J.P. Klein-Szanto, B.M. de Rey y R.L. Cabrini.....	94
D. 7 Semimucosa del labio de los bovinos: Aspectos ultraestructurales y citoquímicos. H.E. Lanfranchi, B.M. de Rey y M.E. Itoiz	98
D. 8 Cambios inmunohistoquímicos de la membrana basal del endometrio del conejo en respuesta a las hormonas ováricas. C.J. Conti, I.B. Giménez y L.E. Gerschenson.....	102
D. 9 Regulación de la ciliogénesis y la proliferación del epitelio endometrial del conejo mediante 20 α hidroxipregn 4-en-3 ona. C.J. Conti, I.B. Giménez, E.A. Conner y L.E. Gerschenson.....	105
D. 10 Efecto de las hormonas ováricas en la proliferación del epitelio endometrial del conejo. C.J. Conti, I.B. Giménez, J.T. Murai y L.E. Gerschenson.....	108
D. 11 Obtención, cultivo e identificación de células del epitelio vaginal de ratas Wistar. C.J. Conti, I.G. Giménez, C.M. Aldas y D.R. Tasat.....	112
D. 12 Obtención de un anticuerpo antiqueratina. Su uso como marcador de células epiteliales. I.B. Giménez, C.J. Conti y L. Larcher..	115
D. 13 Análisis submicroscópico del esquema de bandas del cromosoma X politénico de <i>Drosophila melanogaster</i> . W.F. Kirschbaum.....	117

✕ D. 14	Alta tasa de mutaciones cut inducidas por irradiación sobre loci específicos en esperma móvil de <i>Drosophila melanogaster</i> . W.F. Kirschbaum.....	120
✕ D. 15	Efecto de la radiación X sobre las glándulas salivales. E.G. Espinal, B.M. de Rey y R.L. Cabrini.....	122
D. 16	Transplantes de gérmenes dentarios a la bolsa facial del Hamster y formación experimental de quistes. A.L. Smerilli, M.E. Itoiz, H.E. Lanfranchi y R.L. Cabrini.....	125
✓ D. 17	Mecanismos de remodelación ósea en modelos experimentales y en lesiones espontáneas de hueso. A.M. Ubios y R.L. Cabrini.....	127
✓ D. 18	Inducción tumoral por efecto de radiación de ³² P (fosfato crómico coloidal). A.M. Ubios y R.L. Cabrini.....	132
D. 19	Puesta en marcha del microscopio electrónico E.M. Philips 200. W.F. Kirschbaum, C.R. Cond. R. Alvarez y A. Pantaleone.....	137

E. BIOTERIO

E. 1	Establecimiento de una colonia de ratones portadores de la mutación nu (desnudo). L.S. Montoro y C.J. Quintans.....	139
E. 2	Desarrollo de un modelo de tapa filtrante para la protección de animales de experimentación. L.S. Montoro, S.A. Ramirez, P.E. Cittadini y C.J. Quintans.....	142
✕ E. 3	Estudio sobre radioesterilización de dietas para animales de experimentación. L.S. Montoro, C.R. Ciancaglini, S.A. Ramirez y C.J. Quintans.....	148

✓ F.1.Actividades de la sección irradiación y dosimetría	
D.A. Prahic.....	153
G.1.Actividades de la sección Bioterio	
C.J. Quintans.....	161
INDICE DE AUTORES.....	162
Personal del Departamento de Radiobiología...	163
Presentaciones a Congresos.....	165
Resumenes.....	174
Publicaciones.....	176

A.1. Translocaciones II-III inducidas por Dietilsulfato en espermatozoides maduros de *Drosophila melanogaster*.

E. R. Muñoz y B. Mazar Barnett

II-III translocations induced by Diethyl Sulfate in mature sperm of *Drosophila melanogaster*.

Diethyl Sulfate (DES) dissolved in ethanol, was made up into 0.5% and 0.75% solutions in 5% glucose and administered to 7-day old wild type Samarkand males by means of saturated filter paper attached to the walls of 180 ml. empty bottles (150/males/bottle). The males were exposed to the chemical for 3.5 h (0.5% solution) or for 2.5 h (0.75% solution) and immediately mass-mated in a proportion of 1 male to 3 females *en bw*; ϕ for 3.5 h to sample motile mature sperm. The inseminated females were placed in regular medium and transferred after 5, 8, 11, 15, 18, 22 and 29 days. A parallel sex-linked recessive lethal test was run (0.5% DES solution) and a frequency of 27.11% (138/509) lethals was found. With DES 0.5% no translocations were recovered in 796 chromosomes after storing the treated sperm for 11 days.

However, in the sample collected 16-18 days after treatment, 2.27% II-III translocations were found and this frequency rose to 5.85% after 23-29 days. With a 0.75% DES solution 1 translocation was detected in 334 chromosomes in the sample done 5 days after treatment and the number of translocations increased steadily up to 7.87% in the last sample (days 23-29). It is postulated that DES induces potential breaks that only open and rejoin after a delay. Our data on embryonic and post-embryonic lethals induced by DES also suggest that without storage potential breaks become realized in different cell cycles during cleavage, and their simultaneous opening during the first cleavage division is a rare event.

Con el objeto de establecer si la falta de detección de translocaciones con dietilsulfato (DES) en *Drosophila melanogaster* (1) se debía a una incapacidad de esta droga para inducir rupturas cromosómicas o a dificultades relacionadas con su detección, se llevaron a cabo pruebas después de almacenar el espermatozoides tratado en las hembras por períodos variables de tiempo.

El DES fue disuelto en etanol y llevado a concentraciones de 0,5% y 0,75% con una solución de glucosa al 5%. Para todos los experimentos se utilizaron machos silvestres Samarkand de 7 días que fueron expuestos a los vapores de DES mediante papeles de filtro embebidos en este compuesto,

en botellas de 180 ml. Los machos fueron tratados durante 3,30 hrs. (solución al 0,5%) o por 2,30 hrs. (solución al 0,75%) e inmediatamente apareados masivamente después del tratamiento con hembras *cn bw*; e (2) en proporción de 1 macho por 3 hembras durante 3,30 hrs. Este método asegura el muestreo de esperma que en el momento del tratamiento era maduro y móvil. Después de este período de apareamiento los machos fueron descartados y las hembras se conservaron en botellas con medio de cultivo común haciendo pasajes a los 5,8,11,15,18,22 y 29 días. Con los machos de la F1 se llevaron a cabo pruebas de translocaciones II-III habiéndose mantenido durante todos los experimentos una temperatura de 25°C.

Con la solución de DES al 0,5% se hizo una prueba de letalidad recesiva y de acuerdo con comunicaciones previas (3,4) se encontró una frecuencia de 27,11% (138/509).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I: con DES al 0,5% recién comienzan a detectarse translocaciones a partir del muestreo celular hecho en los días 16-18 de almacenaje, a partir del cual la frecuencia sube hasta 5,83% (días 23-29). Con la solución al 0,75% la detección de translocaciones comienza los días 6-8 con 0,30% llegando a 7,87% los días 23-29.

Estos resultados demuestran claramente que contrariamente a hallazgos previos (1) el DES es un eficiente clastógeno. El hecho de que no se detecten translocaciones sin almacenaje previo del esperma tratado, podría tomarse como indicación de que el tiempo que transcurre entre el tratamiento del esperma y la unión de los pronúcleos después de la fertilización, no es suficiente para que las lesiones den lugar a verdaderas rupturas que posibiliten el intercambio. Otra explicación podría ser que sin almacenaje previo no se establecerían las condiciones necesarias para el intercambio. Datos que hemos obtenido con letales embrionarios y post embrionarios (5) parecen favorecer la primera hipótesis, y sugieren que sin almacenaje la división celular desempeña un importante papel en la apertura de las pre-rupturas inducidas por esta droga. Nuestra inter-

pretación de los datos está de acuerdo con la hipótesis expuesta por Auerbach (6) según la cual los agentes alquilantes inducirían rupturas potenciales que pueden permanecer latentes por períodos que pueden extenderse por varios ciclos celulares y también con los datos que proveyeron la evidencia citológica al efecto de almacenaje (7).

Referencias

- 1.- Pelecanos M. Nature (London), 210: 1294, 1966
- 2.- Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*, Ed. Lindsley D.L. y Grell E.H., 1967.
- 3.- Alderson T y Pelecanos M. Mutation Res., 1: 182, 1964.
- 4.- Pelecanos M. y Alderson T. Mutation Res., 1: 173, 1964.
- 5.- Muñoz E.R. y Mazar Barnett B. Mutation Res., 51: 37, 1978.
- 6.- Auerbach C. Science, 158: 1141, 1967.
- 7.- Slizynska H. Mutation Res., 19: 199, 1973.

TABLA I

FRECUENCIAS DE TRANSLOCACIONES II-III INDUCIDAS
POR DES EN ESPERMA TRATADO EN MACHOS DE 7 DIAS Y
ALMACENADO EN LAS HEMBRAS.

		Tratamiento					
		Control		DES 0,5% (3,30 h)		DES 0,75% (2,30 h)	
Subcul tivo	Días después del trat.	Crom. N° prob. Trs.		N° Transl. N° Crom.Prob.	%	N° Transl. N°CromProb.	%
I	1-5	513	-			$\frac{-}{628}$	-
II	6-8	155	-			$\frac{1}{334}$	0,30
III	9-11	325	-	$\frac{-}{796}$	-	$\frac{10}{1160}$	0,86
IV	12-15	317	-			$\frac{13}{461}$	2,82
V	16-18	301	-	$\frac{22}{969}$	2,27	$\frac{24}{674}$	3,56
VI	19-22	1008	-	$\frac{24}{807}$	2,97	$\frac{25}{594}$	4,21
VII	23-29	380	-	$\frac{7}{120}$	5,83	$\frac{14}{178}$	7,87

A.2. Modificación de daño genético radioinducido en células germinales masculinas de *Drosophila melanogaster* por hidroxitolueno butilado.

B. Mazar Barnett y E. R. Muñoz.

Modification of radiation induced genetic damage in *Drosophila melanogaster* male germ cells by butylated hydroxytoluene.

The effects of butylated hydroxytoluene (BHT) on genetic damage induced by ionizing radiation were studied in post-meiotic male cells of *Drosophila melanogaster*. Prior to submitting *Samarkand* males to 2 Krads of X-rays, BHT was administered a) with the food (0.2 % final concentration) from emergence of the imago for 7 days or b) by intra-abdominal injection (0.05 %) to 7-day-old adults. Dominant lethality (embryonic and total), II-III translocations and sex-linked recessive lethals were recorded. The only effect of BHT observed was a decrease in the frequency of recessive lethals induced, detected in early spermatids. Since oxygen plays an important role in the high radiosensitivity of these cells, it is suggested that the sparing action of BHT was due to its antioxidative and radical scavenging properties.

El hidroxitolueno butilado (BHT) es un aditivo comúnmente utilizado en la industria alimenticia y hay una abundante literatura sobre su interacción con agentes carcinogénicos, luz ultra violeta y radiaciones ionizantes. En *Drosophila* los resultados obtenidos en tratamientos combinados con radiación fueron conflictivos, habiéndose comunicado acciones tanto radiosensibilizadoras (1-2) como radioprotectoras (3). Debido al amplio uso del BHT y a sus propiedades como antioxidante, captador de radicales y modificador de actividades enzimáticas y funciones asociadas a membranas, se consideró de interés reestudiar el efecto del BHT en células germinales irradiadas.

En todos los experimentos se utilizaron machos silvestres *Samarkand* de 7 días que fueron tratados mediante: a) inyección intrabdominal de BHT al 0,05 % en solución fisiológica y etanol y b) la alimentación, para lo cual se colocó en tubos de cultivo con base de agar, 0.25 ml. de una mezcla de levadura y BHT con una concentración final de este compuesto de 0.2 %. Las moscas, en grupos de 25 por tu-

bo, fueron mantenidas desde su nacimiento y durante 7 días en esta mezcla, cambiándose el medio diariamente para evitar los efectos tóxicos de la solución de BHT envejecida. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C y la dosis de irradiación utilizada fue de 2000 Rads. Se llevaron a cabo pruebas de letalidad dominante y de translocaciones II-III utilizando hembras *cn bw;e* (4) y de letalidad recesiva con la cepa "*Base*" (4).

Los tratamientos con BHT solo, no aumentaron la mortalidad de los huevos ni la tasa de translocaciones y letales recesivos ligados al sexo. Cuando el BHT fue utilizado en tratamientos combinados con radiación, no se observó modificación de daños representativos de rupturas cromosómicas como son los letales dominantes y las translocaciones. La frecuencia de huevos no eclosionados varió entre 37,5 % (1200 huevos contados) y 47,7 % (2067 huevos contados) en las series irradiadas y entre 40 % (770 huevos contados) y 48 % (1913 huevos contados) en los grupos inyectados con BHT antes de la irradiación. La frecuencia total de letalidad dominante en el grupo no tratado fue de 13,5 % (3559 huevos contados), de 53,7 % (1169 contados) en el grupo solamente irradiado y de 54,4 % con tratamiento combinado (1810 huevos contados), de la misma forma el BHT no tuvo efecto en la frecuencia de translocaciones II-III inducida por 2000 Rads como muestran las Tablas I y II.

Pretatamientos con BHT administrado por inyección no modificaron la frecuencia de letales recesivos inducidos por la radiación en espermatozoides maduros (Tabla III). En otro grupo de experimentos se estudió el efecto del BHT administrado con la comida o por inyección, en cinco crías sucesivas con el objeto de obtener un muestreo amplio de células germinales que estaban en distintos grados de desarrollo en el momento del tratamiento. Los resultados pueden verse en la Tabla IV de donde se desprende que en la cría E siempre se observa una disminución en la frecuencia de letales que es significativa en los experimentos 1 y 3, atribuyéndose la falta de significancia en el experimento 2 al bajo número de cromosomas analizados.

De nuestros resultados tres hechos surgen claramente: 1) El BHT ejerce una cierta acción radioprotectora en la frecuencia de mutaciones letales recesivas inducidas por 2000 Rads de rayos X; 2) Dicho efecto fue consistente independientemente de la vía de administración, señalando una acción directa y no a través de un metabolito; 3) La disminución en la frecuencia de letales radioinducidos debida a la acción del BHT se circunscribió a las espermátidas tempranas recuperadas en la cría E. Debido a que estas células muestran la mayor radiosensibilidad y el mayor incremento por el factor oxígeno (O.E.R.) entre los estados celulares probados, se postula que el BHT actúa principalmente en la sensibilidad dependiente del oxígeno y que este efecto se ejerce a través de su acción antioxidante y captadora de radicales. Si la acción protectora se ejerce sobre el material genético o sobre los sistemas enzimáticos involucrados en la reparación del mismo no puede por el momento ser esclarecido.

Referencias

- 1.- Kamra O.P. Int. J. Radiat. Biol., 23: 295, 1973.
- 2.- Prasad O.M. y Kamra O.P. Int. J. Radiat. Biol., 25: 67, 1974.
- 3.- Guzmán J., de la Rosa E., Félix R. y Olvera O. *Drosophila* Inf. Serv., 50:140, 1973.
- 4.- "Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*", Ed. Lindley D.L. y Grell E.H., 1967.

TABLA I

Frecuencia de translocaciones II-III después de pretatamientos de machos con BHT y exposición a 2 Krads de rayos X.

	% de trans./N° crom. probados			
	Cría A (3,30 hrs)	Cría B (hasta 24 hrs)	Cría C (4° día)	Cría D (5° días)
Exp. I: 2 Krads	$\frac{5,15}{952}$	$\frac{3,35}{954}$	$\frac{7,18}{863}$	$\frac{17,45}{699}$
BHT (com.) + 2 Krads)	$\frac{3,67}{980}$	$\frac{3,49}{1059}$	$\frac{7,32}{847}$	$\frac{18,80}{383}$
Exp. II: 2 Krads	$\frac{4,32}{1782}$			
BHT (inyec.) + 2 Krads	$\frac{4,07}{1521}$			
Exp. III: 2 Krads	$\frac{5,06}{632}$			
BHT (inyec.) + 2 Krads	$\frac{6,75}{785}$			

TABLA II

Frecuencia de translocaciones II-III recuperadas de machos tratados con 2 Krads y cruzados con hembras: * alimentadas con BHT desde el nacimiento hasta el apareamiento; ** alimentadas con BHT desde el apareamiento y durante la oviposición; *** alimentadas con BHT desde el nacimiento y durante la oviposición.

Subcultivo (días)	% de trans. /Nº de cromosomas probados			
	♀♀ no trat.	* ♀♀ alim. con BHT	** ♀♀ alim. con BHT	*** ♀♀ alim. con BHT
A 1-3	2,97/773	4,06/688	3,32/692	2,76/723
C 6-9	3,93/914	3,58/530	4,37/686	4,41/634
D 9-12	5,27/512	4,86/679	5,54/649	3,27/703
E 12-15	5,07/710	5,85/632	4,79/626	5,22/631
F 15-18	4,68/726	5,21/690	4,13/582	4,83/724
G 18-21	5,22/670	4,63/583	4,73/380	5,39/556

TABLA III

Frecuencia de letales recesivos ligados al sexo inducidos por 2 Krads de rayos X in esperma maduro de *Drosophila melanogaster* y pretratamientos con inyección de BHT al 0,05 %

	rayos X		BHT + rayos X	
	<u>Nº de let.</u>		<u>Nº de let.</u>	
	<u>Nº de crom.</u>	%	<u>Nº de crom.</u>	%
Exp. I (1 apareamiento observado)	94/1285	7,32	97/1299	7,46
Exp. II (apareamiento masivo, 3,30 hrs.)	74/1146	6,45	73/1117	6,53
Exp. III (apareamiento masivo, 3,30 hrs.)	16/276	5,80	39/587	6,64

TABLA IV

Frecuencias de letales recesivos ligados al sexo en cinco crías sucesivas después de pretratar los machos con BHT y someterlos a 2 Krads de rayos X.

		% letales/N° cromosomas probados				
Tratamiento		Cría A	Cría B	Cría C	Cría D	Cría E
Exp. (1)	2 Krad	$\frac{3.79}{791}$	$\frac{3.37}{861}$	$\frac{2.92}{788}$	$\frac{6.52}{920}$	$\frac{12.31}{268}$
						P=0.0014
	BHT (alimento) + 2 Krad	$\frac{4.76}{925}$	$\frac{3.12}{802}$	$\frac{1.85}{864}$	$\frac{4.68}{877}$	$\frac{9.32}{590}$
Exp. (2)	2 Krad			$\frac{1.52}{1313}$	$\frac{5.40}{500}$	$\frac{10.09}{109}$
						P>0.05
	BHT (inyect.) + 2 Krad			$\frac{2.51}{1392}$	$\frac{6.67}{539}$	$\frac{7.24}{138}$
	2 Krad					
Exp. (3)	2 Krad		$\frac{3.00}{833}$		$\frac{6.40}{938}$	$\frac{11.87}{362}$
						P=0.0164
	BHT (inyect.)		$\frac{2.81}{783}$		$\frac{5.79}{1138}$	$\frac{7.61}{618}$

A.3. Influencia de deficiencias en la sección 20 del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* sobre la frecuencia de letales embrionarios y translocaciones II-III.

E. R. Muñoz y B. Mazar Barnett.

Influence of deletions of section 20 of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* on the frequencies of embryonic lethality and II-III translocations.

The influence of genes localized in the proximal region of the X chromosome of *Drosophila melanogaster* on the frequency of embryonic lethals and II-III translocations was studied. Three different stocks of females, homozygous for *cn*, *bw*; *e* were used. In all cases one of the X chromosomes was: *In(1)FM6*, *y³ld sc⁸ dm B* and the other either wild type or deficient for one of two different segments of section 20. The females were mated with untreated or irradiated (2 Krads) males with the Y chromosome bearing a duplication of the X that covers the segment under study. Only mature sperm was sampled. The rate of spontaneous embryonic lethals recovered from the females bearing the deficiencies was higher than that recovered from the females bearing a wild type X. This increase would not be due to a selective elimination of embryos bearing a deleted X chromosome but to a generalized lower viability related to the maternal genotype. When irradiated males were used, no differences were found in the frequencies of embryonic lethals or II-III translocations among the progenies of the three stocks. This is taken as an indication that the increase observed in the untreated series was not due to an impairment of the maternal repair system. It is suggested that a haplo-insufficient gene (s) that affects egg hatchability by altering the oocyte or the early embryonic development is localized in the small segment studied.

En *Drosophila melanogaster*, las frecuencias de letales recesivos ligados al sexo (1) y de pérdida de cromosomas X en anillo (2) espontáneas, varían con el genotipo de las hembras utilizadas en las pruebas. Asimismo, la cantidad de daño genético que se recupera después de tratar esperma en el macho, puede ser modificada mediante alteraciones del estado fisiológico de las hembras con diversos agentes (3-6) o utilizando hembras de distintas cepas (7). Esto sugiere que la fijación de daños genéticos debe depender, por lo menos en parte, de factores presentes en el

óvulo, los que naturalmente deben estar sujetos a control genético.

Dado que las aberraciones cromosómicas que resultan de irradiar esperma se forman en el huevo después de la fertilización, se estudió la influencia de dos segmentos proximales del cromosoma X cuando están presentes en el huevo, sobre la tasa de muerte embrionaria espontánea e inducida y de translocaciones II-III al tratar esperma con rayos X. Se utilizaron cromosomas deficientes para dichos segmentos, ya que si en los mismos se localizaran genes con algún papel en la tasa final de daño recuperado, su falta podría alterar esa frecuencia.

Se utilizaron hembras provenientes de tres cepas genéticamente iguales, que llevan un cromosoma X balanceador, supresor de crossing over, de composición $In(1)FM6$ y $3Ld$ sc^8 dm B (8) y que solo difieren en el otro cromosoma X, que es en a) *Oregon K* (silvestre); en b) $Df(1) 15-13$, deficiencia que incluye toda la sección 20 del cromosoma politénico, y es bb^- (8) y c) $Df(1) 16-2-17$ del mismo tamaño que la anterior pero que no incluye el alelo normal para bb . Todas las cepas son homocigotas para *cinnabar* (cn), *brown* (bw) y *ebony* (e) (8) para la detección de translocaciones II-III. Para los cruzamientos se utilizaron machos de constitución genética silvestre, salvo el cromosoma Y que es portador de una duplicación del segmento proximal del cromosoma X que "cubre" las deficiencias, lo que asegura que toda la F1 sea viable.

En la Tabla I puede verse que los embriones provenientes de hembras con un cromosoma X normal (*Oregon K*) exhiben una letalidad espontánea significativamente menor que la de las dos cepas con deficiencias. Las frecuencias de letalidad en estas dos últimas no difieren.

De la Tabla II se desprende que las diferencias observadas no se deben a no disyunción de los cromosomas sexuales ya que las clases esperadas en la F1 aparecen en frecuencias que no difieren entre las tres cepas. Asimismo, las hembras que han recibido de la madre el cromosoma X (*Oregon K*) silvestre o deficiente o el cromosoma FM6, apa-

recen en proporciones semejantes. La menor frecuencia en que aparecen los machos FM6 en todos los cruzamientos, probablemente se debe a una menor viabilidad de los machos con ese cromosoma y no afecta las comparaciones que se intentan hacer en este trabajo.

En la Tabla I también puede verse que las tasas de letalidad de los embriones provenientes de hembras de las tres cepas cruzadas con machos irradiados con 2 Krads no difieren entre si. Tampoco se observaron diferencias en las frecuencias de translocaciones II-III cuando se utilizaron hembras con el cromosoma X *Df(1)15-13*: 4,23% (72/1702) o hembras con el cromosoma X silvestre: 3,81% (95/2492).

Se sugiere que en la Sección 20 del cromosoma X se localiza algún gen (es) cuya condición haploide en la hembra, afecta desfavorablemente la frecuencia de huevos que eclosionan y que esto se debería a alteraciones del óvulo o del desarrollo embrionario temprano. Podría descartarse en cambio, la localización en dicha zona, de genes implicados en la reparación de daños genéticos radioinducidos.

Referencias

- 1.- Hildreth P.E. y Carlson G.L. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 43:157, 1957.
- 2.- Brown S.W. y Hannah A. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 38:687, 1952.
- 3.- Bonnier G. Heredity, 8:199, 1954.
- 4.- Alexander M.L. Genetics, 47:1505, 1962.
- 5.- Proust J.P. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 269:86, 1969
- 6.- Mendelson D. Mutation Res., 22:145, 1974.
- 7.- Würigler F.E. y Maier P. Mutation Res., 15:41, 1972.
- 8.- "Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*", Ed. Lindsley D.L. and Grell E.H. 1967.

TABLA I

Letalidad embrionaria obtenida cruzando hembras de distintos genotipos con machos Oregon-K/mal+.Y tratados con 2.000 Rads de rayos X y sin tratamiento.

Número de Huevos no Eclosionados x 100 (*)					
Número Total de Huevos					
Tratamiento	♀ FM6/Oregon -K	♀ FM6/Df.(1)16-2-17	♀ FM6/Df.(1)15-13	P	
2.000 Rads	40,79 (6.286/13.546)	41,38 (2.046/4.114)	39,82 (2.620/5.438)		
-----	9,48 (400/4.220)	14,25 (463/3.249)	13,89 (635/4572)	< 2x10 ⁻⁵	

(*) Las series irradiadas están corregidas de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{\text{Proporción de tratados-Prop. de control}}{1 - \text{Prop. de control.}}$$

TABLA II

Frecuencia de hembras y machos de la F1 provenientes de cruzar machos Oregon-K/mal+.Y con hembras de distintos genotipos.

Genotipos de las hembras parentales	♀ %		♂ %	
	(a) Or.-K/Or.-K (b) Or.K/Df.(1)16-2-17 (c) Or.K/Df.(1)15-13	FM6/Or.-K	a) Or.-K/mal+.Y b) Df(1)16-2-17/mal+.Y b) Df(1)15-13/mal+.Y	FM6/mal+.Y Total
FM6/ Oregon-K	(a) 28,35 (404)	26,03 (371)	a) 26,59 (379)	19,02 (271) 1425
FM6/ Df.(1)16-2-17	(b) 28,40 (401)	27,62 (390)	b) 25,42 (359)	18,56 (262) 1412
FM6/ Df.(1)15-13	(c) 27,02 (394)	26,61 (388)	c) 26,34 (384)	20,03 (292) 1458

A.4. Efecto del etanol en la recuperación de daño genético radioinducido en *Drosophila melanogaster*.

E. R. Muñoz.

Effect of ethanol on the recovery of radiation induced genetic damage in *Drosophila melanogaster*.

The radiation induction of II-III translocations and sex-linked recessive lethals was studied in post-meiotic male germ cells pre-treated with ethanol. Seven day old wild type *Samarkand* males were kept in empty vials with a piece of filter paper soaked with 0.5 ml. of ethanol for 45 minutes, prior to irradiation with 2 Krads of X-rays. After a recovering period of 24 h. (less than 10% of males survive the treatments) the males were mass-mated in a proportion of 1 male to 3 females *cn bw; e* for the translocation tests, and *Muller-5* for the recessive lethal tests. Three 24 h. broods were made (A,B,C) that represent cells sampled mainly as mature sperm, late and early spermatids respectively. The frequency of sex-linked recessive lethals induced by the radiation was not modified by pre-treatments with ethanol. However, the frequency of II-III translocations induced by radiation was increased by ethanol pre-treatments in broods A and B. The observed results could be the consequence of: a) an impairment of re-union of induced breaks in mature sperm and spermatids, leading to a greater availability of broken ends after fertilization and hence to an increase of chromosome exchange, or b) the different kinetic of induction of both damages: actually, small increases in radiosensitivity can be missed if the genetic damage scored increases linearly with dose (as is the case with recessive lethals). On the other hand, the frequency of damages (as translocations) that result from two independent hits and grow nearly as the square of the dose, could be more easily detected.

Recientemente se ha encontrado, que cuando células de ovario de Hamster Chino cultivadas son sometidas a tratamientos combinados de etanol y rayos X, se obtiene una inactivación mayor que la que sería de esperar de la suma de las acciones de ambos agentes, indicando que existe una interacción entre los mismos (1). Si bien la naturaleza de dicha interacción se desconoce, esta potenciación del daño resulta de interés, ya que a las dosis utilizadas (300-1200 Rads) el blanco fundamental de la radiación es el DNA. El mencionado efecto difiere de la acción radioprotectora del etanol observada en diversos modelos experimentales (2,3,4) utilizando altas dosis de radiación.

Se llevaron a cabo tratamientos combinados con etanol y rayos X en *Drosophila melanogaster*, organismo en el que el etanol no aumenta la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo por sobre los valores del control (5,6). Nosotros hemos encontrado que tampoco induce translocaciones entre los cromosomas II y III en 6087 cromosomas probados, lo que se toma como evidencia de que tampoco tiene efecto clastogénico en este organismo.

Machos de 7 días fueron sometidos a vapores de etanol en tubos de cultivo con papel de filtro embebido en etanol (0.8 ml.) en la base, durante 45 minutos a 25°C e inmediatamente irradiados con 2000 Rads de rayos X. Después de un período de recuperación de 24 horas (la sobrevida es menor del 10%) los machos fueron cruzados masivamente en proporción de uno a cuatro con hembras "Base" (7) para detectar la inducción de letales recesivos en el cromosoma X o con hembras *cn bw; e* (7) para detectar translocaciones entre los cromosomas II y III. Para ambos grupos de experimentos se proveyó a los machos de nuevas hembras cada 24 horas por tres períodos sucesivos, lo que permite el muestreo de células que en el momento del tratamiento se encontraban en distintos estados de maduración, representando fundamentalmente: cría A, esperma maduro; cría B, espermátidas tardías y cría C, espermátidas tempranas.

La Tabla I muestra las frecuencias de letales recesivos ligados al sexo obtenidas en tres experimentos, no observándose diferencias significativas entre las progenies de los machos que fueron solamente irradiados y aquellos que fueron sometidos a los tratamientos combinados.

En la Tabla II puede verse que pretratamientos con etanol aumentaron significativamente la frecuencia de translocaciones inducidas por 2000 Rads en las crías A y B, con excepción de un experimento en la cría B. Las diferencias que se observan en la cría C no han sido analizadas dado el bajo número de cromosomas recuperados en la misma.

Parece poco probable que los resultados obtenidos se deban a un efecto radiosensibilizador del etanol diferente para los distintos tipos de daños analizados. Es posible que

este compuesto actúe dificultando la restitución de rupturas cromosómicas inducidas por las radiaciones en esperma y espermatidas tardías, quedando de esta forma disponible un mayor número de fragmentos, que al interactuar después de la fertilización (que es cuando normalmente se forman las aberraciones), den origen a un mayor número de translocaciones. Los resultados obtenidos también podrían resultar de una acción radiosensibilizadora débil por parte del etanol, que es detectada en translocaciones y no en letales debido a la distinta cinética de inducción de los mismos. En efecto, pequeños aumentos de radiosensibilidad pueden pasar inadvertidos en la frecuencia de daños que como los letales recesivos se deben a un solo impacto y responden linealmente a aumentos de dosis. En cambio, incrementos en la frecuencia de aquellas aberraciones que como las translocaciones, resultan de dos rupturas independientes y aumentan aproximadamente con el cuadrado de la dosis, se detectarían más fácilmente.

Referencias

- 1.- Li G.C., Shiu E.C. y Hahn G.M. Radiat. Res., 82:257, 1980.
- 2.- Johansen I. y Howard-Flanders P. Radiat. Res., 24:184, 1965.
- 3.- Sanner T. and Pihl A. Radiat. Res., 37:216, 1969.
- 4.- Held K.D. y Powers E.L. Int. J. Radiat. Biol., 36:665, 1979.
- 5.- Vogel E. Mutation Res., 16:157, 1972.
- 6.- Vogel E. y Chandler J.L.R. Experientia, 30:621, 1974.
- 7.- "Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*", Ed. Lindsley D.L. y Grell E.H., 1967.

TABLA I

Letales recesivos ligados al sexo inducido por 2 Krads
y etanol + 2 Krads en esperma de *Drosophila melanogaster*.

% letales/cromosomas probados			
Tratamiento	Cría A	Cría B	Cría C
<u>Exp. I</u>			
R	$\frac{4,85}{(1380)}$	$\frac{3,62}{(1407)}$	$\frac{5,55}{(1190)}$
E + R	$\frac{6,19}{(1340)}$	$\frac{3,93}{(1323)}$	$\frac{7,36}{(1236)}$
<u>Exp. II</u>			
R	$\frac{5,64}{(1348)}$	$\frac{3,85}{(1428)}$	$\frac{6,09}{(427)}$
E + R	$\frac{4,72}{(1272)}$	$\frac{5,39}{(1002)}$	$\frac{7,39}{(257)}$
<u>Exp. III</u>			
R	$\frac{5,59}{(859)}$	$\frac{6,46}{(356)}$	$\frac{23,33}{(30)}$
E + R	$\frac{6,12}{(947)}$	$\frac{4,30}{(302)}$	$\frac{11,49}{(87)}$

TABLA II

Translocaciones II-III inducidas por 2 Krads y etanol + 2 Krads en
esperma de *Drosophila melanogaster*.

Tratamiento	% translocaciones/cromosomas probados		
	Cría A	Cría B	Cría C
<u>Exp. I</u>			
R	$\frac{3,63}{(1597)}$	$\frac{1,09}{(734)}$	$\frac{5,19}{(77)}$
	*	*	
E + R	$\frac{5,16}{(1571)}$	$\frac{4,09}{(659)}$	$\frac{8,11}{(74)}$
<u>Exp. II</u>			
R	$\frac{4,43}{(1827)}$	$\frac{1,70}{(1414)}$	$\frac{5,03}{(199)}$
	*	*	
E + R	$\frac{6,18}{(1908)}$	$\frac{3,49}{(1574)}$	$\frac{5,46}{(238)}$
<u>Exp. III</u>			
R	$\frac{3,75}{(1252)}$	$\frac{3,00}{(1099)}$	$\frac{8,37}{(239)}$
	*		
E + R	$\frac{6,08}{(1251)}$	$\frac{3,68}{(950)}$	$\frac{12,37}{(194)}$

* P < 0,05

A.5. Inducción de letalidad dominante con glioxal en *Drosophila melanogaster*.

B. Mazar Barnett y E. R. Muñoz.

Induction of dominant lethals with glyoxal in *Drosophila melanogaster*.

Glyoxal, a product of the radiolysis of sugars, is known to affect cellular division, RNA and DNA synthesis. We have previously found that it increases the frequency of sex-linked recessive lethals over the control values in *Drosophila melanogaster*. It was thought of interest to determine whether it modifies radiation induced genetic damage related to chromosome breakage. Glyoxal (0.015%) was administered by intra-abdominal injection to adult *Samarkand* males which were subsequently mated to *cn bw, e* virgins. Only motile sperm was tested. The results of the translocation experiments show that glyoxal neither induced II-III translocations by itself, nor modified the frequency of translocations obtained by exposure to 2 Krads. On the other hand, glyoxal increased the yield both, of spontaneous dominant lethals and of those induced by radiation. At the moment it is still not possible to decide whether the increase in embryonic death observed should be ascribed to an increase in chromosome breakage or to impairment of repair.

El glioxal es uno de los productos de radiólisis de carbohidratos y se le atribuyen algunos efectos sobre la división celular, la síntesis de RNA y de DNA (1-3). Previamente hemos encontrado que el glioxal posee efecto mutagénico en *Drosophila*, detectado en pruebas de inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (4). Con el objeto de determinar si también posee efecto clastogénico, se llevaron a cabo pruebas de translocaciones entre los cromosomas autosómicos II y III, y de letalidad dominante utilizando dicho compuesto solo o combinado con 2000 Rads de rayos X.

Glioxal al 0,015% se inyectó intrabdominalmente a machos silvestres *Samarkand* de 7 días que se cruzaron individualmente en tubos vacíos con hembras *cn, bw; e* (5) para las pruebas de letalidad dominante que se llevó a cabo según técnica usada en este laboratorio (6). Para las pruebas de translocaciones se permitió a los machos un período de recuperación de 2 horas después de la inyección, período que in-

cluyó el tiempo de irradiación en los casos en que se llevaron a cabo tratamientos combinados. Como en el caso anterior los machos se cruzaron con hembras *cn bw*; e durante 3.30 horas en proporción de 1 macho por hembras para permitir el muestreo de esperma que en el momento del tratamiento era maduro y móvil. En las pruebas de translocaciones no se detectaron intercambios en el control (595 cromosomas probados), en la serie en que los machos fueron irradiados se encontró una frecuencia de 4,40% (24/545) y en la serie inyectada e irradiada 5,43% (30/552).

En las pruebas de letalidad dominante se llevaron a cabo dos series experimentales compuestas cada una de 4 grupos: 1) control; 2) machos tratados con glioxal; 3) machos irradiados; 4) machos tratados con glioxal e irradiados. En todos los casos los machos fueron cruzados con hembras sin tratar. Debido a que los resultados obtenidos en ambas series no difieren, éstos han sido sumados. Los resultados se muestran en la Tabla I y puede verse que la frecuencia de huevos no eclosionados en la serie tratada con glioxal es significativamente mayor que la obtenida en el control. Asimismo, en las series irradiadas, la pretratada con glioxal muestra una letalidad embrionaria mayor que la sin pretratamiento.

El incremento en la letalidad dominante observado está en línea con el hallazgo previo de que el glioxal aumenta la frecuencia de letalidad recesiva en *Drosophila*. Sin embargo, dado el resultado obtenido con las pruebas de translocaciones no es posible aún establecer si dicho incremento se debe a una acción clastogénica de dicho compuesto.

Referencias

- 1.- Maguire M.P. Chromosoma , 48:213, 1974.
- 2.- Auerbach C. y otros Mutation Res., 39:317, 1977.
- 3.- Gregg C.T. Exptl. Cell. Res., 50:65, 1968.
- 4.- Mazar Barnett B. y Muñoz E.R. D.I.S., 44:119, 1969.

- 5.- "Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*" Ed. Lindsley D.L., Grell E.H. Carnegie Institution, 1967.
- 6.- Muñoz E.R. y Mazar Barnett B. Mutation Res., 51: 37, 1978.

TABLA I

Frecuencia de letales dominantes inducidos en tratamientos combinados de glioxal y 2000 Rads de rayos X en machos de *Drosophila melanogaster*.

huevos no eclosionados (%) / huevos totales			
machos no tratados	machos tratados		
	Glioxal	2000 Rads	Glioxal + 2000 Rads
210/1316	300/1564	523/1436	457/1015
(15,96)	(19,18)	(36,42)	(45,02)
P < 0,05		P < 0,05	

A.6. Ensayo de letalidad dominante con p-hidroxi benzoato de metilo en *Drosophila melanogaster*.

B. Mazar Barnett y E. R. Muñoz.

Lethal dominant tests with p-Hydroxybenzoic acid methyl ester in *Drosophila melanogaster*.

The p-Hydroxybenzoic acid methyl ester(Nipagin) is currently used as a fungicide in Diptera media. However, a certain decrease in hatchability of eggs was observed both in *Drosophila melanogaster* and *Dacus olea* cultures. Since no additional information was found about the effect of Nipagin on the flies, an investigation was started to determine with stage of gametogenesis, sensitive to the drug could lead to embryonic death. Adult *Drosophila* males or females were injected intraabdominally with Nipagin 1.67% in saline 4%. and dominant lethal tests were performed. In experiments designed to sample motile sperm and mature oocytes, no differences were found against untreated controls. These results would suggest that the embryonic death observed in the cultures does not depend on a action exerted by Nipagin on mature germ cells of *Drosophila*.

El p-hidroxi benzoato de metilo (Nipagin) es un fungicida usado habitualmente en medios de cultivo de *Drosophila melanogaster*. Se ha observado que esta droga influye sobre la cantidad de huevos que eclosionan, en detrimento de los cultivos, que se empobrecen consecuentemente. Se hicieron observaciones similares con otro díptero, *Dacus oleae* (1,2) y no existe información sobre las posibles causas de la acción del mencionado compuesto sobre los huevos.

Como tanto machos como hembras se alimentan del medio que contiene Nipagin, sólo un estudio sistemático del posible efecto del compuesto puede indicar cuales son los estados del desarrollo de las células germinales sensibles al mismo y que pueden llevar a la muerte del embrión.

Los primeros experimentos se realizaron para estudiar el efecto del Nipagin sobre esperma maduro móvil y oocitos maduros. Se determinó letalidad dominante (muerte embrionaria) medida como proporción de nuevos no eclosionados.

Se trataron individuos adultos, de 7 días de edad, con una solución de Nipagin al 1,67% en Cl Na al 4%. administrada por inyección intraabdominal. Se usaron machos de la cepa

silvestre *Samarkand* y hembras de la cepa *cn bw; e* (3), y se siguió el mismo procedimiento, tanto cuando se trataron machos como cuando se trataron hembras. Una vez recuperadas de la anestesia, se colocaron las moscas por parejas en tubos sin alimento y luego de observarse un apareamiento, los machos se descartaron pasándose las hembras a un medio especial para ovoposición, según técnica descripta previamente (4). Simultáneamente se realizó un experimento testigo.

Como puede verse en la Tabla I los resultados obtenidos no muestran aumento de muerte embrionaria con respecto a los valores controles. Estos resultados indicarían que la disminución que se observa en el número de huevos que hacen eclosión, no depende de una acción ejercida por el Nipagin en las células maduras.

Referencias

- 1.- Manoukas A.G. FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture, 14:43, 1972.
- 2.- Manoukas A.G. FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture, 21:12, 1976.
- 3.- Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*, Ed. Lindsley D.L. y Grell E.H. Carnegie Institution, 1967.
- 4.- Muñoz E.R. y Mazar Barnett B. Mutation Res., 51:37, 1978.

TABLA I

N° huevos eclosionados/N° total de huevos					
Control		Machos tratados		Hembras tratadas	
$\frac{81}{642}$	10,39%	$\frac{67}{645}$	10,39%	$\frac{69}{525}$	13,14%

A.7. Pruebas genéticas con Metotrexato y rayos X en *Drosophila melanogaster*.

E. R. Muñoz y B. Mazar Barnett.

Genetic tests with Methotrexate and X-rays in *Drosophila melanogaster*.

Sex-linked recessive lethal, dominant lethal and II-III translocation tests were performed with wild type *Samarkand Drosophila melanogaster* males, intra-abdominally injected with Methotrexate (MTX) (250 mg/Kg). For the sex-linked recessive lethal test, only fully mature sperm was sampled, and only 1 lethal was scored among 1627 analyzed chromosomes (0,06%) a frequency not different from the one usually found in our controls. For the dominant lethal tests, also fully mature sperm was used and 5 different series were run: 1) control; 2) males irradiated with 2000 Rads; 3) males injected with MTX; 4) males injected and irradiated; 5) males irradiated and mated with injected females. No increase of lethals was found in the MTX series versus the control or in the combined treatments versus the irradiated series. The II-III translocation tests were performed with MTX treated mature sperm and spermatids stored up to 35 days. No translocations were found in a total of 7616 tested chromosomes. It is concluded that MTX has no mutagenic or clastogenic action in *Drosophila*, neither impairs repair of radiation induced genetic damages.

El Metotrexato es un antagonista del ácido fólico cuyo uso está ampliamente difundido en el tratamiento de diversas afecciones dermatológicas. Este compuesto posee una marcada acción citostática y en algunos modelos experimentales se ha detectado una cierta acción clastogénica aunque esta acción es, en términos generales, conflictiva (1-5). Dado que este compuesto se utiliza por períodos prolongados o en tratamientos reiterados en individuos jóvenes en plena edad de reproducción, es importante determinar el real alcance de la acción genética del mismo. Para contribuir a ello, se llevaron a cabo pruebas de inducción de mutaciones letales recesivas para determinar la posible acción mutagénica y pruebas de letalidad dominante y translocaciones entre los cromosomas II-III para establecer la posible acción clastogénica del Metotrexato, utilizando *Drosophila melanogaster*, que constituye un sistema de probada eficacia en la detección de mutágenos. Asimismo se lle-

varon a cabo tratamientos combinados con esta droga y 2.000 Rads de rayos X. En todos los casos se utilizaron machos silvestres *Samarkand* de 7 días, que fueron inyectados intrabdominalmente con una dosis equivalente a 250 mg/Kg. de peso. En los casos en que se hicieron tratamientos combinados, los machos se irradiaron inmediatamente después de inyectados. En un grupo de experimentos se cruzaron machos irradiados con hembras inyectadas. Para las pruebas de letalidad recesiva se utilizaron hembras "*Base*" (6) que se cruzaron durante 3,30 hrs. en proporción de un macho por tres hembras. Para la detección de letales dominantes se utilizó la técnica habitual en este laboratorio (7) y los machos fueron cruzados con hembras *cn, bw; e* (6) al igual que para las pruebas de translocaciones. Estas últimas se llevaron a cabo utilizando esperma que después de tratado fue almacenado en las hembras por diversos períodos de tiempo, debido a que hay compuestos que sólo mediante esta técnica muestran su efecto clastogénico.

En las pruebas de detección de letales recesivos ligados al sexo se encontró un letal entre 1627 cromosomas analizados con una frecuencia de 0,06% que es la habitualmente encontrada en los controles en nuestro laboratorio.

Los resultados obtenidos en las pruebas de letalidad dominante se muestran en la Tabla I que condensa los datos de dos experimentos que no diferían entre si y han sido sumados. Como puede verse, la tasa de letalidad dominante encontrada en el control no difiere de la encontrada después de inyectar los machos que fueron cruzados con hembras no tratadas.

La tasa de letalidad tampoco difiere entre las tres series en que se utilizaron machos tratados con 2.000 Rads independientemente de que éstos hubieran sido previamente inyectados con Metotrexato o cruzados con hembras inyectadas.

En la Tabla II se muestran los datos obtenidos en el análisis de inducción de translocaciones entre los autosomas II y III en tres distintos muestreos celulares. Para el muestreo A que representa esperma que en el momento del trata-

miento con Metotrexato era maduro y móvil, los machos inyectados se cruzaron masivamente en proporción de 1:3 con hembras vírgenes por 4,30 hrs., habiéndose hecho todos los subcultivos a 25°C. Para el muestreo B los machos inyectados se cruzaron individualmente con 10 hembras durante 3 días a 25°C, las que una vez fecundadas se almacenaron por un primer período (9 días) en botellas con agar a 17°C, siendo transferidas luego a medio de cultivo común y 25°C por el resto del almacenaje. Para el muestreo C, los machos del muestreo B fueron cruzados nuevamente cada uno con 10 hembras por un período de 24 horas, con el objeto de obtener esperma que en el momento del tratamiento se encontraba en el estado de espermatida, siendo la técnica de almacenaje similar que en B.

En ningún caso se detectaron translocaciones, habiéndose analizado en total 7.616 cromosomas.

Asimismo, las alteraciones en la síntesis de DNA que esta droga produce, (3) no llegarían a afectar la reparación de daños genéticos espontáneos o radioinducidos.

Referencias

- 1.- Rodríguez Murcia C. y Arroyo Nombela J.J. Mutation Res., 14:405, 1972.
- 2.- Maier P. y Schmid W. Mutation Res., 40:325, 1976.
- 3.- Littlefield L.G. y otros. Mutation Res., 67:259, 1979.
- 4.- Brusick D.J. y otros. Mutation Res., 76:169, 1980.
- 5.- Redei G.P. y otros. Mutation Res., 74:469, 1980.
- 6.- "Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*". Ed. Lindsley D.L. y Grell E.H. Carnegie Institution, 1967.
- 7.- Muñoz E.R. y Mazar Barnett B. Mutation Res., 51:37, 1978.

TABLA I

Frecuencia de letales dominantes en tratamientos combinados de Metotrexato y rayos X en *Drosophila melanogaster*

Huevos no eclosionados/huevos totales (%)				
Control	♂ MTX x ♀ s/trat.	♂ 2 Krads x ♀ s/trat.	♂ MTX + 2 Krads x ♀ s/trat.	♂ 2 Krads x ♀ MTX
179/1157 (15,47)	102/830 (12,29)	300/566 (53)	397/773 (51,36)	421/859 (49,01)

MTX: Metotrexato

TABLA II

TRANSLOCACIONES II-III Y ESTERILES DETECTADOS CON TRATAMIENTO DE METOTREXATO EN
ESPERMA DE DROSOPHILA MELANOGASTER

Muestra de esperma						
Subcultivo	Almacenaje (días)	A		B		C
		transl. crom. prob.	estériles	transl. crom. prob.	estériles	transl. crom. prob.
A	1-9	-/195	2			
B	10-11	-/227	5	-/844	17	-/103
C	12-13	-/360	2	-/183	1	-/23
D	14-15	-/272	2	-/602	15	-/60
E	16-17	-/306		-/854	2	-/43
F	18-19	-/282	2	-/812	5	-/19
G	20-21	-/221	2	-/391	2	-/2
H	22-23	-/155	1	-/410	5	
I	24-25	-/77	1	-/323		
J	26-27	-/44		-/241	1	
K	28-29	-/7		-/160		
L	30-31			-/92		
M	32-33			-/197	2	
N	34-35			-/111		
TOTAL		-/2146	17	-/5220	50	-/250
						1

B.1. Caracterización y purificación parcial de murein-hidrolasas de mutantes de *Salmonella typhimurium*

R. A. Pizarro, R. O. Fernández y L. V. Orce.

Characterization and partial purification of murein-hydrolases from *Salmonella typhimurium* mutants.

The activity of murein-hydrolases in bacteria seems to be related with growth, septum formation and cell division. The literature is scarce in references to the subject in Gram negatives, probably due to the unfrequent spontaneous autolysis in these species. A series of mutants bearing this property were constructed, characterized and genetically mapped in CNEA by D.A. Antón and two of them, lytic DA 361 (envD1) and its isogenic non-lytic DA 362 (envD⁺) were employed by us in the work reported here.

At least two murein-hydrolases, active on purified ¹⁴C labeled murein as substrate, were found after the cells were broken by means of a French press. One of them is soluble and found in the supernatant and the other is bound to the cell envelope from which it is solubilized with NaCl plus triton X-100. The main difference between them is related to the fact that the former is unaffected by penicillin G, while the latter is very sensitive to low concentrations of the antibiotic.

When the soluble murein-hydrolase activity was fractionated with (NH₄)₂SO₄ a peak was found on the 40% cut. The presence of an inhibitor in the supernatant was detected when assaying the activity of this 40% fraction. It is thermostable, insensitive to pronase and destroyed by treatment with DNase or RNase a fact probably related with the proposed role of DNA in regulating autolysis.

The envelope-bound activity was dialyzed overnight and fractionated on DEAE-cellulose. Two separate peaks with similar hydrolytic activities were isolated, both showing the above mentioned character of being very sensitive to penicillin G inhibition. New experimental approaches are being carried out in order to purify and characterize further the described hydrolytic activities.

La actividad de las hidrolasas de envolturas microbianas se encuentra relacionada con los mecanismos de crecimiento, formación de tabique y división celular. Varias especies de bacterias Gram positivas expresan dicha actividad produciendo autólisis espontánea, lo que ha sido objeto de numerosos estudios.

En bacilos Gram negativos, por el contrario, la autólisis es un fenómeno poco frecuente por lo cual los informes bibliográficos son escasos. En este Departamento la

Dra. Dora N. Antón ha obtenido una numerosa serie de mutantes autolíticos de *Salmonella typhimurium* habiendo descrito una diversidad de características y localizados los genes implicados.

En el presente informe analizamos las propiedades bioquímicas de dos actividades enzimáticas localizadas en distintas fracciones de extractos crudos del mutante autolítico DA361 (*envD1*) y su isogénico no-lítico DA362 (*envD⁺*), cuyos orígenes han sido descritos en (1). Esas actividades enzimáticas son capaces de hidrolizar a la mureína, capa rígida de la pared de las bacterias, cuya función es la de mantener la estructura celular.

Las actividades enzimáticas de las mureína-hidrolasas (MHAsas) fueron ensayadas empleando como sustrato a mureína marcada con ácido diaminopimélico-U-¹⁴C, extraída del mutante autolítico DA361. La mureína-¹⁴C fue separada de bacterias en fase estacionaria y purificada mediante un proceso similar al descrito por Fontana y col. (2), consistente en tratar a las células con lauril sulfato de sodio (SDS) a 100°C y posteriormente con pronasa. La hidrólisis de la mureína fue estimada luego de su incubación con los extractos enzimáticos por 90 minutos a 37°C. La radiactividad liberada se midió en el sobrenadante que resulta al precipitar la mezcla de incubación con TCA 10 %.

Los extractos conteniendo las actividades MHAsas fueron obtenidos de las cepas DA361 y DA362 cultivadas en caldo nutritivo a 37°C, con agitación. Cuando los cultivos alcanzan una D.O. aproximada a 0,800 se separan las bacterias y se las desintegra con una prensa de French, eliminándose el precipitado luego de centrifugar a 4.000 rpm por 20 minutos.

El sobrenadante obtenido contiene las dos actividades enzimáticas capaces de hidrolizar a la mureína, las cuales son separables por ultracentrifugación a 40.000 rpm durante 30 minutos. Una de ellas, denominada soluble, se encuentra en el sobrenadante y la otra ligada al precipitado con las envolturas celulares de las que se separa al

tratarlas durante 20 minutos con NaCl 500 mM y tritón X-100 al 2%, en forma similar a la descrita en las referencias 3 y 4.

Algunas características de ambas actividades son presentadas en la Tabla I. Puede notarse que la principal diferencia se encuentra en el tratamiento con penicilina G que inhibe fuertemente a la MHasa ligada, mientras que la soluble no es afectada por el antibiótico. El comportamiento de ambas actividades enzimáticas es similar frente a los otros efectores ensayados.

La MHasa soluble fue purificada por precipitación fraccionada con concentraciones crecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En la Tabla II se observa que la mayor actividad se encuentra en la fracción proteica obtenida con el 40% de saturación salina. En este procedimiento la recuperación de proteínas fue del 72% y la actividad enzimática en la sumatoria de los precipitados de 40 y 60% de saturación alcanzó al 387%.

La incubación del extracto con mayor actividad enzimática en presencia de los otros cortes, inactivados por calentamiento, señala la presencia de un inhibidor (o inhibidores) en el extracto crudo. En la Tabla III puede observarse que, por ejemplo, la actividad hidrolítica del 40% de saturación se pierde casi totalmente al preincubar con el extracto inicial. La inhibición es similar en preparados de ambos mutantes.

Para determinar la naturaleza del inhibidor, el extracto crudo fue sometido a diferentes tratamientos antes de ensayar su capacidad de frenar la acción hidrolítica de la fracción 40%. Mientras que el calentamiento a 90°C por 10 minutos, o la preincubación con pronasa de dicho extracto resultaron inefectivos, los tratamientos con DNasa o RNasa pancreáticas (40 µg/ml) anulan totalmente el efecto inhibitorio del extracto (Tabla IV).

Por su parte, la MHasa ligada a la envoltura y extraída con la mezcla de NaCl y tritón X-100 fue sometida a cromatografía de intercambio con DEAE celulosa. La elución de las columnas con buffer tris-maleato permitió la separa-

ción de dos picos con similar actividad de mureín-hidrolasa, demostrándose que ambas son inhibidas por el agregado en la mezcla de incubación de 200 U/ml de penicilina G.

En resumen, los resultados obtenidos muestran la presencia en extractos crudos de una MHasa soluble, activada por iones calcio e insensible a penicilina. Su fraccionamiento salino permitió señalar que: a) el pico de actividad se encuentra en la fracción precipitable con el 40% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y b) que en los extractos crudos se encuentra un inhibidor (o inhibidores) no proteico y termoestable, pero inactivado por DNasa y RNasa lo que sugiere su relación con polinucleótidos. Resultados similares fueron obtenidos con *Escherichia coli* (5,6) postulándose un posible rol del DNA en la regulación de autolisinas.

Una segunda actividad de MHasa fue encontrada en unión con la envoltura celular, de la que se desliga al tratarla con NaCl y tritón X-100. Es ligeramente activada por calcio y su cromatografiado en DEAE-celulosa permite separar dos picos de actividad similar, ambos muy sensibles a penicilina G. Se llevan a cabo nuevos estudios tendientes a definir el efecto inhibitorio del antibiótico, como también a progresar en la purificación y caracterización de ambas MHasas.

Referencias

- 1.- Antón D.A., Orce L.V. Molec. gen. Genetic., 144:97, 1976.
- 2.- Fontana R., Canepari P., Sata G.J. Bacteriol., 139:1028, 1979.
- 3.- Hartman R., Holtje J.V. Schwarz U. Nature 235:426, 1972.
- 4.- Hartman R., Bockhenning S.B., Schwarz U. Eur. J. Biochem., 41:203, 1974.
- 5.- Tomioca S., Matsushashi M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84:978, 1978.
- 6.- Keck W., Schwartz W. J. Bacteriol. 139:770, 1979.

TABLA I

Acción de diferentes compuestos sobre la MHase soluble y MHase ligada

Compuesto añadido a la mezcla de incubación	Concentración mM	Act. relativa MHase soluble	Act. relativa MHase ligada
Ninguno	—	100	100
Mg ⁺⁺	3	120	104
Ca ⁺⁺	3	140	109
EDTA	3	104	84
SDS	3	0	1
CYS	3	130	104
PCMB	3	124	88
PEN G	200 µ/ml	124	3

Las actividades enzimáticas fueron ensayadas a pH 4,5 con mureína ¹⁴C-DAP como sustrato. Los extractos enzimáticos fueron preincubados a 37°x10 min antes de agregar el sustrato.

TABLA II

Precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de MHasa
soluble DA 361

% Saturación $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Prot. total (Lowry)	Act. específica cmp/mg prot/hora
0	33,60	2.409
20	4,14	1.378
40	8,72	5.550
60	6,12	2.352
80	2,48	43
SOB. 80%	4,50	000

TABLA III

MHasa soluble; efecto de la adición de las fracciones de la precipitación salina sobre la actividad enzimática del 40% de saturación en DA 361 y DA 362

Fracción añadida a mezcla de incubación	Act. Relativa DA 361	Act. Relativa DA 362
Ninguna	100	100
0 %	19	10
20 %	32	33
60 %	104	91
80 %	50	130
SOB. 80 %	23	15

TABLA IV

Fracción del 40 %: efecto de la adición del extracto
crudo con distintos tratamientos

Adición a la fracción 40%	Actividad relativa	
	DA 361	DA 362
Ninguno	100	100
Extracto crudo	19	10
Extracto crudo Ø 90°	19	10
Extracto crudo DNAsa	124	125
Extracto crudo RNasa	129	125

B.2. Mutantes de *Salmonella typhimurium* con forma celular esférica
D. N. Antón y A. T. De Micheli.

Round-cell mutants of *Salmonella typhimurium*.

Sixteen round-cell mutants were found among colonies of *Salmonella typhimurium* resistant to mecillinam. Ten of them were *rodA-pbpA* mutants and the rest mapped in *envB* gene. No *divD* mutants were found. The effect of mecillinam on round-cell mutants, either selected with mecillinam or isolated fortuitously, was tested. All *rodA-pbpA* and *envB* mutants displayed high resistance to the antibiotic whereas the two *divD* mutants tested were almost as sensitive as the corresponding wild type. It is concluded that the product of gene *divD*, although required for maintenance of bacillar cell shape, is not involved in the lethal action of mecillinam. This observation explains the failure of mecillinam in the isolation of *divD* mutants of *S. typhimurium* and *E. coli*.

Mecilnam es un antibiótico perteneciente a la familia de las β -lactamas, que se une específicamente a una de las proteínas de membrana interna que captan penicilina, la PBP-2, y produce redondeamiento de la forma celular. El examen de colonias de *Escherichia coli* resistentes a ese antibiótico permitió aislar gran número de mutantes redondos, todos ellos pertenecientes a los genes *envB*, *rodA* o *pbpA* (1). Parecería existir, por lo tanto, una estrecha relación entre forma celular y mecilnam tal que las alteraciones resultantes en células esféricas estarían siempre acompañadas por un aumento en la resistencia al antibiótico. Esta relación no se debería exclusivamente al papel de la PBP-2 en la captación de mecilnam, ya que dos de los tipos de mutantes redondos (*envB* y *rodA*) cuentan con una PBP-2 aparentemente normal (2).

Una cuarta clase de mutante redondo se conoce en *S. typhimurium*. El gen afectado en estos mutantes, denominado *divD*, está ubicado en la unidad 56 del mapa genético de ese organismo, entre los marcadores *strB* e *hisS* (3). No se conocen mutantes de este tipo en *E. coli*, a pesar de que hay datos genéticos que demuestran que el gen correspondiente también se halla presente en esa especie.

Se realizó un estudio genético de mutantes esféricos

de *S. typhimurium* obtenidos por medio de mecilinam para investigar si en esta especie aparecen entre ellos mutantes *dívD*. Se estudió, además, el efecto de mecilinam sobre mutantes redondos de todos los tipos conocidos en *S. typhimurium*.

Se aislaron mutantes resistentes a mecilinam a partir de cinco cepas diferentes de *S. typhimurium*. Dos de las cepas se eligieron por contar con marcadores que facilitarían la identificación de las mutaciones investigadas, en tanto que otras dos eran portadoras de mutaciones que producen hipersensibilidad a productos del operón histidina. Se emplearon cepas hipersensibles porque todos los mutantes *dívD* conocidos han sido aislados en cepas con esas características (4) o constitutivas para el operón histidina (3).

El procedimiento de obtención de mutantes fue igual para todas las cepas. Se usó como inductor de mutaciones dietilsulfato, y las colonias resistentes fueron seleccionadas sobre medio que contenía 1 µg/ml. de mecilinam. Se constató la forma celular de las colonias aisladas, y se conservaron 16 mutantes redondos de origen independiente. La identificación genética se realizó estudiando la cotransducción de la mutación de redondez con los marcadores *líp* y *leuS*, para los genes *rodA* y *pbpA* (5), con los marcadores *hisS* y *strB*, para el gen *dívD* (3), y con el marcador *aroE*, para el gen *envB* (6). Para el gen *envB* se estudió, en algunos casos, ligamiento al marcador *aroE* por medio de conjugación sexual.

Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla I. Como los mutantes *rodA* y *pbpA* tienen una localización muy próxima y no pueden diferenciarse por transducción se los ha agrupado en una sola clase. Puede verse en la tabla que 10 de los mutantes correspondían a las clases *rodA-pbpA* en tanto que los 6 restantes eran mutantes *envB*. No se encontró ningún mutante *dívD*. Estos resultados demuestran que en *S. typhimurium*, al igual que en *E. coli*, no pueden obtenerse mutantes *dívD* por selección con mecilinam.

Para aclarar la razón de la falta de mutantes *dívD*, se estudió el efecto de mecilinam sobre mutantes redondos aislados con ese mismo antibiótico u obtenidos en forma ca-

sual. Se incluyeron dos mutantes *dívd* aislados fortuitamente en cepas hipersensibles. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla II y demuestran que todos los mutantes *envB* y *rodA-pbpA*, independientemente del método de aislamiento, presentan un gran aumento en la resistencia a mecilina. Por el contrario, los mutantes *dívd* muestran prácticamente la misma sensibilidad que el tipo salvaje.

Estos resultados indican que la forma celular esférica, por sí misma, no confiere resistencia a mecilina y que el producto del gen *dívd*, a diferencia de los de los genes *envB*, *rodA* y *pbpA*, no interviene en la acción letal de mecilina. Se explica así la incapacidad de mecilina para seleccionar mutantes *dívd* en *S. typhimurium* y, probablemente, también en *E. coli*.

Referencias

- 1.- Spratt B.G., Boyd A. y Stoker N. J. Bacteriol, 143:569, 1980.
- 2.- Tamaki S., Matsuzawa H. y Matsuhashi M. J. Bacteriol., 141:52, 1980.
- 3.- Wyche J.H., Kennedy J., Hartman Z., Hartman P.E. y Diven J. J. Bacteriol., 120:965, 1974.
- 4.- Antón D.N. J. Bacteriol., 137:1271, 1979.
- 5.- De Micheli A.T. y Antón D.N. El presente informe pag. 45-50
- 6.- Antón D.N. Molec. gen. Genet., 160:277, 1978.

TABLA I

Mutantes redondos obtenidos por resistencia a mecilina

Cepa	Propiedades	Nº total	<i>rodA- pbpA</i>	<i>envB</i>	<i>divD</i>
LT2	tipo salvaje	1	1	-	-
SB2299	hipersensible	4	2	2	-
SB2298	hipersensible	7	4	3	-
DA475	<i>aroE32</i>	2	1	1	-
SA342	<i>lip-2</i>	2	2	-	-
Total		16	10	6	-

TABLA II

Supervivencia de mutantes redondos en medio con mecilinam.

Alelo	Aislamiento	Fracción de supervivientes (N/No)
<i>(rodA-pbpA) 1</i>	Casual	$3,3 \times 10^{-2}$
<i>(rodA-pbpA) 2</i>	Mecilinam	$2,8 \times 10^{-2}$
<i>(rodA-pbpA) 3</i>	"	$8,5 \times 10^{-1}$
<i>(rodA-pbpA) 4</i>	"	$8,9 \times 10^{-1}$
<i>(rodA-pbpA) ⁺</i>	Tipo salvaje	$2,5 \times 10^{-5}$
<i>envB4</i>	Casual	$3,8 \times 10^{-1}$
<i>envB6</i>	Mecilinam	$6,5 \times 10^{-1}$
<i>envB7</i>	"	$8,6 \times 10^{-1}$
<i>envB ⁺</i>	Tipo salvaje	$1,8 \times 10^{-5}$
<i>divD132</i>	Casual	$1,9 \times 10^{-4}$
<i>divD133</i>	"	$6,7 \times 10^{-5}$
<i>divD ⁺</i>	Tipo salvaje	$7,4 \times 10^{-6}$

Concentración de mecilinam: 1 µg/ml

B.3. rodA: un nuevo locus que controla la forma celular en *Salmonella typhimurium*.

A. T. De Micheli y D. N. Antón.

rodA: a new locus controlling cell shape in *Salmonella typhimurium*.

Several alterations are shared by strains DA138, DA139, and DA140: round cell shape, sensitivity to cycloserine and deoxycholate, high autolytic activity and abnormal fermentation of maltose. Genetic studies on those strains allowed the identification of a new locus (*rodA*) involved in cell shape control; *rodA* is located between markers *lip* and *leuS* in the unit 14 of the linkage map of *S. typhimurium*. The frequency of cotransduction of *rodA* with *lip* and *leuS* genes is 63,7 % and 13 % respectively. In dominance tests, the *rodA* mutation behaves as recessive with respect to the wild type allele. *rodA* is a pleiotropic mutation since, besides the morphological change, it produces an increase in cycloserine and acridine orange sensitivity, modifies the level of autolysis and alters the fermentation of maltose. It has been found that the *rodA* mutation abolishes the filamentation produced by derepression of the histidine operon; it is assumed that the positive selection of *rodA* mutants in strains hypersensitive to the overproduction of *hisF* and *hisH* gene products is due to this property of *rodA* mutation.

La familia de cepas DA138, DA139 y DA140 se originó a partir de un transductante *his*01242 viable de DA78, una cepa hipersensible al exceso de producto de los genes *hisH* e *hisF*; las tres cepas son sensibles a cicloserina (20 µg/ml) y desoxicolato (3 mg/ml), tienen un nivel autolítico elevado, fermentan anormalmente maltosa y tienen forma celular redonda (1).

Se estableció la ubicación aproximada de la mutación responsable de la alteración morfológica de DA139 por medio de cruzamientos entre una derivada dadora de DA139 y una cepa auxotrófica con marcadores distribuidos en todo el cromosoma. El 40% de los recombinantes *nadA*⁺ *his*⁺ estudiados presentaban forma redonda lo que indicó que existía un ligamiento bastante estrecho entre la mutación de forma de DA139 y el marcador *nadA*.

En *S. typhimurium* se han encontrado, hasta el presente, dos tipos de mutantes redondos ninguno de los cuales se encuentra en esta zona del cromosoma: *envB* (2) y *dívD* (3).

Sin embargo en *E.coli* se ha descrito un gen que controla la morfología celular, denominado *rodA*, que se encuentra en el minuto 14 y está estrechamente ligado por transducción con el marcador *lip* (14).

En pruebas de transducción (Tabla I) se comprobó que la mutación responsable de la alteración morfológica de DA139 también cotransduce con *lip* con una frecuencia de 63,5 % y que además está ligada con *leuS* con una frecuencia de 9,9 %.

La ubicación genética de esta mutación sugiere que se trata de una mutación en el gen *rodA*, cuya existencia no había sido descrita en *S.typhimurium* hasta el presente.

Las mutaciones presentes en DA138 y DA140 cotransducen con *lip* y *leuS* con frecuencias similares a las encontradas con DA139, lo cual, sumado al estrecho parentesco que existe entre estas cepas, sugiere que las tres cepas son portadoras de la misma mutación.

También se observa en la Tabla I que *leuS* cotransduce con *lip* y *nag* con frecuencias de 7,7% y 1,8% respectivamente, no habiéndose detectado ligamiento entre *lip* y *nag*; estos valores de cotransducción junto con los que se establecieron entre *rodA* y los marcadores *lip* y *leuS* permiten establecer el orden de los marcadores que se presenta en la Fig. 1.

Para estudiar la dominancia de la mutación *rodA* se construyó un diploide parcial *rodA/rodA*⁺ cruzando un transductante *rodA* con una cepa F' de *E.coli* cuyo episoma cubre la zona del cromosoma correspondiente a *rodA* y lleva el marcador *lac*⁺. Los recombinantes *lac*⁺ contruídos de esta forma (diploides) tienen forma bacilar en tanto que los segregantes *lac*⁻ (haploides) tienen forma redonda lo que indica que la mutación *rodA* es recesiva respecto al alelo salvaje.

Las alteraciones producidas por la presencia de la mutación *rodA* se estudiaron en la cepa DA587, un transductante *lip*⁺ *rodA*, y los resultados se compararon con los obtenidos con la cepa isogénica salvaje DA588 (Tabla II).

La cepa DA587 tiene forma redonda independientemente del medio de cultivo y de la temperatura de incubación, fer-

menta anormalmente maltosa, presenta un nivel autolítico elevado y es sensible a 20 $\mu\text{g/ml}$ de cicloserina y a 100 $\mu\text{g/ml}$ de anaranjado de acridina en tanto que DA588 es normal con respecto a estas propiedades.

Estos resultados indican que *rodA* produce, además de la alteración morfológica, un incremento en la sensibilidad a cicloserina y anaranjado de acridina, un considerable aumento en el nivel autolítico e interferencias en la fermentación de maltosa.

El hecho de que DA139, al igual que DA138 y DA140, sea resistente a 100 $\mu\text{g/ml}$ de anaranjado de acridina sugiere que en estas cepas la sensibilidad al colorante determinada por la mutación *rodA* está enmascarada. Por otra parte, si bien estas tres cepas son sensibles a desoxicolato, la respuesta de DA587 al detergente es muy variable lo que hace pensar que es otra mutación distinta a *rodA* la que produce esta alteración en DA138, DA139 y DA140.

Las cepas DA138, DA139 y DA140 se obtuvieron entre los derivados *his01242* de DA78, una cepa hipersensible a altos niveles de expresión del operón histidina. Se estudió la posibilidad de que la mutación *rodA* interfiera con los efectos de la constitutividad.

Las cepas constitutivas sufren inhibición de la división celular cuando crecen en medio adicionado con 2 % de glucosa y, en consecuencia, forman filamentos; por el contrario, los derivados *rodA* de una cepa constitutiva forman células redondas cuando crecen en dicho medio. Este hecho indica que la mutación *rodA* suprime la filamentación de las cepas constitutivas y sugiere que las mutantes *rodA* fueron seleccionadas positivamente entre los derivados *his01242* de DA78 debido a esta propiedad.

Referencias

- 1.- Antón D.N. J. Bacteriol., 137:1271, 1979.
- 2.- Antón D.N. Mol. gen. Genet., 160:277, 1978.
- 3.- Wyche J.H., Kennedy J., Hartman Z., Hartman P.E. y Diven J. J. Bacteriol., 120:965, 1974.
- 4.- Matsuzawa H., Hayakawa K., Sato T. e Imahori K. J. Bacteriol., 115:436, 1973.

TABLA I

Frecuencias de cotransducción halladas entre los marcadores *lip*, *leuS*, *nag* y *rodA*.

Fago	Cepa	Marcador seleccion.	Nº Transd. analizados	Nº Transd. con marcad. no seleccion.	Frec. de cotransd.
DA139	SA342	<i>lip</i>	493	313 <i>rodA</i>	63,48 %
	CV356	<i>leuS</i>	505	50 <i>rodA</i>	9,90 %
DA138	SA342	<i>lip</i>	144	94 <i>rodA</i>	65,27 %
	CV356	<i>leuS</i>	286	35 <i>rodA</i>	12,20 %
DA140	SA342	<i>lip</i>	133	84 <i>rodA</i>	63,15 %
	CV356	<i>leuS</i>	384	70 <i>rodA</i>	18,20 %
SA342	CV356	<i>leuS</i>	413	28 <i>lip</i> ⁻	6,80 %
DA644	CV356	<i>leuS</i>	325	29 <i>lip</i> ⁻ <i>nag</i> ⁺	8,90 %
				6 <i>lip</i> ⁺ <i>nag</i> ⁻	1,80 %

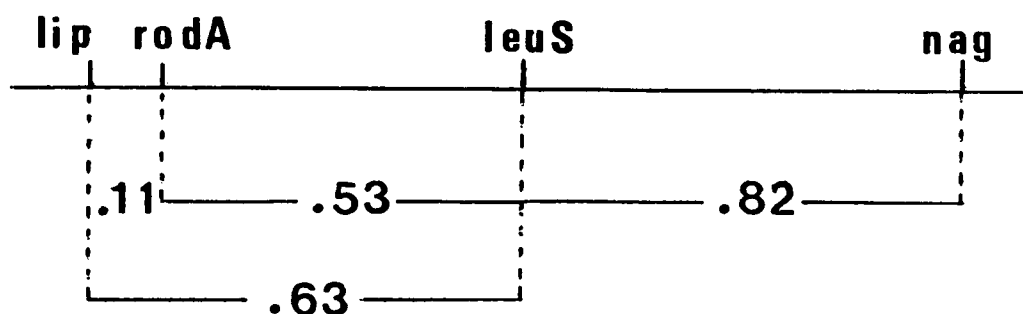


Fig. 1: Mapa de la zona del cromosoma correspondiente a la unidad 14. Se indican las distancias entre los distintos marcadores calculadas en base a las frecuencias de cotransducción halladas en este trabajo.

TABLA II

Alteraciones detectadas en transductantes *rodA*

Cepa	Forma Celular	Crecimiento en			Nivel de Autólisis %	Ferment. de Maltosa
		Ciclos. (1)	Doc. (2)	Acrid. (3)		
LT2	Bacilo	+	+	+	17,91	Normal
DA587	Redonda	-	+	-	50,62	Anormal
DA588	Bacilo	+	+	+	24,11	Normal
DA139	Redonda	-	-	+	50,61	Anormal

1: Cicloserina, 20 µg/ml

2: Desoxicolato, 3 mg/ml

3: Anaranjado de acridina, 100 µg/ml

B.4. Efectos de la mutación *envB* en la respuesta de *Salmonella typhimurium* a la radiación ultravioleta.
D. N. Antón.

Effects of *envB* mutations on the response of *Salmonella typhimurium* to ultraviolet radiation.

Mutations in gene *envB* confer UV-resistance to some strains of *S. typhimurium* but UV-sensitivity to others. Double mutants carrying mutations in *envB* and in each of the main mechanisms for repair of DNA were constructed. In *envB* strains displaying resistance, mutations in *recBC* and *recA* genes produce additive effects whereas the double mutant *uvrA401 envB4* shows no difference with the single mutant *uvrA401 envB⁺*. It is concluded that the resistance to UV conferred by *envB* mutations is mediated by the process controlling excision of thymine dimers. In *envB* strains displaying UV-sensitivity, there is a significant liquid holding recovery that is inhibited by the presence of caffeine or acridine orange. Double mutants carrying an *envB* mutation and mutations in either *recBC* or *uvrB* genes show increased sensitivity with respect to the level conferred by the repair mutation alone. However, *envB recA* mutants are more resistant than the corresponding *envB⁺ recA* strain. It is assumed that in those strains the *envB* mutation interferes somehow with inducible repair mediated by gene *recA*. When inducible repair is not active, the strain recovers the typical resistance conferred by *envB* mutations.

Las mutaciones *envB* modifican la morfología celular con producción de células redondas. Tienen, además, numerosos efectos pleiotrópicos entre los cuales se cuenta el incrementar la sensibilidad a desoxicolato, penicilina y cicloserina, elevar el nivel normal de autólisis en buffer alcalino y alterar la fermentación de varios carbohidratos(1).

Además de las características pleiotrópicas mencionadas, las mutaciones *envB* producen, en *Escherichia coli*, un aumento en la resistencia a la radiación ultravioleta (UV) (2). Se observó, sin embargo, que la única mutación *envB* conocida, hasta hace poco, en *Salmonella typhimurium*, tenía el efecto contrario ya que incrementaba la sensibilidad de la cepa (1).

Se investigó si esa diferencia de comportamiento se debía a propiedades de los distintos alelos usados. Para ello se transfirió, por conjugación sexual, la mutación

envB de *Salmonella* (*envB4*) a *E. coli* y se estudió su efecto en este organismo. Como puede verse en la Fig. 1 la cepa obtenida, un híbrido estable de *E. coli* y *S. typhimurium*, mostró resistencia a UV al igual que los auténticos mutantes *envB* de *E. coli*. A partir del híbrido se transfirió nuevamente a *Salmonella* la mutación *envB4* y, como antes, la cepa de *Salmonella* mostró incremento de la sensibilidad (Fig. 1) (3). Estos resultados descartan un efecto debido a diferencias de alelos.

El aislamiento, por medio de mecilinam, de varios nuevos mutantes *envB* en distintas cepas de *S. typhimurium* (4) permitió observar que, a diferencia de *envB4*, varios de ellos aumentaban considerablemente la resistencia a UV (Fig. 2-B). Por ello se estudió el comportamiento de la mutación *envB4* en diversas cepas de *S. typhimurium*, y se encontró que el efecto de la misma depende de la cepa en la que se halla presente ya que en algunas produce sensibilidad pero en la mayoría aumenta la resistencia a la radiación (Fig. 2-A y -C). En base a estos resultados puede concluirse que en *S. typhimurium* el efecto de las mutaciones *envB* sobre la respuesta a la radiación UV varía de acuerdo a características de la cepa portadora.

La resistencia a UV conferida por las mutaciones *envB* podría deberse a una estimulación de la actividad o eficiencia de algunos de los sistemas que efectúan la reparación del ADN irradiado con UV. Para probar esta posibilidad se construyeron, en cepa que muestran resistencia a UV por efecto de las mutaciones *envB*, dobles mutantes con mutaciones en cada uno de los principales mecanismos de reparación de ADN y en el gen *envB*. Estas cepas se compararon con los correspondientes mutantes afectados sólo en los sistemas de reparación. Los resultados obtenidos (Tabla 1) demuestran que aún en ausencia del mecanismo post-replicativo constitutivo (mutantes *recBC* o *recA*) o inducible (mutante *recA*) la mutación *envB* produce aumento en la resistencia de la cepa. Por el contrario, en cepas con mutaciones en el sistema de escisión de dímeros de timina (mutante *uvrA*) esa resistencia no se manifiesta, y tanto el doble mutante

uvrA envB como el simple *uvrA envB*⁺ muestran la misma respuesta. Estos resultados indican que en las cepas resistentes la acción del gen *envB* se cumple por medio del proceso de escisión.

En las cepas en las que las mutaciones *envB* producen sensibilidad a UV se observa una activa reparación por incubación en medio líquido no nutritivo, que no se advierte en las cepas salvajes, y que en dos horas eleva la sobrevivida del mutante casi al nivel de la cepa normal (Fig. 3). Esta reparación no se produce en presencia de cafeína o anaranjado de acridina, drogas ambas que actúan como inhibidoras del proceso de escisión. Estas evidencias demuestran que en las cepas *envB* sensibles hay una activa escisión de dímeros y que la sensibilidad mostrada se debe a deficiencias en alguno de los otros sistemas de reparación.

Se construyeron dobles mutantes empleando siempre cepas que muestran sensibilidad por acción de *envB*. Como en el caso de las cepas resistentes se observó que los dobles mutantes *envB recBC* presentan un efecto aditivo (Tabla 1), con mayor sensibilidad que el mutante simple *recBC*, lo que descarta al sistema de reparación post-replicativo constitutivo. Lo mismo sucede en el caso de las cepas *envB uvrB*, lo que permite eliminar a la escisión de dímeros como responsable de la sensibilidad. Por el contrario, en el caso del doble mutante *envB recA* se produce el fenómeno opuesto y dicho doble resulta ser más resistente que el mutante simple *recA*. Estos resultados indican que la sensibilidad a UV que presentan algunas cepas *envB* necesita para manifestarse que la reparación post-replicativa inducible, mediada por el gen *recA*, funcione activamente. Cuando este requisito no se cumple, por ej. en mutantes *recA*, reaparece la típica resistencia conferida normalmente por la mutación *envB*.

Puede suponerse que así como en las cepas resistentes la mutación *envB* aumentaría la actividad o eficiencia de la reparación por escisión de dímeros, en las cepas sensibles la mutación *envB* disminuiría la actividad o eficiencia del sistema inducible, también llamado SOS. Se es-

tán investigando las características de las cepas que condicionan una u otra respuesta.

Referencias

- 1.- Antón D.N. Molec. gen. Genet., 160:277, 1978.
- 2.- Adler H.I., Terry C.E. y Hardigree A.A. J. Bacteriol., 95:139, 1968.
- 3.- Antón D.N. Molec. gen. Genet., 181:150, 1981.
- 4.- Antón D.N. y De Micheli A.T. El presente Informe, p.p.40-50.

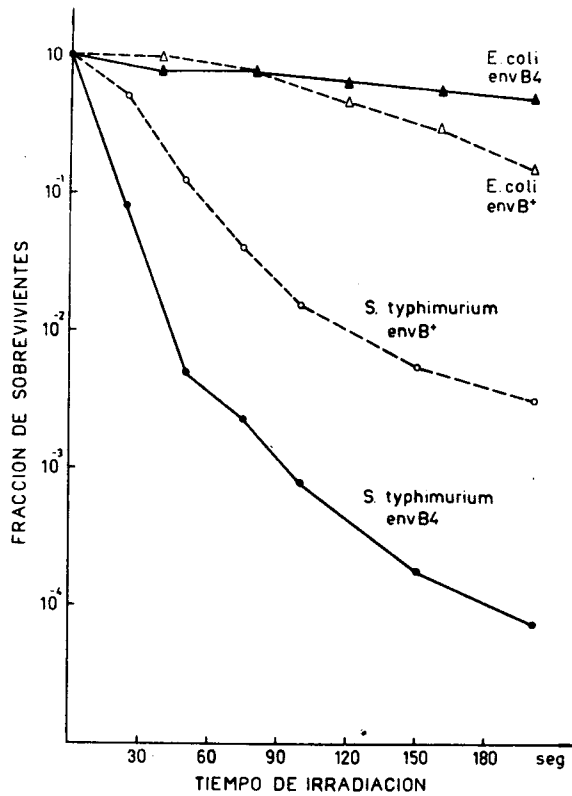


Figura 1:

Sobrevivencia de derivadas *envB*⁺ y *envB4* de *E. coli* y *S. typhimurium* irradiadas con UV. Las bacterias, crecidas hasta fase logarítmica, se resuspendieron en solución de NaCl (0,1 M) y se irradiaron con dosis crecientes de UV. El número de sobrevivientes con cada dosis se determinó por siembra en agar nutritivo.

Figura 2:

Sobrevivencia de derivadas *envB*⁺, *envB4* y *envB6* en cepas de *S. typhimurium*. Las curvas de los sectores A y C corresponden a derivadas *envB*⁺ y *envB4* de diferentes cepas de *S. typhimurium*.

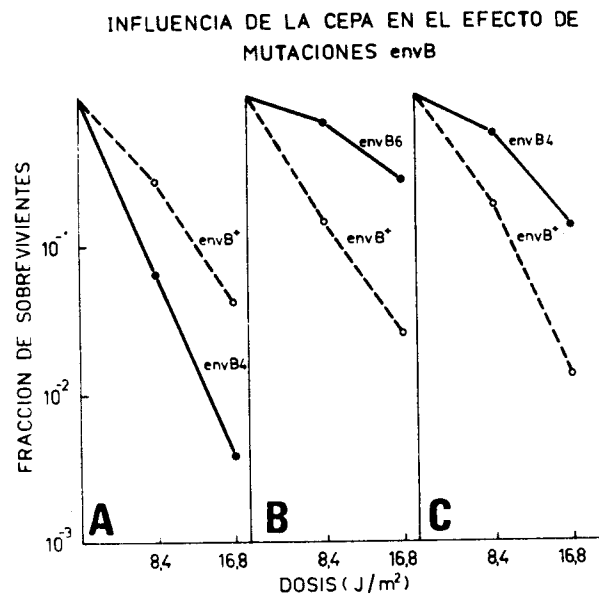
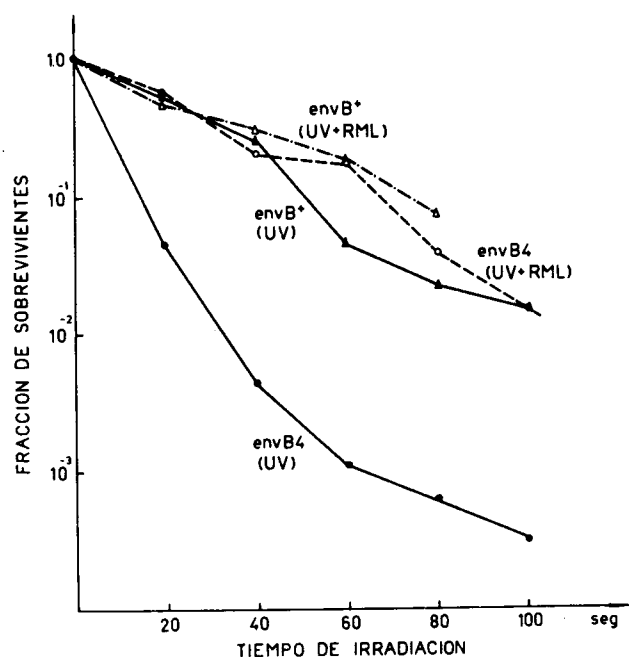


Figura 3:



Recuperación en medio líquido (RML) de derivadas *envB*⁺ y *envB*⁴ de cepas sensibles de *S. typhimurium*. Se irradiaron con diferentes dosis de UV suspensiones en NaCl (0,1 M) de células en fase logarítmica (D.O. a 650 nm: 0,1). Tras cada dosis se tomaron muestras y parte se sembró inmediatamente para recuento de bacterias viables (UV, en la figura) en tanto que otra parte se incubó en solución salina, durante dos horas, a 37°, en la oscuridad, y recién entonces se sembró en agar nutritivo (UV+RML, en la figura).

Cepas	Efecto de <i>envB</i> en mutantes		
	<i>uvrA</i>	<i>recBC</i>	<i>recA</i>
Resistentes	Sin cambio	Aumento de resistencia	Aumento de resistencia
Sensibles	Aumento de sensibilidad	Aumento de sensibilidad	Aumento de resistencia

Tabla I: Efecto de una mutación *envB* en la sobrevivencia de mutantes de reparación irradiados con UV.

B.5. Promoción de la division celular en mutantes *divC* de *Salmonella typhimurium*.

A. T. De Micheli y D. N. Antón.

Promotion of cell division in *divC* mutants of *Salmonella typhimurium*.

Three stains displaying thermosensitive growth were found among 41 viable *his01242* derivatives of a strain hypersensitive to the excess of *hisH* and *hisF* gene products. The three strains (DA138, DA143 and DA148) own their thermosensitive phenotype to mutations in gene *divC*, located in unit 3 of the *S. typhimurium* linkage map. It has been observed that hypersensitivity is very efficiently suppressed by *divC* mutations; this fact provides an explanation for the high frequency of *divC* mutants found in viable derivatives of the hypersensitive strain. Mutation *divC131* produces inhibition of cell division at 42°C but does not interfere with synthesis of DNA or protein. Non-septate filaments formed at 42°C divide when the temperature is decreased (32°C) or when the osmolarity of the medium is increased. Division promoted by a temperature shift proceeds even in the absence of protein synthesis and works still on cells entering stationary phase. On the contrary, the effect of osmolarity requires protein synthesis and works only on cells in early exponential phase. These evidences suggest that different pathways to cell division are employed in each case.

Entre 41 transductantes *his01242* de DA78, una cepa hipersensible al exceso de producto de los genes *hisH* e *hisF*, se encontraron tres que son incapaces de formar colonias a 42°C. Se demostró anteriormente que la termosensibilidad de una de estas cepas, DA138, se debe a la presencia de una mutación en el gen *divC* que está ubicado en la unidad 3 del cromosoma y que presenta una frecuencia de cotransducción de 11,8% con el marcador *leu* (1).

En el presente trabajo se estudió la determinación genética de la termosensibilidad de las otras dos cepas observándose que la mutación de DA143 está ligada por transducción con *leu* con una frecuencia del 3,9 % en tanto que la DA148 cotransduce con este marcador con una frecuencia del 5,7%. En base a estos resultados puede suponerse que estas dos cepas, al igual que DA138, son portadoras de mutaciones *divC* (2).

La alta frecuencia de aparición de mutantes *divC* en-

tre los derivados *his01242* de una cepa hipersensible sugiere que esa mutación desempeña un papel importante en la supresión del efecto letal que tiene la superproducción del producto de los genes *hisH* e *hisF* sobre dicha cepa.

En la cepa SB2299 la hipersensibilidad se manifiesta por la ausencia de recombinantes *hisF*⁺ en transducciones con fago crecido en una cepa dadora *his01242* (3). Con el objeto de analizar el efecto de *dívC* sobre hipersensibilidad se comparó el comportamiento de una derivada *dívC*⁺ de la cepa SB2299 con el de las tres derivadas *dívC* de la misma cepa.

Las pruebas realizadas mostraron que el derivado *dívC*⁺ de SB2299, al igual que la cepa parental hipersensible, no produce transductantes *hisF*⁺ al ser cruzado con fago *his01242* mientras que sí los produce con fago salvaje. Por otra parte, los tres derivados *dívC* de SB2299 no se comportan como hipersensibles ya que forman abundantes recombinantes *hisF*⁺ al ser transducidos tanto con fago salvaje como con fago *his01242*.

Estos resultados indican que, efectivamente, las mutaciones *dívC* suprimen la hipersensibilidad de SB2299 y sugieren que su aparición entre los derivados *his01242* de DA78 se debe a que son, por esta razón, positivamente seleccionadas.

Se ha consignado previamente que el pasaje de una cepa portadora de una mutación *dívC131* (DA470) de 32°C a 42°C produce la inhibición de la división celular y la consiguiente formación de filamentos (1).

Con el objeto de aclarar las causas de dicha inhibición se estudió la síntesis de ADN y de proteínas en un cultivo de DA470 crecido a 42°C. La Fig. 1 muestra que a 42°C la síntesis de ADN y de proteínas continúa en forma semejante a la del control de 32°C, hecho que indica que la inhibición de la división celular que ocurre a temperatura no permisiva no se debe a interrupciones en el proceso de síntesis de estas macromoléculas.

Por otra parte se sometieron cultivos de DA470 mantenidos durante diferentes tiempos a 42°C al efecto de la

radiación ultravioleta. Se observó que los cultivos crecidos a 42°C son más resistentes que el control mantenido a 32°C, y que esa resistencia aumenta al aumentar el tiempo de incubación a 42°C. Las formas de las curvas de inactivación muestran que la incubación a 42°C no modifica en realidad la sensibilidad de las células puesto que todas las curvas presentan aproximadamente la misma pendiente. La mayor resistencia aparente se debe al hombro que presentan las curvas, cuya longitud es proporcional al tiempo de incubación a 42°C y que refleja el progresivo aumento en el contenido de ADN de los filamentos (Fig. 2).

Se sabe por experiencias previas que los filamentos formados a 42°C pueden dividirse ya sea por pasaje a 32°C o por aumento de la presión osmótica del medio y que el agregado de cloranfenicol en el momento del pasaje a temperatura permisiva no inhibe la división de los filamentos inducida por la disminución de la temperatura (Fig. 3) (1).

Se estudió el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre las divisiones celulares producidas por elevación de la presión osmótica. Para ello se agregó NaCl y cloranfenicol a un cultivo de DA470 crecido a 42°C y se analizó el aumento del número de células viables. La Fig. 4 muestra que la presencia del inhibidor anula completamente la recuperación inducida por el agregado de sales, es decir que las divisiones que se producen por el aumento de la presión osmótica requieren, a diferencia de las producidas por la disminución de la temperatura, síntesis de proteínas.

Además de esta diferencia detectada entre los dos procesos de división mencionados, ambos caminos difieren también en cuanto a su vigencia temporal. La Fig. 5 muestra que mientras el cultivo se encuentra en fase logarítmica, los filamentos mantienen su capacidad de división por pasaje a 32°C y recién al entrar en fase estacionaria el potencial de división decrece hasta desaparecer completamente. Sin embargo los filamentos dejan de responder al estímulo de las sales cuando el cultivo se encuentra aún en fa-

se logarítmica.

Los resultados presentados indican que la mutación *dívc131* produce a 42°C la inhibición reversible de la división celular por interferencia con uno de los pasos del ciclo celular posterior a la síntesis de ADN. El requerimiento de síntesis de proteínas para la promoción, por medio de sales, de la división celular de los filamentos, junto con las diferencias halladas en la persistencia temporal de las vías de división mediadas por sales y por disminución de la temperatura, indica que las sales actúan por un proceso que no es la simple renaturalización de la proteína termosensible.

Referencias

- 1.- De Micheli, A.T. y' Antón D.N. Informe de actividades del Departamento de Radiobiología 1975-1976, pág. 91.
- 2.- Ciesla Z., Bagdasarian M., Szczurkiewicz W., Przygonska M. y Klopotoski T. Molec. gen. Genet., 116:107, 1972.
- 3.- Savic D.J. Genetics, 71:461, 1972.

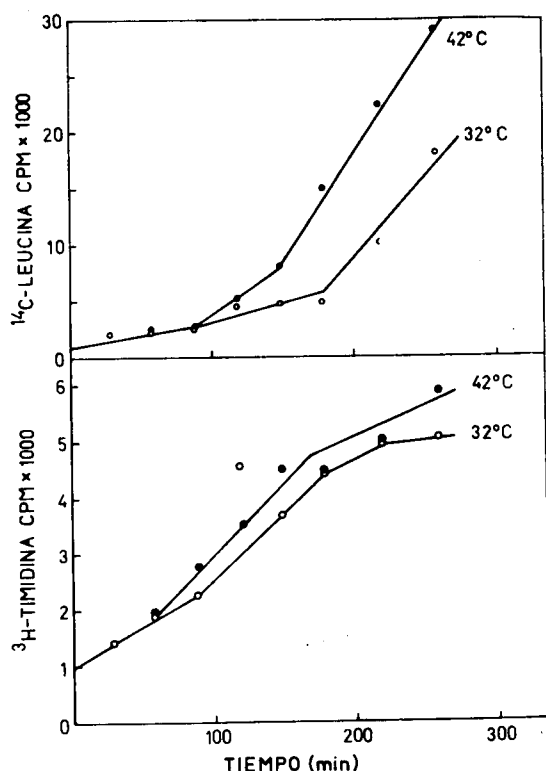
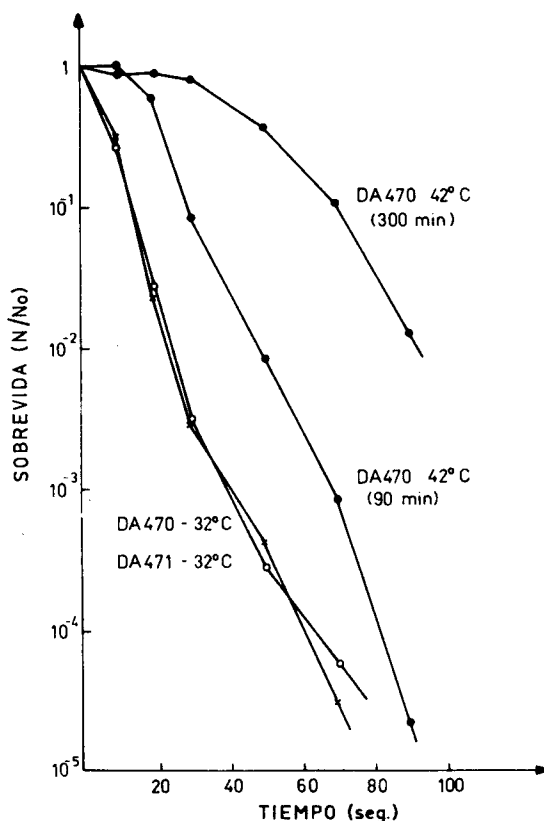


Figura 1:

Síntesis de ADN y de proteínas en cultivos de DA470 crecidos a 32°C y a 42°C. Un cultivo de DA470 crecido a 32°C se separó en dos partes al iniciar la experiencia (t:0); a una de ellas (A) se agregaron 5 μ Ci/ml de ¹⁴C-Leucina (2 mCi/ml) y a la otra (B) 10 μ Ci/ml de ³H-Timidina (47 mCi/mmol) junto con 100 μ g/ml de adenosina. Una alícuota de cada subcultivo fue transferida a 42°C (T:30) y cada 30 minutos se tomaron muestras de cada uno de ellos y del control de 32°C. Las muestras de 0.1 ml se absorbieron en discos de papel de filtro de 25 mm de diámetro que fueron a su vez sumergidos en ácido tricloroacético, lavados, secados y colocados en viales junto con 10 ml de líquido de centelleo para ser leídos en un contador de centelleo líquido.

Figura 2:

Respuesta de DA470 a la radiación ultravioleta. Un cultivo de DA470 crecido a 32°C y dos cultivos de la misma cepa crecidos a 42°C durante distintos períodos de tiempo fueron centrifugados y resuspendidos en solución salina hasta alcanzar una densidad óptica de 0.2 (650 nm). Las suspensiones fueron irradiadas durante distintos tiempos con luz ultravioleta (dosis aproximada: 5.4 erg/mm²/seg). Se muestra también la curva de sobrevivencia de DA471 (divC⁺) crecida a 32°C



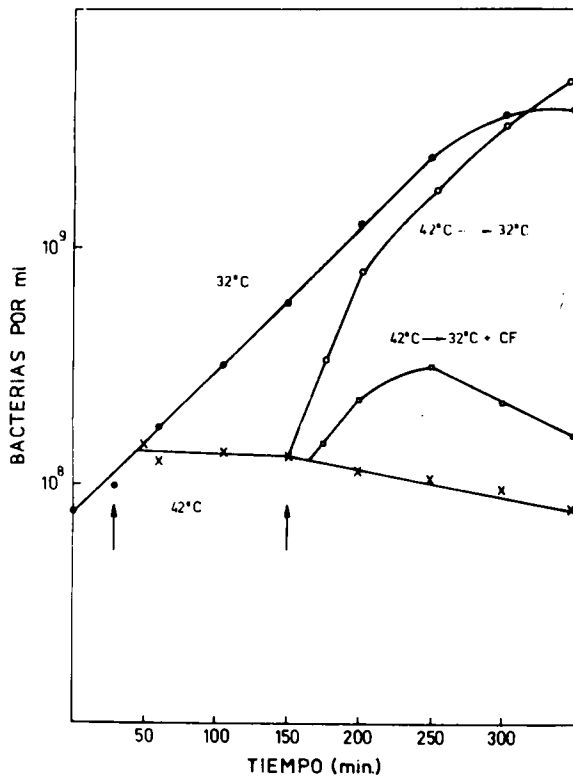
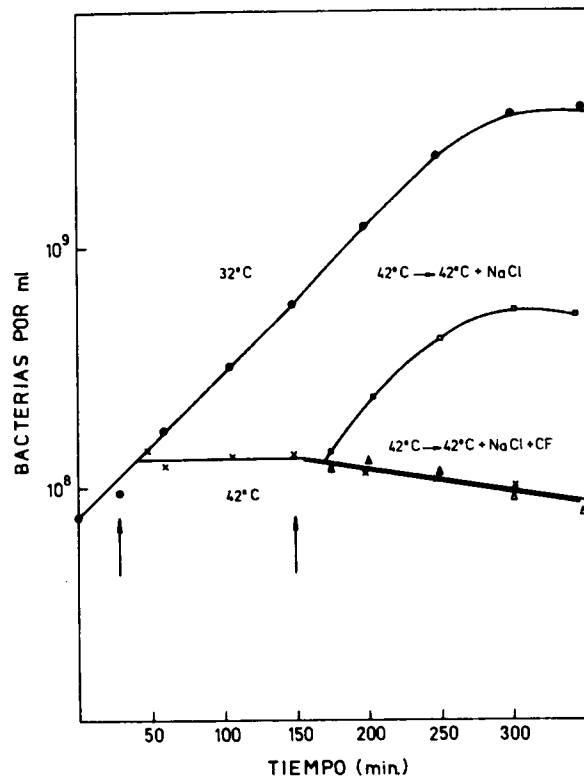


Figura 3:

Recuperación de la división celular por disminución de la temperatura en presencia y en ausencia de cloranfenicol. Una alícuota de un cultivo de DA470 que crecía activamente a 32°C fue pasada a 42°C a los 30 minutos de iniciada la experiencia (primera flecha); 120 minutos después (segunda flecha) se tomaron dos alícuotas del cultivo de 42°C y se pasaron a 32°C y a 32°C con cloranfenicol (40 µg/ml) respectivamente.

Figura 4:

Recuperación de la división celular por efecto del incremento de la presión osmótica del medio, en presencia y en ausencia de cloranfenicol. Una alícuota de un cultivo de DA470 fue transferida de 32°C a 42°C a los 30 minutos de iniciada la experiencia (primera flecha); 120 minutos después de separaron dos alícuotas del cultivo de 42°C y se le agregó a una de ellas NaCl (0.25 M conc. final) y a la otra NaCl (0.25 M conc. final) y cloranfenicol (40 µg/ml).



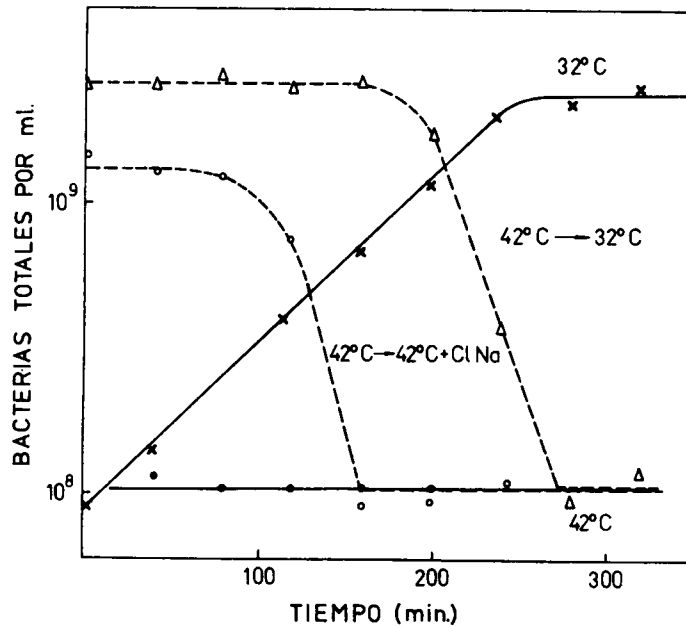


Figura 5:

Influencia de la edad de los filamentos en la recuperación producida por disminución de la temperatura y por aumento de la presión osmótica del medio. Un cultivo que crecía activamente a 32°C fue transferido a 42°C (t:0); en ese momento y cada 40 minutos se tomaron dos alícuotas del cultivo de 42°C, una de las cuales se pasó a 32°C y a la otra, que continuó a 42°C, se le agregó NaCl (0.25 M conc. final). A los 430 minutos de iniciada la experiencia se contaron las células totales de cada alícuota y se graficó el título alcanzado en función del momento en que fueron obtenidas.

B.6. Efecto de iones uranilo en *Salmonella typhimurium*
expuesta a irradiación ultravioleta.

G. O. Boselli y L. V. Orce.

Effect of uranyl ions on ultraviolet irradiated *Salmonella*
typhimurium cells.

Cultures of *Salmonella typhimurium* cells show no difference when grown in nutrient broth supplemented or not with 5×10^{-4} - 5×10^{-5} M uranyl ions (acetate or nitrate). However, when exposed to ultraviolet (253,7 nm) irradiation the survival rate is strikingly different.

Cells obtained from cultures grown in 5×10^{-5} M UO_2 are photosensitized when exposed to 2.000 ergs of U.V. rays, showing a survival 50% lower than controls grown in the same media without the cation. On the other hand, a photoprotection is effective when uranyl molarity is increased to 5×10^{-4} , originating a survival to the same radiation dose almost a 100 times higher than untreated controls.

It is postulated that in the former condition uranyl ions are absorbed into the cells blocking the repair mechanisms, while molarities 10 times higher may originate an adsorption of ions into the cell wall "shielding" the energy deposition. The following preliminary results lend support to these assumptions: a) treatment of previously U.V. irradiated cells with photoreactivating light induce a repair of 20% of the control cells, being ineffective with those grown in 5×10^{-5} M uranyl ions; b) washing with saline solutions prior to irradiation voids the photoprotection afforded by 5×10^{-4} molarity. New experimental approaches are planned, including ultrastructural studies by electron microscopy.

La fotoquímica de los iones uranilo ha sido objeto de numerosos estudios habiéndose demostrado que, al ser irradiados con ultravioleta en presencia de sales de uranio, algunos hidratos de carbono, ácidos orgánicos y alcoholes sufren importantes modificaciones en sus estructuras.

Wacker y col. (1) al tratar con luz visible timina dimerizada en solución con acetato de uranilo, obtuvieron monómeros de la base y otros productos no identificados. Aplicando este resultado a bacterias inactivadas por ultravioleta determinaron que la fotorreactivación se incrementaba en un 10% en presencia de acetato de uranilo. Por su parte, Neely y col. (2) demostraron un efecto sensibilizante del acetato de uranilo sobre *Escherichia coli* K-12 ex-

puesta por varias horas a una fuente luminosa similar a la luz solar al mediodía.

Con esta base iniciamos una serie de experiencias tendientes a determinar el efecto del uranio en bacterias cultivadas en presencia de acetato o nitrato de uranilo y la influencia del catión en la sensibilidad celular a irradiación ultravioleta.

Si bien la toxicidad de los iones pesados sobre microorganismos es conocida desde hace muchos años, son escasas las referencias sobre la acción de iones uranilo en bacterias. Entre ellas se encuentra el informe de Agulhom y Sazerac (3) sobre inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de acetato de uranilo 5×10^{-3} M.

De acuerdo con nuestros resultados, la concentración empleada por dichos autores al contacto con caldo o agar nutritivo (Difco) produce un intenso precipitado que, estimamos, no permite establecer si la inhibición del crecimiento se debe a toxicidad o se encuentra asociada a otros factores. Por esta razón empleamos concentraciones 5×10^{-5} ó 5×10^{-4} M de iones uranilo, las que no precipitan en caldo nutritivo. Cultivos en este medio, con o sin el catión son similares en lo que respecta a sus densidades ópticas, pH, morfología en contraste de fases y número de bacterias viables. Diluciones 1:10 en buffer tris-maleato de bacterias en fase estacionaria fueron expuestas a 2.000 ergios/mm² de irradiación ultravioleta (253,7 nm) y la fracción sobreviviente contada en cajas de Petri con agar nutritivo (Difco). En la Tabla I puede observarse que las bacterias cultivadas en presencia de acetato de uranilo 5×10^{-5} M sufren un efecto fotosensibilizante, ya que la supervivencia es casi un 50% inferior a la de los controles en cultivos sin el catión. Como contraste, encontramos que concentraciones 10 veces mayor del catión producen un efecto totalmente opuesto, ya que las bacterias crecidas en caldo nutritivo con acetato de uranilo 5×10^{-4} M presentan una supervivencia 85 veces superior a la de los controles.

Como hipótesis de trabajo atribuimos el efecto foto-

sensibilizante a la absorción intracelular de iones uranilo y su interferencia con la reparación del daño radioinducido, mientras que el efecto contrario sería consecuencia de la adsorción del catión a la pared celular protegiéndola del paso de la radiación.

En apoyo a la mencionada hipótesis determinamos, para el primer caso, que el tratamiento de las bacterias previamente expuestas a irradiación ultravioleta con luz fotorreactivante induce la reparación del 20% de los controles, mientras que resulta inefectivo para las cultivadas en uranilo 5×10^{-5} M por el bloqueo del mecanismo de reparación. En el segundo caso y teniendo en cuenta que el espectro de absorción ultravioleta de los medios con ambas molaridades es casi basal, determinamos que el lavado de las bacterias con solución fisiológica, previo a la irradiación, produce la anulación del efecto fotoprotector obtenido en los cultivos conteniendo 5×10^{-4} M de uranilo.

Nuevas aproximaciones experimentales están siendo llevadas a cabo en el laboratorio, planeándose en un próximo paso el estudio ultraestructural por microscopía electrónica.

Referencias

- 1.- Wacker A., Dellweg H., Träger L., Kornhauser A., Lodemann E., Türck G., Selzer R., Chandra P. and Ishimoto M. Photochem. and Photobiol. 3:369, 1964.
- 2.- Neely W., Ellis S. and Cody R. Photochem. and Photobiol. 13:503, 1971.
- 3.- Agulhon H. and Sazerac R. Compt. Rend. 156:162, 1913.

TABLA I

Comportamiento de cultivos de *Salmonella typhimurium*
LT-2 irradiados con 2.000 ergios/mm² de ultravioleta.

Concentración de UO_2^{2+}	Fracción sobre- viviente (N/No)	Sobrevivencia %
—	$7,5 \times 10^{-6}$	100
5×10^{-5} <u>M</u>	$2,8 \times 10^{-6}$	42
5×10^{-4} <u>M</u>	$4,7 \times 10^{-4}$	8540

C.1. Propiedades oncogénicas de un virus endogeno ARN de hamster.
Activación de las propiedades oncogénicas del virus por irradiación total del huesped.

J. Mayo y S. C. Michelin.

Oncogenic properties of an hamster ARN endogenous virus.
Activation of virus oncogenic properties by host total body irradiation.

The line BHK-21 (C-13) of new born kidney hamster cells are carriers of an ARN oncogenic virus. This virus is able to induce neoplastic transformation of normal cells as has been demonstrated in "in vivo" and "in vitro" experiments. The passages of viruses through total body irradiated host activated its oncogenic properties. These new acquired properties has been demonstrated by induction of tumors by direct virus inoculation of animals and an increase of the cells spectrum transform "in vivo" and "in vitro" by the particle.

La línea BHK-21 (C- 13) formada por fibroblastos de riñón de hamster es portadora de un virus endógeno (1). Debido a que la inoculación de estas células en el hamster y en ratones desnudos atímicos producen un fibrosarcoma, se planteó la hipótesis que el virus tendría propiedades oncogénicas. Debido al uso de la línea BHK-21 y sus clones en investigaciones virológicas y oncológicas vinculadas a la patología humana y veterinaria, y habiéndose demostrado en ellos la presencia del virus endógeno, se empleó el clon 13 para demostrar la oncogenicidad del virus.

Dado el origen de la línea celular en que se demostró la presencia del virus endógeno se escogió el hamster, *Mesocricetus auratus*, para comprobar la producción de neoplasias ya sea por inoculación de las células portadoras o por implantación peritoneal de cámaras de difusión conteniendo células BHK-21 (C-13) con paredes de 220 nm. de poro.

La transformación neoplásica de cultivos primarios fue confirmada por inoculaciones de estas células en el hamster. Se emplearon para los distintos grupos experimentales 200 hamsters excluyendo los utilizados para el mantenimiento de neoplasias producidas por células o inducidas por virus, 80 ratones BALB y 30 ratones desnudos atímicos.

Para demostrar in vitro las propiedades oncogénicas

del virus endógeno aislado de la línea BHK-21 (C-13), línea 169 y de tumores producidos en animales, se utilizaron cultivos primarios de riñón y células de exudado peritoneal. Una línea de células de ovario de hamster chino (*Cricetulus barabensis griseus*), CHO, se empleó para investigar esta propiedad y para la cuantificación viral. Para la caracterización bioquímica se utilizaron partículas purificadas por gradientes de sacarosa y verificada su actividad biológica induciendo la transformación de las células CHO luego de su separación por cromatografía en columna. La extracción del ácido nucléico viral por fenol se realizó a partir del virus purificado y caracterizado luego por reacciones colorimétricas y enzimáticas específicas.

La activación del virus endógeno se obtuvo por inoculación y pasaje de las células portadoras del virus BHK-21 (C-13) en la cavidad peritoneal de hamsters totalmente irradiados con 700 rads (2).

Los resultados demostraron que la inoculación en el hamster del virus oncogénico endógeno extraído de la línea BHK-21 (C-13) no induce una neoplasia. En cambio los animales portadores de cámaras de difusión conteniendo células BHK-21 (C-13) desarrollaron un fibrosarcoma. La actividad del virus oncogénico presente en los fibrosarcomas y en el plasma de los animales se verificó por transformación de las células CHO, cuyo cariotipo verificó este origen celular (3).

La infección viral indujo la transformación de cultivos primarios de riñón y células de exudado peritoneal de hamster.

Luego del pasaje de las células portadoras del virus por hamster irradiados se produce una activación del mismo que induce la transformación de células de tejido conjuntivo y epitelial del hamster (4). Se indujo un mesotelioma peritoneal del cual se obtuvo una línea celular (Línea 169). La neoplasia y la línea contienen el virus activado y se mantienen hasta el presente desde hace 7 y 5 años respectivamente. Los animales desarrollan neumonitis intersticial y una intensa viremia "in vitro". El virus activado posee un período mas breve de inducción neoplásica y los cultivos pre-

sentan células más atípicas que los transformados por virus extraídos de la línea BHK-21 (C-13). El virus activado induce la transformación de células BHK-21 (C-13) y origina en ratones BALB recién nacidos el cuadro de la enfermedad autoinmune (3). Las células portadoras del virus activado producen un sarcoma en ratones desnudos atímicos formado, de acuerdo al cariotipo, por células de hamster. El virus aislado inoculado al ratón desnudo no induce una neoplasia.

La caracterización viral demostró tratarse de un virus ARN.

En conclusión las células de la línea BHK-21 (C-13) son portadoras de un virus endógeno ARN oncogénico. El pasaje del virus por animales totalmente irradiados activa sus propiedades oncogénicas expresadas por la inducción de neoplasias por su inoculación directa en el animal y el aumento del espectro celular transformado in vivo e in vitro.

Referencias

- 1.- Klein-Szanto A.J.P., Conti J.C., Mayo J. Z. Krebsforsch, 80:227, 1973.
- 2.- Mayo J., Lombardo J.H., Klein-Szanto A.J.P., Conti C.J. Moreira J.L. Cancer Research, 33:2273, 1973.
- 3.- Mayo J., Michelin S.C. Premio "Osvaldo L. Bottaro" Academia Nacional de Medicina, 1980.
- 4.- Navarrete H.D., Mayo J. Abstracts of the International Cancer Congress 1:53, 1978.

C.2. Cultivos de tejidos transformados *in vitro* por radiación ultravioleta: características morfológicas, oncogénicas y citogenéticas.

C. P. de Gersberg.

Ultraviolet induced transformation of mammalian cells: morphologic and cytogenetic characteristics.

We developed a system to study cell transformation after irradiation with low dosis of U.V. light. Neoplastic transformation was observed in the three cellular types studied. A cytogenetic study was made with the CHO transformed cells and both numeric and structural aberrations were found.

Estudios experimentales realizados en animales de laboratorio junto con un gran número de investigaciones epidemiológicas realizadas en poblaciones humanas que habitan a distintas latitudes demuestran que la radiación U.V. juega un papel etiológico importante en la inducción de cáncer de piel en las partes del cuerpo que se encuentran más expuestas a la luz solar (2,3).

En función de estos antecedentes se realizó el presente trabajo con el objeto de estudiar las características de la transformación neoplásica *in vitro* inducida por este agente físico.

Para esto se utilizaron: la línea CHO de ovario de hamster chino (*Cricetulus barabensis griseus*), la línea BHK-21 (C-13) de hamster dorado (*Mesocricetus aureatus*) y cultivos primarios de piel de hamster dorado. Para obtener la transformación *in vitro* estos cultivos se irradiaron con una longitud de onda $\lambda = 2537 \text{ \AA}$ y una dosis de 36 ergs/mm^2 (1).

Asimismo teniendo en cuenta los antecedentes sobre los efectos de la radiación U.V. sobre el material genético, otro de los objetivos del trabajo fue realizar un estudio citogenético de las transformaciones neoplásicas inducidas por U.V.

Los trabajos realizados demostraron que la radiación U.V. indujo la transformación neoplásica en los tres sistemas estudiados luego de un período de 7-15 días.

Con respecto al análisis de los cariotipos de las

células transformadas, éste se realizó en células de la línea CHO.

En primer lugar, se demostró que la línea CHO normal utilizada posee un número modal de $2n=19$ cromosomas con una distribución quasidiploide de los mismos.

Con respecto a las células transformadas, las muestras se separaron en tres grupos correspondientes a las fechas de cosechas, efectuadas luego de observada la transformación.

En el primer grupo (cosecha día 7) el 55 % de las células observadas tuvieron cariotipos normales y el 45 % presentaron cariotipos con aberraciones. En el segundo grupo (cosecha día 12). Se invirtieron estos porcentajes resultando un 55 % de las células con cariotipos con aberraciones y un 45 % con cariotipo normal. En el tercer grupo (cosecha día 14) se registró un gran aumento del número de células normales (76 %) y solo un 24 % presentó aberraciones.

Las aberraciones cromosómicas observadas fueron tanto numéricas como estructurales. Entre las numéricas se encontraron tri y tetrasomías, tetraploidías y pérdida de algunos cromosomas. Entre las aberraciones estructurales se observaron dicéntricos, deleciones terminales de cromátide, aparición de una neoconstricción secundaria y de diplocromosomas por endoreduplicación. También se observó en algunos cariotipos uno o dos pequeños cromosomas acrocéntricos no observados en los cariotipos standard a los que se denominó "marcadores".

Las experiencias realizadas demuestran que la radiación U.V. aun suministrada en dosis bajas es un importante agente oncogénico. Con respecto a las alteraciones observadas en los cariotipos, resta como duda si éstas responden a un efecto directo de la irradiación o si constituyen una expresión de las distintas etapas de malignización por las que atreviesan las células irradiadas.

Referencias

- 1.- Di Paolo J.A., Denovan P.J. Int. J. Rad. Biol., 30:1, 41-53, 1976.
- 2.- Scotto J., Fears Th. Int. Conf. on U.V. carcinogenesis, Monograph 50:167-169, NCI, 1978.
- 3.- Urbach F. Int. Conf. on U.V. carcinogenesis, Monograph 50:5-10, NCI, 1978.

D.1. Desarrollo de metodologías microfotométricas para cuantificación de reacciones histoquímicas.

M. E. Itoiz y R. L. Cabrini.

Development of microphotometric methodologies for quantitation of histochemical reactions.

Microspectrophotometric of histoenzyme reactions is a practical and fast method for studying enzyme activity "*in situ*". However, application conditions should be established for each of the enzymes and each of the tissues to be measured. So far, these conditions have been established for a limited number of histo-enzyme reactions. The present study was carried out to determine the reliability of the microphotometric quantitations of the cytochrome-oxidase reaction.

Optimal concentration of the substrate was determined after measuring the enzyme reaction kinetics on polyacrilamide models to which known amounts of enzyme were incorporated. A small incubation chamber was developed to determine the measurement limits for each biological model.

The methodology of prior adjustments such as the choice of sections, the areas to be measured, the number and type of scans and data processing was also determined. For this purpose, an example of measurements of SH and S-S groups in normal and irradiated epithelium was critically studied.

La microespectrofotometría, desarrollada inicialmente para la cuantitación del DNA en cortes de tejidos, fue adaptada luego para la evaluación de diversas reacciones histoquímicas. Las condiciones de su aplicabilidad deben ser cuidadosamente estudiadas para cada una de las reacciones a evaluar.

Entre los grupos de trabajo que han demostrado la posibilidad de cuantitación microfotométrica de reacciones histoquímicas, se cuenta el de la División Patología del Departamento de Radiobiología, en el cual se han optimizado los métodos de medida de la succino deshidrogenasa, la fosfatasa ácida y las esterases inespecíficas en años anteriores (1,2,3,4).

En los últimos años, se ha demostrado la posibilidad de medir *in situ* de la *cítocromo-oxidasa* (5).

La puesta a punto de estas metodologías exige la obtención de modelos que simulen el corte histológico y que

posean una actividad enzimática que pueda ser evaluada con un método bioquímico ya probado y con la metodología microfotométrica propuesta. Los modelos más comunmente usados son láminas de poliacrilamida o gelatina a los cuales se incorpora una solución de actividad enzimática conocida. Esta se demuestra luego histoquímicamente y se lee microfotométricamente ajustándose las condiciones de medida para poder obtener las lecturas teóricamente esperadas (6).

En el caso de la *citocromo-oxidasa*, se utilizaron como modelos films de poliacrilamida a los cuales se incorporaron diferentes concentraciones conocidas de extracto mitocondrial de corazón de bovino, y cortes de criostato de músculo y epitelio lingual de rata. La demostración histoquímica de la *citocromo-oxidasa* se realizó con la técnica de Saligman y col. (7) que utiliza la oxidación de la diaminobenzidina (DAB) para formar un compuesto insoluble, coloreado y electronicamente denso. La precisión de localización del precipitado final en las membranas mitocondriales se controló en los modelos de músculo y epitelio a nivel de microscopía electrónica. En un grupo de modelos de igual contenido enzimático, se estudió la cinética de la reacción usando diferentes concentraciones del substrato y distintos tiempos de incubación. La evaluación microfotométrica se realizó con una longitud de onda de 480 mμ, la que se fijó luego de hacer un espectro de absorción en uno de los modelos. En base al Km aparente obtenido en las condiciones de trabajo, se determinó que es útil aumentar la concentración del substrato indicada en la técnica original. Se determinó además, que la reacción procede en forma lineal con respecto al tiempo, en un período antes del cual la velocidad de la reacción es mayor, debido a la acción del citocromo C endógeno del extracto mitocondrial. Después del período de linealidad, el producto final se satura. La zona de linealidad es propia del tipo de reacción y útil para la realización de las medidas microfotométricas pero debe ser establecida para cada tipo de tejido a medir. Con este fin se ideó una camarita que permite la obtención de medidas mientras procede la reacción. Con esta cámara se delimi-

tó la zona de linealidad en los modelos de músculos y epitelio (Fig. 1).

Criterios para la obtención de medidas microfotométricas (7).

Una vez probada la validez de la lectura microfotométrica de una determinada reacción histoquímica y determinadas las condiciones dentro de las cuales deben efectuarse las medidas, relativas al microfotómetro y a la reacción en sí, quedan por establecer otras condiciones, no menos importantes, relativas a la elección de los cortes a medir, las áreas a ser medidas, el adecuado número de medidas y el procesamiento de los datos.

Con la finalidad de optimizar una metodología que permita fijar con relativa facilidad las condiciones arriba mencionadas, se realizó un estudio crítico de la obtención de medidas con el método de barrido microfotométrico, tomando como modelo la evaluación del contenido de grupos sulfhidrilo y disulfuros (SH y SS) en epitelio normal e irradiado.

En este estudio se establecieron condiciones: 1) para determinar la mayor especificidad de una determinada reacción cuando existe más de una técnica de tinción, fotométricamente medible, para evaluar *in situ* una determinada sustancia. La mayor especificidad se determinó en base a la comparación de los espectros de absorción del producto de las reacciones; 2) condiciones para la selección del programa de barrido en base a diferentes aspectos morfológicos de las zonas a medir; 3) determinación del número de barridos y áreas a medir en base a la homogeneidad de respuesta del modelo; 4) determinación de la forma y tamaño del haz luminoso, en base a la homogeneidad de la reacción, 5) procesamiento de los datos para la obtención de resultados válidos, utilizando el menor número posible de pasos técnicos.

Referencias

- 1.- Cabrini R.L., Viñuales E.M., Itoiz M.E. Acta Histochem. 34:287, 1969.

- 2.- Cabrini R.L., Frasch A.C.C., Itoiz M.E. Histochem. J., 7:419, 1975.
- 3.- Cabrini R.L., Frasch A.C.C., Itoiz M.E. Histochem. J., 9:369, 1977.
- 4.- Cabrini R.L. Histochem. J., 13:241, 1981.
- 5.- Frasch A.C.C., Itoiz M.E., Cabrini R.L. J. Histochem. Cytochem., 26:157, 1978.
- 6.- Volco H.E., Itoiz M.E., Frasch A.C.C. Cell Mol. Biol., 23:249, 1978.

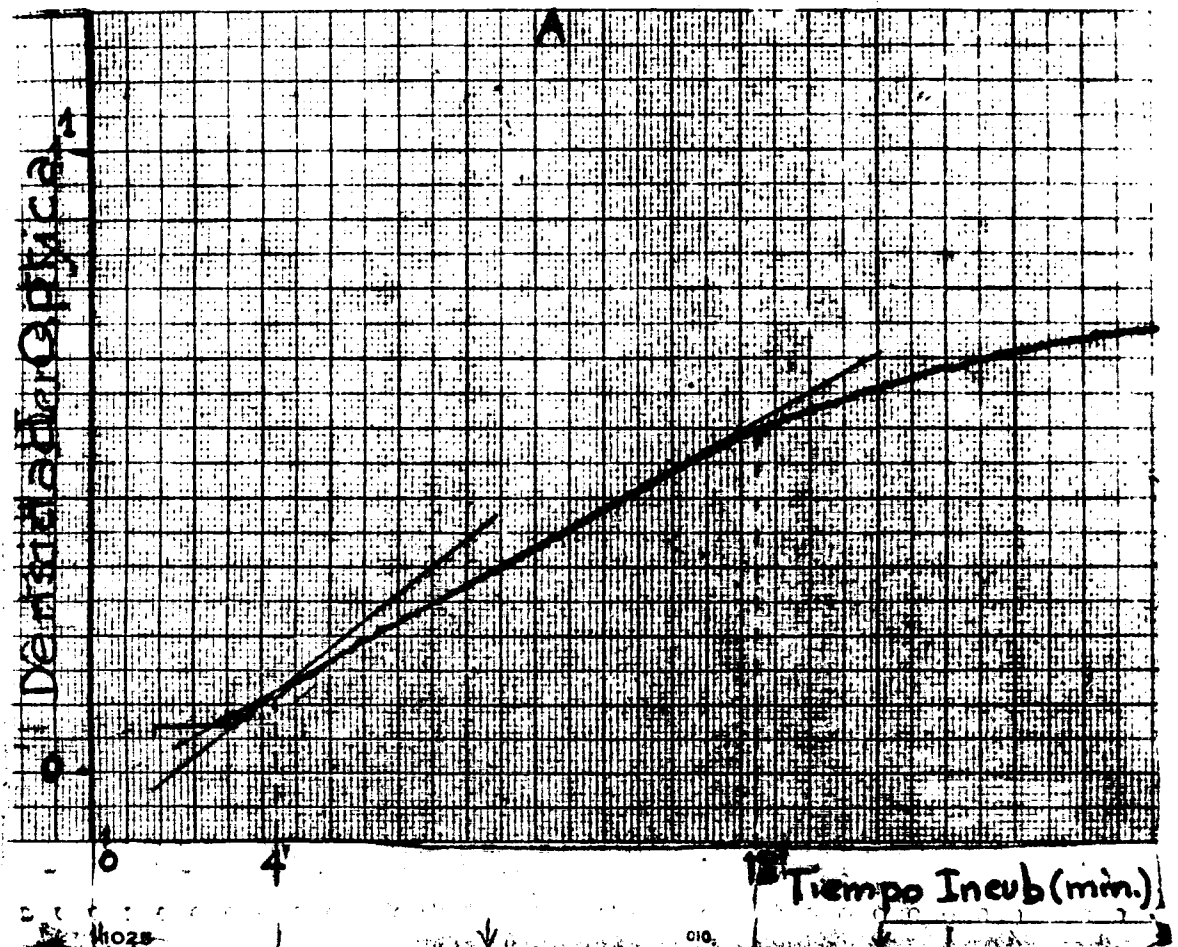


Fig. 1: Registro gráfico de la reacción para *citocromo-oxidasa* en un área fija de 3μ de diámetro, de un corte de músculo lingual. El registro se inició simultáneamente con la adición del medio de incubación a una camarita colocada debajo del objetivo del micro-fotómetro.

D.2. Aplicación de los métodos microfotométricos a la cuantificación de alteraciones metabólicas producidas por la irradiación y otras variaciones patológicas.

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

Microphotometric methods applied to the quantitation of metabolic variations produced by irradiation and other pathological conditions.

Microspectrophotometric methodology was applied to evaluate different metabolic variations produced under experimental or spontaneous pathological conditions:

1) Modifications of *cítocromo-oxidase* activity produced by irradiation in the epidermis of newly-born rats were studied by means of unidirectional epithelial scans. The total enzyme activity was found to be increased in relation to the increased epithelial thickness. The mean enzyme concentration, however, decreased in direct relation to the dosis applied.

2) Another microphotometric study was carried out to evaluate DNA content in giant cells of human bone tumors. DNA amounts were constant, uniform and diploid in character for each nucleus individually considered. Results suggested the formation of giant cells through a mechanism of cellular fusion.

3) A comparative study of amount and distribution of SH and S-S groups in the epithelium of keratocysts and human normal mucosa was made using the Mercury Orange reaction.

Different patterns of SH and S-S distribution were found in the epithelial layers of both epithelia. Mean concentrations were lower in the keratocysts, thus indicating a lower production of keratin substance.

Cuando se han fijado las condiciones para la validez de las lecturas de cada reacción histoquímica, el método microfotométrico es fácilmente aplicable al análisis de alteraciones patológicas espontáneas o experimentales (1).

En la División de Patología, esta metodología ha sido ya muy utilizada para evaluar variaciones histoenzimáticas y del DNA en modelos experimentales de piel irradiada y se ha aplicado también al estudio de otros tipos de lesiones humanas espontáneas.

Variaciones de la *cítocromo-oxidasa* en el epitelio irradiado: (2)

En los últimos años, la adaptación del método a la medición de la *cítocromo-oxidasa*, ha permitido estudiar el

comportamiento de esta enzima, como indicadora del daño mitocondrial producido experimentalmente en la piel de la cola de ratas recién nacidas. Los animales se irradiaron localmente con rayos X de 250 KV, 13 mA, con dosis de 2,4,8,12 y 16 Krads, y se sacrificaron a los 4 días post-irradiación.

La piel irradiada y su correspondiente control fueron procesadas para la demostración histoquímica de la *cítocromo oxidasa* a nivel de microscopía de luz y microscopía electrónica.

A nivel de microscopía electrónica, la reacción de las crestas mitocondriales en la piel irradiada es irregular, con vacuolización y homogeneización parcial de la matriz. Las vacuolas grasas, características del daño por radiación en las células epidérmicas, mostraron estar rodeadas parcialmente o contener en su interior restos de membranas reaccionantes. Este hecho confirmó el origen mitocondrial de estas estructuras ya previamente observadas.

Las medidas microfotométricas a nivel óptico, mostraron un aumento de actividad enzimática en relación al aumento de espesor epidérmico inducido por la irradiación. No obstante, la concentración enzimática (expresada por unidad de volumen del tejido) disminuyó en relación directa con la dosis aplicada. (Fig. 1).

La medición microfotométrica de la *cítocromo-oxidasa* demostró ser un método rápido y útil para evaluar el daño por radiación de la epidermis en modelos experimentales.

Cuantificación del DNA en tumores óseos (3).

Existe un número de tumores espontáneos de hueso con la característica común de poseer células gigantes como parte de su estructura histológica. El origen de estas células gigantes ha sido largamente investigado y es aún controversial. La cuantificación del DNA de los núcleos de estas estructuras multinucleadas, es un aporte más a dichas investigaciones ya que aporta datos sobre su posible reproducción. Con esa finalidad se estudió el contenido del DNA nuclear de las células gigantes de seis casos de osteoclastomas, ocho casos de condroblastomas y cuatro casos de osteosarco-

mas obtenidos del Archivo de Biopsias del Registro Latinoamericano de Patología Osea. El DNA se evidenció mediante la reacción de Feulgen y se cuantificó microfotométricamente con el método de barridos bidimensionales. Se tomó el valor diploide normal en cada tumor midiendo en los mismos cortes de tumores, los núcleos de los linfocitos. El contenido del DNA de las células gigantes de todos los tumores estudiados fue uniforme, constante y de cantidad diploide para cada nucleo considerado individualmente (Fig. 2). La ausencia de cantidades menores o mayores al contenido diploide indicaron falta de posibilidad de mitosis o gemación. Por el contrario, los resultados parecen favorecer la hipótesis de formación de células gigantes por mecanismos de fusión celular.

Las células del estroma tumoral (no gigantes) mostraron evidencia de su capacidad proliferativa mediante la síntesis de DNA.

Cuantificación de grupos sulfhidrilos y disulfuros en el epitelio de queratoquistes (4).

Los queratoquistes son entidades patológicas que se desarrollan en el hueso maxilar, se caracterizan por su tendencia a la producción de substancia córnea y tienen habitualmente un curso evolutivo diferente al de otros quistes de los maxilares. Por ese motivo, reviste interés el estudio de la biología de estas entidades, particularmente en lo relativo a su capacidad queratinizante.

Dado que la evaluación del contenido de grupos sulfhidrilos y disulfuros (SH y S-S) es indicadora de la producción de queratina, se realizó un estudio microfotométrico de dichos grupos en paredes de queratoquistes comparándolo con datos obtenidos del epitelio de la mucosa oral de los mismos pacientes.

Los SH y S-S fueron demostrados con la técnica histoquímica del Mercury Orange y cuantificados con barridos microfotométricos unidireccionales del epitelio.

Los patrones de distribución de estos grupos fueron diferentes en ambos epitelios estudiados, siendo los de los queratoquistes similares a los de la epidermis. La concentra-

ción media (por unidad de volumen de tejido) no obstante, es menor en los queratoquistes que en la mucosa oral, sugiriendo un ritmo menor de producción de queratina en los primeros.

Referencias

- 1.- Cabrini R.L. Histochem J., 13:241, 1981.
- 2.- Itoiz M.E., Rey B.M. de y Cabrini R.L. Histochem J., (en prensa).
- 3.- Schajowicz F., Cabrini R.L. y Giménez I.B. Clin. Orthop. Rel. Res., 156:241, 1981.
- 4.- Smerilli A.L. y Itoiz M.E. J. Den. Res., 59:1766, 1980.

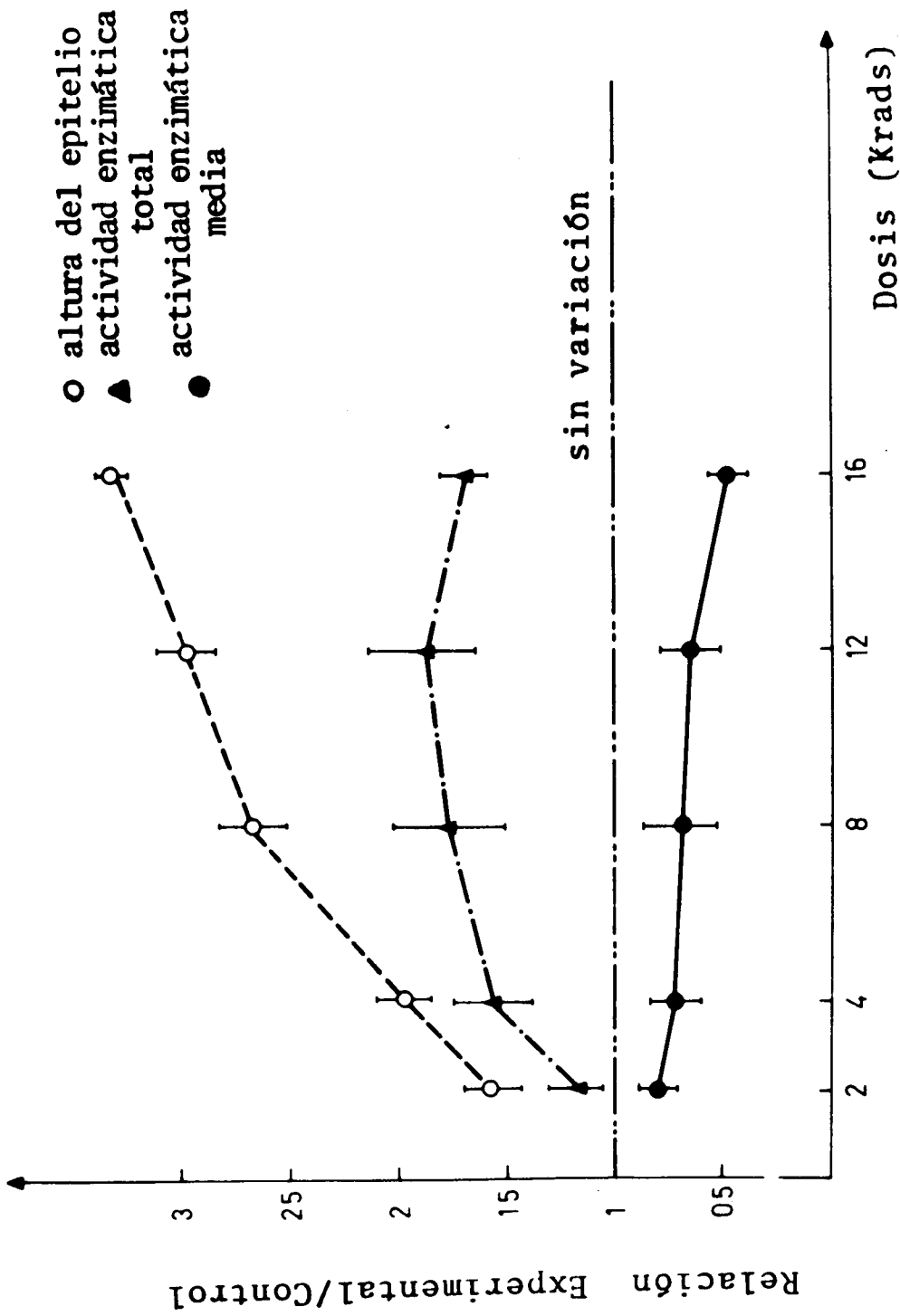


Fig. 1: Variaciones de la altura epitelial y la actividad de la *cátocromo-oxidasa* producidas por la irradiación en la piel de rata. Cada punto representa la media de 8 a 10 casos $\pm$ 1 desv. standard.

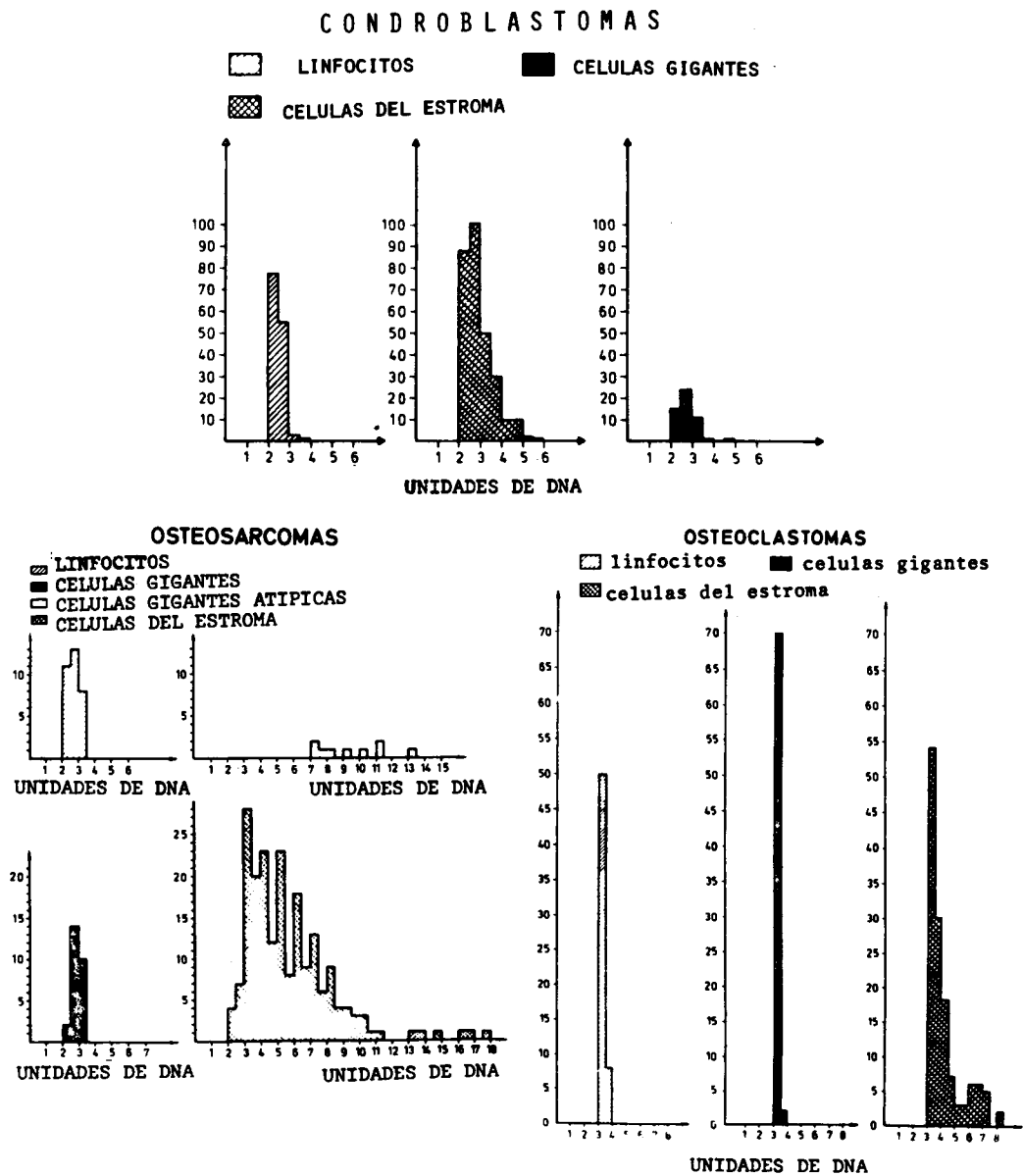


Fig. 2: Distribución del contenido del DNA en 6 casos de osteoclastomas, 8 casos de condrioblastomas y cuatro casos de osteosarcomas. (Datos acumulados).

D.3. Efectos de drogas radiopotenciadoras sobre la epidermis.

B. M. de Rey, H. E. Lanfranchi, A. J. P. Klein-Szanto y M. E. Itoiz.

Effects of hypoxic radiosensitizers on epidermis

Misonidazole, a hypoxic cell radiation-sensitizer, has been used in vivo to analyze its effects on normal and X-irradiated epidermis. The response of the epidermis and specially of the basal cells to the drug alone and in combination with X-radiation was studied. The ultramorphologic analysis as well as quantitative data on epidermal thickness and keratinocyte volume showed that high doses of misonidazole impair the usual postirradiation epidermal reaction, thus enhancing the involutinal effects of radiation and inhibiting radiation-damage repair even under conditions of normal oxigenation.

Misonidazole (Ro-07-0582) es un compuesto con afinidad por electrones que tiene la propiedad de aumentar la producción de radicales libres y de esta forma incrementar los efectos de la radiación ionizante. Ultimamente se lo ha utilizado como droga radiopotenciadora en tratamientos radioterapéuticos de tumores.

En el presente trabajo se analizan las alteraciones inducidas por el misonidazole sobre la piel normal y sobre la piel irradiada (1). Se ensayó la droga en dos condiciones: a) la droga fue administrada a animales con alguna zona del cuerpo irradiada; b) la droga fue administrada a animales sin irradiar. Se utilizaron ratas Wistar de 60 g. a las que se implantó la droga en la zona subcutánea a razón de 0.5 mg/g. de peso. La irradiación se realizó en la planta de la pata izquierda y la de la pata derecha se utilizó como control no irradiado.

La observación ultraestructural de las células basales del tejido epidérmico de los animales tratados con la droga y en animales no irradiados, demostró algunas alteraciones en las mitocondrias y la presencia de células oscuras. Los animales tratados con la droga e irradiados localmente en la pata izquierda, mostraron escaso daño, radioinducido, sólo se observaron algunos núcleos lobulados. Tam-

bién se observaron algunas células oscuras.

Los datos cuantitativos que se obtuvieron midiendo el volumen absoluto de los queratinocitos según el método descrito en (2), se resumen en la Figura 1. El análisis de la variancia de los datos, demostró que el volumen celular fue significativamente modificado por el tratamiento.

El análisis de los resultados sugiere que el misonidazol afecta la estructura de la piel normal y que la epidermis irradiada sin droga reacciona en forma diferente a la epidermis irradiada con droga. La mayoría de las alteraciones descritas en piel irradiada (3) entre las que se destacan fragmentación nuclear, gigantización celular, etc. no se observaron en la epidermis irradiada con droga. Los datos cuantitativos están de acuerdo con las observaciones morfológicas. Se postula que la acción prolongada del misonidazole disminuye la capacidad de reacción de las células e impide el desarrollo de los mecanismos de reparación del daño radioinducido. Estos datos señalan el efecto tóxico de las dosis elevadas de misonidazol en las células epidérmicas aun bajo condiciones normales de oxigenación del tejido.

Referencias

- 1.- de Rey B.M., Lanfranchi H.E, Klein-Szanto A.J.P. , Itoiz M.E. J. Cutan. Pathol., 8:91, 1981.
- 2.- Klein-Szanto A.J.P., de Rey B.M., Cabrini R.L. J. Cutan. Pathol., 4:23, 1977.
- 3.- de Rey B.M., Cabrini R.L. J. Invest. Dermatol., 60:137, 1973.

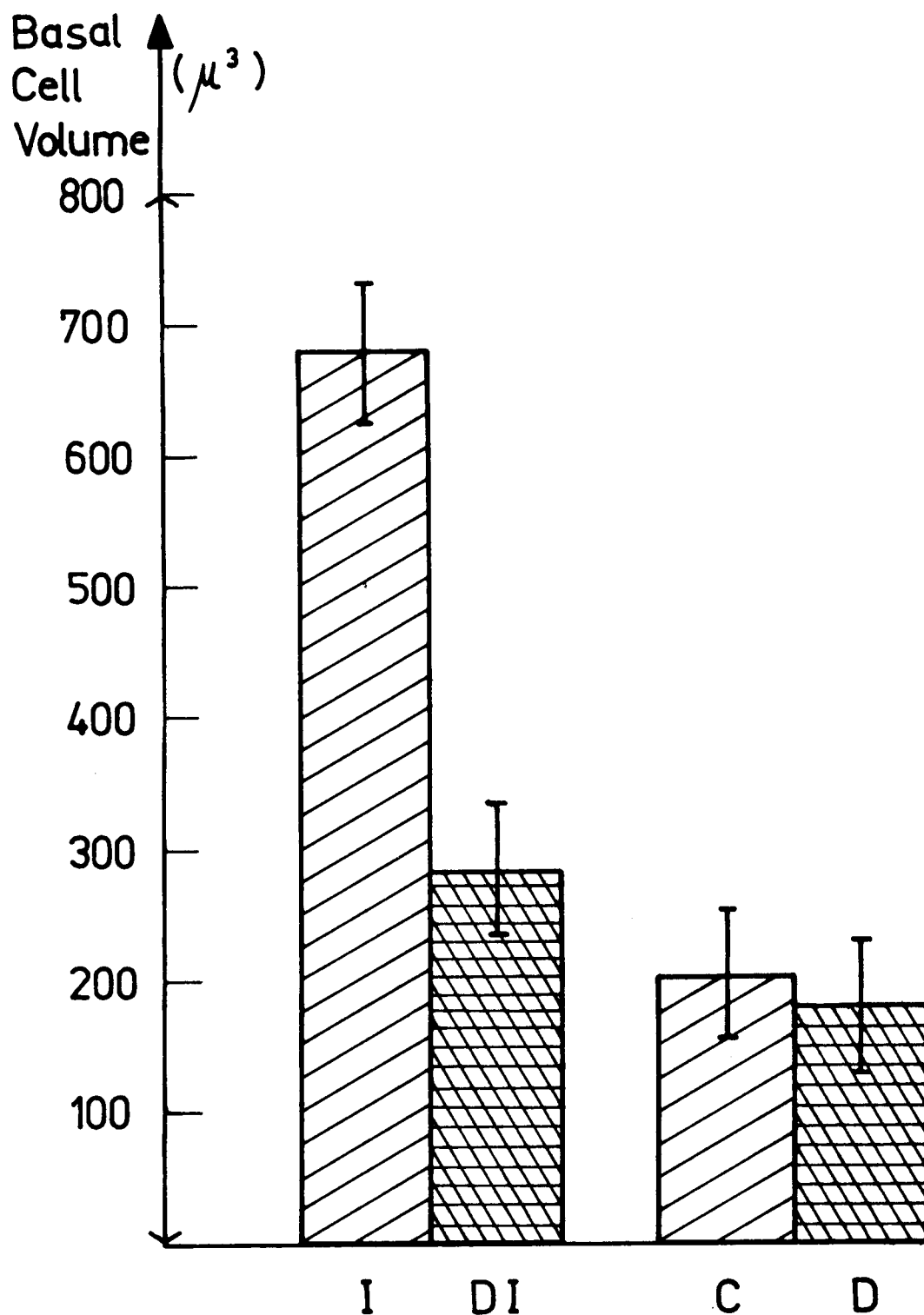


Figura 1: Volumen absoluto de los queratinocitos bajo las siguientes condiciones experimentales: I) Células irradiadas tres días postirradiación con 8 Krad sin Misonidazole; DI) Células irradiadas tres días postirradiación con 8 Krad y 6 días después de la aplicación de Misonidazole. C) Células no irradiadas, no tratadas con Misonidazole; D) Células no irradiadas, 6 días después de la aplicación de Misonidazole. Las líneas verticales indican desvío standard.

D.4. Microscopía electrónica de barrido de folículos pilosos irradiados.

A. J. P. Klein-Szanto y B. M. de Rey.

Surface architecture of X-irradiated hair follicles.

The combined use of scanning electron-microscopy and chemical separation of epidermis permitted the study of the irradiated and normal hair follicle surface characteristics. Irradiation reduced the length and density of the hair follicles producing at the same time marked alterations and deformities of the individual follicles. As most of these changes were dose-and-time-dependent, these structures provide an interesting model as biological indicator of radiation dose.

A fin de obtener información sobre el daño inducido en los folículos pilosos por la radiación ionizante se realizó este estudio con el microscopio electrónico de barrido (1). La porción distal de la cola de ratas Wistar de 4 días de edad se irradió con 2,4,8 y 16 Krad de rayos X. Los animales se sacrificaron a los 1,2,4 y 7 días postirradiación. Dado que el interés radicaba en la reacción de los folículos pilosos, se incubó la piel con BrNa 2N a fin de separar la epidermis de la dermis y permitir así la observación de la superficie inferior de la epidermis y la superficie completa de los folículos. El material se fijó y preparó para ser observado en el microscopio electrónico de barrido.

Las observaciones más importantes se refieren a la organización en hileras de los folículos pilosos ya sea en tejido irradiado o normal. Los folículos irradiados presentaban una superficie lisa con algunas zonas apicales rugosas. En el extremo del bulbo era fácil distinguir el orificio correspondiente a la comunicación de la papila dérmica con la dermis. Las alteraciones foliculares más marcadas se observaron en material irradiado con 8 y 16 Krad. La irradiación con 2 y 4 Krad indujo el mismo tipo de alteraciones aunque mucho más atenuadas. Las alteraciones más importantes fueron la inclinación o curvatura del folículo, la disminución del tamaño del mismo especialmente como consecuencia de la aplicación de las dosis más

altas. Luego de transcurrir 5 a 7 días desde la irradiación se observaron importantes deformaciones en los folículos, las más importantes de las cuales fueron las largas prolongaciones o "cuernos" en la porción apical del folículo y perpendicular al eje longitudinal del mismo. Los orificios correspondientes a las papilas no se observaron en los folículos irradiados.

Estas alteraciones estructurales y las probables modificaciones cuantitativas observadas abren un campo a la investigación de estas modificaciones como probable dosímetro biológico.

Referencias

- 1.- Klein-Szanto A.J.P., de Rey B.M. J. Cutan. Pathol., 5:184, 1978.

D.5. Captación epidérmica de cistina tritiada y histidina tritiada.

B. M. de Rey y A. M. Ubios.

Epidermal uptake of tritiated cystine and tritiated histidine.

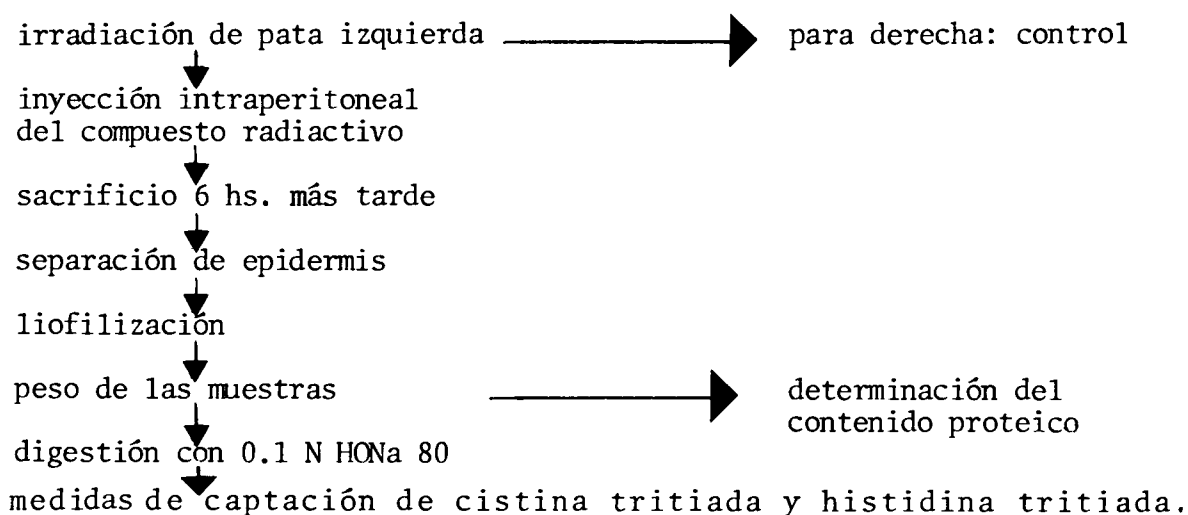
Cistine-rich protein and histidine-rich protein are closely related to the keratinization process of epidermis. The analysis of the effects of X-radiation on the synthesis of both proteins in epidermis "in vivo" has been carried on. The results showed a significant increase in dry weight of the irradiated samples. A selective action of radiation, increasing the synthesis of cistine-rich protein was demonstrated. On the other hand no effect was observed on histidine rich protein excepting those related with involution processes seventy two hours postirradiation.

El proceso de queratinización epidérmica es alterado por la radiación ionizante y la expresión morfológica de este efecto es la importante acantosis que induce y las irreversibles alteraciones celulares que provoca (1-2).

La "proteína rica en histidina" (PRH) y la "proteína rica en cistina" (PRC), características ambas de la capa granulosa epidérmica, se hallan íntimamente relacionadas con los mecanismos de queratinización y las modificaciones que sobre ellos induce la radiación, pueden ser considerados como clave para la interpretación del proceso de queratinización epidérmica. En este trabajo se analiza el efecto de la radiación X sobre la captación de histidina tritiada y de cistina tritiada por la epidermis aislada y libre de anexos (3).

Para esto se usaron las plantas de las patas de rata Wistar irradiada con 2,4,8 y 16 Krad de rayos X. La pata opuesta se usó como control no irradiado. Los animales fueron sacrificados 48,72 y 120 días después de irradiados y todos 6 horas después de recibir la inyección del isótopo correspondiente a razón de 2 uCi/g peso de cistina tritiada o histidina tritiada.

El procedimiento que se siguió se resume en el siguiente esquema:



En la Figura 1 se observa el aumento del peso seco del material en función del tiempo postirradiación para dosis de 16 Krad y se la compara con el contenido total de proteínas en las mismas muestras.

La Figura (A,B,C) muestra la relación de captación de aminoácidos entre tejidos irradiados y no irradiados $\frac{I}{C}$. La captación de cistina tritiada aumenta en todas las condiciones experimentales de irradiación (2.5, 4 y 16 Krad). Los valores máximos se obtienen luego de 16 Krad, al cabo de 48 hs. En este caso se alcanzaron valores que equivalen al 100% de aumento de los valores control. Los valores de captación disminuyen a las 72 hs. y 120 hs. postirradiación. Por otro lado los valores de captación de histidina tritiada no sufren modificaciones hasta las 48 hs. luego de la irradiación y la incorporación decae a valores menores que en los tejidos no irradiados, 72 y 120 hs. luego de la irradiación.

El análisis estadístico en cuanto a captación de cistina indicó significación entre las modificaciones inducidas con radiaciones de 8 y 16 Kr. Las diferencias entre los valores de captación de histidina no fueron significativos.

Nuestros resultados indican un aumento significativo en el peso seco absoluto del tejido irradiado que es coincidente con un aumento en el contenido de proteínas del tejido. Además se demuestra una acción selectiva de la radiación ionizante que induce una mayor síntesis de "proteína rica en cistina" mientras que no afecta la síntesis de "proteína rica en histidina", durante las primeras 48 horas post-

irradiación y la inhibe 72 y 120 horas más tarde. Esta respuesta diferente a ambos aminoácidos frente a la misma injuria confirmaría la existencia de dos proteínas independientes relacionadas con los gránulos de queratohialina y estructuras queratinizantes.

Referencias

- 1.- de Rey B.M. y Klein-Szanto A.J.P. Strahlentherapie, 143:699, 1972.
- 2.- de Rey B.M. y Cabrini R.L. Journal Invest. Dermatol., 60:137, 1973.
- 3.- de Rey B.M. y Ubios A.M. Revista de Microscopía Electrónica, 5:134, 1978.

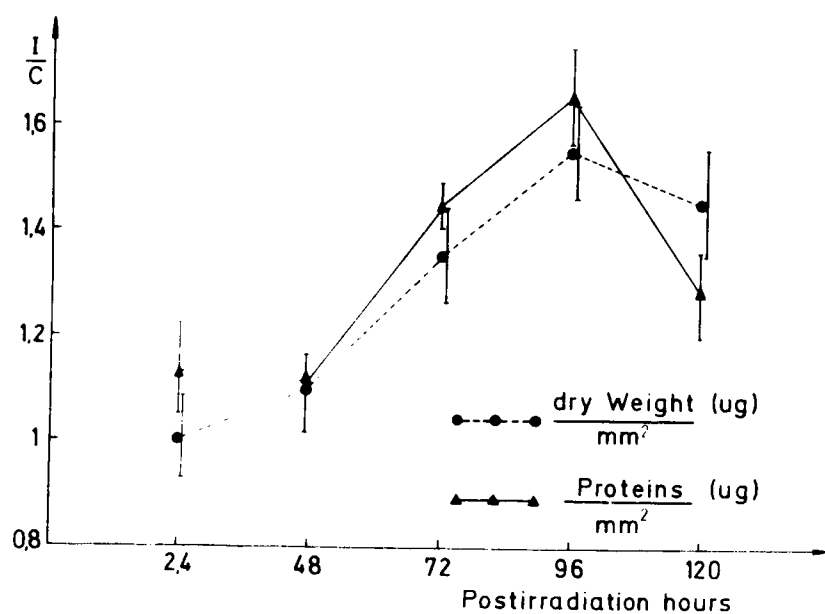
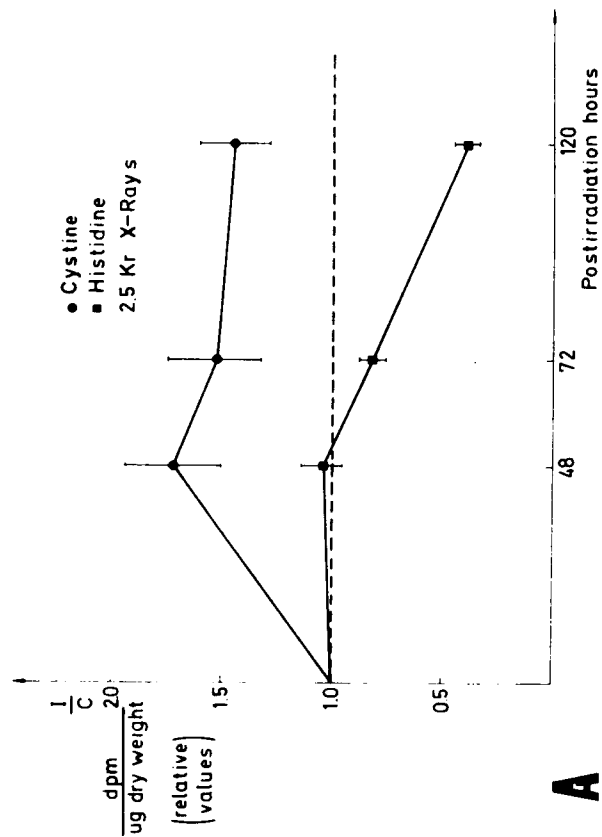
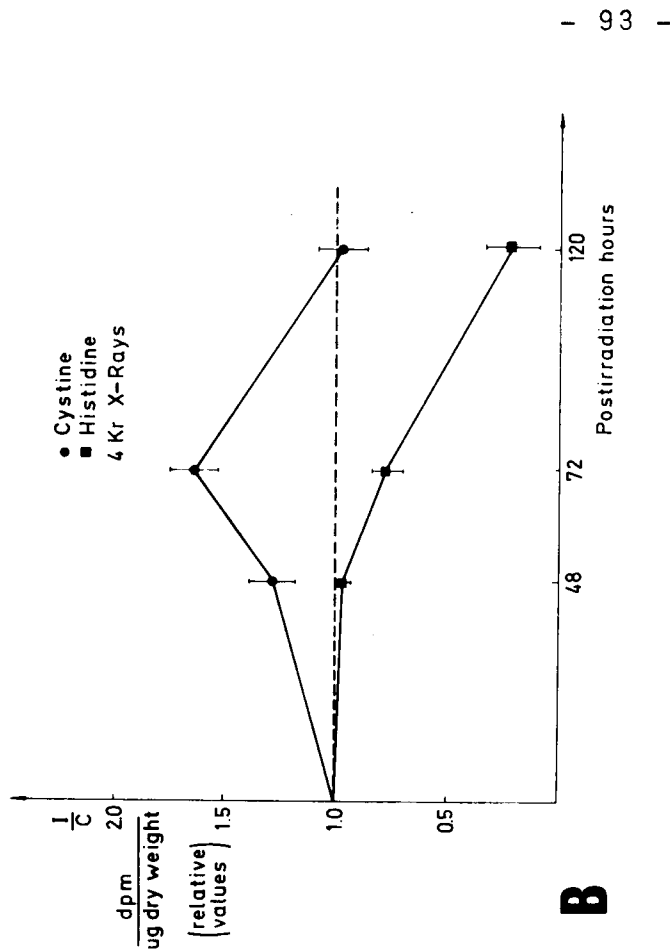


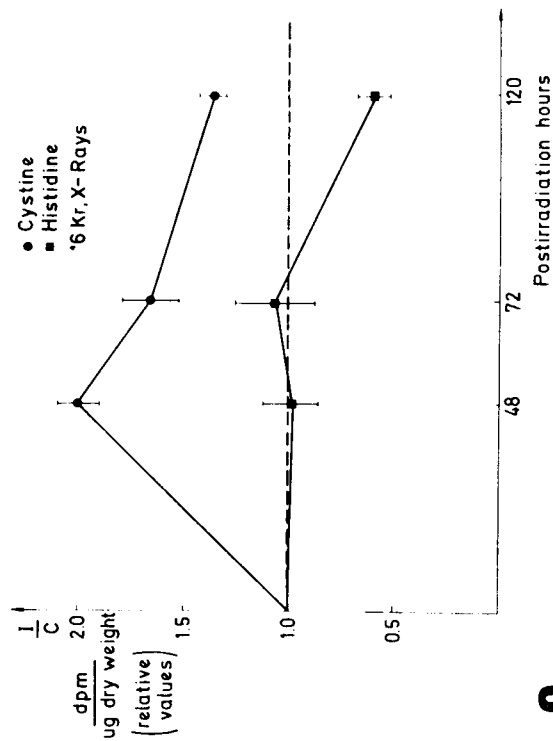
Figura 1: Aumento relativo $\frac{I}{C}$ del peso seco de la epidermis de la planta de la pata de ratas Wistar considerado en función del tiempo postirradiación. Se comparan los valores de peso seco con el contenido absoluto de proteínas por milímetro cuadrado de epidermis. Las líneas verticales indican desvío standard.



A



B



C

Figura 2: En los gráficos A,B,C, se representan los valores de desintegraciones por minuto por microgramo de peso seco de tejido epidérmico cuando se inyecta cistina tritiada (—●—) y cuando se inyecta histidina tritiada (—■—) En ambos casos se toman valores relacionados con el mismo parámetro medido en la epidermis no irradiada.

A. luego de irradiar con 2.5 Krad

B. luego de irradiar con 4 Krad

C. luego de irradiar con 16 Krad

D.6. Modificación volumétrica de los queratinocitos basales expuestos a diferentes dosis de irradiación X.

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

Dose-dependent volume changes in X - irradiated keratinocytes.

Absolute keratinocyte volume was determined during this study in non-irradiated and irradiated epidermal basal keratinocytes using objective quantitative methods of stereological cytology. The volumetric modifications analysed as a function of the radiation dose was characterized by two components, one taken place between 1,000 and 4,000 rad and another between 4,000 and 16,000 rad.

The first one can be depicted as corresponding to a dose range in which sudden volume increments took place, the second component, comprising the higher dose range, exhibited a less marked although sustained volume increase.

Es conocido que las radiaciones ionizantes producen en ciertas condiciones un efecto acantogénico en los epitelios malphigianos. Varios autores (1-2-3-4-5-6-7) han estudiado este efecto sobre la epidermis de la rata obteniendo valores máximos de acantosis a los cuatro días post-irradiación con una dosis de 16 Kr. Al mismo tiempo se comprobó que el número de células epiteliales no variaba significativamente, por lo que se atribuyó el aumento del espesor epitelial a un incremento del volumen celular.

Este trabajo se realizó con el objeto de determinar en que medida aumenta el volumen de las células basales irradiadas en función a la dosis recibida (8). Para ello se irradió la porción distal de la cola de ratas Wistar de cuatro días de edad mediante una metodología anteriormente descrita (4). Se aplicaron dosis de 1; 1,25; 1,50; 2; 2,5; 3; 3,50; 4; 8; 12 y 16 Kr en grupos de cinco animales que fueron sacrificados 96 horas postirradiación. Luego de separar las áreas irradiadas y no irradiadas el material fue fijado y procesado de acuerdo a las técnicas habituales para microscopía electrónica. Se realizaron cortes de dos micrones de espesor los que se colorearon con PAS- Azul de Toluidina. Para realizar el análisis estereológico cuantitativo se uti-

zaron 165 cortes de pieles irradiadas (11 condiciones diferentes, 3 tacos cada 5 animales) y 55 de pieles no irradiadas. Para obtener los valores absolutos del volumen celular (V) y la determinación de la densidad numérica de las células de la capa basal de las áreas interfoliculares de la epidermis, se utilizó la técnica estereológica descripta en un trabajo previo (4).

El epitelio sometido a radiación mostró una gama importante de alteraciones morfológicas. Con dosis hasta de 1 Kr. no se observó ningún tipo de alteraciones histológicas. Las dosis de 2 a 4 Kr; si bien causan una leve hipertrofia de las células y los espacios intercelulares no afectan ni los núcleos ni la organización de las capas basales y espinosas. Dosis altas, entre 8 y 16 Kr., inducen una degeneración progresiva con tumefacción del citoplasma, hipertrofia celular y fragmentación nuclear. La densidad numérica de las células basales por unidad de tejido están expresados en la Tabla I.

Estos datos permiten calcular el volumen absoluto de los queratinocitos. Las células no irradiadas presentaban un volumen promedio de $274 \mu^3$. Las bajas dosis (1.000 rads) no producían un cambio volumétrico detectable. Entre 1.000 y 2.000 rads se observaba un escaso incremento del volumen celular. Con dosis entre 2.000 y 4.000 rads el volumen celular de los queratinocitos basales aumentaba considerablemente obteniéndose valores aproximadamente de $700 \mu^3$. Después de exposiciones con 8.000 12.000 y 16.000 rads se observaba un incremento progresivo del volumen celular alcanzando con la última dosis, valores alrededor de los $1.000 \mu^3$ (Fig. 1). Estos datos indican que el crecimiento volumétrico de los queratinocitos basales en función de la dosis está caracterizado por dos componentes, uno inicial entre 1.000 y 4.000 rads caracterizado por un crecimiento brusco del volumen celular y uno posterior entre 4.000 y 16.000 rads, en el cual el aumento volumétrico es menos marcado. Estudios anteriores (1-2-3-5-6-7) han determinado que el aumento del volumen celular se debe no sólo a un edema intracelular sino que también existe un incremento de la síntesis de proteínas y

ácidos nucleicos, con un aumento de los componentes y organelas correspondientes.

Estos estudios asociados a nuestros datos volumétricos indicarían, por lo menos, la presencia de dos fenómenos distintos. El primero relacionado con dosis de hasta 4.000 rads está caracterizado por una marcada hipertrofia celular relacionado con una intensa actividad metabólica lo que conformaría un intento de reparación del daño por irradiación. El segundo fenómeno, evidenciado con las dosis mayores, sería una superposición parcial del fenómeno anterior con un proceso de degeneración celular irreversible. Independientemente de estos procesos, las modificaciones volumétricas obtenidas en función de la dosis de irradiación pueden ser consideradas como un interesante parámetro indicador para dosis bajas con un alto rango de sensibilidad para estas especies estudiadas.

Referencias

- 1.- Conti C.J., Giménez I.B. and Cabrini R.L. Strahlentherapie, 151:236, 1976.
- 2.- Frasc A.C.C., Itoiz M.E., Volco H.E. and Cabrini R.L. Int. J. Radiat. Biol., 29:301, 1976.
- 3.- Klein-Szanto A.J.P. and Cabrini R.L. Int. J. Radiat. Biol., 18:235, 1970.
- 4.- Klein-Szanto A.J.P., de Rey B.M. and Cabrini R.L. J. Cutan. Pathol., 4:23, 1977.
- 5.- de Rey B.M. and Klein-Szanto A.J.P. Strahlentherapie, 143:699, 1972.
- 6.- de Rey B.M. and Cabrini R.L. J. Invest. Dermatol., 60:137, 1973.
- 7.- de Rey B.M., Klein-Szanto A.J.P. and Cabrini R.L. Radiat. Res., 77:103, 1979.
- 8.- Lanfranchi H.E., Klein-Szanto A.J.P., de Rey B.M. and Cabrini R.L. Int. J. Radiat. Biol., 36:659, 1979.

TABLA I

Dosis	Número de queratinocitos por milímetro cúbico de capa basal.
No irradiado	$1800 \times 10^3 \pm 270 \times 10^3$
1 Krad	$1769 \times 10^3 \pm 220 \times 10^3$
1.25 Krad	$1503 \times 10^3 \pm 130 \times 10^3$
1.5 Krad	$1285 \times 10^3 \pm 82 \times 10^3$
2 Krad	$1177 \times 10^3 \pm 87 \times 10^3$
2.5 Krad	$810 \times 10^3 \pm 94 \times 10^3$
3 Krad	$755 \times 10^3 \pm 90 \times 10^3$
3.5 Krad	$726 \times 10^3 \pm 134 \times 10^3$
4 Krad	$709 \times 10^3 \pm 118 \times 10^3$
8 Krad	$680 \times 10^3 \pm 192 \times 10^3$
12 Krad	$539 \times 10^3 \pm 73 \times 10^3$
16 Krad	$471 \times 10^3 \pm 64 \times 10^3$

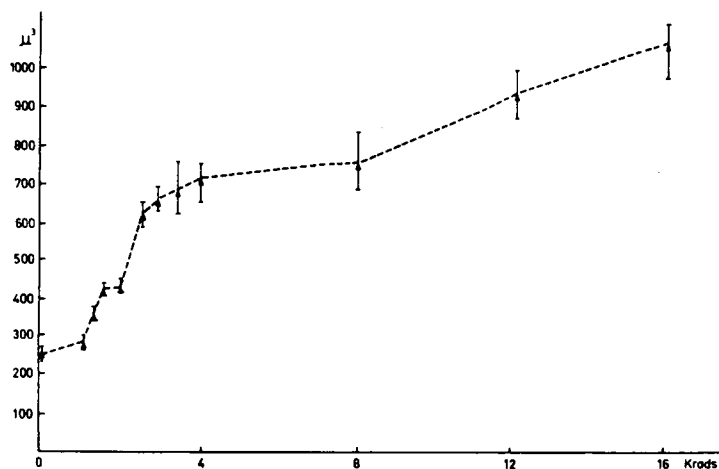


Fig. 1.: Volumen absoluto de queratinocitos basales en función de la dosis aplicada. Cuatro días postirradiación.

D.7. Semimucosa del labio de los bovinos: Aspectos ultra-estructurales y citoquímicos.

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

An ultrastructural and cytochemical analysis of the glabrous border of the bovine lip.

Glabrous border of the lip of cattle has a malpighian epithelium 800 μm thick. Horny layer is about 200 μm thick there is no granulous layer visible with light microscope. At electron microscopic level, the more evident morphological features are: high concentration of tonofilaments abundant mitochondria in basal as well as in spinous cells, and few little keratohyaline granules. Blood vessel supply, as shown by the histochemical demonstration of TPPase, is composed of capillary loop which penetrate up to near the horny layer. The oxidative enzymes reactions of cattle lip epithelia was compared with those of rat lip epithelia. Microphotometric evaluation of histochemical preparations showed a greater activity of SDh and Gl-6-ph Dh in cattle glabrous border. LDh, on the contrary, revealed lower activity in bovine glabrous border. Data presented show different structural and metabolic characteristics in epithelia of both species under study.

El epitelio de la semimucosa del labio de los bovinos presenta características morfológicas particulares que hicieron interesante su estudio desde el punto de vista de la biología epitelial. En un trabajo previo, aplicando técnicas estereológicas, se ha encontrado, que a pesar de su gran espesor este epitelio guarda las mismas proporciones entre sus estratos que las encontradas en la semimucosa del labio humano y de la rata (1).

El motivo de este trabajo ha sido analizar algunas características estructurales y metabólicas del epitelio del labio de los bovinos (2). Para ello se obtuvieron muestras de semimucosa y piel del labio de bovinos y ratas Wistar, estas últimas fueron utilizadas como control de la actividad metabólica.

Parte de este material fue fijado y procesado de acuerdo a las técnicas habituales para microscopía electrónica, el resto del material fue utilizado con distintas técnicas histoquímicas para la determinación de succinodeshidrogenasa, (SDh), lácticodeshidrogenasa (LDh) y glucosa seis fosfatodeshidrogenasa (Gl6phDh), así como para la determina-

ción de tiaminopirofosfatasa utilizada como marcador de las paredes vasculares. La actividad de las enzimas oxidativas fue cuantificada microespectrofotometricamente.

Las cantidades totales (CET) de las tres enzimas analizadas se relacionaron con las cantidades totales de elementos celulares que componen cada epitelio, siendo considerablemente mayor en los de los bovinos que en los de la rata. Cuando se consideraron las concentraciones enzimáticas medias (CEM) que evidencian la actividad por unidad de tejido, independientemente del volumen del mismo, se observa que la SDh tiene mayor actividad en la semimucosa bucal, en particular en la de los bovinos, que en la piel de ambas especies estudiadas. La LDh, en cambio mostró los valores de concentración más bajos en la semimucosa de los bovinos y los más altos en la piel de dicha especie. La Gl6phDh es evidentemente más activa en los epitelios de los bovinos que en los de la rata, siendo levemente mayor en la semimucosa que en la piel, como se observa en la Figura 1. En la Fig2 se expresan las variaciones del contenido enzimático en los diferentes estratos epiteliales en relación al contenido de la capa basal. La distribución del contenido enzimático fue similar para ambas especies, con excepción de la SDh en la semimucosa de los bovinos, en donde la concentración de dicha enzima aumenta en el estrato espinoso, para luego descender lentamente en las capas superficiales. Este hecho se complementa con numerosas asas capilares detectadas con TPP que, por delgadas papilas dérmicas, alcanzan los estratos superficiales.

Esta vascularización "excesiva" facilitaría un mayor consumo de oxígeno lo cual explicaría la presencia de un mayor número de mitocondrias en las capas superficiales, la mayor utilización de las actividades correspondientes al ciclo de Krebs, evidenciado por una alta concentración de SDh y el escaso suministro energético, por la vía de la glucólisis anaeróbica evidenciado por la menor actividad de la LDh.

La mayor actividad de la Gl6phDh en los epitelios altamente cornificados de los bovinos apoya la hipótesis de que

la misma está vinculada de un modo aún no conocido con la producción de la substancia subcórnea (3). La intensidad de producción de proteínas para elaborar una capa córnea de gran espesor se pone también de manifiesto en los cuadros de microscopía electrónica donde se observa una gran densidad de tonofilamentos en todos los estratos epiteliales.

Es interesante el hallazgo ultraestructural de pequeños y solitarios gránulos de queratohialina, no visibles a nivel de microscopía óptica, en la semimucosa bovina. Se podría considerar que el mecanismo de formación de esta capa córnea, con abundantes formaciones membranosas y una carencia casi total de gránulos de queratohialina, sería un proceso diferente al de otros epitelios ortoqueratinizados.

Referencias

- 1.- Lanfranchi H.E. and Rey B.M. de. Acta Anat., 101:187, 1978.
- 2.- Lanfranchi H.E., Rey B.M. de and Itoiz M.E. Arch. Oral Biol., 26:509, 1981.
- 3.- Itoiz M.E., Carranza F.A. (Jr), Gimenez I.B. and Cabri-
ni R.L. J. Periodont. Res., 7:14, 1972.

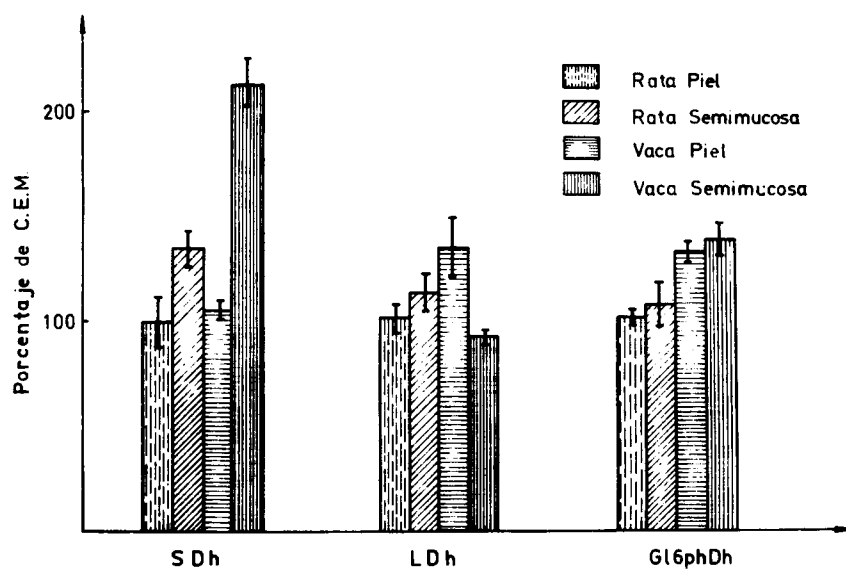


Fig. N° 1: Concentración enzimática media en los cuatro epitelios estudiados. Los valores porcentuales son obtenidos tomando los valores de la piel de la rata como 100 %.

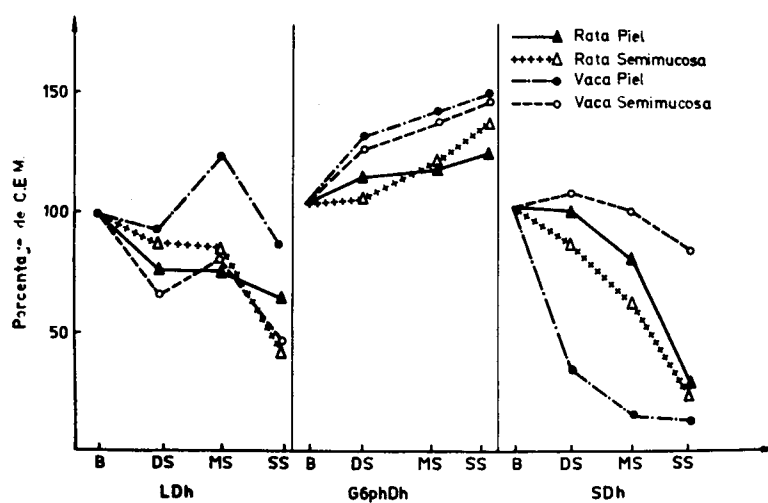


Fig. N° 2: Concentración enzimática media en los diferentes estratos epiteliales. Los valores son expresados como porcentaje, tomando el estrato basal como 100%.

D.8. Cambios inmunohistoquímicos de la membrana basal del endometrio del conejo en respuesta a las hormonas ováricas.

C. J. Conti, I. B. Giménez y L. E. Gerschenson*

Immunohistochemical changes in the basement membrane of rabbit endometrium in response to ovarian hormones.

Immunohistochemical studies of the basement membrane (BM) of the rabbit endometrium were carried out with an antibody produced in sheep using BM isolated from rabbit lens capsules. Indirect immunoperoxidase technique was used in frozen sections fixed in cold acetone. Kidney sections were used as a control.

Three different patterns of BM were found in the endometrium depending on the hormonal status of the animal. Ovariectomized rabbits showed a very thin continuous reaction in the corio-epithelium interphase. When this animals were treated with estrogens their pattern resembled that of the control, untouched animals (continuous estrus): a very thin and continuous area of BM reaction. On the other hand progesterone treated animals and pseudopregnant does showed a marked thickening of the BM area with a discontinuous, sometimes multilayered and ill defined pattern.

All these modifications seems to be associated with changes in the epithelial cell anchorage which probably are related to the formation of the secretory endometrium.

Preparaciones rutinarias con coloraciones argénticas y la técnica de PAS, en el endometrio de conejas, realizadas en el curso de experimentos con hormonas ováricas, han mostrado variaciones importantes en el límite epitelio-coriónico atribuibles a modificaciones de la membrana basal en respuesta a la acción hormonal. Con el objeto de investigar esas variaciones se preparó un anticuerpo contra membrana basal usando como antígeno las cápsulas del cristalino del ojo de conejo. Estas cápsulas, de composición idéntica a la membrana basal (1), fueron disecadas, extraídas, homogeneizadas sonicadas y lavadas. Con el material

Trabajo realizado durante la estadía de C.J. Conti e I.B. Giménez en el Departamento de Patología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Colorado, U.S.A.

* Profesor titular de esa Universidad.

insoluble se obtuvo un anticuerpo en oveja usando el adyuvante de Freund.

El anticuerpo antimembrana basal fue ensayado en cortes de criostato de riñón de conejo fijados en acetona a 0°C. Para ello se usaron técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirecta utilizando conjugados comerciales (2). Con ambas técnicas se observó la tinción característica de la membrana basal en glomérulos y túbulos renales con diluciones del suero hasta 1/400.

Para los estudios hormonales se utilizaron conejas de Nueva Zelandia de 3-4 Kg. Las hormonas se inyectaron en aceite de maíz de acuerdo a la siguientes dosis: 17 β -estradiol 2,5 mg/Kg de peso y progesterona 1 mg/Kg. Pseudopreñez fue inducida con gonadotrofina coriónica humana (HCG) 100 UI/animal.

Algunas conejas fueron ovariectomizadas 60 días antes de los experimentos.

Se obtuvieron 3 patrones fundamentales de tinción:

- A) En animales control (estro continuo) o en conejas castradas con estradiol, se obtuvo una delgada zona de reacción positiva en forma continua en el límite epitelio-coriónico.
- B) Los animales ovariectomizados sin ulterior tratamiento, mostraron un considerable engrosamiento de la zona de reacción.
- C) Los cambios más importantes fueron los observados en los animales tratados con progesterona o que se encontraban en las primeras fases de la pseudopreñez inducida por HCG. En este caso la membrana basal mostraba un notable incremento del área de reacción así como un trazo irregular, mal definido, presentando duplicaciones y dicotomizaciones, fracturas etc. (3-4).

Estas alteraciones de la membrana basal parecen estar relacionadas con la formación de glándulas que se producen previamente a la anidación del huevo fecundado en el endometrio de la coneja (3-4). El incremento de la proliferación celular inducida por los progestágenos (5-6) acoplado a un posible anclaje celular, explicaría razonablemente la forma-

ción de glándulas (arborización) en el preanidamiento. Del mismo modo muchos autores han relacionado a la membrana basal con el desarrollo de estructuras epiteliales (7-8). En ese sentido podemos sugerir que un rol fundamental de la membrana basal es la adherencia epitelial, contribuyendo de ese modo a la formación del endometrio secretorio.

Referencias

- 1.- Denduchis B., Kefalides N.A. Biochem. Bioph. Acta., 22: 357, 1970.
- 2.- Nakane P.K., Pierce G.B. J. Cell Biol., 33:307, 1967.
- 3.- Conti J.C., Giménez-Conti I.B., Conner E.A., Gerschenson L.E. J. Cell Biol., 83:233, 1979.
- 4.- Murai J.T., Conti C.J., Giménez-Conti I.B., De Paoli J.R., Conner E.A., Gerschenson L.E. The Endometrium Spectrum Publication, 1980.
- 5.- Conti C.J., Giménez-Conti I.B., Zerbe G.O., Gerschenson L.E. Biology of Reprod., 24:643, 1981.
- 6.- Murai J.T., Conti C.J., Giménez-Conti I.B., Orlicky D., Gerschenson L.E. Biology of Reprod., 24:649, 1981.
- 7.- Meier S. Anat. Rec., 191:447, 1978.
- 8.- Vracko R. Amer.J. Pathol., 77:314, 1974.

D.9. Regulación de la ciliogénesis y la proliferación del epitelio endometrial del conejo mediante 20 α -Hidroxi pregn 4-en-3 ona.

C. J. Conti, I. B. Giménez, E.A. Conner* y L. E. Gerschenson**.

Regulation of ciligenesis and proliferation of endometrial epithelium by 20 α -Hidroxi pregn 4-en-3 ona.

20 α -Hydroxy-pregn-4-en-3 one (20-OH-P), a steroid hormone secreted by the ovarian interstitium in rabbits, induced the appearance of ciliated cells in the endometrium of ovariectomized rabbits. Estradiol-17 β appeared to inhibit this effect partially, but 20-OH-P and progesterone were antagonists, since their simultaneous administration did not result in either the formation of ciliated cells or a fully developed secretory endometrium.

Withdrawal of 20-OH-P for 5 days, after its administration, resulted in a very rapid proliferative effect leading to the formation of arborized secretory endometrium in 48 h. Ciliated cells did not seem to be involved in this proliferative reaction, since the evidence presented here suggests that they are probably terminally differentiated cells. Furthermore, cytophotometric determination of DNA in individual nuclei showed that while ciliated cells are a homogeneous population of nondividing cells arrested in G₁, the rest of the luminal epithelium is a heterogeneous cell population showing a bimodal DNA distribution with one peak in the G₁ and the other in the G₂ range. This last peak, not observed in either ovariectomized or intact rabbits, and very prominent in rabbits injected with 20-OH-P, probably represents a population of cells arrested in the G₂ phase of the cell cycle. These cells, after the withdrawal of the 20-OH-P, probably reenter the cell cycle, playing a role in the formation of the arborized secretory epithelium.

Estudios previos han mostrado que la 20 α -Hidroxi-pregn 4-en 3 ona (20-OH-P), una hormona esteroide secretada por el ovario intersticial en el conejo, induce la aparición de células ciliadas en el endometrio de conejas ovariectomizadas.

Trabajo realizado durante la estadía de C.J. Conti e I.B. Giménez en el Departamento de Patología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Colorado, U.S.A.

* Jefe de trabajos prácticos del mismo Departamento.

** Profesor titular de esa Universidad.

zadas (1). En este trabajo (2) se ha profundizado en el conocimiento de la acción de esta hormona, cuyo rol fisiológico es todavía desconocido.

En primer lugar, estudios de competencia con otras hormonas ováricas demostraron que 17 β -estradiol tiene un efecto antogónico a la acción ciliogénica del 20-OH-P. Por otra parte esta última hormona y la progesterona mostraron ser antagonistas, ya que la administración simultánea de ambos no resulta ni en la formación de células ciliadas, ni en un endometrio secretorio completamente desarrollado. Esto argumenta en contra de previos trabajos que consideraban a 20-OH-P como una progesterona débil (3).

Cuando se suspende la administración de 20-OH-P después de cinco días de aplicación a conejas ovariectomizadas, ocurre un rápido efecto proliferativo que lleva a la formación del endometrio secretorio en sólo 48 hs. Las células ciliadas no parecen estar envueltas en esta reacción proliferativa ya que evidencias de tipo morfológico a nivel ultraestructural muestran que son células terminalmente diferenciadas. Además, estudios citofotométricos de células ciliadas teñidas para ADN con **cromo alumbre galocianina** (4), han dado el patrón monomodal, simétrico y diploide, característico de células no proliferativas. Sin embargo, el mismo estudio citofotométrico mostró en el resto de las células epiteliales una distribución mucho más heterogénea, que en el caso de las células luminales, evidenció un patrón bimodal con un segundo pico en la región tetraploide, probablemente formado por células bloqueadas en el período G₂ del ciclo celular. La existencia de esta posible población de reserva bloqueada en G₂ explicaría razonablemente el rápido desarrollo del endometrio secretorio que ocurre rápidamente después del retiro de la 20-OH-P.

La arborización (endometrio secretorio) producida por el retiro de la 20-OH-P, si bien presenta en términos generales una gran semejanza con la arborización producida en la preñez o pseudopreñez inducida por HCG, ha mostrado algunas diferencias interesantes que conviene puntualizar. El epite-

telio secretorio verdadero dura varios días y tiene una lenta regresión con la formación de células gigantes multinucleadas (5). El epitelio arborizado generado por la suspensión de la hormona 20-OH-P, muestra rápidos cambios regresivos en ausencia de células multinucleadas (2).

De acuerdo a estos resultados, la función de la 20-OH-P sería la inducción ciliogénesis por un mecanismo todavía no conocido. Los estudios previos mostrando que otras progesteronas hidroxiladas tendrían efecto similares (1) sugerirían que éste puede ser un mecanismo común a otras especies, además del conejo. Nuestros resultados confirman también previos resultados, desechando la idea de que las progesteroneas hidroxiladas son simples metabolitos con débil acción progestágena.

Referencias

- 1.- Conner E.A., Murai J.T., Gerschenson L.E. Life Sci. 22:1015, 1978.
- 2.- Conti C.J., Conner E.A., Giménez-Conti I.B., Silverberg S.G., Gerschenson L.E. Biology of Reprod. 24:903, 1981.
- 3.- Rennie P., Davies J. Endocrinology 76:535, 1965.
- 4.- Sandritter W., Kiefer G., Rick W. In Introduction to Quantitative Cytochemistry (G.L. Wied Editor) Academic Press, 1966.
- 5.- Davies J., Hoffman L.H. Am. J. Anat. 137:423, 1973.

D.10. Efecto de las hormonas ováricas en la proliferación del epitelio endometrial del conejo.

C. J. Conti, I. B. Giménez, J. T. Murai*, L. E. Gerschenson **.

Effects of the ovarian hormones on the proliferation of the rabbit endometrial epithelium.

A short term incubation technique was developed to study the effects of the ovarian hormones on the proliferation of rabbit endometrial epithelium. Using this technique we observed that 17β -estradiol stimulates the proliferation of endometrial glandular cells in intact or ovariectomized rabbits. Progesterone also induced an increase in the proliferation of both luminal and glandular epithelium, of intact rabbits. Foci of cells with nuclei labeled with $^3\text{HTdr}$ suggesting active hyperplasia were observed in the luminal uterine epithelium of progesterone treated rabbits, which seems to be related to the formation of glands, characteristic of secretory endometrium.

The same technique was also used to study the temporal relationship between the epithelial proliferation and uteroglobin production in HCG treated (pseudopregnant) does. Uteroglobin was secreted when cell proliferation had drop to very low levels confirming that uteroglobin is produced by differentiated non-dividing cells.

Evidencias acumuladas durante muchos años han mostrado inequívocamente que las hormonas ováricas tienen un rol fundamental en la patología del carcinoma de endometrio. El conejo por su alta incidencia espontánea de este tumor, ha sido el modelo de elección para su estudio (1,2). En este trabajo se ha profundizado en el estudio de los efectos de las hormonas ováricas en la proliferación del epitelio uterino del conejo, con la idea de que un mejor conocimiento de los efectos de cada hormona ovárica y su interacción con el crecimiento epitelial puede brindar información relevante para el estudio de la hiperplasia endometrial y del cáncer de endometrio. Con este motivo se desarrolló una técnica

Trabajo realizado durante la estadía de C.J. Conti e I.B. Giménez en el Departamento de Patología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Colorado U.S.A.

* Jefe de trabajos prácticos del mismo Departamento

** Profesor titular de esa Universidad.

de marcación con precursores radiactivos del ADN que permitió el estudio de la proliferación en tejidos de conejos que han recibido tratamiento hormonal *in vivo*. De esta forma se obtiene información sobre el estado proliferativo de los tejidos del animal sin necesidad de inyectarlo con compuestos radiactivos (3).

El endometrio del conejo consiste de un epitelio luminal formado por células cilíndricas y un estroma en el cual existen glándulas tubulares, también compuestas por epitelio cilíndrico. Las glándulas se abren a la luz del órgano formando con el epitelio luminal una lámina epitelial continua. Las células de ambos tipos, epitelio luminal y glandular, son morfológicamente similares tanto al microscopio óptico como al electrónico (4,5). En estudios previos llevados a cabo en la Universidad de Colorado se demostró, en cultivo de tejidos de endometrio de conejo, la existencia de por lo menos dos tipos celulares diferentes, en proliferación y en reposo, las cuales parecen ser reguladas en forma diferente por los estrógenos y progestágenos (6,7). Esta heterogeneidad encontrada con cultivos de endometrio llevó a la hipótesis de que los epitelios glandular y luminal podrían ser el origen de las dos poblaciones celulares *in vitro* y por lo tanto tener diferente regulación hormonal.

Utilizando la técnica anteriormente citada, hemos observado que el 17 β -Estradiol estimula la proliferación de las glándulas endometriales en conejas normales (estro continuo) y en conejas ovariectomizadas. La progesterona, por otra parte no solo indujo un incremento de la proliferación de la glándulas endometriales sino también del epitelio luminal (3,8). En las conejas tratadas con progesterona pudieron observarse focos de células marcadas en el epitelio luminal, sugiriendo áreas de activa hiperplasia que parecen estar relacionadas con la neoformación glándular que lleva la génesis del epitelio secretorio arborizado, característico de las conejas tratadas con progesterona o en la primera etapa de la preñez (8). La administración simultánea de estrógenos y progesteronas produjo un efecto mutuamente antagónico con la inhibición del efecto proliferativo en ambas

poblaciones celulares. Esto está sugiriendo la complejidad de los mecanismos regulatorios de la proliferación y la existencia de mecanismos de interacción hormonal (3).

Usando la misma metodología se estudió la correlación entre la proliferación del epitelio endometrial y la síntesis de uteroglobina (o blastoquinina) considerada como un marcador de la diferenciación del epitelio uterino (9). La uteroglobina es una proteína de bajo peso molecular que se segrega en la luz de los cuernos uterinos, en la primera fase de la preñez, aparentemente modulada por la progesterona. En este estudio la uteroglobina fue determinada por medio de "rocket inmunolectroforesis" con un anticuerpo antiuteroglobina desarrollado en el laboratorio. Los resultados de este experimento mostraron un pico inicial de proliferación de ambas poblaciones celulares, luminal y glandular, en el segundo día de pseudopreñez inducida por 50 UI de gonadotrofina humana. La actividad proliferativa desciende en el cuarto día haciéndose nula a partir del día sexto. Contrariamente la secreción de uteroglobina recién empieza a aumentar a partir del segundo día, llegando al máximo entre el cuarto al sexto día de pseudopreñez. Este estudio, junto con estudios inmunohistoquímicos de otros autores (10) sugirió que la producción de uteroglobina es llevada a cabo por el epitelio secretorio diferenciado y no proliferante.

Referencias

- 1.- Siiteri P.K. Cancer Research 38:4360, 1978.
- 2.- Griffiths C.T et al. Gynecol. Oncol. 3:259, 1975.
- 3.- Conti J.C., Giménez-Conti I.B., Zerbe G.O., Gerschenson L.E. Biology of reproduction 24:643, 1981.
- 4.- Davies J., Hoffman L.H. Amer. J. Anat. 137:423, 1973.
- 5.- Davies J., Hoffman L.H. Amer. J. Anat. 142:335, 1975.
- 6.- Gerschenson L.E., Conner E.A., Murai J.T. Endocrinology 100:1468, 1977.
- 7.- Gerschenson L.E., Conner E.A., Yang J., Andersson M. Life Sci. 24:1337, 1979.

- 8.- Murai J.T., Conti C.J., Giménez-Conti I.B., De Paoli J.R., Conner E.A., Gerschenson L.E. "The Endometrium" (F. Kimbal Ed).
- 9.- Murai J.T., Conti C.J., Giménez-Conti I.B., Orlicky D., Gerschenson L.E. Biology of reproduction 24:649, 1981.
- 10.- Kirschner C. Cell and Tissue Res., 170:425, 1976.

D.11. Obtención, cultivo e identificación de células del epitelio vaginal de rata Wistar.

C. J. Conti, I. B. Giménez, C. M. Aldaz y D. R. Tasat.

Isolation, cultivation and identification of epithelial cells from de vagina of Wistar rats.

A cell culture system of vaginal epithelium was developed for the study of the effects of steroid hormones on the proliferation and differentiation of epithelial cells *in vitro*.

Vagina from 250-300 g Wistar rats were everted, washed in a saline solution and incubated in 0.5% trypsin solution. Epithelial cells, obtained through the trypsinization, were plated in Ham's F12 medium. Fetal calf serum, when added, improve plating efficiency and growth but it is not essential since cell culture plated in chemically defined medium are still able to stick and growth. The addition of 10^{-10} of cholera toxine prevent the massive differentiation of the cell culture. Cell differentiation was evaluated by the resistance of cornified cells (differentiated) to the solution of either 8M urea or 8M urea with 0.2M 2-Mercaptoethanol, depending the degree of differentiation. The characteristics of this system makes it very suitable for the study of the effects of different compounds on proliferation and differentiation.

Con el fin de buscar un modelo que permita el estudio de las complejas relaciones de las hormonas ováricas y sus células "target" se desarrolló un cultivo de células del epitelio vaginal de rata Wistar. La vagina de los roedores, que se caracteriza por los drásticos cambios en proliferación y diferenciación de su epitelio en respuesta a cambios hormonales, se presenta como un modelo interesante para aclarar alguna de las controversias sobre la acción *in vitro* de las hormonas esteroides ováricas (1-2). Ratas Wistar de 250-300 gr. fueron clasificadas de acuerdo a su estado en el ciclo estral por medio de extendidos vaginales. Los animales fueron sacrificados con éter etílico, las vaginas extraídas asepticamente, lavadas en una solución salina libre de calcio y magnesio (PBS) y sometidas a una solución dispersante de 0.5% de tripsina en PBS. Las células libres se separaron del tejido sin digerir y la tripsina se inactivó con suero bovino. Aproximadamente 500.000 células

fueron sembradas en cápsulas de poliestireno de 25 cm. de superficie, con medio de Ham F12 modificado (3). Las células adhieren durante las primeras 24 horas formando colonias de tipo epitelioides. Regulando los tiempos de tripsinización se pudieron eliminar los fibroblastos casi completamente. Fibroblastos remanentes pudieron ser eliminados con lavados en soluciones libres de calcio y magnesio (4).

El medio de cultivos fue suplementado con suero fetal bovino de 0-20%, insulina $10^{-7}M$, hidrocortisona $10^{-6}M$ y toxina del cólera $10^{-10}M$. El suero fetal bovino aumenta sensiblemente la eficiencia de los cultivos pero no parece ser esencial como en la mayoría de los cultivos celulares, ya que cultivos de células vaginales en medios químicamente definidos (libres de suero) desde el momento de la siembra, son capaces de desarrollar y crecer aunque con baja eficiencia. Los cultivos sembrados en medios químicamente definidos fueron suplementados con albúmina bovina, como "carrier" de los esteroides. La toxina del cólera tiene el efecto de elevar el tenor de AMP cíclico intracelular y ha sido reportado como un inhibidor de la queratinización en cultivos de epidermis (4). En nuestro caso se lo ha incluido en la formación del medio para inhibir la tendencia hacia la masiva diferenciación que tienen los cultivos de vagina. Insulina e hidrocortisona fueron considerados componentes normales del medio y no fue estudiada su omisión.

La eficiencia de los cultivos parece estar relacionada intimamente al estado hormonal de la rata en el momento del sacrificio. Cuando los cultivos fueron realizados con vaginas de ratas en los estadios proestro y diestro del ciclo estral la eficiencia de los cultivos (definida como la capacidad de las células sembradas para adherir) fue máxima, mientras que este parámetro fue mínimo en metaestro.

El origen epitelial de los cultivos fue demostrado mediante técnicas inmunohistoquímicas con un anticuerpo antiqueratina desarrollado en nuestro laboratorio (5). Una característica de máximo interés en estos cultivos es la tendencia a diferenciarse (queratinizarse) *in vitro*. Este fenómeno pudo demostrarse por características morfológicas, téc-

nicas de inmunohistoquímica y fundamentalmente por la demostración de citoesqueletos de queratina y envoltura córnea en las células cultivadas. Los primeros son demostrados por la resistencia de esas células a soluciones de 8M urea, mientras que las envolturas córneas son resistentes a 8M urea en un medio reductor (0.2M 2-Mercaptoetanol).

La posibilidad de regular proliferación y diferenciación en estos cultivos, los convierte en un modelo interesante para el estudio del efecto biológico de distintos compuestos que puedan alterar el crecimiento y la maduración de los tejidos, tales como: contaminantes ambientales, radiaciones, hormonas, etc. La posibilidad de trabajar, con este modelo en medios químicamente definidos les da un punto adicional de interés.

Referencias

- 1.- Murai J.T., Conti C.J., Giménez-Conti I.B., De Paoli J.R., Conner E.A., Gerschenson L.E. In "The endometrium" (F.A. Kimbal Ed) S.P. Medical and Scient. Books, 1980.
- 2.- Sonnenschein C., Soto A.M. J. Natl. Cancer Inst., 63: 835, 1979.
- 3.- Gerschenson L.E., Berliner J.A. and Yang J. Cancer Research 34:2873, 1974.
- 4.- Rheinwald J.G. In "Methods in Cell Biology" Vol. 21A, 1980.
- 5.- Osborne M., Franke W., Webel K. Exptl. Cell Res. 125: 37, 1980.

D.12. Obtención de un anticuerpo antiqueratina. Su uso como marcador de células epiteliales.

I. B. Giménez, C. J. Conti y F. Larcher.

Obtainment of an antikeratine antibody. Its use as a marker of epithelial cells.

Keratin polipeptides were extracted from rat skin with 8M urea and 0.25mM 2-mercaptoetanol and checked electrophoretically for purity. Keratin solutions were dialyzed against water and insoluble proteins injected into rabbits using Freund's adjuvant. After several booster injections antikeratin activity was detected in rabbit serum.

Whith this antibody an immunohistochemical technique was developed using the peroxidase-antiperoxidase method (PAP). Frozen and conventional paraffin sections were assayed with this technique and a positive reaction was obtained in epithelial structures. This method was also used to confirm the epithelial origin of vaginal cells in culture. Immunochemical methods for keratin and other intermediate filaments can be used to obtain information about the origen of cells in culture and indiferentiated. tumors.

Los filamentos intermedios de células epiteliales están compuestos por un ensamble de polipéptidos de queratina o prequeratina (1-4). La constancia de este hecho ha sugerido la posibilidad de, a través de métodos inmunohistoquímicos, usar anticuerpos antiqueratina como marcador de células de origen epitelial en experimentos de cultivo de tejidos o crecimientos neoplásicos cuyo origen no puede ser definido morfológicamente por su alto grado de indiferenciación.

La queratina fue extraída a partir de una fracción insoluble de epidermis de rata, con 8M urea y 0.25mM de 2-mercaptoetanol, mostrando electroforéticamente las bandas características de los polipéptidos queratínicos (2). La queratina así obtenida, diluída en adyuvante de Freund fue inyectada en conejos para la obtención de anticuerpos antiqueratina. La actividad del suero de los conejos fue analizado por inmunodifusión e inmunohistoquímica usando en este último caso la técnica de peroxidasa antiperoxidasa (5). Esta técnica ha indicado ser útil para la demostración de epitelios normales, tanto en cortes por congelación como en cor-

tes de parafina de material de archivo. También hemos usado esta técnica para confirmar el origen epitelial de células de cultivos primarios de vaginas de rata Wistar (6). En estas células se observa una típica estructura reticular similar a la mostrada por otros autores en otras estirpes celulares y con técnicas de inmunofluorescencia (2), como también una variación en la intensidad de la reacción (una importante proporción de células mostró una reacción varias veces más intensa) confirmando esto último, hallazgos morfológicos y bioquímicos que sugerían la existencia de células en los cultivos con distintos grado de diferenciación. Cultivos primarios de fibroblastos y la línea celular 3T3, ambas de origen mesodérmico, fueron usados como controles, mostrando siempre reacción negativa.

A través de la obtención de anticuerpos antiqueratina y su posterior visualización por técnicas de inmunohistoquímica (PAP en este caso) se presenta la posibilidad de usar la composición de los filamentos intermedios para la determinación del origen de diversos tipos celulares, ya sea *in vitro* o células indiferenciadas de tejidos tumorales.

Referencias

- 1.- Baynes J., Levine M., McLeod A., Wilkinson A. Brit. J. Dermatol. 98:165, 1978.
- 2.- Tung-Tien Sun, Chiachio Shih, Green H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:2813, 1979.
- 3.- Osborn M., Frank W., Weber K. Exptl. Cell Res. 125: 37, 1980.
- 4.- Franke W., Weber K., Osborn M., Schmid E, Freudenstein C. Exptl. Cell Res. 116:429, 1978.
- 5.- Sternberger L. "Immunocytochemistry" Prentice Hall Inc, 1974.
- 6.- Conti C.J., Giménez I.B., Aldaz C.M., Tasat D.R. El presente Informe, p.p. 112-114.

D.13. Análisis submicroscópico del esquema de bandas del cromosoma X politénico de *Drosophila melanogaster*.

W. F. Kirschbaum.

Submicroscopic analysis of the banding scheme, of polytene X chromosome of *Drosophila melanogaster*.

The analysis of the banding scheme of polytene X chromosome of *Drosophila melanogaster*, was carried out by electron microscopy, after planning and developing a technique that allowed us to obtain sections that include, a whole, well stretched polytene X chromosome that has been sectioned in all its length, parallel to the chromosome axis. Mounting the sections over grids for serial sections, one can obtain images, that cover the whole chromosome, keeping the structure in an uninterrupted and continuous way. This allows an analysis without confusions of regions and sequence of bands. Also sections of different thickness of the same chromosome can be obtained for comparative purposes. Comparing the electron microscopic analysis with the original schemes obtained by light microscopy, shows that only one fifth of the double bands could be considered as such in the X chromosome. This occurs because with electron microscopy one can only consider bands as double, when they are truly separated and simultaneously maintain contact zones and not because they have a certain thickness. One can neither find a complete coincidence of thin bands. Due to the higher resolution power of the electron microscope, some additional thin bands were detected.

La hipótesis de que cada banda individual de cromosoma politénico, corresponde a un locus génico (1), está condicionada a una correcta información, sobre el número de genes y bandas en los mismos. El cromosoma X de *Drosophila melanogaster*, es el mejor conocido en ambos aspectos genético y citogenético. Los trabajos (2-3) sobre el número de genes en el cromosoma X por los métodos de saturación y "crossing-over" comparados con los de número de bandas por microscopía electrónica, (m.e.) confirman la correlación entre ambas cantidades. Pero esta información, es solamente parcial, puesto que abarca únicamente pequeñas porciones del cromosoma X. Todavía, la exactitud y el correcto número de bandas de todo el cromosoma X, queda por ser resuelto. Con el objeto de obtener una mayor información al respecto, se utilizó la técnica de-

sarrollada para la observación de extendidos de cromosomas politénicos por m.e. (4). La misma permite la observación por m.e. de la totalidad de un cromosoma, obteniendo imágenes que abarcan el mismo en toda su longitud, sin confusión de zonas ni de secuencia de bandas, perfectamente comparables con los mapas de Bridges, obtenidos por microscopía óptica (m.o.).

Se contaron 804 bandas por microscopía electrónica, adoptando el criterio de Bridges (5) de multiplicar por dos las bandas consideradas con dobles. Bridges en cambio registra en su mapa de microscopía óptica 1012 bandas, 1,12 veces mayor que por m.e. Ello se debe a que por m.e. se encontraron 664 bandas simples, clasificándose además adicionalmente nada más que 70 bandas como dobles, mientras que por m.o., 290 bandas resultan ser simples y 391 son consideradas dobles. Esta gran diferencia de 5,15 veces más bandas dobles por m.o. que por m.e., se debe a que por m.e. únicamente se llegan a considerar las bandas como dobles, cuando se encuentran realmente separadas y además mantienen zonas de contacto evidentes y no simplemente considerando el grosor de las mismas. Bridges clasifica en su mapa 76 bandas como dobles y gruesas, es decir con una relación de 1,08 con respecto a las dobles obtenidas por m.e. Si se consideran todas las bandas como simples, por m.e. se cuentan 734 y por m.o. 651, es decir se encuentran 1,13 veces más bandas por m.e. debido a que muchas bandas dobles del mapa de Bridges se resuelven como dos simples por m.e.

Se llega a la conclusión que la diferencia de resultados obtenidos, se debe al mayor poder del m.e. de resolver mayor cantidad de bandas simples, obteniendo algunas adicionales no detectables por m.o. y de la capacidad de diferenciar bandas dobles de simples.

Referencias

- 1.- Bridges C.B. J. Hered., 26:60, 1935.
- 2.- Judd B.H., Shen M.W., Kaufmann T.C. Genetics, 71:139, 1972.

- 3.- Lefevre G. Genetics, 67:497, 1971.
- 4.- Kirschbaum W.F., Fromme H.G. Drosoph. Inf. Serv.,
50:171, 1973.
- 5.- Bridges C.B. J. Hered., 29:11, 1938.

D.14. Alta tasa de mutaciones cut inducidas por irradiación sobre loci específicos en esperma móvil de *Drosophila melanogaster*.

W. F. Kirschbaum.

High rate of cut mutations induced by irradiation of *Drosophila melanogaster* at specific loci in motile sperm.

Polytene chromosomes cytogenetic analysis of 36 visible mutations, induced by 3000 rads at 10 specific loci in motile sperm, was carried out to detect chromosomal rearrangements. Results showed that 24 were point mutations and 12 were chromosomal rearrangements. This means that for a mean overall mutation frequency of the 10 loci of $1.18 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$, the resulting average mutation frequency of the point mutations is $0.78 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$, and an average mutation frequency of $0.4 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$ for the chromosomal rearrangements. The ct mutations showed a high proportion of chromosomal rearrangements, half of them translocations, compared with all the loci of the eye colour mutations. The mean overall mutation frequency for the eye colour mutations is $1.07 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$, with an average mutation frequency of $0.82 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$ for the point mutations and $0.25 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$ corresponding to the chromosomal rearrangements. On the other hand, the mean mutation frequency of the ct mutations reached $2.63 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$, with an average mutation frequency of $0.66 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$, for the point mutations and $1.97 \times 10^{-7}/\text{locus/r}$ due to the chromosomal rearrangements. Therefore we can assume that in this case the high rate of ct mutations is caused by the high chromosomal rearrangements, especially translocations associated with the ct locus.

Se efectuó el estudio citogenético de los cromosomas politénicos de 36 mutaciones visibles inducidas por 3000 rads en esperma móvil de *Drosophila melanogaster* sobre 10 loci específicos, con el objeto de detectar rearranglos cromosómicos comprendidos en los mismos. Dichas mutaciones fueron obtenidas en este laboratorio (1) irradiando 3163 machos del stock "Binsc", que luego fueron apareados con hembras portadoras del cromosoma "maple", que contiene los genes marcadores recesivos considerados. Las mutaciones sobre loci específicos se detectaron sobre un total de 10.132 hembras apareadas. Considerando las 36 mutaciones obtenidas, el análisis de los cromosomas politénicos indicó que 24 resultaron ser mutaciones de punto y 12 rearranglos

cromosómicos (2). Ello significa que para los 10 loci considerados, se obtuvo una frecuencia media total de mutaciones de $1,18 \times 10^{-7}$ /locus/r, con una frecuencia media de mutaciones de $0,78 \times 10^{-7}$ /locus/r, para las mutaciones de punto y de una frecuencia media de mutaciones de $0,40 \times 10^{-7}$ /locus/r, para los rearreglos cromosómicos. Las mutaciones de color de ojo tuvieron un comportamiento similar con respecto al número de rearreglos cromosómicos detectados en ellas. En cambio las mutaciones cut, mostraron una proporción alta de rearreglos cromosómicos, correspondiendo la mitad de ellos a translocaciones. Comparando las mutaciones cut con el conjunto de los loci de las mutaciones de color de ojo, se obtuvieron los siguientes resultados: la frecuencia media total para las mutaciones de color de ojo resultó ser de $1,07 \times 10^{-7}$ /locus/r, con una frecuencia media de mutaciones de $0,82 \times 10^{-7}$ /locus/r, para las mutaciones de punto y de $0,25 \times 10^{-7}$ /locus/r, correspondiente a los rearreglos cromosómicos; por otro lado la frecuencia media de las mutaciones cut alcanzó a $2,63 \times 10^{-7}$ /locus/r, con una frecuencia media de $0,66 \times 10^{-7}$ /locus/r, para las mutaciones de punto y de $1,97 \times 10^{-7}$ /locus/r, debido al elevado número de rearreglos cromosómicos. Cut es un locus altamente mutable, ya sea desde el punto de vista espontáneo o bien inducido y además muestra una alta frecuencia de rupturas cromosómicas inducidas por radiaciones. (3) Con los resultados obtenidos podemos asumir, que en este caso, la alta tasa de mutaciones cut obtenidas, es causada por la elevada cantidad de rearreglos cromosómicos, especialmente translocaciones, asociadas al locus de cut.

Referencias

- 1.- Maroni G.P. *Drosoph. Inf. Serv.*, 43:133, 1968.
- 2.- Kirschbaum W.F. *Drosoph. Inf. Serv.*, 53:157, 1978.
- 3.- Johnson T.K., Judd B.H. *Genetics*, 92:485, 1979.

D.15. Efecto de la radiación X sobre las glándulas salivales

E. G. Espinal, B. M. de Rey y R. L. Cabrini.

Radiation effects on the salivary glands.

The salivary glands are generally considered as radioresistant organs. The serous acini have demonstrated to be altered by the radiation. Clasically, neither the mucous acini nor the ducts were considered as radiosensitive. In recent experiments we have tested the effect of 2000 rads of X radiation applied to the salivary glands of the Wistar adult rats. The study was performed since 2 days after irradiation up to 9 months. Histological, stereological and ultrastructural changes were analyzed.

The effectiveness of the radiotherapy on the salivary gland tumours was generally accepted as a coadyuvant of the surgery to prevent recurrences.

Las glándulas salivales son consideradas generalmente como órganos que presentan radioresistencia, ésta es variable de acuerdo a su estructura histológica. Así, los acinos serosos son sensibles a las radiaciones, en tanto que los mucosos son considerados radioresistentes. Con respecto a los ductos existe poca información, y además son considerados como radioresistentes.

Estos trabajos se han realizado para rever el proceso de la acción tanto aguda como crónica de la radiación, en todos los elementos histológicos que forman el lobulillo de la glándula submaxilar de la rata, tanto cualitativa como cuantitativamente, y con la ayuda de la microscopía electrónica.

Se desarrolló también, una nueva metodología para la exposición de parte de la glándula submaxilar a la irradiación, aislándola del resto del cuerpo del animal; tanto en la rata como en el ratón, las glándulas submaxilares son órganos hormonodependientes, por lo tanto la obligada irradiación de la tiroides, agregaría lesiones por el efecto de la radiación sobre el funcionamiento tiroideo. Se realizaron los trabajos con dos técnicas experimentales distintas. La primera es la técnica convencional, donde se irradiaba la porción cervical de ratas Wistar adultas. Con esta metodología se analizaron los cambios producidos en los distintos elementos que integran el tejido glandular a nivel

de microscopía óptica, desde 48 hs. post-irradiación hasta los 9 meses. Allí se observó la tumefacción de las células acinares durante los primeros períodos de tiempo; posteriormente, a partir de los 2 meses post-irradiación se sucedieron los cambios más marcados a nivel acinar, que se caracterizaron por una desaparición progresiva del número de acinos. Los ductos demostraron ser radiosensibles con la dosis empleada, mostrando cambios a partir de los dos meses. Métodos estereológicos confirmaron los datos obtenidos por la microscopía óptica. Se encontró una disminución del número de acinos a los 9 meses post-irradiación del 54 %. El peso glandular disminuyó un 57 % y la medida de densidad de superficie acinar disminuyó un 16.5 %. Si se compara esto con los datos referidos al número de acinos queda demostrado que si bien son menos, su membrana se torna flexuosa y se hacen asimétricos. Los ductos granulares y estriados variaron su estructura de manera diferente de acuerdo a que se analicen cada uno de ellos por separado. Los granulares disminuyeron en su número y en la densidad de volumen ocupada por ellos en los primeros meses post-irradiación; a partir de los 7 meses se hallaron muestras de recuperación. Los ductos estriados, demostraron una atrofia progresiva no mostrando recuperación en el tiempo estudiado (1,2).

La segunda técnica experimental fue la exposición quirúrgica de la glándula submaxilar, para ser irradiada aisladamente. El material obtenido se evaluó con microscopía óptica y métodos estereológicos. Los datos obtenidos mostraron un daño mayor en la glándula expuesta que en la no expuesta quirúrgicamente (3). El tratamiento radioterapéutico de los tumores de las glándulas salivales como carcinomas adenoquísticos, adenomas pleomorfos, etc. se presenta controvertido. Muchos autores consideran a las glándulas salivales como radioresistentes, por lo menos en algunas estructuras glandulares, por ej. las células mioepiteliales. Es por eso que la radioterapia en los tumores de las glándulas salivales es utilizada después del tratamiento quirúrgico, y como prevención de recidi-

vas. Además, el tratamiento radiante de tumores de otras regiones cervico-faciales, afecta a las glándulas salivales. En esos casos, las glándulas pierden su capacidad secretoria, y la falta de humedad en la mucosa y las alteraciones en todos los tejidos de la cavidad bucal, crean problemas post-terapia aun sin solución (4).

Referencias

- 1.- Espinal E.G., de Rey B.M., Cabrini R.L. J. D. Res., 59:1765, 1980.
- 2.- Espinal E.G., de Rey B.M., Cabrini R.L. Rev. Fac. Odont. Buenos Aires, 12:65, 1980.
- 3.- Espinal E.G., Cabrini R.L. J. D. Res., 59:1765, 1980.
- 4.- Espinal E.G., de Rey B.M., Cabrini R.L. Rev. Asoc. Odont. Argent., 68:237, 1980.

- D.16. Transplantes de germen dentarios a la bolsa facial del hamster y formación experimental de quistes.
Smerilli A. L., Itoiz M. E., Lanfranchi H. E. y
Cabrini R. L.

Germ tooth transplantation in the hamster cheek pouch and experimental epithelial cysts.

An experimental model of transplantation of homologous germs in the hamster cheek pouch is presented. It was demonstrated that the transplantation of germs in this anatomic place progresses and reproduces vital teeth and bone tissue with hemocytopenetic marrow. The development of experimental epithelial cysts is really important for the knowledge of its growth and its transformation. With two different techniques, cysts with keratin formation were developed without inflammatory cells, resembling the histological structure of the keratocysts.

Distintos autores han enfocado el estudio experimental de transplantes dentarios a distintas zonas de la economía, como por ejemplo el tejido celular subcutáneo, cámara anterior del ojo, ovario, cápsula renal, etc., En cambio no se ha utilizado la bolsa facial del hamster, que por su estructura anatómica de fácil acceso y con relativa ausencia de células inmunocompetentes, la hacen comparable a la cámara anterior del ojo.

Para los transplantes dentarios se estudió la evolución de gérmenes homólogos dentro de la bolsa facial. La pieza transplantada fue el 1° o 2° germen inferior, de animales de 3 a 4 días de edad. Se analizó la evolución del trasplante histológica y radiográficamente a los 7,24,30, 40,42 y 44 días. Se observó el crecimiento de las estructuras dentarias, con formación de esmalte y dentina y en algunos casos de hueso a partir de células periféricas del trasplante. En un caso, se observó la formación de imágenes quísticas por degeneración del epitelio del órgano del esmalte. Se considera, por lo tanto que la bolsa facial del hamster es un lugar ideal para estudiar la evolución de los transplantes de gérmenes dentarios, abriendo la posibilidad de crear modelos en donde se modifiquen las condiciones biológicas, especialmente las respuestas inmunitarias. (1,2,3).

La bolsa facial del hamster, también se utilizó para la formación experimental de quistes. Se utilizaron 2 técnicas: La primera se realizó invirtiendo y suturando el medio distal de la bolsa facial y se cerró su comunicación con la cavidad bucal mediante sutura. En el segundo método, se seccionó el tercio distal de la bolsa facial invirtiéndola y suturándola, conformando una cavidad epitelizada, la cual fue transplantada al dorso del mismo animal, previamente rasurado. Se obtuvieron imágenes quísticas con formación de queratina, ausencia de componente inflamatorio, que en algunos casos daban la imagen de quera-toquistes. El 8% de los casos desarrolló un intenso cuadro inflamatorio, que destruyó la mayor parte de la bolsa epitelial. Ambos modelos son interesantes pues posibilitan el análisis *in situ* de la cinética epitelial en diferentes condiciones del tejido, así como la respuesta del epitelio quístico frente a diferentes agentes externos y distintas condiciones del medio que lo circundan. La eficacia de los modelos expuestos es demostrada por una producción de quistes en el 85% de los casos (4).

Referencias

- 1.- Smerilli A.L. y Itoiz M.E. Rev. Asoc. Odont. Argent., 67:84, 1978.
- 2.- Smerilli A.L. y Itoiz M.E. Rev. Asoc. Odont. Argent., 68:21, 1980.
- 3.- Smerilli A.L., Lanfranchi H., y Cabrini R.L. J. D. Res., 59:1766, 1980.
- 4.- Smerilli A.L., Lanfranchi H.E. y Cabrini R.L. Rev. Asoc. Odont. Argent., (en prensa).

D.17. Mecanismos de remodelación ósea en modelos experimentales y lesiones espontáneas.

A.M. Ubios y R.L. Cabrini.

Mechanisms of bone remodeling in experimental models and spontaneous bone lesions.

Bone remodeling is a process that appeared in normal bone as well as in spontaneous bone lesions. Their intrinsic mechanisms are not completely clarified up to date for which some aspects of bone remodeling under different conditions were analyzed. The action of forces of crescent magnitud on the alveolar bone was studied by means of histometric methods. It was demonstrated that the capacity of bone remodeling is stabilized with forces over 100 g. Other aspects of bone remodeling in spontaneous bone lesions were studied. Osteoclasts of Paget's disease showed the presence of intranuclear particles in 43% of the cases when studied under electron microscopy. Clear lesions of osteoarthritis were found in dogs after an operation of articular instability. All these investigations are dedicated to clarify different aspects of the bone resorption mechanism. The data here obtained will be usefull for next studies on radiation effects on bone remodeling, which could be altered under radiant treatments

Los mecanismos de remodelación ósea, especialmente en lo que se refiere a la reabsorción no están completamente aclarados. Desde hace tiempo se ha investigado en nuestro laboratorio sobre un modelo experimental especialmente desarrollado(1), con el que, por medio de fuerzas se provoca la reabsorción del hueso alveolar y su posterior neoformación (2). Con dicho modelo hemos comprobado que la reabsorción ósea aparece previamente al incremento en el número de osteoclastos(2), células tradicionalmente relacionadas con la reabsorción. Esta secuencia se ha repetido bajo condiciones de irradiación total (3-4) y local (5). La evaluación del proceso se ha realizado sobre preparados histológicos por medio de técnicas histométricas (2-6). Con el objeto de obtener datos más precisos en este sentido hemos realizado estudios concurrentes que tienden a clarificar el problema.

Fuerzas de diferente magnitud, entre 25 y 400 gramos fueron obtenidas por medio de alambres de diámetro creciente, entre 0,25 y 0,50 mm. Su aplicación demostró que más allá de los 100 gramos y a igual lapso de tiempo, las fuerzas a-

plicadas al hueso alveolar no provocan ni mayor desplazamiento dentario (Fig. 1), ni se incrementa la superficie de reabsorción ósea (7-8)(Fig. 2).

Además de la aplicación de fuerzas, la reabsorción y la neoformación óseas pueden ser modificadas por acción de drogas, entre ellas los difosfonatos. Hemos comprobado que el etidronato disódico inyectado intraperitonealmente en dosis diarias de 7,5 mg./kg. de peso durante 10 días, provoca osteoesclerosis en el hueso maxilar y en los huesos largos. Dosis diarias de 20 mg./Kg. durante 10 días provocan una lesión completamente distinta como es la osteomalacia (9). Estos datos permitirán efectuar nuevas investigaciones en el tema de la reabsorción ósea, ya que se ha postulado que los difosfonatos actuarían inhibiendo la acción de los osteoclastos.

Dado que las fuerzas provocadas por medio de resortes contruídos con alambres de sección circular determinan el desplazamiento dentario por medio de movimientos de inclinación, se buscó la forma de obtener un modelo experimental que cause la formación de superficies frontales, puras de reabsorción, por un lado y de neoformación, por el otro. Para ello se desarrolló un aparato ortodóncico con alambre de sección cuadrada (14" X 14"), arco de canto, que ejerce una fuerza uniformemente distribuida en las superficies de aplicación de las mismas (10).

Los mecanismos de remodelación ósea pueden ser alterados en muchas enfermedades del hueso y en lesiones en las que éste esté involucrado. En la osteítis deformante o enfermedad de Paget se encuentran exacerbados los procesos de reabsorción y de neoformación. Las áreas de reabsorción van acompañadas por un gran número de osteoclastos. El estudio ultraestructural de los mismos además de las características habituales, demostró la presencia de formaciones intranucleares de aspecto viral, y estructura paracristalina. Un cuidadoso estudio de las mismas y su recuento demostró que ellas aparecen en el 43% de los casos, indicándolas como altamente características de esta enfermedad(11). Sin embargo no se las puede catalogar como patognomónicas de la misma, ya que, aun-

que en menor proporción (15%), la hemos encontrado en los núcleos de las células gigantes multinucleadas de los osteoclastomas.

Otro proceso patológico en el que el hueso sufre alteraciones en su remodelación es la artrosis, enfermedad muy frecuente en el ser humano, a la que se ha postulado sea tratada con isótopos radiactivos. Por medio de una operación en la que se provoca la inestabilidad articular en la articulación de la rodilla del perro, se obtuvieron cambios en la membrana sinovial, en el cartílago articular y en el hueso subyacente de clara naturaleza artrósica (12). A nivel del hueso subcartilaginoso, se observó una franca reacción osteoesclerótica en la zona de contacto entre las superficies articulares. En tanto que en sus bordes aparecieron signos de proliferación cartilaginosa con zonas de neoformación ósea.

Estos trabajos están dirigidos a estudiar distintos aspectos que pueden aclarar los mecanismos de remodelación ósea. Los datos y hallazgos obtenidos en estas investigaciones serán de utilidad para próximos estudios en los que se analizarán los efectos de radiación sobre estos mecanismos, que pueden ser alterados durante tratamientos por radioterapia.

Referencias.

- 1.- R. López Otero, R.L. Cabrini, R.J. Parodi. *Ortodoncia*, 30:154, 1972.
- 2.- R. López Otero, R.J. Parodi, A.M. Ubios, F.A. Carranza(h), R.L. Cabrini. *J. Period. Res.*, 8:327, 1973.
- 3.- A.M. Ubios, R.J. Parodi, R.L. Cabrini, R. López Otero. *Ortodoncia*, 32:1, 1974.
- 4.- R.J. Parodi, A.M. Ubios, J. Mayo, R.L. Cabrini. *J. Oral Path.* 2:1, 1973.
- 5.- A.M. Ubios, R.J. Parodi, R. López Otero, A.C.C. Frasch. *J. Dental Res.*, 54:633, 1975.
- 6.- R.L. Cabrini, R. López Otero, A.M. Ubios. *Ortodoncia*, 37:5, 1973.

- 7.- R.López Otero,E.A. Bruschi,A.M. Ubios. Rev. Asoc. Odont. Argent.,67:84,1979.
- 8.- R. López Otero,A.M. Ubios,A.L. Dotto,R.L. Cabrini. Rev. Asoc. Odont. Argent.,68:229,1980.
- 9.- A.M.Ubios,R.L. Cabrini J.Dent.Res.,59:1763,1980.
- 10.- R.L. Cabrini,A.L. Dotto,R. López Otero,A.M. Ubios. Ortodoncia,44:125,1980.
- 11.- F. Schajowicz,R.L. Cabrini,I. Blumenfeld,A.M. Ubios,E. Santini Araujo,M. Berenstein. Bol. Soc. Argent. Ortop. 45:24,1980.
- 12.- A.M. Ubios,F.S.Silberman,R.L. Cabrini. Rev. Argent. Cirug.,36:118,1979.

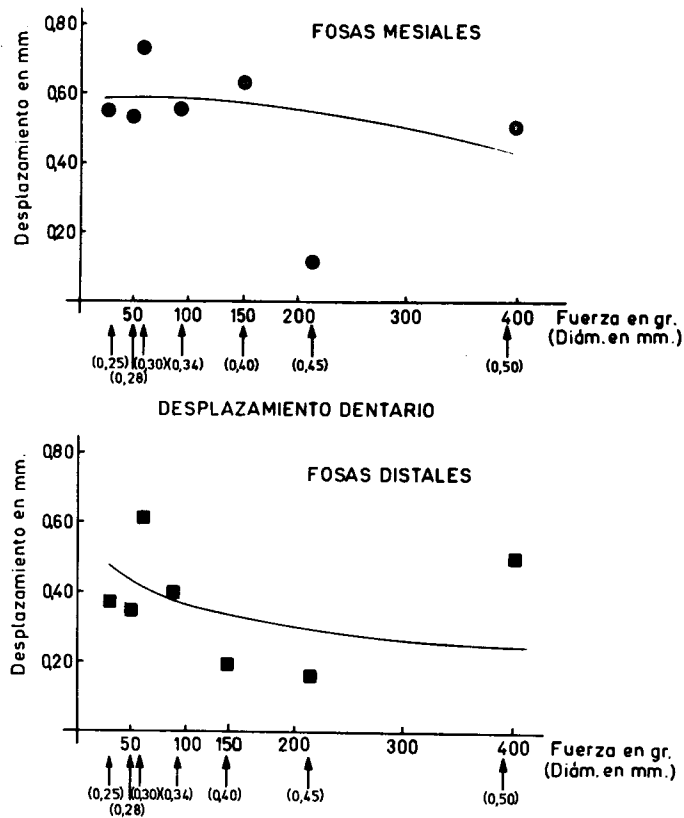


Figura 1:

Esquemati-
zación despla-
zamiento denta-
rio medido a nivel de
las fosas mesia-
les y de las fo-
sas distales en
función de la
fuerza inicial
del resorte.

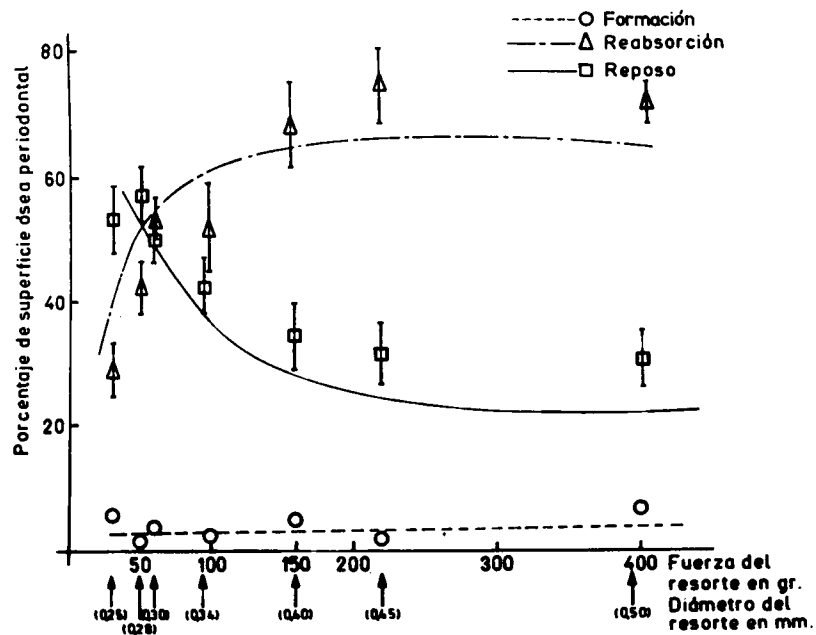


Figura 2:

La medición por métodos histométricos de la actividad de la pared ósea alveolar en función de la fuerza del resorte indica que con fuerzas mayores de 150 gr se establece una estabilización del grado de reabsorción.

D.18. Inducción tumoral por efecto de radiación de ^{32}P
(fosfato crómico coloidal).

A. M. Ubios y R. L. Cabrini.

Tumoral induction by radiation effect of ^{32}P (colloidal
chromic phosphate.

The use of radioisotopic colloidal compounds has been proposed for the treatment of articular diseases. The intra-articular injection of colloidal chromic phosphate ^{32}P provoked several lesions at articular and para-articular levels.

The findings in the articular cartilage were of particular significance, because its changes are irreparable. The ultrastructural studies demonstrated alterations at cellular and matrix level, which represent processes of accelerated ageing.

The most important finding was the verification of the oncogenic power of the colloidal solution of ^{32}P . Sarcomatous tumors were induced by the intraarticular injection of this compound with 70% of incidence and 30% of lung metastasis. While subcutaneous injection induced spindle cell carcinomas in 56% of the animals injected with 46% of lymph node metastasis and 25% of lung metastasis.

A clear valoration of the disease under treatment and the risk implied are necessary when radioisotopes in form of colloidal compounds are planned to be used in therapeutics.

En los últimos años se ha propuesto el empleo de soluciones coloidales marcadas con isótopos radioactivos con fines terapéuticos. Inyecciones intraarticulares de soluciones coloidales marcadas con ^{198}Au , ^{90}Y y ^{32}P (1-2-3-4) se han empleado para el tratamiento de enfermedades como artritis reumatoide, sinovitis vellosa, artrosis y otras. Por estas razones emprendimos un estudio en el que analizamos microscópicamente varios aspectos referidos a este problema, utilizando fosfato crómico coloidal marcado con ^{32}P e inyectándolo en la cavidad articular de la rodilla de la rata.

En trabajos previos (5-6) habíamos comprobado por medios macroautorradiográficos que la inyección practica-da era verdaderamente intraarticular y por microautorradio-grafías que la localización preferente del isótopo se rea-lizaba a nivel de la membrana sinovial, adosado a sus pa-

redes (5-6).

A partir de estos hallazgos realizamos una serie de experiencias en las que analizamos diferentes aspectos sobre el tema.

Por una parte se estudiaron los aspectos microscópicos de los tejidos articulares y paraarticulares en animales a los que se inyectó el compuesto coloidal marcado con ^{32}P dentro de la cavidad articular de la rodilla (7). Se utilizaron tres actividades diferentes: 0,06 mCi; 0,12 mCi y 0,25 mCi, siendo los animales sacrificados a diferentes tiempos luego de la inyección: 7,14,28,31,38, 42,56,70,84,91,112, y 140 días. Las alteraciones histológicas y los tiempos de aparición de las mismas según las dosis figuran en la Tabla I. De todas ellas las lesiones más llamativas e importantes fueron: la transformación adiposa de la médula ósea, cambios a nivel celular y de la matriz en los cartílagos articulares y de crecimiento, y cuadros inflamatorios crónicos en la membrana sinovial(8).

Es de destacar que el cálculo de las dosis empleadas se realizó teniendo en cuenta la superficie articular total y el decaimiento total del isótopo, llegándose a la conclusión de que para actividades inyectadas de 0,25 mCi la dosis empleada en la experiencia resulta ser 4 veces mayor que la utilizada en los tratamientos de seres humanos, cuando se inyecta el compuesto coloidal marcado dentro de la cavidad articular de la rodilla y 2 veces mayor cuando se la inyecta en la articulación interfalángica (5-9), de este modo inyecciones de 0,06 mCi pueden ser consideradas equivalentes a las empleadas en los seres humanos.

El estudio microespectrofotométrico del contenido de ADN de las células de la membrana sinovial de ratas inyectadas con 0,25 y 0,12 mCi evidenció un desvío de los valores respecto a los normales. Estas alteraciones se interpretaron como un aumento de la proliferación del tejido como respuesta reaccional a la injuria por radiación(10).

El estudio ultraestructural del cartílago articular sometido a la irradiación del ^{32}P bajo las condiciones de

actividad nombradas permitió detectar una serie de cambios ultraestructurales a nivel de los condrocitos y de la matriz, que indican un proceso acelerado de envejecimiento del mismo (11).

Desde el punto de vista de la aplicación práctica de nuestros estudios, la inducción tumoral por acción del ^{32}P resulta el hallazgo más interesante. Ratas inyectadas con 0,25 mCi de ^{32}P de fosfato crómico coloidal comenzaron a mostrar deformaciones tumorales a nivel de la zona inyectada a partir de los 9 meses post-inyección. Los estudios histológicos de estos tumores demostraron su naturaleza sarcomatosa (12). La incidencia alcanzada fue del 70%, detectándose diseminación metastásica pulmonar del tumor en un 30%. La alta incidencia tumoral alcanzada en esta experiencia podría deberse a que el radioisótopo actúa como una fuente constante de radiación hasta su decaimiento total, porque al ser incorporado en forma coloidal permanece en la zona a la que fue incorporado.

Inyecciones subcutáneas del mismo compuesto en la zona del dorso y en la zona de la rodilla de la rata, indujeron la formación de carcinomas epidermoides en el área de la inyección, obteniéndose una incidencia hasta el presente del 56%, detectándose metástasis ganglionares en el 46% de los casos y pulmonares en el 25% (Tabla II).

Estos hallazgos adquieren particular importancia por la alta incidencia tumoral detectada. Nuestra recomendación ha sido que se deben estudiar cuidadosamente los riesgos que implican el uso de radioisótopos, cuando se los va a emplear en terapéutica de enfermedades de seres humanos. Este estudio previo requiere la ponderación de la enfermedad a tratar, la edad del enfermo, la dosis a emplear y una valoración del riesgo probable contra los beneficios que se espera obtener.

Referencias

- 1.- Grahame R., Ramsey N.W., Scott J.T. Ann. Rheum. Dis., 29:159, 1970.

- 2.- Prichard H.L., Bridgman J.F., Bleehe N.M. Br. J. Radiol., 43:466, 1970.
- 3.- Winston A.M., Bluestone R., Cracchiolo A. J. Nucl. Med., 14:886, 1973.
- 4.- Koptan M.T., El-Zorkany K., El-Bolkainy N., Razzak M.A. Strahlentherapie, 148:295, 1974.
- 5.- Miranda F.F., Ubios A.M., Cabrini R.L., Degrossi A.J., Silberman F.S. Rev. Biol. Med. Nucl., 9:102, 1977.
- 6.- Silberman F.S., Ubios A.M., Miranda F.F., Degrossi A.J., Cabrini R.L. Acta Ortop. Latinoam., 2:186, 1976.
- 7.- Ubios A.M., Cabrini R.L., Silberman F.S., Miranda F.F. Clin. Ortop. Rel. Res., 136:299, 1978.
- 8.- Ubios A.M., Silberman F.S., Cabrini R.L. Acta Ortop. Latinoam., 5:149, 1978.
- 9.- Silberman F.S., Lanari E.M., Miranda F.F., Ubios A.M., Degrossi A.J., Cabrini R.L. Rev. Biol. Med. Nucl., 12:7, 1980.
- 10.- Cabrini R.L., Ubios A.M., Giménez I.B., Silberman F.F. Bol. Soc. Argent. Ortop. Traumat., 42:373, 1977.
- 11.- Ubios A.M., Silberman F.S., Cabrini R.L. J. Cell Biol., 22:562, 1980.
- 12.- Silberman F.S., Ubios A.M., Cabrini R.L. Bol. Soc. Arg. Ortop. Traumat., 44:336, 1979.

TABLA I

Alteraciones histológicas	Actividad inyectada de ^{32}P		
	0,25 mCi	0,12 mCi	0,06 mCi
MEDULA OSEA :			
TRANSFORMACION ADIPOSA	31 días	63 días	120 días
ATROFIA SINOVIAL	31 días	63 días	120 días
CARTILAGO ARTICULAR: DESORGANIZACION CONDROCITARIA	31 días	70 días	150 días
CARTILAGO DE CRECIMIENTO: DESORGANIZACION CONDROCITARIA	31 días	70 días	150 días
TRABECULAS SELLADORAS	31 días	70 días	150 días
CARTILAGO EN CRECIMIENTO: ALTERACION DE LA MATRIZ	39 días	70 días	150 días
CARTILAGO ARTICULAR: ATROFIA	39 días	70 días	
HUESO OSTEOPOROSIS	42 días	94 días	

TABLA II

^{32}P CROP

INDUCCION TUMORAL

INYECCION INTRAARTICULAR	INCIDENCIA	METASTASIS	
		Pulmonar	Ganglionar
Sarcomas	70 %	30 %	
INYECCION SUBCUTANEA			
Carcinomas	56 %	25 %	46 %

D.19. Puesta en marcha del microscopio electrónico E.M. Philips 200.

W. F. Kirschbaum, C. R. Conde, R. Alvarez y A. Pantaleone.

Starting out of an electron microscope - EM Philips 200.

After an agreement between the Argentine Atomic Commission - CNEA- and the Municipality of the City of Buenos Aires, it was decided to move to the CNEA, and electron microscope EM Philips 200, belonging to the municipality, that had been installed at the Fernández Hospital. This microscope was completely out of order in its original place. The apparatus had several problems in its different systems and components, that made it impossible to make it work.

The microscope had to be taken apart before it was moved. To recondition the apparatus the whole vacuum system had to be disassembled, cleaned, readjusted and new adaptations introduced. The column needed several repairs and adjustments including rewinding of the coils of two lenses.

It took 2220 hours work to put the electron microscope to operate efficiently. Since then it has already worked 650 hours with 180 hours of high tension and a resolution of 10 Å and more than 50 films of 35 mm. photographs were taken.

Se decidió trasladar a la C.N.E.A., por intermedio de un convenio entre la Municipalidad de Buenos Aires y la C.N.E.A. un microscopio electrónico, E.M. Philips 200, ubicado en el Hospital Fernández. Dicho microscopio no se encontraba en condiciones operativas en su lugar de origen.

La factibilidad de llegar a hacer funcionar en forma eficiente al microscopio electrónico, resultaba difícil de prever, puesto que el equipo demostraba tener importantes inconvenientes no totalmente diagnosticables sin previo desarme. Se sumaban a ello, los riesgos de las consecuencias posibles de un total desarme del equipo a fin de posibilitar su transporte y posterior armado del mismo en su nuevo local.

Debido a que el estado general del aparato, independientemente de sus deficiencias, resultaba ser muy bueno, además de poseer solamente 2000 horas de encendido y 550 ho-

ras de alta tensión, se decidió encarar su total reparación, para su posterior puesta en servicio.

- I.- Transporte: Desde el Hospital Fernández a la C.N.F.A. Desarme hasta separación de los principales componentes del aparato. Transporte posterior a la C.N.E.A. rearmado en la misma.
- II.- Equipo de vacío: No funcionaba. Desarme, limpieza y reparación de las bombas de vacío. Sustitución del sistema mecánico del bloque de relés de la bomba mecánica de vacío, por válvula solenoide electrónica. Control y calibración del sistema hasta lograr un rendimiento correcto.
- III.- Columna: Se efectuaron las reparaciones mecánicas de las piezas desgastadas y deterioradas. Se efectuaron los ajustes necesarios hasta conseguir alto vacío en la columna. La pantalla fue refosforada y se controló su funcionamiento. Fue necesario rebobinar la lente objetiva e intermedia por baja aislación a masa de las lentes.
- IV.- Electrónica: Se detectaron las fallas en los componentes del armario de alimentación general, cambiándose los condensadores, transistores y resistencias que mostraron deficiencias de funcionamiento en las distintas unidades. Se repararon y cambiaron las partes de los módulos de panel, que se encontraban en mal estado.

Funcionamiento: La puesta en marcha del equipo ha significado el empleo de un total de 2220 horas de trabajo. El microscopio ha operado eficientemente desde su puesta en marcha, habiendo cumplido 650 horas de encendido con 180 horas, de alta tensión y con una resolución de 10 Å, habiéndose obtenido más de 50 rollos de fotografía de 35 mm.

E.1. Establecimiento de una colonia de ratones portadores de la mutación nu (desnudo).

L. S. Montoro y C. J. Quintans.

Development of a unit for breeding nude mice.

A small colony for the production of "nude" mice was established.

The barrier-room employed was equiped with a laminarflow device which was installed as described by Sedlacek (2).

The breeding nucleus of N:NIH(S) nude outbred mice was obtained from the high security open room barrier facility of NIH through the kindness of Dr. Carl T. Hansen. Before entering the room the caretakers must a shower and don a sterilized attire. All the supplies are sterilized by vacuum autoclaving or gamma radiation (2,5 Mrad). After a year in operation the colony has been maintained free of pathogenic organisms. During the same period of time about one thousand mice were produced.

Se puso en operación una unidad de producción para la cría de ratones portadores de la mutación nu (1). Dicha mutación tiene carácter recesivo, y sus efectos se manifiestan sólo en los individuos homocigotas, los cuales presentan una ausencia casi total de pelo, y carencia de timo funcional. Esta última característica es sumamente valiosa, ya que debido a ella estos animales aceptan transplantes de tejidos de otras especies, y además constituyen un modelo adecuado para el estudio de la respuesta inmune mediada por células. Debido a su deficiencia inmunitaria estos animales deben ser mantenidos en condiciones de estricta ausencia de patógenos.

Se utilizó un local ubicado en una zona aislada dentro del edificio del Bioterio. Dicho local está acondicionado en forma central a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa del 50-10%, el aire se renueva completamente a razón de 12 veces por hora. La iluminación se mantiene regulada en ciclos de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad. De las cuatro bocas de entrada de aire existentes, tres fueron selladas, y la cuarta fue entubada mediante una cañería metálica flexible de 20 cm. de diámetro cuya salida se conec-

tó a la toma de aire de un equipo de flujo laminar horizontal. De esta manera, todo el aire que ingresa al local es filtrado con una eficiencia del 99,97% para partículas de 0,5 micrones. Dado que el ingreso de aire al local es de aproximadamente 400 m³/hora, mientras que el equipo de filtración circula cuatro veces ese volúmen, el resto de la capacidad filtrante se utiliza para recircular el aire del cuarto purificándolo en forma adicional (2).

En las condiciones actuales se dispone de capacidad para alojar 200 cajas de 14x18x28 cm.

El cuarto fue desinfectado inicialmente, limpiándolo cuidadosamente con solución antiséptica, y tratándolo posteriormente con vapores de formaldehído.

Posteriormente se limpió una vez por semana con un detergente de acción antiséptica.

Todos los elementos utilizados se esterilizan mediante autoclave de vacío y doble puerta, o bien se tratan con radiación gama en la planta de radioesterilización de la CNEA.

El agua suministrada a los animales se esteriliza en autoclave, y luego es acidificada con ClH hasta pH 2,5 para asegurar su conservación.

Se utiliza alimento comprimido esterilizado por radiación gama (2,5 Megarad).

Las cajas donde se alojan los animales están protegidas por tapas-filtro de fibra poliéster.

El personal encargado de la atención del cuarto se ducha antes de entrar y cambia completamente su ropa por indumentaria estéril, y utiliza gorro, barbijo, calzado, y guantes esterilizados.

La colonia se inició el 19/V/80 al recibirse el plantel inicial de 9 reproductores de la cepa de ratón N:NIH, portadores de la mutación Nude. Ese núcleo reproductor fue cedido por el National Institutes of Health, de Bethesda, Maryland, Estados Unidos de Norteamérica. Los animales provenían del bioterio SPF de dicha institución, y se recibieron en cajas especiales provistas de filtros para evitar su contaminación durante el viaje.

Al 30 de junio de 1981 la colonia constaba de alrededor de 450 ratones entre reproductores y stock, y hasta esa fecha se habían entregado aproximadamente 500 para propósitos experimentales.

Los animales son controlados en los laboratorios del Bioterio CNEA con el propósito de detectar posibles infecciones con bacterias y parásitos.

Periódicamente se envían muestras de suero a un laboratorio de referencia para control de virus murinos.

Hasta el 30 de junio de 1981 la colonia permaneció libre de los agentes patógenos mencionados en el listado publicado por la OMS en 1974 (3).

Referencias

- 1.- Flanagan S.P. Genet. Res. Camb., 8:295, 1966.
- 2.- Sedlacek R.S., Mason K.A. Laboratory Animal Science, 27:667, 1977.
- 3.- Meeting of Directors of WHO Collaborative Centres for Laboratory Animals. WHO Consultation on Laboratory Animal Medicine Carshalton, Surrey, U.K. 8-9 Nov., 1974.

E.2. Desarrollo de un modelo de tapa filtrante para la protección de animales de experimentación.

L.S. Montoro, S.A. Ramírez, P.E. Cittadini y C.J. Quintans.

Development of a filter-cap for the protection of mouse-cages.

A model of filter-cap, adapted to the dimensions of our stainless steel mouse cages was built. Non-woven polyester cloth locally available was used as filter material. The cloth was supported in a frame of fine smooth cardboard. The protective ability of our filter caps was compared with that of a commercial model (Envirogard, Lab products Inc. Rochelle Park, N.J. U.S.A.) Both kinds of cap diminished more than fourteen times the number of air-borne contaminations entering the cages. Our filter-cap was also tested in its ability to protect SPF mice exposed to a conventional mice room environment. Some pathogenic organisms appeared four to nine weeks later in mice held under filters than in the unprotected ones.

Desde hace tiempo se ha comprobado la utilidad de las tapas filtrantes para proteger los animales de experimentación de las contaminaciones transmitidas a través de partículas suspendidas en el aire (1-2-3). Si bien esas tapas son comercializadas por varios proveedores extranjeros, los modelos ofrecidos por los mismos no se adaptan a las cajas utilizadas en este bioterio. Por ese motivo se desarrolló un modelo de tapa filtrante que ofreciera un grado de protección similar al de los modelos comerciales, se adaptara a las cajas disponibles en este bioterio, y pudiera construirse con materiales producidos en el país a un costo razonable.

Luego de probar distintos materiales se encontró que el más apropiado era una manta de fibra poliéster sin tejer, la cual se utiliza como entretela para la fabricación de indumentaria. Este material se comercializa bajo la denominación de Inteler 1401. Se construyeron varios prototipos de tapa utilizando para tal fin soportes de malla de alambre, madera, resina poliéster y cartulina. Finalmente se adoptó un modelo realizado sobre un marco de cartulina de 0,55 mm. de espesor, por razones de economía y simplicidad.

dad de ejecución. En la Figura 1 se muestra un diagrama del modelo definitivo, cuya forma de pirámide truncada responde a la necesidad de aprovechar al máximo el espacio cuando se las apila para almacenarlas o esterilizarlas.

Se efectuaron diferentes pruebas para determinar las propiedades protectoras de estas tapas filtrantes en forma comparativa con modelos que se pueden obtener comercialmente (Envirogard, Lab Products Inc., Rochelle Park N.J., USA).

En un primer ensayo se determinó el número de unidades formadoras de colonia que se depositaban sobre cajas de petri conteniendo medio de cultivo agarizado, cuando estas eran expuestas al ambiente de una colonia de animales convencionales durante 24 horas. Se efectuaron pruebas en las cuales el medio era protegido por tapas filtrantes comerciales, por tapas construidas en este laboratorio, o bien se dejaban sin ninguna protección. Los resultados obtenidos en un experimento de este tipo figuran en la Tabla I.

El segundo ensayo se realizó determinando el número de unidades formadoras de colonia que aparecen en cajas de petri conteniendo Agar MacConkey cuando se las expone durante 30 minutos a un aerosol producido pulverizando una suspensión de *E. coli* conteniendo 2×10^7 bacterias por ml. Las pruebas se efectuaron exponiendo el medio de cultivo sin ninguna protección, o bien colocando las cajas de petri bajo tapas comerciales o correspondientes al modelo en desarrollo. En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos.

Finalmente se determinó el tiempo en que una bacteria (*Pasteurella pneumotropica*), un ectoparásito (*Myobia musculi*) y un endoparásito (*Hymenolepis diminuta*) colonizaban a ratones libres de esos patógenos cuando se los colocaba en ambientes convencionales, dentro de cajas protegidas o no por tapas filtrantes, y rodeadas de otras cajas conteniendo animales parasitados por dichos patógenos. Los resultados obtenidos figuran en la Tabla III, puede observarse que el uso de tapas retrasó cuatro semanas la apari-

ción de *Pasteurella pneumotropica*, cinco semanas la contaminación con *Hymenolepis diminuta*, y luego de quince semanas no fue posible detectar *Myobia* en las cajas protegidas mientras que en los animales usados como control el parásito se evidenció a las siete semanas.

Los resultados obtenidos demuestran que la protección conferida por las tapas desarrolladas en este laboratorio es similar a la que brindan las tapas filtrantes comerciales. Ambos elementos son capaces de disminuir más de catorce veces el número de contaminantes transmitidos por el aire, y ofrecen una protección real que retrasa entre cuatro y más de nueve semanas la contaminación con patógenos murinos.

Referencias

- 1.- Kraft L.M. Yale J. Biol. Med., 31:121, 1958.
- 2.- Collins G.R., Goodhearth C.R. Lab. Animal Care, 18:
469, 1968.
- 3.- Sedlacek R.S., Mason Kathryn A. Lab. Animal Science,
27:667, 1977

TABLA I

Protección frente a organismos transmitidos por el aire

Tapa Filtrante	Promedio del número de unidades formadoras de colonias depositadas por cm ² en 24 horas
Ninguna	7,3
Bioterio CNEA	0,5
Envirogard	0,49

TABLA II

Protección frente a un aerosol de *Escherichia coli*

Tapa Filtrante	Promedio del número de unidades formadoras de colonia depositadas por cm ² en 30 minutos
Ninguna	incontables
Bioterio CNEA	6
Envirogard	4,4

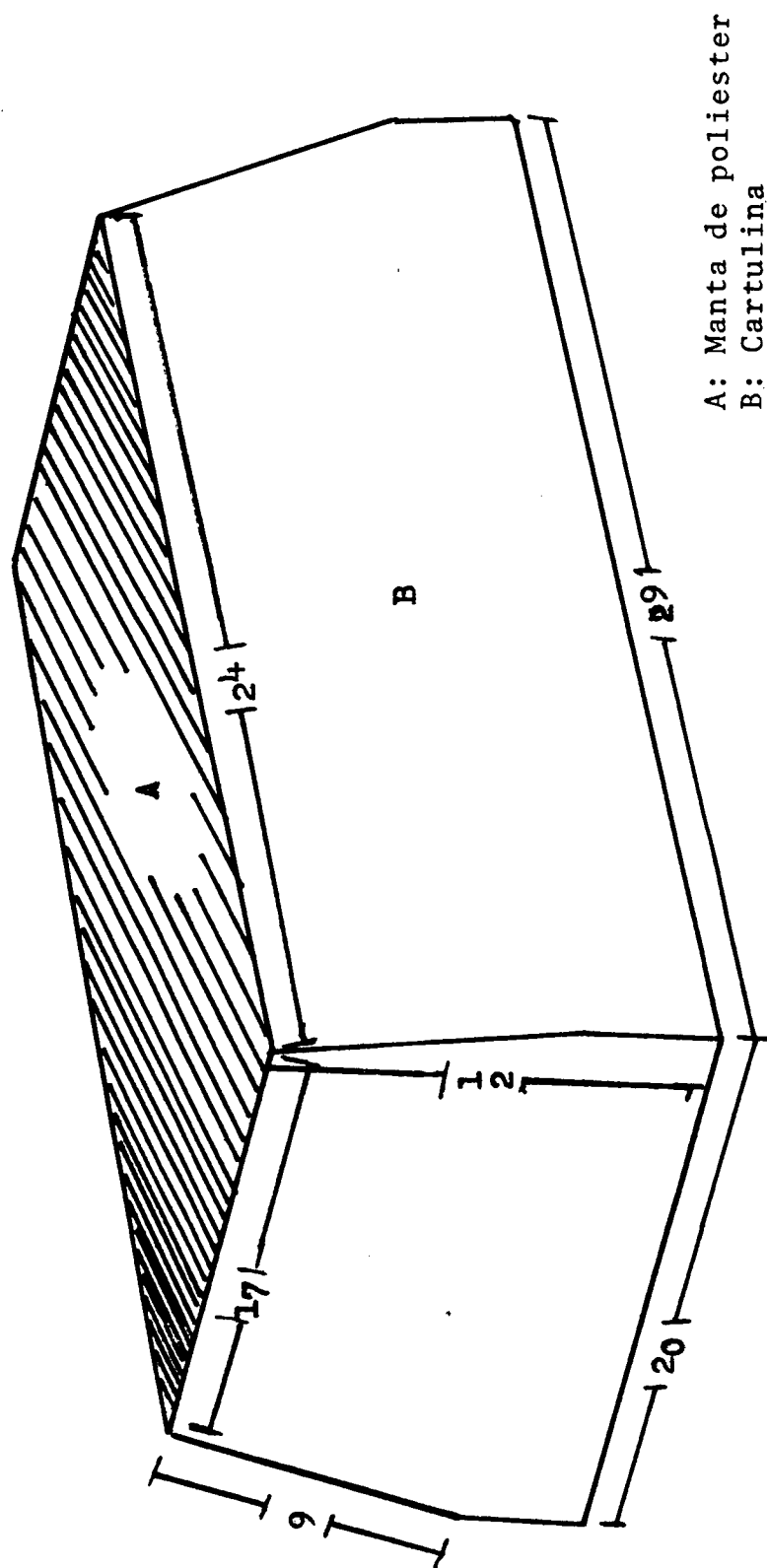


Figura 1: Diagrama del modelo de tapa filtrante (medidas en centímetros)

E.3. Estudio sobre radioesterilización de dietas para animales de experimentación.

L. S. Montoro, C. R. Ciancaglini, S. A. Ramírez y C. J. Quintans.

Sterilization of laboratory animals feed by gamma irradiation treatment.

The conditions for the sterilization of a standard pelleted rodent diet by means of gamma radiation were studied, in order to obtain a food useful for SPF mice. A 60 Co industrial source was used for the irradiation treatment. The mean range of contaminant in the diet is $9,6 \times 10^5$ colony forming units per gram, and the decimal reduction dose (D10) value for the diet bacterial flora is 0,180 Mrad. By using a 2,5 Mrad dose the survival probability would be of 1 organism in 100 tonnes of food. This figure is good enough for the requirements for S.P.F. mice. No differences were recorded when irradiated and un-irradiated diet were used to feed an inbred CFW mice colony during a year long test.

Los animales de laboratorio pertenecientes a la categoría conocida como S.P.F. (libre de patógenos específicos) deben ser obligatoriamente alimentados con dietas estériles con el fin de evitar su contaminación con organismos indeseables.

La necesidad de iniciar la producción de ratones portadores de la mutación nude (1), los cuales debido a su deficiencia inmunitaria deben ser mantenidos en condiciones estrictas de ausencia de patógenos, nos llevó a desarrollar la metodología necesaria para esterilizar el alimento destinado a esos animales.

Después de considerar los distintos métodos posibles se decidió utilizar radiación gamma debido a que es la que causa menos deterioro en las propiedades del alimento (2).

Este estudio se realizó empleando la dieta producida por la firma Cargill bajo la denominación RR, la cual se presenta en comprimidos de 12 mm. de diámetro y longitud variable de 10 a 30 mm.

En la Tabla I se muestra los resultados de la determinación del número de bacterias totales en distintas par-

tidas de alimento; en base a esos datos se calculó que la contaminación promedio es de $9,6 \times 10^5$ unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de dieta.

La Figura 1 representa la fracción de UFC sobreviviente a distintas dosis de radiación gamma de Cobalto 60, dicho gráfico permite calcular la dosis (D10) necesaria para reducir diez veces el número de UFC, que en este caso resultó igual a 180 kilorads.

En la Tabla II se presentan en forma comparativa los resultados obtenidos al alimentar durante un año un grupo de ratones con dieta tratada con 2,5 Mrad, y otro grupo similar con alimento sin irradiar. Puede observarse que ambos lotes respondieron en forma similar, independientemente de la dieta recibida.

Considerando que la D10 es de 180 kilorad, una dosis de 2,5 Mrad causará una inactivación del orden de 10^{-14} . Teniendo en cuenta que la contaminación media es de $9,6 \times 10^5$ UFC/g, y en la partida más contaminada alcanzó las $3,6 \times 10^6$ UFC/g, la probabilidad de encontrar bacterias sería de 1 cada 100 toneladas. Esta cifra ofrece un margen de seguridad razonable para animales SPF. Teniendo en cuenta que nuestro consumo anual de alimento es de 12 toneladas, la probabilidad de entrada de contaminaciones por esa vía sería de una cada 8 años. Este margen es en realidad mucho más amplio ya que los números de UFC mencionados corresponden en su casi totalidad a bacterias saprófitas.

Al no haberse observado diferencias significativas en la respuesta de los animales a las dos dietas, puede asumirse que la dosis de 2,5 Mrad no causa efectos detrimentales de importancia en el alimento.

Referencias

- 1.- Flanagan S.P. Genet. Res. Camb., 8:295, 1966.
- 2.- Larcher K. Report on FAO/IAEA Advisory group meeting on Radiation Treatment of Animal Feeds., ICLA Bulletin 43:13, 1978.

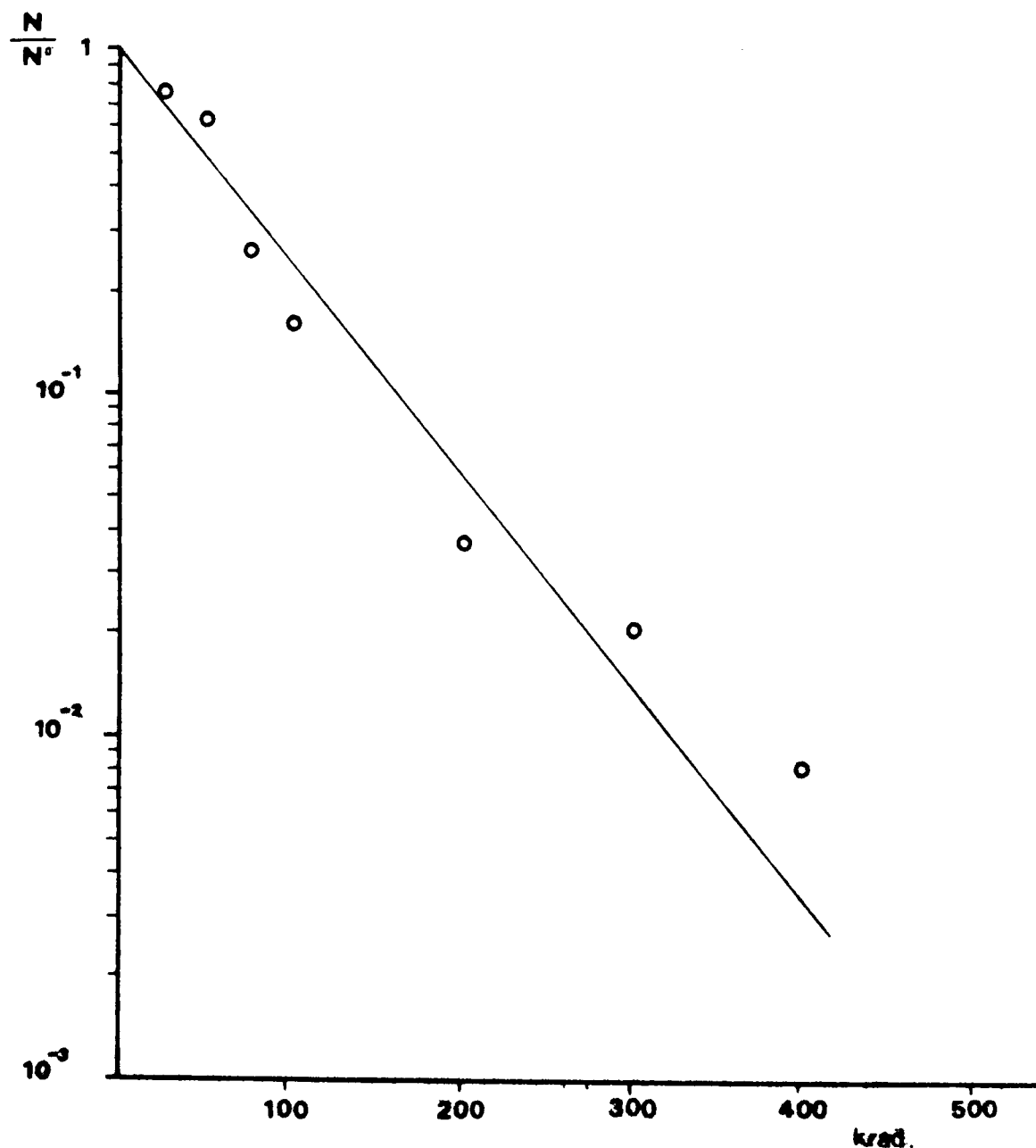


Figura 1

Sensibilidad de la flora del alimento a la radiación gamma
Se tomaron muestras de dieta como se indica en la leyenda de la tabla 1, pulverizando la totalidad de la muestra (10 g.) y dividiéndola luego en porciones de 1 a 2 gramos que se colocaban asépticamente en bolsas de polietileno estériles que posteriormente se sellaban.
El material así preparado se trató con diferentes dosis de radiación gama en una fuente de Cobalto 60, una alícuota se conservó sin irradiar como control (No).
Luego de la irradiación se efectuó el recuento de bacterias viables según se indica en la leyenda de la tabla I.
Los resultados se expresan como N/N° (fracción de sobrevivientes) en función de la dosis.

CARGA MICROBIOLOGICA DE UNA DIETA COMERCIAL

Muestra N°	N° de bact. por gr. de alimento
1	$2,4 \times 10^6$
2	6×10^5
3	$3,3 \times 10^5$
4	$4,1 \times 10^5$
5	3×10^6
6	$5,1 \times 10^5$
7	3×10^5
8	$8,24 \times 10^5$
9	$8,8 \times 10^5$
10	$2,9 \times 10^6$
11	$4,3 \times 10^4$
12	$2,6 \times 10^5$
13	$4,2 \times 10^4$

TABLA I

Las muestras se tomaron de partidas recién recibidas abriendo las bolsas correspondientes en el momento del muestreo. Se retiraron de cada bolsa aproximadamente 10 gramos de comprimidos utilizando pinzas estériles. Porciones de 1-2 gramos se pulverizaban en un mortero estéril, y se pesaban asépticamente 0,5 gramos del polvo transfiriéndolo a un tubo con 5 ml. de solución fisiológica. A partir de la suspensión resultante se efectuaban diluciones decimales sembrando volúmenes de 0,05 y 0,1 ml. en cajas de petri conteniendo agar tripticosa de soya (Difco). Las cajas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas y el número de colonias se determinó utilizando un contador New Brunswick.

PARAMETRO	ANIMALES ALIMENTADOS CON DIETA IRRADIADA (24 PAREJAS)	ANIMALES ALIMENTADOS CON DIETA NORMAL (24 PAREJAS)
Número de camadas nacidas.	241	243
Tiempo promedio entre camadas.	22,18 días	22,10 días
Número promedio de crías nacidas por camada.	9,77	9,51
Peso promedio de la crías al nacimiento.	1,45 g.	1,47 g.
Número promedio de crías destetadas por camada.	8,25	8,08
Peso promedio de la crías al destete.	9,62 g.	9,67 g.

TABLA II

Unidad de la dieta irradiada

Se emplearon ratones endocriados de la cepa CFW, formando dos grupos compuestos de 24 parejas reproductoras cada uno. Los animales se mantuvieron durante el ensayo en un cuarto acondicionado a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa del 50 al 70%, 12 renovaciones horarias de aire, y régimen de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad. Las pesadas se efectuaron utilizando una balanza Sartorius con sensibilidad de 0,01 g. El alimento se irradió con 2,5 Mrad. en una fuente de Cobalto 60, y se suministraba ad-libitum renovandolo 1 vez por semana.

F.1. Actividades de la sección irradiación y dosimetría
D.A. Prahic

La tarea del servicio durante el tiempo mencionado fue la de irradiar materiales, fundamentalmente biológicos, de interés para distintos grupos de investigación del Departamento de Radiobiología de la CNEA y de otras instituciones. Se cuenta con un equipo de radioterapia profunda "Philips" 250 Kv/15 mA y una fuente emisora Beta de ⁹⁰Sr.

Otra tarea complementaria del laboratorio, es la de colaboración, asesoramiento y participación, en problemas de dosimetría de rayos X que puedan tener grupos de la institución o fuera de la misma.

Durante el período mencionado fueron realizados los siguientes tipos de irradiaciones:

A) Irradiación total en animales

Hamsters:

Condiciones: 200 kV-8 mA-0.5 Cu 1.0 Al-
DFO: 59 cm E.E.: 84 eV

Dosis solicitadas: 600 rad - 1000 rad - 16000 rad

N° de animales: 151

Finalidad: Obtención inmunodepresión e investigar su comportamiento frente a infecciones.

Ratas Wistar:

Condiciones: 200 kV/8 mA/0.5 Cu-1.0 Al/
DFO: 59 cm/E.E: 84 keV

Dosis solicitadas: 900 rad y 125 rad (preñadas)

N° de animales: 50 y 27 preñadas

Finalidad: Obtención de inmunodepresión.

Ratones:

Condiciones: 200kV/8mA/0.5Cu 1.0AL/DFO:36cm/EE.84keV
200kV/15mA/0.5Cu 1.0AL/DFO:55.5cm/EE.84keV
200kV/8mA/0.5Cu 1.0AL/DFO:59cm/EE.84keV
200kV/15mA/0.5Cu 1.0AL/DFO:59cm/EE.84keV
200kV/12mA/0.5Cu1.0AL/DFO:59cm/EE.84keV

Dosis solicitadas: 300 a 900 rad
500 rad en 4 frac. de 125 rad.

N° Animales: 2785 ratones

Finalidad: Obtención de inmunodepresión

Conejo:

Condiciones: 220 kV-14mA-DF0=67cm-0.5cm. 1.0Al-
E.E = 87 keV.

Dosis solicitadas: 600 rad

N° Animales: 1

Finalidad: Obtención de inmunodepresión

B) Irradiación Local en Animales

	<u>Condición</u> : 220kV-15mA-0.25Cu-1.0Al/ DF0:20.3/E.E. 77 keV
<u>Herida de lomo de rata Wistar</u>	<u>Dosis</u> : 600 rad <u>N° Animales</u> : 13 <u>Finalidad</u> : Estudio de efectos de radiación en la cicatrización.
	<u>Condición</u> : 220kV-14mA/0.25Cu 1.0Al/ DF0:23.5/E.E. 72 keV.
<u>Colas de ratas Wistar RN</u>	<u>Dosis</u> : 500 rad a 16 Krad <u>N° Animales</u> : 785 ratas <u>Finalidad</u> : Estudios sobre efectos de radiación sobre metabolismo de Histidina y Cistina
	<u>Condición</u> : 220kV/14mA/0.25Cu/OAl/ DF0:23.5/E.E.:77 keV.
<u>Planta de la pata posterior de Wistar RN</u>	<u>Dosis</u> : 250 rad a 16 Krad <u>N° Animales</u> : 848 ratas <u>Finalidad</u> : Efectos del fraccionamiento de dosis. Efecto de alteraciones de tejidos. Efectos sobre la vascularización. Estudios químicos de citocromo-oxidasa.

Tiroides de Wistar
adultas.

Condición: 220kV-14mA/0.25Cu 1.OAL/
DFO:21cm E.E. 77 keV.

Dosis: 10 Krad

N° Animales: 104

Finalidad: Efectos de iodo-adición
sobre parámetros bioquímicos y fisiológicos.

Glándulas salivales
de Wistar adultas
(Expuestas y no exp)

Condición: 220kV/14mA/2.OAL/21.0cm
DFO/60keV

Dosis: 2/3/6/16 Krad

N° Animales: 231 ratas

Finalidad: Investigar daños de radiación en las glándulas salivales de ratas aisladas del efecto de las mismas'

Glándulas salivales
en ratas Wistar
Rn

Condición: 220kV/14mA/2.OAL/DFO:21cm
60 keV

Dosis: 2/4/8 Krad

N° Animales: 221

Finalidad: Investigar detención y/o atrofia del crecimiento de las glándulas salivales

Testículos de Wistar
adultos

Condición: 220kV/14mA/0.25Cu 1.OAL/
DFO:26.1 cm/77 keV

Dosis: 1 Krad/300 rad

N° Animales: 55

Finalidad: Efectos de irradiación en testículos.

Bolsa facial de
Hamsters

Condición: 220kV/14mA/0.25Cu 1.OAL/
DFO:23.5/77 keV

Dosis: 16 Krad

N° Animales: 185

Finalidad: Investigación de la radiosensibilidad de la mucosa oral.

Mejilla de Wistar
RN

Condición: 220kV/14mA/0.25Cu 1.OAL/
DFO:23.5cm/77keV.

Dosis: 16 Krad a 200 rad

N° Animales: 775 ratas

Finalidad: Comparación de radiosensi-
bilidad de piel y mucosa
oral.

Cabeza de Wistar
de 1 día

Condición: 220kV/14mA/0.25Cu 1.OAL/
DFO:23.5/77 keV

Dosis: 1/2.0/2.5/16 Krad

N° Animales: 55

Finalidad: Investigar la aparición de
malformaciones dentarias

Mitad de la cabeza
de Wistar 5 días

Condición: 220kV/14mA/0.5Cu 1.OAL/
23.5 cm/87 keV

Dosis: 16 Krad

N° Animales: 5

Finalidad: Investigar la aparición de
malformaciones dentarias

Cabeza de Hamster
adultos

Condición: 220kV/14mA/0.5Cu 1.OAL/
DFO:33 cm/84 keV

Dosis: 1500 rad

N° Animales: 10 Hamster

Finalidad: Investigar la aparición de
malformaciones dentarias

C) Insectos

Condición: 200kV/10mA/1.OAL/37 cm
DFO/50 keV

Dosis: 2 Kr/4/1/3 Krad

N° Animales: 68 recipientes

Finalidad: Investigar efectos genéti-
cos de radiaciones ioni-
zantes

D) Material Biológico "in vitro"

	<u>Condición:</u> 200 kV/10mA/0.25Cu 1.OAL/ DFO:40.5 cm 73 keV
<u>Cultivo de tejidos</u>	<u>Dosis:</u> 200-300 rad
<u>en ampollas descar-</u>	<u>N° Elementos:</u> 6
<u>tables</u>	<u>Finalidad:</u> Transformación de culti- vos celulares inducidos por radiaciones ionizantes
	<u>Condición:</u> 220kV/10mA/0.25Cu 1.OAL/ DFO:24.7 y 16.5 cm E.E: 77 keV
<u>Tiroides de bovi-</u>	220kV/14mA/0.25Cu 1.OAL/ DFO:18.7 cm 77keV
<u>no in vitro</u>	<u>Dosis:</u> 1/10/5/50 Krad
	<u>N° Elementos:</u> 22 vasos precipitado y 4 cajas
	<u>Finalidad:</u> Efectos de irradiación so- bre parámetro bioquímicos y fisiológicos
	<u>Condición:</u> 220kV/11mA/0.25Cu 1.OAL/ DFO: 37 y 40 cm 77 keV
<u>Cultivo en Leighton</u>	<u>Dosis:</u> 700 rad/1/2/4/8 Krad
<u>y ampollas</u>	<u>N° Elementos:</u> 30 Leighton + 10 ampo- llas
	<u>Finalidad:</u> Estudio del daño celular evaluado por citofotome- tría
	<u>Condición:</u> 220kV/15mA/0.25Cu 1.OAL/ 77 keV/DFO: 29 cm
<u>Tubos de ensayo</u>	<u>Dosis:</u> 10 Kr/5/7 Krad
<u>en aparato girato-</u>	<u>N° Elementos:</u> 65 tubos
<u>rio</u>	<u>Finalidad:</u> Para determinar la capta- ción de precursores de síntesis de proteínas

Cajas de petri

Condición: 200kV/15mA/0.25Cu 1.OAL/
73 keV/DF0: 18.2 cm.

220kV/15mA/0.25Cu 1.OAL/
77 keV/DF0: 50 cm

Dosis: 10 Kr/3 Krad

N° Elementos: 42

Finalidad: Irradiación de células
neoplásicas *in vitro*

Frascos carrell

Condición: 220kV/8mA/0.25Cu 1.OAL/
DF0: 48 cm/77 keV

Dosis: 250 rad/3 Krad

N° Elementos: 3

Finalidad: Irradiación de células
neoplásicas *in vitro*

E) Varios

Dosímetros de emul-
sión fotográfico y
termoluminiscencia

Condiciones: Varias

Dosis: 50 mR a 10 R

N° Elementos: 800

Finalidad: Calibración de películas
y discos destinados a do-
simetría personal

Determinación de
C.H.R. en aire:
campo 8 x 10

Condiciones: 80kV/0.0mm
150 kV/0.0mm
220 kV/0.0mm
220 kV/1.0mm AL
160 kV/1.0mm AL
100 kV/1.0mm AL

Finalidad: Determinar Energía Efect.

Partículas Beta

Lomo de ratones C₃H

Dosis: 3 Kr
6 Kr
10 Kr

N° Animales:181

Efectos de alteraciones por irradia-
ción en piel

Glándula salival
de Wistar (Expuesta)
Lomo de Wistar
adulto

Dosis: 32 Kr
64 Kr
8 Kr
16 Kr

Nº Animales: 12

Determinación de diferentes dosis de irradiación en glándulas salivales expuestas.

Piel de torax Buffo
Arenarum

Dosis: 64 Kr

Nº Animales: 15

Determinación de efectos de irradiación sobre piel de sapo.

Gérmenes Wistar RN

Dosis: 1 Kr
2 Kr

Nº Animales: 66

Investigar la aparición de malformaciones dentarias.

Film dosimétrico

Dosis: 240 R
120 R
60 R

Nº Elementos: 30

COMPUTOS DE HORAS DE IRRADIACION

	Año	Horas de Irradiac.	Nº total de Irradiaciones
Rayos X	1977	353	200
	1978	358	156
	1979	242	162
	1980	220	132
Beta	1977	155	
	a 1980		

Otras Instituciones que usaron el Servicio de Irradiación

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Facultad de Ciencias Médicas

Facultad de Odontología Universidad de Buenos Aires

Academia Nacional de Medicina

Hospital de Niños

INTA

Salud Pública

Hospital de Oncología "Angel Roffo"

G.1. Actividades de la sección Bioterio
C.J. Quintans

Este grupo tiene por objetivo desarrollar la tecnología para la producción de animales microbiológicamente definidos, y proveer animales de experimentación a los Investigadores de la CNEA y otras Instituciones.

Proyecto SPF

Durante el año 1980 se puso en marcha una unidad piloto para la producción de animales libres de gérmenes patógenos, iniciando la cría de ratones de la cepa N:NIH (S) portadores de la mutación denominada Nu (desnudo). Dicha mutación se manifiesta en los individuos homocigotas, los cuales presentan carencia casi total de pelo, y ausencia de timo funcional. Esta última característica es sumamente valiosa, ya que debido a ella estos animales aceptan transplantes de tejidos de otras especies, incluyendo tumores de origen humano.

Como consecuencia de su deficiencia inmunitaria, estos animales deben ser mantenidos en condiciones estrictas de ausencia de patógenos, ya que son sumamente sensibles a enfermedades de origen infeccioso.

El núcleo inicial de reproductores compuesto por 9 reproductores obtenidos del National Institute of Health de los Estados Unidos de Norteamérica, fue introducido al Bioterio el 19 de mayo de 1980.

En seis meses la colonia se expandió hasta 250 animales y se comenzaron a efectuar entregas para fines experimentales.

Los controles efectuados indican que los animales han permanecido libres de los organismos patógenos cuya exclusión recomienda la OMS.

Producción de animales convencionales

Como es habitual, el bioterio produjo animales de experimentación convencionales, los cuales fueron utilizados por distintos sectores de la CNEA, como así también en otros Centros oficiales y privados.

Durante el período 1978-1980 se proveyeron 22.940 ratones adultos, 2.127 hembras de raton con preñez a término, 9.100 ratas adultas, 1.488 hembras de rata con preñez a término, y 2.100 Hamsters.

INDICE DE AUTORES

Aldaz C.M.	D.112
Alvarez R.	D.137
Antón D.N.	B.40, B.45, B.51, B.57
Boselli G.O.	B.64
Cabrini R.L.	D.74, D.78, D.94, D.122, D.125, D.127, D.132
Ciancaglini C.R.	E.148
Cittadini P.E.	E.142
Conner E.A.	D.105
Conde C.R.	D.137
Conti C.J.	D.102, D.105, D.108, D.112, D.115
De Micheli A.T.	B.40, B.45, B.57
Espinal E.G.	D.122
Fernández R.O.	B.32
Gersberg C.P.	C.71
Gerschenson L.E.	D.102, D.105, D.108
Giménez I.B.	D.78, D.102, D.105, D.108, D.112, D.115
Itoiz M.E.	D.74, D.78, D.84, D.87, D.98, D.125
Kirschbaum W.F.	D.117, D.120, D.137
Klein-Szanto A.J.P.	D.84, D.94
Lanfranchi H.E.	D.84, D.94, D.98, D.125
Larcher F.	D. 115
Mayo J.	C.68
Mazar Barnett B.	A.1, A.5, A.12, A.22, A.27
Michelin S. C.	C.68

Montoro S.L.	E.139, E.148
Muñoz E.R.	A.1, A.5, A.12, A.17, A.22, A.27
Murai J.T.	D.108
Orce V.L.	B.32, B.64
Pantaleone A.	D.137
Pizarro R.A.	B.32
Prahic D.A.	F.153
Quintans C.J.	E.139, E.142, E.148, G.1
Ramírez S.A.	E.148
Rey B.M. de	D.78, D.84, D.87, D.89, D.122
Smerilli A.L.	D.125
Tasat D.R.	D.112
Ubios A.M.	D.89, D.127, D.132

PERSONAL DEL DEPARTAMENTO
(1980)

Investigadores

Antón, D.N.
Cabrini, R.L. (Gerente de Investigaciones)
Cartagenova, R.E.
Conti, C.J.
Conde, C.R.
Finocchiaro, L.
Kirschbaum, W.F.
Klein de Mazar Barnett, B.
Lanfranchi, H.E.
Mayo, J.
Muñoz, E.R.
Molinari de Rey, B.L.
Montoro, L.S.
Orce, V.L.
Pizarro, R.A.
Quintans, C.J.
Smolko, E.E.

Investigadores Asociados (CONICET)

De Micheli, A.T.
Espinal, E.G.
Giménez de Conti I.B.
Itoiz de Cabrini, M.E.
Ubios, A.M.

Becarios

Alvarez, R.
Boselli, G.O.
Cittadini, P.
Panick de Gersberg, C.B.
Moses, D.

Técnicos

Berengueres de Fernández, V.
Cabaleiro de Zuccoli, E.B.
Caraballo, M.E.
Demyda, A.
Diaz, P.P.
Flores, A.M.
Fernández, R.O.
González, M.I.
Ibañez, J.A.
Latricchina, J.C.
Michelin, S.C.
Orrea, S. (CONICET)
Prahic, D.A.
Pereyra, N.E.
Paz, B.C.
Quattrini, D.
Ramírez, S.A.

Auxiliares de Laboratorio

Bertuzzi, M.E.
Briga de Antivero, N.
Begoña de Mazzochi, G.E.
Caliva de Piantoni, B.C.
Diaz, R.M.
Erriquez, A.L.
Fernandez, L.
Gomez, C.
Garramone, M.A.
Ghiotti de Daneri, L.M.
Miguel de Dursi, F.
Medina, M.A.
Meza, F.
Peralta de Vasconcello, E.
Pascal de Martinez, C.
Petragalli, A.B.
Quevedo, M.N.
Ruíz de Lobos, R.

Personal Administrativo

De Luca, M.T.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y SOCIEDADES CIENTIFICAS

- Ubios A.M., Silberman F.S. y Cabrini R.L. Efecto del ^{32}P CROP sobre los componentes de la articulación. X Congreso Latinoamericano de Ortopedia y Traumatología y XXI Congreso Brasileiro de Ortopedia y Traumatología. Río de Janeiro, Brasil, Julio de 1977.
- Silberman F.S., Ubios A.M. y Cabrini R.L. Estudio con isótopos de un modelo de artrosis experimental. X Congreso Latinoamericano de Ortopedia y Traumatología y XXI Congreso Brasileiro de Ortopedia y Traumatología. Río de Janeiro, Brasil, Julio de 1977.
- Schajowicz F., Giménez I.B. y Cabrini R.L. Estudio microspectrofotométrico del DNA de las células gigantes multinucleadas en el osteoblastoma y el osteosarcoma. V Sesión Ordinaria de la Sociedad Argentina de Ortopedia y Traumatología, Buenos Aires, 1977.
- Giménez I.B., Ubios A.M., Cabrini R.L. y Silberman F.S. Alteraciones del DNA en sinovial de ratas irradiadas con ^{32}P . Reunión Invernal de la Sociedad Argentina de Anatomía Normal y Patológica. Buenos Aires, Julio de 1977.
- Muñoz E.R. y Mazar Barnett B. Intercambios cromosómicos inducidos por dietil sulfato en *Drosophila melanogaster*. VIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Posadas, Setiembre de 1977.
- Mazar Barnett B. y Muñoz E.R. Letales dominantes inducidos por un agente alquilante monofuncional (dietil sulfato) en esperma maduro de *Drosophila melanogaster*. VIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Posadas, Setiembre de 1977.
- Antón D.N. Propiedades y localización genética de un gen que controla forma celular en *Salmonella typhimurium*. VIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Posadas, Setiembre de 1977.
- De Micheli A.T. y Antón D.N. Estudio de la división celular en un mutante termosensible de *Salmonella typhimurium*. VIII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Posadas, Setiembre de 1977.
- Cabrini R.L., Ubios A.M., Giménez I.B. y Silberman F.S. Análisis histopatológico y comportamiento del ADN en lesiones producidas por la inyección intraarticular de ^{32}P . IX Sesión Ordinaria de la Sociedad Argentina de Ortopedia y Traumatología. Buenos Aires, Octubre de 1977.

- de Rey B.M., Klein-Szanto A.J.P., Conti C.J., Itoiz M.E. Giménez I.B. y Cabrini R.L. Effects of ionizing radiation on epidermis. A multidisciplinary approach. XIV Congreso Internacional de Radiobiología. Rio de Janeiro, Brasil, Octubre de 1977.
- Ubios A.M., Cabrini R.L., Silberman F.S. y Aisenberg E.Y. de Lesiones histopatológicas provocadas por la inyección intraarticular de ^{32}P . XIV Congreso Argentino de Patología. Mar del Plata, Noviembre de 1977.
- Conti C.J., Giménez I.B. y Cabrini R.L. Modificaciones del ADN inducidas por irradiación X en células de cultivos BHK. XIV Congreso Argentino de Patología. Mar del Plata, Noviembre de 1977.
- Solanot M.E., Giménez I.B., Conti C.J. y Lema B.E. Micro-espectrofotometría del ADN en epitelios pavimentosos metaplásicos del cuello uterino. XIV Congreso Argentino de Patología. Mar del Plata, Noviembre de 1977.
- López Otero R., Dotto A. y Ubios A.M. Respuesta periodontal a movimientos ortodóncicos producidos por fuerzas de diferentes magnitudes. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Cabrini R.L., Petillo A. y Bracco J.A. Estudio "in vitro" de obturación retrógrada con resinas epóxicas. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Giménez I.B. y Itoiz M.E. Comportamiento de las enzimas oxidativas durante el retardo de la cicatrización producido por la irradiación de heridas experimentales. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Itoiz M.E., de Rey B.M. y Cabrini R.L. Variaciones de la citocromo-oxidasa en la epidermis irradiada. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Ubios A.M., Klein-Szanto A.J.P. y Cabrini R.L. Estudio autoradiográfico del comportamiento celular en epitelios irradiados. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.

- Giménez I.B., Conti C.J. y Cabrini R.L. Estudio de las alteraciones en el contenido de DNA producidas por las radiaciones ionizantes en tejidos calcificados. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- de Rey B.M., Ubios A.M. y Cabrini R.L. Diferencias en la captación de aminoácidos relacionados con los mecanismos de queratinización como respuesta a radiaciones ionizantes. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Lanfranchi H.E., Klein-Szanto A.J.P. y de Rey B.M. Modificación volumétrica de los queratinocitos basales expuestos a diferentes dosis de radiación X. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Lanfranchi H.E. y de Rey B.M. Ultraestructura de la semimucosa y la piel del labio de bovinos. X Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Miranda F.F., Ubios A.M., Cabrini R.L., Degrossi O.J. y Silberman F.S. Artrosis experimental: Acción del ^{32}P -CROP y utilización del ^{85}Sr . V Congreso Argentino de Biología y Medicina Nuclear. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Barmasch M., de Rey B.M., Pisarev M.A. y Altschuler N. Receptores tiroideos a T y T. V Congreso Argentino de Biología y Medicina Nuclear. Buenos Aires, Noviembre de 1977.
- Ubios A.M., Silberman F.S. y Cabrini R.L. Artrosis experimental. XLIX Congreso Argentino de Cirugía. Buenos Aires, Setiembre de 1978.
- Kirschbaum W.F. Alta tasa de mutaciones cut, obtenidas por irradiación de esperma móvil, de *Drosophila melanogaster*. IX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Vaquerías, Córdoba, Setiembre de 1978.
- Kirschbaum, W.F. Número de bandas del cromosoma politénico X de *Drosophila melanogaster*, obtenido por microscopía electrónica. IX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Vaquerías, Córdoba, Setiembre de 1978.
- De Micheli A.T. y Antón D.N. Control genético de la forma celular en mutantes de *Salmonella typhimurium*. IX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Vaquerías, Córdoba, Setiembre de 1978.

- Mazar Barnett B. Efecto de la temperatura en la tasa de translocaciones II-III inducidas por radiación X en *Drosophila melanogaster*. IX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Vaquerías, Córdoba, Setiembre de 1978.
- Muñoz E. R. y Mazar Barnett B. Daño genético inducido por dietil sulfato en espermatozoides maduros de *Drosophila melanogaster* pretratado con hidroxitolueno butilado. IX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Vaquerías, Córdoba, Setiembre de 1978.
- Navarrete H.D. and Mayo J. Neoplastic lesions induced in Hamster by a RNA virus. XII International Cancer Congress. Buenos Aires, Octubre de 1978.
- Basombrío M.A. and Mayo J. Immunization against X-ray mouse leukemia using a sarcoma virus pseudotype (MSV-RadLV.). XII International Cancer Congress. Buenos Aires, Octubre de 1978.
- de Rey B.M., Ubios A.M. y Cabrini R.L. Efectos de radiación sobre la captación de aminoácidos en epitelio. IV Congreso Latinoamericano de Microscopía Electrónica y I Congreso Iberoamericano de Biología Celular. Mendoza, Octubre de 1978.
- Ubios A.M. y Mitre A. Descalcificación de muestras biológicas con procesamiento automático. XV Congreso Argentino de Patología. Buenos Aires, Noviembre de 1978.
- de Rey B.M., Itoiz M.E. y Klein-Szanto A.J.P. Efectos experimentales de radiopotenciadores. XV Congreso Argentino de Patología. Buenos Aires, Noviembre de 1978.
- Mayo J. y Michelin S.C. La línea BHK-21 (C-13) portadora de un virus oncogénico. Jornadas Internacionales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Noviembre de 1978.
- Smerilli A.L. y Itoiz M.E. Transplantes de gérmenes dentarios en la bolsa facial de Hamsters. XI Reunión Anual de la Sección Argentina de Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1978.
- Itoiz M.E., Lanfranchi H.E. y Cabrini R.L. Alteraciones ultraestructurales producidas por la irradiación en los gérmenes dentarios. XI Reunión Anual de la Sección Argentina de Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1978.
- Kokubu G.A., Lanfranchi H.E. y Itoiz M.E. Estudio comparativo del efecto de la irradiación en diferentes tipos de epitelios malpighianos. XI Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1978.

- Lanfranchi H.E., de Rey B.M., Itoiz M.E. y Kokubu A.G. Repuesta de la mucosa oral del hamster a la irradiación local. XI Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica, Buenos Aires, Noviembre de 1978.
- López Otero R., Bruschi E.A. y Ubios A.M. Efecto de la magnitud de la fuerza ortodóncica sobre la respuesta periodontal. XI Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1978.
- Orce L.V. y Rivelis G. Modificación de la viabilidad celular y de la resistencia a radiaciones inducidas en *Salmonellas* por drogas activas en membranas. VII Congreso Argentino de Biología. Mendoza, Noviembre de 1978.
- Ubios A.M., Silberman F.S. y Cabrini R.L. Estudio longitudinal del efecto por radiación de diferentes dosis de radiación de ^{32}P . XV Congreso Argentino de Ortopedia y Traumatología. Mar del Plata, Diciembre de 1978.
- Kirschbaum W.F. Submicroscopic analysis of the banding scheme, of polytene X chromosome of *Drosophila melanogaster*. XIV International Congress of Genetics. Moscú, U.R.S.S., 1978.
- Antón D.N. Positive selection of cell envelope defective mutants in *Salmonella typhimurium*. XIV International Congress of Genetic. Moscú, U.R.S.S., 1978.
- Orce L.V. Radiation sensitivity modified by membrane active drugs on *S.typhimurium*. VI International Congress of Radiation Research. Tokio, Japón, Mayo de 1979.
- Mayo J. y Michelin S.C. Activación de las propiedades oncogénicas de un virus ARN por pasaje en animales irradiados. II Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Junio de 1979.
- Basombrio M.A., Pasqualini C.D. y Mayo J. Activación de un virus sarcogénico latente por Rayos X. VI Congreso Latinoamericano y X Congreso Argentino de Genética. Mendoza, Setiembre de 1979.
- Antón D.N. Efectos de la mutación *envB4* sobre la respuesta de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* a la radiación ultravioleta. IV Congreso Latinoamericano y X Congreso Argentino de Genética. Mendoza, Setiembre de 1979.

- De Micheli A.T. y Antón D.N. Supresión de la hipersensibilidad de la cepa DA78 de *Salmonella typhimurium* a las proteínas codificadas por los genes *hisF* e *hisH*. IV Congreso Latinoamericano y X Congreso Argentino de Genética. Mendoza, Setiembre de 1979.
- Mazar Barnett B. y Muñoz E.R. Acción del hidroxitolueno butilado en daños genéticos radioinducidos en células postmeióticas de machos de *Drosophila melanogaster*. IV Congreso Latinoamericano de Genética y X Congreso Argentino de Genética. Mendoza, Setiembre de 1979.
- Kirschbaum W.F. Observaciones ultraestructurales de bandas en el cromosoma X de glándulas salivares de *Drosophila melanogaster*. IV Congreso Latinoamericano de Genética y X Congreso Argentino de Genética. Mendoza, Setiembre de 1979.
- Silberman F.S., Ubios A.M. y Cabrini R.L. Producción experimental de tumores por la inyección intraarticular de ³²P. IX Sesión Ordinaria de la Sociedad Argentina de Ortopedia y Traumatología. Buenos Aires, Setiembre de 1979.
- Silberman F.S., Ubios A.M. y Cabrini R.L. Inducción de tumores articulares por acción de isótopos radiactivos XIII Congreso Argentino de Reumatología. Buenos Aires, Noviembre de 1979.
- Ubios A.M. y Cabrini R.L. Efecto del eitodronato disódico sobre el hueso maxilar. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.
- López Otero R., Ubios A.M., Dotto A.L. y Cabrini R.L. Movimientos ortodóncicos experimentales con arco de canto. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.
- Lanfranchi H.E., de Rey B.M. y Cabrini R.L. Estudio estereológico de queratinocitos basales con irradiación fraccionada. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.
- Kokubu G.A., Itoiz M.E. y Lanfranchi H.E. Respuesta del epitelio oral y la piel a la irradiación local. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.

- Smerilli A.L., Lanfranchi H.E. y Cabrini R.L. Formación experimental de quistes epiteliales. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.
- Espinal E.G. y Cabrini R.L. Descripción de una técnica para la irradiación de la glándula submaxilar expuesta de la rata Wistar. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.
- Espinal E.G., de Rey B.M. y Cabrini R.L. Efecto de la radiación X sobre las glándulas salivales de la rata. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.
- Itoiz M.E., Lanfranchi H.E., Domínguez F.V. Antígeno carcinoembrionario en tumores de glándulas salivales. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.
- Smerilli A.L. y Itoiz M.E. Microespectrofotometría de grupos sulfhidrilos y disulfuros en el epitelio de queratoquistes. XII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Vaquerías, Córdoba, Noviembre de 1979.
- Conti C.J., Conti I.B. Giménez de, Conner E.A. and Gerschenson L.E. Hormonal regulation of rabbit uterine epithelium. XIX Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Toronto, Canadá, Noviembre de 1979.
- Murai J.T., Conti C.J. and Gerschenson L.E. The effects of uteroglobin and prostaglandin F on proliferation of cultured rabbit endometrial cells. XIX Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Toronto, Canadá, Noviembre de 1979.
- Mayo J. y Itoiz M.E. Estudios biológicos con deuterons. Jornadas Commemorativas de los 25 años de operación del Sincrociclotrón de la Comisión Nacional de Energía Atómica. Buenos Aires, Diciembre de 1979.
- Schajowicz F., Cabrini R.L., Blumenfeld I., Ubios A.M., Santini Araujo E. y Berenstein M. Estudio ultraestructural del osteoclasto en la enfermedad de Paget. II Sesión Ordinaria de la Sociedad Argentina de Ortopedia y Traumatología. Buenos Aires, Abril de 1980.

- Itoiz M.E., de Rey B.M. and Cabrini R.L. Variations of epidermal cytochrome-oxidase activity after local irradiation. VI International Histochemistry and Cytochemistry Congress. Brighton, Inglaterra, Agosto de 1980.
- Ubios A.M., Silberman F.S. and Cabrini R.L. Ultrastructural aspects of radiation injury caused by ^{32}P in articulations. II International Congress on Cell Biology. Berlín Occidental, Agosto-Setiembre de 1980.
- Ubios A.M., Santini Araujo E., Berenstein M., Schajowicz F. and Cabrini R.L. Ultrastructure of osteoclasts nuclei in Paget's disease. XIII International Congress of the International Academy of Pathology. París, Setiembre de 1980.
- de Rey B.M., Lanfranchi E.H. and Cabrini R.L. Quantitative response of epidermal cells to fractionated irradiation. II Rome International Symposium on Radiation Therapy. Roma, Italia, Setiembre de 1980.
- Ubios A.M., Silberman F.S. y Cabrini R.L. Diferentes tipos de injurias por la utilización de isótopos radiactivos en las articulaciones. XI Congreso Latinoamericano de Ortopedia y Traumatología. México, Octubre de 1980.
- Kirschbaum W.F. Microscopía electrónica de cromosomas politénicos. XI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Mar del Plata, Octubre de 1980.
- Mazar Barnett B. y Muñoz E.R. Modificación de daño genético inducido por dos agentes alquilantes en *Drosophila melanogaster* por medio de hidroxitolueno butilado. XI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Mar del Plata, Octubre de 1980.
- Antón D.N. y De Micheli A.T. Mutantes esféricos de *Salmonella typhimurium* aislados por resistencia a mecilnam. XI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética. Mar del Plata, Octubre de 1980.
- Ciancaglini C.R., Montoro L.S. y Quintans C.J. Estudio sobre radioesterilización de dietas para animales de experimentación. V Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario, Octubre de 1980.
- Orce L.V. y Pizarro R.A. Hidrólisis enzimática en pared de mutantes autolíticos de *S. typhimurium*. V Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario, Octubre de 1980.
- Espinal E.G., de Rey B.M. y Cabrini R.L. Valoración estereológica de los cambios producidos en la glándula submaxilar de la rata por el efecto de la Radiación X. XVII Congreso Argentino de Patología. Buenos Aires, Noviembre de 1980.

- Lanfranchi H.E., de Rey B.M. y Cabrini R.L. Efecto biológico de la contaminación percutánea con distintos compuestos de uranio. XVII Congreso Argentino de Patología. Buenos Aires, Noviembre de 1980.
- Cortés J., López Otero R., Ubios A.M. y Cabrini R.L. Recidiva del movimiento dentario ortodóncico medida por la distancia intermolar. XIII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1980.
- Ubios A.M. y Gulielmotti M.B. Acción de una fuerza ortodóncica en animales tratados con etidronato disódico. XIII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1980.
- Espinal E.G., de Rey B.M. y Cabrini R.L. Ultraestructura del daño crónico por irradiación de la glándula submaxilar. XIII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1980.
- Costa O.R., Itoiz M.E. y Cabrini R.L. Modelo experimental de enfermedad periodontal en rata. XIII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1980.
- Lanfranchi H.E., Bruzzzone R., Borghelli R., Domínguez F., de Rey B.M., Lascano E. Aspectos ultraestructurales de la hiperplasia focal epitelial. XIII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1980.
- Iraola E., Negroni N., Rosa A., Barrientos O., Molganti S. e Itoiz M.E. Formación de cálculos "*in vitro*" a partir de cuerpos de Actinomyces. XIII Reunión Anual de la Sección Argentina de la Asociación Internacional de Investigación Odontológica. Buenos Aires, Noviembre de 1980.

RESUMENES

- Klein-Szanto A.J.P. and de Rey B.M. Scanning electron microscopy of irradiated hair follicles. Radiat. Res. 70:625, 1977.
- Miranda F.F., Ubios A.M., Cabrini R.L., Degrossi A.J. y Silberman F.S. Artrosis experimental. Acción del ^{32}P CROP y utilización de ^{85}Sr . Rev. Biol. Med. Nucl. 9: 102, 1977.
- Barmasch M., de Rey B.M., Pisarev M.A. y Altschuler N. Receptores tiroideos A T3 y T4. Rev. Biol. Med. Nucl. 9:112, 1977.
- Frasch A.C.C., Itoiz M.E. and Cabrini R.L. Microspectrophotometry for esterases quantitation. J. Dent. Res. 56:D219, 1977.
- Lanfranchi H.E., Itoiz M.E. and de Rey B.M. Activity of oxidative enzymes in the lip epithelium of cattle. J. Dent. Res. 56:D219, 1977.
- Itoiz M.E. de Rey B.M. and Klein-Szanto A.J.P. Vascular alterations in the irradiated skin. J. Dent. Res. 56: D220, 1977.
- de Rey B.M., Ubios A.M. and Cabrini R.L. Radiation effects on the uptake of aminoacids in epithelia. Rev. Micr. Electron. 5:134, 1978.
- López Otero R., Bruschi E.A. y Ubios A.M. Efectos de la magnitud de la fuerza ortodóncica sobre la respuesta periodontal. Rev. Asoc. Odont. Argentina 67:84, 1979.
- Smerilli A.L. y Itoiz M.E. Transplantes de gérmenes dentarios en la bolsa facial de hamsters. Rev. Asoc. Odont. Argentina 67:84, 1979.
- Itoiz M.E., Lanfranchi H.E. y Cabrini R.L. Alteraciones ultraestructurales producidas por la irradiación en los gérmenes dentarios. Rev. Asoc. Odont. Argentina 67:85, 1979.
- Kokubu A.G., Lanfranchi H.E. y Itoiz M.E. Estudios comparativos del efecto de la irradiación en diferentes tipos de epitelios malpighianos. Rev. Asoc. Odont. Argentina 67:85, 1979.

- Lanfranchi H.E., de Rey B.M., Itoiz M.E. y Kokubu G.A. Respuesta de la mucosa oral del Hamster a la irradiación local. Rev. Asoc. Odont. Argentina 67:85, 1979.
- Conti C.J., Giménez-Conti I.B., Conner E.A. and Gerschenson L.E. Hormonal regulation of rabbit uterine epithelium. J. Cell. Biol. 83:253, 1979.
- Murai J.T. Conti C.J. and Gerschenson L.E. The effects of uteroglobin and prostaglandin F₂ on proliferation of cultured rabbit endometrial cells. J. Cell. Biol. 83:110, 1979.
- Ubios A.M., Silberman F.S. and Cabrini R.L. Ultrastructural aspects of radiation injury caused by ³²P in articulations. J. Cell Biol. 32:562, 1980.
- Smerilli A.L. and Itoiz M.E. Microphotometry of sulphhydryl and S-S groups in the epithelium of keratocysts. J. Dent. Res. 59:1766, 1980.
- López Otero R., Ubios A.M., Dotto A. and Cabrini R.L. Experimental orthodontic movements with an edge wise. J. Dent. Res. 59:1767, 1980.
- Espinal E.G. and Cabrini R.L. Description of a technique to expose the submaxilar gland of the Wistar adult rat to X-irradiation. J.D. Res. 59:1765, 1980.
- Espinal E.G., de Rey B.M., Cabrini R.L. X-radiation effects on the salivary glands of the rat. J. Dental Res. 59:1765, 1980.
- Itoiz M.E., Lanfranchi H.E., Domínguez F.V. Carcinoembryonic antigen in salivary glands tumors. J. Dent. Res. 59:1765, 1980.
- de Rey B.M. and Cabrini R.L. Stereology study of basal keratinocytes irradiated with fractionated X-rays. J. Dent. Res. 59:1765, 1980.
- Kokubu G.A., Itoiz M.E. and Lanfranchi H.E. Oral epithelia and skin response to local irradiation. J. Dent. Res. 59:1766, 1980.
- Smerilli A.L., Lanfranchi H.E. and Cabrini R.L. Experimental epithelial cysts. J. Dent. Res. 59:1766, 1980.
- Mayo J. y Michelin S.C. Caracterización y propiedades oncogénicas de un virus endogeno de la Línea BHK-21 (C-13) de Hamster. I Activación de las propiedades Oncogénicas del virus por irradiación del huesped. II Importancia experimental y práctica. Bol. Acad. Nac. Medicina 58:626-627, 1980.

PUBLICACIONES

- Ubios A.M., Pfautsch M. and Fromme H.G. Scanning electron microscopic studies of oral epithelia and vaginal mucosa. Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. 10:463-468, 1977.
- Klein-Szanto A.J.P. and Schroeder H.E. Architecture and density of connective tissue papillae of the human oral mucosa. J. Anat. 123:93-109, 1977.
- Cabrini R.L., Frascch A.C.C. and Itoiz M.E. Quantitative histochemistry of esterases. Histochem. J. 9:369-371, 1977.
- Klein-Szanto A.J.P. Stereologic baseline data of normal human epidermis. J. Invest. Derm. 68:73-78, 1977.
- Banoczy J., Klein-Szanto A.J.P. and Schroeder H.E. Morphometric analysis of oral leukoplakia. Morphol Igaz Orv. Szem. 17:18-25, 1977.
- Klein-Szanto A.J.P., de Rey B.M. and Cabrini R.L. Volumetric modifications of X-irradiated keratinocytes. J. Cutan. Pathol. 4:23-31, 1977.
- Giménez I.B. and Conti C.J. Microspectrophotometric determination of DNA in oral lesions. J. Oral Surg. 35:465-468, 1977.
- Itoiz M.E. and Frascch A.C.C. Variations in the enzymatic behaviour of irradiated epidermis as function of age and lesion localization. Int. J. Radiat. Biol. 31:499-502, 1977.
- Klein-Szanto A.J.P. Clear and dark basal keratinocytes in human epidermis. A stereological study. J. Cutaneous Path. 4:275-280, 1977.
- Giménez I.B., Conti C.J. and Cabrini R.L. The effect of decalcification in the microspectrophotometry determination of DNA. Stain Technol. 52:252-353, 1977.
- Cabrini R.L., Ubios A.M., Giménez I.B. y Silberman F.S. Análisis histopatológico y del comportamiento del DNA de lesiones producidas por la inyección intraarticular de ³²P. Bol. Soc. Arg. Ortoped. Traumatol. 42:364-373, 1977.
- Muñoz E.R. and Mazar Barnett B. II-III translocations induced by diethyl sulfate in mature sperm of *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 45:355-357, 1977.

- Cabrini R.L. y Silberman F.S. Investigación experimental en ortopedia. Acta Ortop. Latinoam. 4:244-247, 1977.
- Silberman F.S. y Cabrini R.L. Formación de un equipo de investigación en ortopedia. Acta Ortop. Latinoamm. 4:244-247, 1977.
- Lanfranchi H.E. and de Rey B.M. Comparative morphometric analysis of the vermilion border epithelium and lip epidermis. Acta Anatomica 101:187-191, 1978.
- Ubios A.M., de Aisenberg E.Y. and Cabrini R.L. Total and local X radiation effects of ^{18}F uptake of bones. Strahlentherapie, 154:139-142, 1978.
- Frasch A.C.C., Itoiz M.E. and Cabrini R.L. Microspectrophotometric quantitation of the diaminobezidine reaction for histochemical demonstration of cytochrome oxidase activity. J. Histochem. Cytochem. 26:157-162, 1978.
- Volco H.E., Itoiz M.E. and Frasch A.C.C. Methodology for microspectrophotometric quantitation of histochemical reactions. I. Investigation of sulhydryl and disulfide groups in squamous epithelium. Cell. Mol. Biol. 23:249-255, 1978.
- Klein-Szanto A.J.P. and de Rey B.M. Surface architecture of X-irradiated hair follicles. J. Cutaneous Pathol. 5:184-192, 1978.
- Ubios A.M., Cabrini R.L., Silberman F.S. and Miranda F.F. Radiation effects produced by the intraarticular injection of ^{32}P . Clinical Ortop. Relat. Res. 136:299-303, 1978.
- Ubios A.M., Pfautsch M. y Fromme H.G. La estructura de la superficie de la encía y el surco gingival vista por microscopía electrónica de barrido. Rev. Asoc. Odont. Argentina 66:261-264, 1978.
- Ubios A.M., Silberman F.S. y Cabrini R.L. Daño por radiación en articulaciones sometidas a diferentes dosis de ^{32}P . Acta Ortop. Latinoam. 5:149-154, 1978.
- Antón D.N. Genetic control of defective cell shape and osmotic-sensitivity in a mutant of *Salmonella typhimurium*. Mol. gen. Genet. 160:277-286, 1978.
- Muñoz E.R. y Mazar Barnett B. Embryonic and post-embryonic lethals induced by diethyl sulfate in mature sperm of *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 51:37-44, 1978.

- Muñoz E.R. y Mazar Barnett B. Influencia de deficiencias en la sección 20 del cromosoma X de *Drosophila melanogaster* sobre la frecuencia de letales embrionarios y translocaciones II-III. *Mendeliana* 3:23-30, 1978.
- Mayo J. Radiobiología y Cancer. Editorial Revista Argentina de Cancerología. 16:17-22, 1978.
- Mayo J. Physical oncogenesis. *Bull Int. Contre le Cancer* 16:7-8, 1978.
- de Rey B.M., Klein-Szanto A.J.P. and Cabrini R.L. Ultrastructural stereology of X-irradiated epidermis. *Radiat. Res.* 77:103-116, 1979.
- de Rey B.M. and Conti C.J. Adaptive differences of the surface organization of horny cells. *Acta Anat.* 104:155-158, 1979.
- Silberman F.S., Ubios A.M. y Cabrini R.L. Producción experimental de tumores por la inyección intraarticular de ³²P. *Soc. Arg. Ortop. y Traumat.* 44:336-338, 1979.
- Lanfranchi H.E., Klein-Szanto A.J.P., de Rey B.M. and Cabrini R.L. Dose-dependent volume changes in X-irradiated keratinocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 36:659-663, 1979.
- Cabrini R.L. The skin as a model for the analysis of radiation injury. *Advances in medical oncology, research and education. Vol. 6: Basis for Cancer Therapy.* Edit. M. Moore (Pergamon Press) pág. 201-207, 1979.
- Antón D.N. Positive selection of mutants with cell envelope defects of a *Salmonella typhimurium* strain hypersensitive to the products of genes *hisF* and *hisH*. *J. Bacteriol.* 137:1271-1281, 1979.
- Mayo J. et. al. Informe del Comité Científico Internacional del XII Congreso Internacional del Cáncer. Universidad del Salvador. Enero de 1979.
- Ubios A.M., Silberman F.S. y Cabrini R.L. Artrosis experimental en perros. *Rev. Argent. Cir.* 36:118-120, 1979.
- Petillo A., Brocco J.A. y Cabrini R.L. El perro en cirugía experimental bucal. Estudio del composite en obturaciones retrógrados de conductos radiculares. *Rev. Arg. Cir.* 36:121, 1979.
- Smerilli A.L. y Itoiz M.E. Transplante de gérmenes dentarios a la bolsa facial del hamster. Modelo experimental. *Rev. Asoc. Odont. Argentina* 68:21-24, 1980.

- Espinal E.G., de Rey B.M. y Cabrini R.L. Efectos de las radiaciones sobre las glándulas salivales. Rev. Asoc. Odont. Argentina 68:237-240, 1980.
- López Otero R., Ubios A.M., Dotto A.L. y Cabrini R.L. Respuestas periodontal a la acción de fuerzas de diferentes magnitudes. Rev. Asoc. Odont. Argentina 68:229-232, 1980.
- Murai J.T., Conti C.J. and Giménez-Conti I.B., Depaoli J.R., Conner E.A. and Gerschenson L.E. Hormonal regulation of proliferation and differentiation of rabbit uterine epithelium: Cell culture and animal studies. En The Endometrium. F.A. Kimbal Editor. EP Medical and Scientific books, 1980.
- Mazar Barnett B. and Muñoz E.R. Modification of radiation-induced genetic damage in *Drosophila melanogaster* male germ cells by butylated hydroxytoluene. Int. J. Radiat. Biol. 38:559-566, 1980.
- Schajowicz F., Cabrini R.L., Blumenfeld I.B., Ubios A.M., Santini Araujo E. y Berenstein M. Estudio ultraestructural del osteoclasto en la enfermedad de Paget. Bol. Soc. Arg. Ortop. Traumatol. 45:24-32, 1980.
- Silberman F.S., Lanari E.M., Miranda F.F., Ubios A.M., Degrossi O.S. y Cabrini R.L. Transformaciones patológicas relacionadas a inyección intraarticular de ^{32}P coloidal. Rev. Biol. y Med. Nuclear 12:7-12, 1980.

