

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

Aspectos bioquímicos de la radiolesión gamma en el pez dorado (clarassius aurativo)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Pilar Andrés Puente

DIRECTOR:

Carlos Dávila

Madrid, 2015

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

T1
S77.1
AND



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326699965

ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA RADIOLESION GAMMA EN EL PEZ DORADO
(CARASSIUS AURATUS)

MEMORIA

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas
presenta

PILAR ANDRES PUENTE

b1636692x
(3763866x

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro33.592.....

Madrid 1976

Esta investigación ha sido realizada en los laboratorios del grupo de Biofísica de la División de Física de Radiaciones en la Junta de Energía Nuclear, bajo la dirección del Dr. Carlos A. Dávila, director jefe - de dicho Departamento cuyo asesoramiento agradezco muy especialmente.

Igualmente hago constar mi más profundo reconocimiento al Prof. Dr. Angel M. Municio, titular de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la - Universidad Complutense, por sus apreciadísimas orientaciones así como por el interés que puso en la supervisión de este trabajo.

Un recuerdo también para todos los compañeros - del grupo de Biofísica cuya colaboración y apoyo valoro en toda su amplitud.

Finalmente gracias expresivas a la Junta de Energía Nuclear por la acogida que me ha dispensado durante la realización de esta investigación.

A mi madre y hermano que me alentaron en mi traba
bajo y a la R. M. Catalina Martí Cabot Superiora
General de las HH. Franciscanas Hijas de la Miseric
ordia con singular afecto y agradecimiento.

I N D I C E

	<u>Pg.</u>
I. INTRODUCCION	3
I. 1. PROTEINAS SERICAS DE PECES	
I. 1. 1. Funciones y diferencias genéticas de las proteínas	5
I. 1. 2. Fracciones proteicas detectadas en el suero de peces	7
I. 1. 3. Identificación de las fracciones proteicas de "dace" (Leuciscus, leuciscus)	11
I. 1. 4. Comparación del suero de pez y humano	14
I. 1. 5. Factores que alteran las proteínas séricas de pez	18
I. 2. LAS RADIACIONES IONIZANTES Y SU ACCION SOBRE LAS PRO- TEINAS SERICAS Y OTRAS MAGNITUDES DEL SUERO DE MAMIFE- ROS	
I. 2. 1. Naturaleza de las radiaciones ionizantes	31
I. 2. 2. Los seres vivos pluricelulares como blanco de la acción ionizante	34
I. 2. 3. Efecto de la radiación ionizante sobre las proteínas - séricas totales	36
I. 2. 4. Causas capaces de originar alteraciones en las protei- nas séricas despues de la irradiación	39
I. 2. 5. Efecto de las radiaciones ionizantes sobre otras magni- tudes del suero de mamíferos	41
I. 2. 5. 1. Fosfatasa alcalina	41
I. 2. 5. 2. Urea	43
I. 2. 5. 3. Hemoglobina	43
I. 2. 5. 4. Lípidos	45

	<u>19.</u>	
I.3.	EFFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE LAS PROTEINAS SERICAS DE PEZ	
I.3.1.	Efecto de la radiación gamma sobre las proteínas séricas totales	46
I.3.2.	Hematocrito	48
I.3.3.	Grupo de peces sometidos a la acción de 1000 rads	49
I.3.4.	Grupo de peces sometidos a la acción de 2000 rads	49
I.3.5.	Grupo de peces sometidos a la acción de 3000 rads	50
I.3.6.	Conclusiones	50
I.4.	EFFECTOS DE LA RADIACION IONIZANTE SOBRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE MAMIFEROS	
I.4.1.	Tiempo de supervivencia de mamíferos despues de la irradiación	52
I.4.2.	Alteraciones morfológicas en el intestino delgado de mamíferos	53
I.4.3.	Migración de las células del epitelio intestinal despues de la irradiación	54
I.4.4.	Metabolismo de macromoléculas en el intestino de - mamíferos irradiados	56
I.5.	EFFECTOS DE LA RADIACION IONIZANTE SOBRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE PEZ DORADO (CARASSIUS AURATUS)	
I.5.1.	Tiempo de supervivencia despues de la radiación X influjo de la temperatura	60
I.5.2.	Cambios histológicos en el epitelio intestinal, in <u>flujo</u> de la temperatura	61
I.5.3.	Proporción de la migración de las células epitelia <u>les</u> a diferentes temperaturas	62

I.5.4.	Proporción de timidina incorporada por las células del epitelio intestinal durante un periodo de 200 días despues de la irradiación	63
I.5.5.	Efectos de la radiación X sobre la síntesis de DNA a temperaturas diferentes	65
I.5.6.	Efecto de la radiación X sobre la proliferación celular del epitelio intestinal a temperaturas diferentes	67
I.6.	EFFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE EL DNA " IN VITRO "	
I.6.1.	Radiolisis del agua	69
I.6.2.	Mecanismos de reacción del radical OH·	74
I.6.3.	Efectos producidos por el radical OH sobre la molécula de DNA	76
I.6.4.	Rotura internucleotídica radioinducida	80
I.6.5.	Reparación enzimática de la radiolesión en la cadena de DNA	83
I.7.	AMINOACIDOS LIBRES EN DIFERENTES ORGANOS ANIMALES	
I.7.1.	Aminoacidos libres en tejidos de organismos superiores	87
I.7.2.	Intercambio de aminoacidos entre plasma y cerebro	89
I.7.3.	Flujo de aminoacidos desde el cerebro	90
I.8.	EFFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES SOBRE LOS AMINOACIDOS LIBRES DE ORGANOS ANIMALES	
I.8.1.	Efecto de las radiaciones ionizantes sobre los niveles de aminoacidos en cerebelo y cerebro	92

		<u>Pg.</u>
II	MATERIALES Y METODOS	
II.1.	MATERIAL BIOLOGICO	96
II.2.	IRRADIACION Y DOSIMETRIA	96
II.3.	TOMA DE MUESTRAS	101
II.4.	MARCADO RADIOACTIVO DE LA BIOSINTESIS DE DNA	101
II.5.	MAGNITUDES BIOQUIMICAS DEL SUERO	
II.5.1.	Proteinas totales	102
II.5.2.	Fosfatasa alcalina	104
II.5.3.	Hemoglobina	105
II.5.4.	Urea	106
II.5.5.	Gliceridos totales	108
II.6.	SEPARACION POR ELECTROFORESIS, IDENTIFICACION Y CUAN <u>T</u> TIZACION DE PROTEINAS SERICAS	109
II.7.	DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS EN TEJIDOS POR EL METODO DE SCHIMIDT-THANNHAUSER	111
II.7.1.	Preparación previa de las muestras de tejidos	112
II.7.2.	Extracción de ácidos nucleicos, proteínas, y otras ma cromoléculas por eliminación de compuestos de bajo pe so molecular	112
II.7.3.	Separación de ambos ácidos nucleicos RNA y DNA	113
II.7.3.1.	Condiciones para la hidrolisis alcalina del RNA	114
II.7.3.2.	Estabilidad del DNA frente a la digestión alcalina	115
II.7.3.3.	Separación de la fracción RNA ácido soluble del hidro lizado	115

	<u>Pg.</u>
II.7.3.4. Tratamiento de la fracción DNA ácido soluble del hidrolizado	116
II.7.4. Determinación de ácidos nucleicos por absorción ultravioleta	116
II.8. EXTRACCION, SEPARACION ANALITICA E INTERRELACION DE AMINOACIDOS LIBRES EN BAZO, HIGADO, CEREBRO Y MUSCULO	118
III RESULTADOS Y DISCUSION	
III.1. EVOLUCION POSTIRRADIACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS TOTALES EN SUERO DE PEZ DORADO, (CARASSIUS AURATUS)	123
III.2. EVOLUCION POSTIRRADIACION DE LA CONCENTRACION DE OTRAS MAGNITUDES BIOQUIMICAS EN EL SUERO DE PEZ DORADO (CARASSIUS AURATUS)	124
III.2.1. Fosfatasa alcalina	124
III.2.2. Hemoglobina	126
III.2.3. Urea	126
III.2.4. Gliceridos totales	127
III.3. EVOLUCION POSTIRRADIACION DE LOS REGISTROS ELECTROFORETICOS DEL SUERO DE PECES (CARASSIUS AURATUS)	127
III.4. EVOLUCION POSTIRRADIACION DE LA BIOSINTESIS DE - DNA EN EL INTESTINO DE PEZ DORADO. (CARASSIUS AURATUS)	134
III.5. EVOLUCION DEL PORCENTAJE RELATIVO DE AMINOACIDOS LIBRES EN CEREBRO, MUSCULO, BAZO E HIGADO DE PEZ DORADO, CARASSIUS AURATUS TRAS LA IRRADIACION	141

		<u>Pg.</u>
IV.	CONCLUSIONES	151
V.	BIBLIOGRAFIA	156

I INTRODUCCION

En la actualidad se dispone ya de una bibliografía sufi-
cientemente documentada como para profundizar en el conocimiento de
la evolución de los diferentes parámetros bioquímicos en el suero -
sanguíneo de animales sometidos a irradiaciones.

No obstante en el conjunto de estos estudios de Bioquí-
mica comparada se nota la falta del correspondiente a suero de pe-
ces, lo cual no deja de resultar chocante al considerar por un lado
la enorme variedad de especies animales estudiadas (Gerber G.B. Alt-
man K.I. 1970) y por otro, el hecho de que se hayan puesto de mani-
fiesto con absoluta clarividencia las repercusiones de toda una se-
rie de condicionamientos ecológicos sobre el suero de los peces.

El trabajo más antiguo correspondiente a análisis elec-
troforético de proteínas séricas de peces, concretamente carpas, -
que aparece en la bibliografía del presente trabajo data de hace ya
treinta años y fué llevado a cabo por Moore (Moore D.H. 1945). No -
se ha tenido especial interés en remontarse hasta los orígenes de -
la investigación en este campo, por tanto se ignora si es este autor
el primero o uno de los primeros que investigaron sobre proteínas sé-
ricas de peces o bien si existe alguno anterior a él.

Ciertas variables como son : sexo, edad, madurez sexual,
migraciones, ayuno, tipos diferentes de stress, temperatura, salini-
dad, intoxicación por residuos industriales, enfermedades, etc. pro-
ducen modificaciones apreciables en los electroforegramas de suero -
de peces. (Fujiya M. 1961) ; (Drilhon A. Fine J.M. 1963) ; (Thoms M.
L. Mc Crimmon H.R. 1964) ; (Bouck G.R. Ball R.C. 1965) ; (Booke H.E.
1964) ; (Hunn J.B. 1967) ; (Thurstone R.N. 1967) ; (Tsuyuki 1965) ;
(Harris J.E. 1974).

Todos estos trabajos pusieron de manifiesto la gran sen-sibilidad del método electroforético para detectar alteraciones fisiológicas que se producen como consecuencia de los condicionamientos ambientales ya citados.

A la vista de los hechos parece lógico utilizar el método de electroforesis cuando nos proponemos contribuir a la descripción del síndrome de irradiación en peces, y particularmente el tipo electroforesis disco-gel que aporta mayor riqueza de datos. Es previ-sible que este procedimiento de análisis de proteínas pueda resultar un buen indicador de los cambios fisiológicos que acompañan a los efectos letales y subletales de la irradiación.

I. 1. PROTEINAS SERICAS DE PECES.

I.1.1. Funciones y diferencias genéticas de las proteínas

Las proteínas séricas de los peces han sido estudiadas con amplitud suficiente debido al importante papel que desempeñan en el mantenimiento de la homeostasis fisiológica del cuerpo del animal. (Booke 1964).

Las proteínas en colaboración con otros sistemas de la sangre participan en actividades diversas como son :

- . Coagulación de la sangre
- . Mantenimiento de la tensión coloidosmótica del plasma y por tanto de la regulación del metabolismo del agua y de la viscosidad plasmática
- . Regulación del pH
- . Vehículo de transporte y medio de salubrización
- . Funciones enzimáticas propias
- . Funciones inmunológicas, nutritivas y de recambio
- . Funciones reguladoras del metabolismo implicado en los sistemas de reparación.

Se ha podido comprobar que existen diferencias notables y características específicas en los distintos modelos electroforéticos, obtenidos en condiciones equiparables para las distintas especies, según era de esperar. Estos modelos típicos de cada especie son altamente reproducibles y las diferencias en cuanto a cantidad y ausencia o presencia de componentes, se vio que es significativo. Así se encontraron diferencias apreciables debidas al sexo, concretamente en pollos de gallinaceas (Moore 1945).

Como resultado de la constitución genética y de la influencia de factores del entorno y fisiológicos que encuentran, aparecen variaciones intraespecificas en las proteínas del suero sanguíneo de las diferentes especies animales. (Harris J.E. 1974).

En 1972 Cherkashchenco y col. estudiaron las proteínas séricas de los peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Uno de sus múltiples hallazgos consistió en apreciar el efecto de la edad sobre la cantidad de las proteínas séricas de las aves.

Los resultados de estudios electroforéticos de las proteínas séricas de los peces pueden resumirse así :

1º.- Los modelos de proteínas séricas de la sangre varían por la acción de ciertos factores como son : sexo, madurez, productos químicos, alimentación, métodos de captura, (Shireman 1974) así como muestreo repetido, localización de la extracción de la sangre, escasez de oxígeno disuelto en el agua, poblaciones salvajes y poblaciones de criadero, etc. (Thurstone 1967).

2º.- Normalmente los cambios inducidos son similares a los modelos obtenidos en personas sometidas a condiciones de hipoxia. (Dunn y Pearce 1961).

3º.- Las diferencias debidas a las variaciones genéticas individuales se dan en las proteínas de los peces de agua dulce.

Las proteínas séricas de dace (*leuciscus leuciscus*) - aunque presentan variaciones en todos los componentes del suero en cuanto al número y concentración, sin embargo no parecía existir - una relación definida con el sexo, la edad, ni con la época de desove (excepto uno de los componentes de una fracción). Estos componentes presentaban evidentemente variaciones significativas individuales, e indicaban el alto grado de variación intraespecífica. - (Harris J.E. 1974).

No obstante en algún caso se ha llegado a correlacionar los cambios en las proteínas séricas del pez con alguna de estas magnitudes. (Booke 1964) (Harris 1971).

Esta aparente discrepancia podría justificarse considerando que como los modelos de las proteínas séricas de algún pez - en particular, dependen no solamente de su constitución genética - sino de factores fisiológicos y del entorno, estos cambios serían a menudo demasiado complejos o no suficientemente consistentes para ser atribuidos a tales factores con cierto grado de certeza.

La complejidad se ha visto incrementada al aumentar el número de componentes, pero éstos llegan a identificarse por homología con los componentes del suero humano, cuando una identificación exacta podría resultar dificultosa. (Harris J.E. 1974).

I.1.2. Fracciones proteicas detectadas en el suero de peces

En el caso de "dace," (*leuciscus, leuciscus*) si bien existen grandes similitudes entre las muestras séricas, no puede afirmarse que dos modelos de ejemplares distintos sean realmente idénticos. Se llegaron a identificar nueve proteínas como máximo en cada suero y cinco como mínimo. En algunos modelos se resolvieron accidentalmente fracciones más difusas pero se excluyeron debido a la dificultad que ofrecían para su cuantificación.

Las diferentes fracciones se denominaron así : 1(a,b) ; 2 ; 3(a,b) ; 4(a,b) ; 5(a,b) en orden decreciente de movilidad electroforética. En ciprínidos según muestra la tabla I se detectaron - por diferentes métodos electroforéticos, como máximo doce componentes y como mínimo cuatro. (Harris J.E. 1974).

De las proteínas séricas de "bluegill" (*lepomis macrochirus*) se llegaron a separar por electroforesis en acetato de celulosa cuatro grandes fracciones de proteínas séricas (Shireman 1974).

Trabajando con barvos (*barvus fluviatilis*) se encontraron cinco fracciones séricas que por su disposición se equipararon a las observadas en el hombre, denominandolas : albúmina, α_1 , α_2 , β , γ globulina (cada muestra de suero era mezcla de cincuenta - sueros).

MODELOS DE PROTEINAS SERICAS DE CIPRINIDOS

Especies	Tipo de electroforesis	Albúminas y globulinas	Autores
Carp (cyprinus carpio)	mouving-boundary	Prealb, albm ₂ α, β, γ	Deutsch Goodloe 1945
Carp (cyprinus carpio)	mouving-boundary	alb, α, β, γ,	Moore 1945
Carp (cyprinus carpio)	paper	---	Deutsch Mcshan 1949
Carp (cyprinus carpio)	paper	2 alb, 3α, 2β, 2γ	Sorvachev 1957
Carp (cyprinus carpio)	paper	alb, 2α, β, γ	Lysak, Wojic 1960
Carp (cyprinus carpio)	paper	alb, 2α, β, γ	Fujiya 1961
Carp (cyprinus carpio)	agar-gel	alb, 2α, β, γ	Chandresakar 1959 a
Catla (catla, catla)	agar-gel	alb, 2α, β, γ	Chandresakar 1959 a
Rohu (labeo rohito)	agar-gel	alb, 2α, β, γ	Chandresakar 1959 a
Mrigal (cirrhana mrigala)	agar-gel	alb, 2α, β, γ	Chandresakar 1959 a
Bata (labeo bata)	agar-gel	alb, 2α, β, γ	Chandresakar 1959 a
Kalbaus (labeo calbusa)	agar-gel	alb, 2α, β, γ	Chandresakar 1959 a
Dace (leuciscus leuciscus)	starch-gel	3prealb, alb, 7 globulins	Chandresakar 1959 a
Roach (rutilus rutilus)	starch-gel	1(2)prealbs, albs, 7(9) globulins	Nyman 1965
Orfe (leuciscus idus)	starch-gel	3prealbs, alb, 7globul,	Nyman 1965
Barbel (barbus fluviatilis)	paper	album, 2α, β, γ,	Planas y Gras 1957
Chub (leuciscus cephalus)	paper	alb, α, β, γ,	Planas y Gras 1957
Golden shiner (notemigonus crysoleucas)	paper	alb, 2α, β, γ,	Summerfelt 1966 a

TABLA I

En el caso de *leuciscus cephalus* se pudieron diferenciar en el diagrama electroforético la albumina, α_1 , y γ globulina, mientras que la α_2 y la β aparecen como si fuesen una sola fracción, si bien en algún caso parece insinuarse su resolución en dos; por esto parece lógico que se acepte también en estas especies la existencia de las globulinas α_2 y β que serían más difíciles de diferenciar entre sí. (Planas y Gras 1957).

El estudio sobre separaciones electroforéticas del suero de diferentes peces, llevó al autor a la conclusión de que el modelo de pez normal presenta cuatro manchas sobre papel, es decir cuatro bandas para cada curva electroforética.

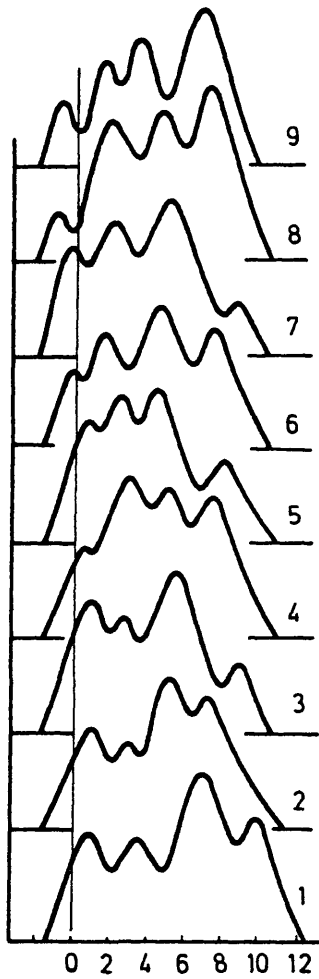
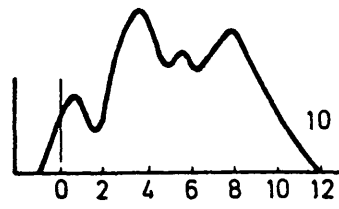
Generalmente el suero humano normal presenta también cuatro bandas en la curva electroforética sobre papel, correspondientes a cuatro componentes denominados : albúmina, α globulina, β globulina, γ globulina.

Los peces empleados en esta experiencia pertenecían a dos clases diferentes : Teleósteos y Elasmobranquios, notándose una diferencia notable entre los diagramas electroforéticos de unos y de otros.

Los electroforegramas de Elasmobranquios muestran una banda hacia el lado del cátodo, mientras que todas las bandas del suero de Teleosteos migran hacia el lado del ánodo.

La fg. (1) muestra las curvas electroforéticas correspondientes a : (1) *Pagrosomus major*; (2) *Sebastes inermis*; (3) *Sparus srvinho* mis; (4) *Acanthbius flavianus*; (5) *Platycephalus indicus*; (6) *Astroconger myriaster*; (7) *Spheroides rubripes*; (8) *Raja kenojei*; (9) *Cynias manazo*; y (10) *Cyprinus carpio*.

Aunque hay algunas diferencias en la forma de las curvas de Teleosteos, sin embargo parece ser aproximadamente la misma, especialmente la distancia de migración de las bandas.



espacio de migracion cm.

Fig. 1

Diagramas electroforéticos de diferentes peces

Comparando estas curvas con las curvas procedentes de sueros de peces sometidos a la exposición de materiales tóxicos - de la impresión de que puede ser un método apto para medir los efectos de deterioro. (Masaru Fujiya 1961).

Se ha intentado determinar si realmente existe un modelo de proteínas séricas característico entre peces de la misma especie y procedentes de la misma población, y qué variaciones existen entre modelos de sueros de individuos sometidos a una tensión física o química antes de la extracción de la sangre. La experiencia fué realizada con salmo gairdneri, y se llegó a la conclusión de que en esta especie de pez a causa de las diferencias individuales, no ha sido posible caracterizar un " modelo tipo " de electroforesis disco-gel a partir del suero. El máximo de bandas aparecidas de un modo permanente era de diez, denominando 1 a la más rápida y 10 a la más lenta. Aunque el perfil presentaba diez fracciones standard, en la fracción 10 aparecían agrupadas dos bandas, y tres en la fracción 9. El perfil indicaba la posibilidad de bandas adicionales en las fracciones 8 y 6 aunque estas no eran claramente discernibles en el gel. La fg. 2 muestra el perfil densitométrico de un modelo de electroforesis disco-gel de suero - de trucha arco iris salvaje (salmo gairdneri)

Los modelos obtenidos de la misma muestra de suero en geles diferentes eran replicables aún cuando migraron en corridas distintas. (Thurstone 1967).

I. 1.3. Identificación de las fracciones proteicas de dace (leuciscus, leuciscus).

Las diferentes fracciones proteicas detectadas en suero de dace (leuciscus, leuciscus), se denominaron : 1(a,b); 2 ; 3 (a,b); 4(a,b); 5(a,b) en orden decreciente de movilidad electroforética. (Harris J.E. 1974).

Los componentes 1a y 1b se han considerado como prealbúminas porque migraron más rápidamente que el componente principal, la albúmina. Estos componentes aparecen invariablemente en casi todos los casos conteniendo normalmente del 14 al 16 % del total de proteínas. La prealbúmina más rápida es la 1a, que fué también la más abundante. Estas prealbúminas 1a y 1b aparecen también en el electroforegrama de *leuciscus cephalus*.

Las prealbúminas de suero de pez se han resuelto en otras ocasiones usando un gel patrón. (Fine y col 1963) ; (Nyman - 1965) ; (Luckyanenko y col 1967).

El componente 2 forma una ancha banda intensamente teñida, es la fracción más grande y prominente del suero de pez. Fué identificada como albúmina por diferentes autores : Summerfelt en ciprínidos 1964, por fraccionamiento de sales ; Snieszko 1966 por análisis químico en truchas arco iris (*salmo gairdneri*). Alcanza algo menos de la mitad del contenido total de proteínas séricas en la mayor parte de los casos. Los porcentajes de albúmina de suero de "dace," coinciden con los publicados por Chandresakar 1959 para ciprínidos de agua dulce.

La fracción 3 fué menos uniforme variando entre 4 y 22%, aparece en la zona de las postalbúminas y consta de una ancha banda difusa, circunstancialmente aparece una segunda banda igualmente difusa situada muy próxima a la anterior.

Las transferrinas, ceruloplasminas, hemoglobina libre, protombina etc. se encuentran probablemente entre las fracciones 3 y 4 y las fracciones más pequeñas de suero de "dace." Esto parece estar confirmado por el hecho de que se demostró que las transferrinas del suero de salmón cuando se separan en geles de poliacrilamida o almidón, se encuentran también en las fracciones 3 y 4. (H. Anwar - comunicación personal) ; (Payne y col 1971).

Las inmunoglobulinas aisladas del suero de salmón, cuando se separan sobre geles de poliacrilamida se detectan también como una banda difusa en una región correspondiente al componente 4 - del suero de " dace ".

La fracción 5 es el componente de menor movilidad y nada más entrar en el gel de poro pequeño forma una banda bien definida de intensidad regularmente uniforme, variando normalmente entre 9 y 14 $\%$. Ocasionalmente aparece en esta zona una segunda banda que es a menudo menos intensa que la banda principal y ligeramente más movable.

Se demostró que el componente 5a del suero correspondía a β lipoproteínas, fué encontrado solamente en suero de peces hembras y que habían desovado, nunca pudo identificarse en peces macho. La electroforesis subsiguiente a la separación de las lipoproteínas en machos y hembras confirmó ésto. Al fin una lipoproteína mostró - estar implicada en cambios de madurez e iniciación de producción de huevos en las hembras de ambos peces : ciprínidos y salmónidos. - (Vanstone & Ho 1961) ; (Krauel & Ridgway 1963) ; (Summerfelt 1964).

En resumen, los componentes 1a y 1b son prealbúminas, - el componente 2 es albúmina y las fracciones 3, 4 y 5 en virtud de sus respectivas movilidades electroforéticas pueden ser consideradas como α , β , γ globulinas respectivamente.

La proporción albúmina/globulina era regularmente uniforme, aunque algún pez mostró valores extremadamente altos, la mayor parte de los peces daban valores entre 1.4 y 1.9. Estos valores coinciden con los publicados para leuciscus 1.13 y 1.31 (Planas y Gras 1957) y para sábalo (*brevortia tyranus*) 1.28 y 2.08 (Lepkovsky 1929). No existía correlación entre la proporción A/G y la edad y - sexo de leuciscus, leuciscus y aparentemente tampoco existía correlación con los cambios de temperatura como habían divulgado en el - caso de las truchas (Meisner & Hickman 1962). Sin embargo existía -

una reducción relativa de la albúmina durante los meses más fríos del año. Varios autores descubrieron la existencia de una disminución en la cantidad de albúmina y/o en la proporción de A/G durante el invierno (Saito 1957) ; (Khailov 1963). Durante este tiempo tiene lugar también una disminución general en todas las proteínas séricas (Saito 1957) ; (Sorvachev 1957) ; (Flemming 1958). Como las proteínas de la dieta son como un precursor directo de las proteínas del plasma (Harper 1965), estos efectos debidos al invierno o a bajas temperaturas, donde el alimento de los peces está notablemente reducido, parece lógico. Se ha comprobado, que, efectivamente el efecto de inanición sobre las proteínas séricas es comparable al efecto de invernación. (Sorvachev 1957) ; (Love 1970).

I.1.4. Comparación del suero de pez y humano.

Al cotejar las proteínas séricas humanas y de pez se pudo comprobar que :

Las prealbúminas, componente 1, correspondientes a las bandas 1a y 1b aparecen en el caso de *leuciscus cephalus*, si bien con una movilidad equiparable a la albúmina humana. También se resolvieron estas prealbúminas en el suero de dace pero no en suero humano.

El componente 2 aparece en ambos sueros de pez y humano, en el caso de los peces constituye la fracción mayor pero es menos móvil que la albúmina del suero humano.

Aunque las proteínas séricas de "dace" (*leuciscus, leuciscus*) correspondían en general a los componentes de suero humano en una relación espacial, las movilidades electroforéticas de los componentes del suero de pez parecen ser bastante menores que aquellas de suero humano. Por ejem. una serie de investigaciones han demostrado que el componente mayor del suero de Teleosteos es realmente análogo a la α globulina del suero humano más bien que a la albúmina, (Summerfelt 1964) ; (Snieszko y col 1966). El hecho de que -

el componente 2 del suero de " dace " tenga la movilidad de la α globulina e incorpore tinte lipídico, no excluye la posibilidad - de que de hecho sea albúmina.

Se encontró una proteína igualmente capaz de incorporar tinte lipídico, en la misma posición del electroforegrama de suero de " golden shiners " (Summerfelt 1964, 1966) ; " eel ", - (Drilhon 1954) ; "cool", (Wilkins 1967) y en otras especies de - vertebrados, (Commun y col 1953) ; (Crenshaw 1962). Hay que tener en cuenta que la albúmina a menudo tiene moléculas de ácidos gra-sos libres unidas a ella. (West y col 1967).

El componente 3 que está ocasionalmente como dos bandas separadas, se encontró en esta zona de las postalbúminas en suero - de "dace" (leuciscus, leuciscus). Ambas bandas regularmente difusas, se encuentran muy cerca la una de la otra.

En la separación de proteínas séricas de humanos aparece en la zona de las postalbúminas una banda regularmente densa seguida por dos o tres bandas menos intensas. Estas eran normalmente los componentes específicos del grupo y otras α globulinas tales como pro-tombina, ceruloplasmina, etc. (Davis 1964) ; (Luckyanenko y col 1967).

La segunda fracción más prominente del suero humano es la localizada en el centro, la transferrina, (Davis 1964). Ni el componente 4a ni el 4b del suero de "dace" eran tan densos como éste.

Entre la transferrina y el origen se encontraron varias - bandas en ambos modelos de suero. En suero humano y en orden decreciente de movilidad estas bandas son : haptoglobina dos fracciones, α_2 ma-croglobulina, β lipoproteína. Esta región muestra un fondo difuso que es el volumen ocupado por γ globulina (Davis 1964).

Hay también en esta región de suero humano un número de bandas que no han sido identificadas. En la región correspondiente de suero de "dace", aparecieron la mayoría de las fracciones más pequeñas, en la zona inmediata al componente 4.

Se intentó identificar las lipoproteínas del suero de "dace" (leuciscus, leuciscus) con cuatro ejemplares capturados en el mes de agosto comparándolas después con las del suero humano.

Se demostró la existencia de dos lipoproteínas séricas en ambos sueros que migraban en las regiones α y β respectivamente. Esto es comparable a los hallazgos de otros autores sobre lipoproteínas séricas en ciprínidos y seres humanos. (Chandresakar 1959) y (Luckyanenko 1967) respectivamente.

En el suero de dace el componente β comprendía la mayor parte de las lipoproteínas, aunque en la anguila el componente α era el mayor. (Fine y col 1963). La movilidad más baja de las proteínas de "dace" en comparación con sus respectivos componentes humanos, fg. 3, está de acuerdo con la observación de que todos los componentes séricos de "dace" tienen menor movilidad que sus correspondientes análogos de suero humano.

La fracción 5a corresponde a β lipoproteínas, la 5b ó α lipoproteínas tuvo una movilidad ligeramente mayor en el suero humano que en el de "dace", pero en ambos casos de "dace" y seres humanos la β lipoproteína fué el componente más grande. Se sugirió que el componente 5b que se encuentra en el extremo final del gel de poro pequeño, casi en la conjunción entre el gel de poro grande y poro pequeño, puede ser una inmunoglobulina. Al menos en suero humano podría tratarse de la 19S γ globulina. (Davis 1964).

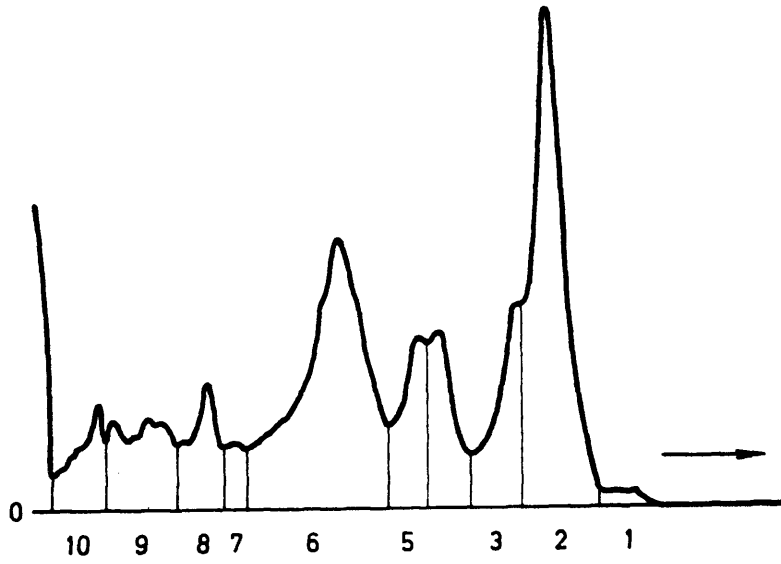


Fig.2

Perfil densitométrico del suero de trucha salvaje por electroforesis disco-gel

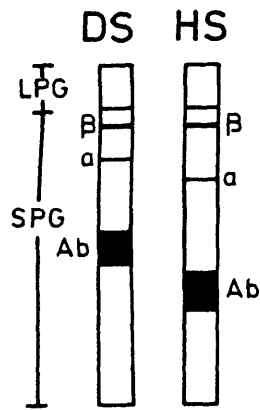


Fig.3

Separación de lipoproteínas séricas de "dace" y naminas . Ab albúmina y lipoproteínas .

I.1.5. Factores que alteran las proteínas séricas de pez.

Sexo y madurez. -

El análisis de regresión indicó que los estanques, la estación del año y el sexo, así como las alteraciones de estas variables ejercen un efecto significativo sobre los modelos de las proteínas séricas de "bluegill". (Shireman J.V. 1974).

Las diferencias de sexo fueron significativas para cada fracción durante tiempos específicos. Las interacciones entre estanques, tiempo y sexo fueron significativas, indicando que a periodos distintos dentro de estanques distintos, el porcentaje proteico dentro de las fracciones varía con el tiempo.

Con todo se demostró que los porcentajes proteicos de cada fracción ofrecían una tendencia similar en machos y hembras inmaduros de "bluegill". Sin embargo el factor decisivo fué la cantidad relativa de la fracción 4 durante la época de reproducción en las hembras. No es extraño un aumento en una fracción tratándose de animales ovíparos. (Mac Kinley y col. 1953) ; (Mac Cully, Maw, Common 1959), aparentemente se trata de una mezcla de compuestos lipoproteicos. — (Bailey 1957).

Es preciso considerar el sexo como una variable cuando se comparan fracciones proteicas de peces tomados de estanques diferentes. Las diferencias en el porcentaje proteico entre las fracciones fueron estadísticamente significativas, superiores a las de los estanques pero se debían a la influencia de ambos : sexo y época. — (Shireman 1974).

Trabajando con proteínas séricas de peces herbívoros se observaron ligeras diferencias debidas al sexo, apreciando también que las albúminas decrecían con la edad del pez. (Adamova y col 1973).

Se hizo un análisis de muestras de suero procedentes de 28 hembras y 20 machos de trucha arco iris (*salmo gairdneri*), capturados por el procedimiento de cucharilla " dip net ", en los canales del criadero, a fin de determinar las posibles variaciones del modelo atribuibles al sexo y madurez. Dos machos eran inmaduros (había dificultad para determinar el sexo sin examen microscópico), catorce eran maduros (se apreciaba el sexo sin ampliación) y cuatro estuvieron " a punto " (se desprendía el esperma o los huevos al manejar el pez). Catorce hembras fueron maduras y catorce inmaduras. Se observaron diferencias significativas en las fracciones 6 y 9 - que se referían a madurez pero no pudo atribuirse ninguna a la fracción de sexo.

Tan solo se encontraron dos hembras " a punto " de desovar entre los peces del criadero sometidos a prueba, ambas exhibieron en la fracción 10, cantidades de proteínas que eran excesivamente grandes para ser controladas por el densitómetro. Se estimó que estas bandas contenían más de un 70 % del contenido total de proteínas.

Muestras de ocho hembras maduras (se aprecia el sexo sin necesidad de ampliación), observadas en otros tests pusieron también de manifiesto esa fracción excepcional. La fracción 10 en muestras de machos o hembras inmaduras no excede del 13 % en contenido proteico. Una intensa banda se apreció también en dos truchas a punto de desovar, *salmo gairdneri* y dos *salmo clarki*, en las mismas condiciones capturadas en el río y lagos cercanos. (Thurstone 1967).

Productos químicos.-

. Sulfito de cobre.- Se expusieron carpas de 20 cms. de longitud en agua conteniendo Cu en cantidades de 0.1 ; 0.2 ; 0.5 ; 1.0 y 2.0 mg/l durante veinticuatro horas.

Las curvas electroforéticas para cada concentración apa recen en la fg. 4

A la vista de éstas se aprecia una profunda diferencia cuando el contenido de Cu alcanza una concentración de 0.5 mg/l.

Se llegó a la conclusión de que la concentración umbral capaz de inducir un efecto nocivo, está entre 0.2 y 0.5 mg/l de Cu (Masaru Fujiya 1961).

. Sulfato de cobre.- Se hicieron experiencias sobre cincuenta y un peces en series de cuatro experiencias. Los peces control mostraron diferencias significativas respecto a los modelos procedentes de peces expuestos a la acción del Cu, en las fracciones 7 y 10 de trucha arco iris (*salmo gairdneri*) ; (Thurstone 1967).

Fujiya en 1961 sugirió que el análisis electroforético de suero sanguíneo de peces ha demostrado ser un instrumento util pa ra detectar la polución. Se notaron cambios notables en los modelos de *salmo gairdneri* sometidos a niveles letales de sulfato de cobre.

La naturaleza compleja de las reacciones del Cu sobre los peces se desconoce. Se sabe que metales pesados, incluidos el Cu, forman compuestos insolubles cuando se combinan con proteínas en el mucus segregado por el tejido epitelial externo de los peces. Se sabe que eso interfiere la respiración. (Doudoroff y Katz 1953).

(Fromm y Schiffman 1958) ; (Holland y col 1960) concluyeron que el tejido epitelial externo es capaz de retener metales pesados, incluso Cu, de la penetración a los tejidos internos.

Algunos trabajos recientes muestran cambios histopatológi cos definidos bajo condiciones prolongadas de concentraciones bajas de metales pesados (Crandall y Goodnight 1963), así como acumulación tisular de ciertos metales pesados (Fromm y Stokes 1962).

. Sulfito sódico.- Concentraciones grandes de sulfito disuelto en el agua causaron un descenso notable en el oxígeno disuelto. Aún así no existían diferencias significativas entre los peces de control y alguno de los grupos de peces sometidos a las sales de sulfito. Estos datos son parecidos a los obtenidos en la experiencia sobre concentraciones bajas de oxígeno, en las que se obtienen diferencias no significativas entre los grupos de control y los tests.

. Hidróxido sódico y ácido sulfúrico.- Para el hidróxido sódico - hubo un cambio significativo en la curva electroforética sobre papel cuando la concentración alcanzó los 40 mg/l. El cambio más notable sin embargo se observó al alcanzar los 60 y 90 mg/l.

Una concentración de 20 mg/l de ácido sulfúrico produjo un cambio muy notable en el suero de pez. A simple vista se apreció un cambio histológico en las branquias. En conexión con el fenómeno aparece un cambio significativo en la curva electroforética sobre papel del suero.

. Acetato de plomo.- Diez carpas tests se mantuvieron durante cuarenta días en agua conteniendo 1.0 mg/l de Pb. Se recogieron especies muertas al cabo de los 9, 20, y 21 días. Siete peces sobrevivieron - durante la totalidad del periodo de experiencia, pero casi todos quedaron supersensibilizados y una pequeña tensión les producía shock.

La fg. 5 muestra las grandes diferencias entre curvas electroforéticas de sueros de carpa expuestos a la acción del Pb y carpas normales.

En estas experiencias la carpa sobrevivió durante veinticuatro horas en una concentración de 50 mg/l de Pb.

Se ha comprobado sin embargo que una exposición prolongada a una concentración de Pb mucho más baja, 1.0 mg/l de Pb, produjo un efecto nocivo en su cuerpo. (Masaru Fujiya 1961).

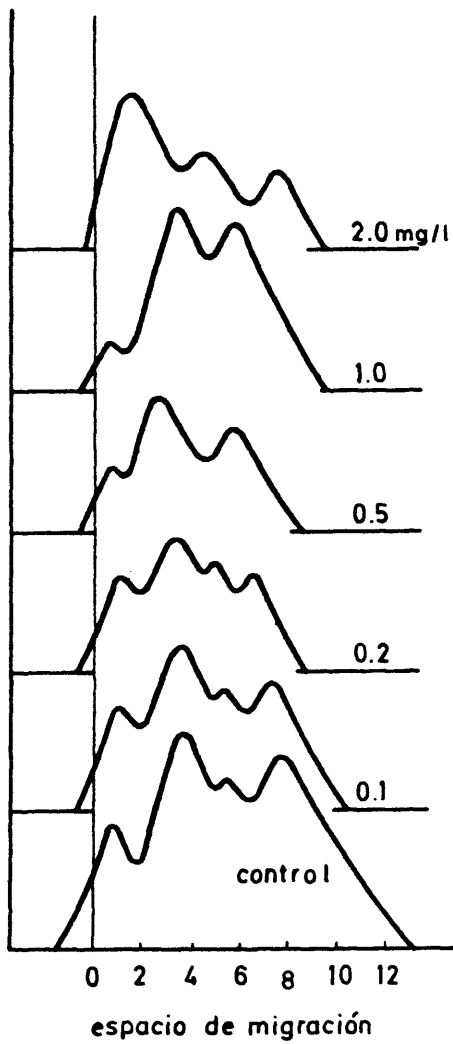


Fig.4

Variaciones en el diagrama electroforético de la carpa producidas por la exposición a diferentes concentraciones de Cu .

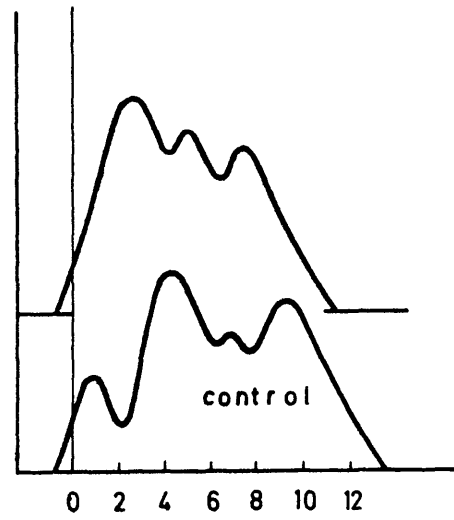


Fig. 5

Efecto del Pb sobre el diagrama electroforético de la carpa .

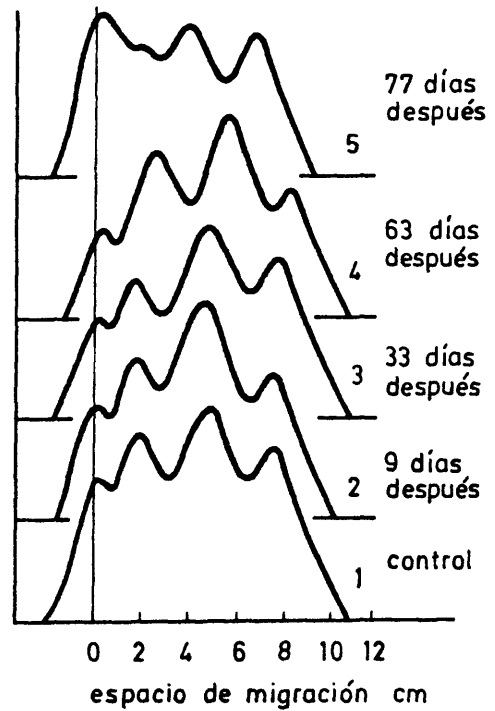


Fig.6

Efecto del tiempo sobre el diagrama electroforético de *M. myriaster* .

Baja concentración de oxígeno en el agua.-

Se han encontrado diferencias significativas en los perfiles de plasma de dos de las tres especies de peces estudiados en condiciones de escaso oxígeno. Se notaron cambios en dos de las seis fracciones obtenidas en perfiles de electroforesis en papel del "blue gill" (*lepomis macrochirus*) y una de las cinco fracciones obtenidas - en el perfil del " largemouth base " (*micropterus salmoides*), " yellow bullheads " (*ictalurus natalis*) no manifestaron cambios de perfil.

Se sugirió que los niveles de oxígeno disuelto 2.7 ppm - en las condiciones del test pueden representar una escasa o nula tensión para estas especies. (Bouck y Ball 1965).

No se apreciaron sin embargo cambios significativos en - el perfil del suero de trucha arco iris (*salmo gairdneri*), sometidos a niveles de oxígeno disuelto del orden de 1.3 ppm. En realidad no - se notaron cambios significativos en los modelos de trucha arco iris sometidos durante un mes a un descenso de oxígeno hasta de 0.1 ppm. (Thurstone 1967).

Población salvaje y población de criadero.-

Se tomaron muestras de nueve truchas arco iris (*salmo - gairdneri*) salvajes para ver si existían variaciones entre los mode- los de sus proteínas séricas y los modelos de peces de vivero. Los - peces salvajes seleccionados eran hembras maduras, capturadas por - electroshock y retenidas durante un periodo de adaptación de 48 horas, antes de sacarles la muestra de sangre.

A un número equiparable de hembras inmaduras procedentes de la población del criadero capturadas por electroshock, se les extrajo la muestra inmediatamente después de la captura. Se tomaron también hembras maduras del criadero por el método de cucharilla " dip net " - útiles para ser comparadas.

Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de peces salvajes y los de ambos grupos del criadero en las fracciones 1 y 6. Los peces del criadero que no habían sido sometidos a electroshock mostraron diferencias respecto de los otros dos grupos en las fracciones 6 y 8.

En la experiencia sobre los diferentes métodos de captura también apareció una diferencia significativa en la fracción 8 - aunque no apareció ninguna en la fracción 6. (Thurstone 1967).

Al interpretar estas diferencias entre los modelos de peces de criadero y peces salvajes, hay que tener en cuenta las diferencias de dieta de estos dos grupos. Los peces del criadero se mantuvieron a base de bolitas de harina, en oposición al forraje ingerido por los peces salvajes.

Las diferencias de modelos se manifestaron entre muestras de suero procedentes de carpas alimentadas con alimentos diferentes conteniendo cantidades variables de proteínas, (Lysack y Wojcik 1960), y también entre lampreas de mar que habían estado en ayunas durante periodos diferentes de tiempo, concurrendo estados diferentes de desove. (Thomas y Mac Crimmon 1964).

Falta de alimentación en peces cultivados.-

El resultado de esta experiencia llevada a cabo por (Masaru Fujiya 1961) sobre peces de la especie *A. myriaster*, aparecen en la fg. 6, como puede apreciarse no se nota nada anormal en el diagrama hasta el día sesentaitresavo, en que las bandas se desvían.

Se pensó que probablemente las experiencias no cubrirían un periodo más largo de ocho semanas y que los peces habrían sido alimentados.

Se concluyó que las diferencias respecto a las curvas de control indicarian cambios debidos a la exposición a la acción de material tóxico.

Método de captura.-

La experiencia consistió en hacer comparaciones diversas sobre 126 peces, truchas arco iris (*salmo gairdneri*) para determinar los efectos de los diferentes métodos de captura sobre los modelos - del suero sanguíneo.

Los métodos usados fueron : anzuelo y sedal, " gill net ", eletroshock y cucharilla " dip net ". Se hicieron comparaciones entre los modelos de proteínas séricas capturados por estos cuatro procedimientos.

El método de captura de cucharilla " dip net " mostró diferencias significativas respecto de los otros métodos en la fracción 1, del procedimiento de anzuelo y sedal en las fracciones 4 y 10 y - del procedimiento de electroshock en la fracción 8.

Los procedimientos de anzuelo y sedal y electroshock ofre cen diferencias significativas en cada una de las fracciones 4 y 8.

Las dos fracciones que acusaron diferencias significativas en las experiencias de sexo y madurez no muestran tales diferencias - significativas en ésta. (Thurstone 1967).

Previamente se había comunicado la existencia de diferencias significativas en los modelos de proteínas del plasma de truchas arco iris (*salmo gairdneri*) capturados con jabea, anzuelo y sedal y - electroshock. Se había usado electroforesis en papel y se obtuvo un - perfil con cinco fracciones de plasma. (Bouck y Ball 1966). Pero es--tas diferencias en los modelos debidas a los métodos de captura pue--den ser el resultado de las diferentes respuestas hormonales. (Thurs--tone 1967).

Muestreo repetido.-

En el trabajo con trucha arco iris (*salmo gairdneri*), anteriormente citado, se vió que los machos presentaban un aumento significativo en la fracción 10 entre la segunda y la tercera extracción y las hembras ofrecían un aumento significativo en las fracciones 6 y 9 entre la primera y la segunda extracción.

Para determinar el efecto de muestreo repetido sobre los modelos de suero sanguíneo se sometieron tres veces a extracción de muestra cuatro machos maduros y ocho hembras inmaduras. (Thurstone 1967).

Localización de la extracción de sangre.-

Se hizo un análisis comparando los perfiles de ocho hembras inmaduras sometidas a muestreo a partir de la aorta dorsal, con diez hembras inmaduras sometidas a muestreo a partir del corazón para determinar las posibles variaciones resultantes de la localización de la extracción de la sangre.

Se encontraron diferencias significativas en los perfiles de sangre tomados de la aorta dorsal y de la sangre tomada del corazón en las fracciones 4, 8 y 10.

Otras posibles causas de las diferencias en proteínas séricas de pez.-

En el mencionado trabajo sobre trucha arco iris (*salmo gairdneri*) se expone toda una serie de causas adicionales capaces de originar cambios. Sabido es que los modelos de gel en poliacrilamida aportan un mayor número de fracciones séricas.

Se comprobó que realmente no existen dos modelos de - muestras séricas distintas que puedan considerarse idénticos y que pocos, fueron suficientemente semejantes para que no pudiera apreciarse algún grado de diferencia en ellos. Debido a esta gran variedad de diferencias individuales, no ha sido posible caracterizar un modelo normal de electroforesis disco gel para el suero de salmo gairdneri, trucha arco iris.

Los cambios en el perfil pueden producirse por introducción o incremento de una proteína dada, por la eliminación de una proteína determinada o bien por un cambio en la estructura de una proteína, que es motivo suficiente para alterar su movilidad electroforética.

Como resultado de una tensión o esfuerzo se produce un aumento en el flujo endocrino que puede afectar a las proteínas séricas totales. Este cambio no puede medirse por los procedimientos actuales aunque puedan ocurrir cambios medibles en otras proteínas en respuesta a este flujo.

La destrucción del tejido y como consecuencia el flujo de proteínas celulares al torrente sanguíneo, puede ser también una de las causas del cambio en los modelos de proteínas séricas. La lesión puede ser por trauma o bien por degradación fisiológica.

Alguna proteína puede también incorporarse a alguna muestra de suero como resultado de la hemólisis durante la más cuidadosa extracción de sangre.

En varias especies de peces, incluida la trucha arco iris (salmo gairdneri) e híbridos de trucha arco iris, se ha dado el caso de aparición de hemoglobinas múltiples. (Hashimoto y Matsura 1959) ; (Schuman 1959) ; (Buhler 1963) y (Tsuyuki y col. 1965) respectivamente.

Este polimorfismo celular puede ser debido a una hemolisis indetectada o bien a un derrame celular que vierten en ambos casos proteínas al torrente sanguíneo. (Bouck y Ball 1965).

El polimorfismo de la transferrina del suero fué divulgado por (Moller y Naevdal 1966), quienes usaron electroforesis de gel almidón/agar y examinaron el suero de " coalfish " (*gadus virens*) " pollac " (*g. pollachius*) "whiting " (*g. merlangus*). Todos estos tipos de polimorfismos genéticos serian independientes de ciertos tests a los que los peces estarían sujetos y cuya influencia se puede reconocer sobre los datos del test. (Thurstone 1967).

Se apreció la existencia de una fracción de migración lenta en el suero de hembras de salmón " coho " (*oncorhynchus kisutch*) de 2.5. años de edad, se pensó que podría tratarse de lipovitelina. En esta experiencia se eliminaron las muestras séricas de peces que estaban desovando y de aquellas que acababan de desovar. (Vanstone y Chung-Wai Ho 1961).

Igualmente se comprobó la aparición de una fracción de migración rápida en plasma procedente de lampreas maduras (*petromyzon marinus*) ; (Rall y col. 1961). Años más tarde se encontraron en estas mismas especies diferencias apreciables en los modelos de sueros de peces de sexo distinto, en la fase de pre-desovación que no parecían en la fase de maduración.

En un estudio sobre ocho peces estonianos no se encontraron diferencias intraespecíficas entre machos y hembras inmaduros pero las albúminas y las globulinas de migración rápida aumentaron durante el periodo de desovación. (Kirispun 1964).

Se ha apreciado la existencia de una fracción separable sobre gel de poliacrilamida que parecía ser similar a la fracción característica de migración lenta de hembras " a punto " encontrada en salmo *gairdneri*. Esta fracción no ha sido identificada. (Tsuyuki 1966).

En el trabajo sobre "dace" (*leuciscus, leuciscus*), reiteradamente citado, se afirma que aparentemente no existe correlación entre los cambios de temperatura y la proporción A/G como habían publicado en el caso de las truchas (Meisner & Hickman 1962). Durante los meses de diciembre a abril hay una reducción relativa de la albúmina, es decir los meses más fríos del año. Varios autores han confirmado la existencia de una disminución en la cantidad de albúmina y/o en la proporción A/G durante el invierno. (Saito 1957) ; (Khailov - 1963).

Durante este tiempo ocurre también una disminución general en todas las proteínas séricas, (Saito 1957) ; (Sorvachev 1957) ; (Flemming 1958). Como las proteínas de la dieta son como un precursor directo de las proteínas del plasma, (Harper 1965), estos efectos en invierno o a bajas temperaturas parecen lógicos ya que el alimento de los peces en esta época está notablemente reducido. Y en efecto se ha comprobado que el efecto de la inanición sobre las proteínas séricas es comparable al efecto de hibernación, (Sorvachev 1957) ; (Love 1970). Cuando a ratas hambrientas se les permitía reanudar su alimentación - una proporción notable de las proteínas sintetizadas de nuevo en el hígado es albúmina. (Wilson y col. 1967) ; (Harris J.E. 1974).

A través de todos estos datos se aprecia una variabilidad considerable en los modelos de las proteínas del suero de trucha arco iris (*salmo gairdneri*) procedentes de una población de criadero y una ulterior variación entre ésta población y un grupo de truchas arco iris salvajes. Se notó que las variaciones en peces de agua salada eran menores que las encontradas en peces de agua dulce, de donde se deduce que los peces dulceacuícolas ofrecen una diversidad genética mayor que los peces de agua salada. (Tsuyuki y Roberts 1966).

Es un hecho que los peces cultivados tales como la carpa ofrecen muchas diferencias individuales mientras que los peces salvajes presentan modelos más estables. (Masaru Fujiya 1961).

Desde el punto de vista biológico las variaciones indivi
duals de las diferentes especies de peces es el problema más impor-
tante a la hora de interpretar resultados.

I.2 RADIACIONES IONIZANTES Y SU ACCION SOBRE LAS PROTEINAS Y OTRAS MAGNITUDES DEL SUERO DE MAMIFEROS.

I.2.1. Naturaleza de las radiaciones ionizantes e interacción con la materia.

Se intenta aqui desarrollar simplemente de una manera somera la acción de las radiaciones ionizantes sobre la materia, puntualizando no obstante las características esenciales del fenómeno.

Cualquier radiación ionizante corpuscular ó electromagnética se puede considerar en cuanto a su interacción con la materia se refiere, como una partícula de masa m , carga Ze y velocidad v . Las radiaciones alfa, beta, así como protones y deuterones etc. son esencialmente partículas cargadas.

La radiación alfa está compuesta por núcleos de Helio de gran poder ionizantes y capaces tambien de excitar a los átomos. Su recorrido es corto debido precisamente a su gran capacidad de ionización, que provoca una pérdida súbita de energía.

La radiación beta consiste en una emisión de electrones procedentes del núcleo de ciertos átomos. Lo mismo que las radiaciones alfa producen ionización y excitación de los átomos pero en menor escala que aquellas. Su recorrido es por ello más largo ya que no pierde tan pronto su energía.

En el caso de los neutrones se trata de partículas sin carga eléctrica. Teniendo en cuenta la naturaleza ligera de todos los átomos que componen el material biológico, parece probable que el mecanismo de interacción sea el de colisión elástica, tratándose de neutrones moderadamente energéticos. Como en los tejidos de los animales el elemento mayoritario es el Hidrógeno las colisiones originan protones. Estos protones llevan carga positiva, atraviesan los tejidos y crean una elevada densidad de iones.

Finalmente están las radiaciones X y gamma, constituidas ambas por fotones electromagnéticos, son simplemente una radiación. Su energía oscila entre 0.3 y 5 MeV. Si la energía es menor de 0.3 - se manifiesta efecto fotoeléctrico y la absorción del cuanto causa - la ionización del átomo, emitiendo un electrón.

Cuando la energía es mayor, el fotón y los electrones li bres entran en colisión (efecto Compton), causando deflexión del e- lectrón y del fotón. Los rayos X y gamma penetran profundamente en - el material de baja densidad la profundidad depende del voltaje, en consecuencia la transferencia de energía por unidad de longitud de - trayectoria, varia, siendo poca para radiaciones duras o de poca lon- gitud de onda. Estas radiaciones penetran más profundamente que las partículas cargadas porque no reaccionan inmediatamente con la materia dentro de la cual penetran.

En última instancia la interacción de las radiaciones io nizantes con la materia se puede considerar como una interacción entre la materia y partículas cargadas, dotadas de gran energía, pres- cindiendo incluso de la propia naturaleza de las radiaciones ionizantes.

La probabilidad de que en una interacción entre la parti- cula cargada rápida y el átomo tenga lugar una transferencia de ener- gía es directamente proporcional a la carga de la partícula rápida - Ze e inversamente proporcional a su energía cinética y al valor de - energía transferido.

$$d\phi = \frac{2\pi e^2 (Ze)^2}{m v^2} \cdot \frac{dW}{W^2}$$

e = carga del electrón ; m = masa del electrón ; Z = multiplicidad - de carga de la partícula ; W = energía del átomo ; v = velocidad de la partícula.

El número de transferencia energética o energía absorbida por unidad de volumen en un material dado depende de Z , número atómico efectivo y del número de átomos por unidad de volumen N . (Pollard 1970).

$$dy = NZd\phi = \frac{2\pi e^4 Z^2}{m v^2} NZ \frac{dW}{W^2}$$

A partir de estas consideraciones se llega a la ecuación de Bethe Bloch, que expresa cómo la transferencia lineal diferencial de energía depende en lo que a material absorbente se refiere, exclusivamente, de su densidad electrónica y de su potencial de ionización medio. (Dertinger 1970).

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^2 (Ze)^2}{m v^2} NZ \left(\ln \frac{2m v^2}{I} - \ln (1 - \beta^2)^2 - \beta^2 \right)$$

$$\beta = v/c ; I = \text{potencial de ionización medio} ; N = \frac{\text{número de átomos}}{\text{cm}^3}$$

A la vista de esto podemos apreciar cómo la absorción de las radiaciones ionizantes es un fenómeno puramente másico que depende de la densidad electrónica por unidad de volumen del material de que se trate.

No hay por tanto especificidad a nivel molecular ni incluso atómico aún tratándose de materiales biológicos, ya que la diferencia entre los números atómicos de los elementos presentes en dichos materiales suele ser muy pequeña. Tan sólo cabría una posibilidad mayor de interacción tratándose de P ó bien de S frente a los de C, H y O.

I.2.2. Los seres vivos pluricelulares como blanco de la acción ionizante.

La radiación ionizante produce en organismos vivos pluricelulares una serie de lesiones perfectamente localizadas, dentro de la jerarquización molecular de la célula en general y sobre ciertas células del organismo en particular.

El estudio de los efectos producidos por las radiaciones ionizantes sobre los seres vivos puso de manifiesto una serie de hechos :

. Las lesiones sobre las moléculas o estructuras moleculares de la célula que están presentes en gran número, y cuya existencia está programada y producida por otra molécula o estructura, no son importantes. Puede suceder que dentro de cada espacio, tan sólo algunas unidades aparezcan dañadas, tal es el caso de las proteínas y de algún ácido nucleico tipo RNA.

. Las lesiones en moléculas o estructuras cuya especie esté representada por un único o muy pocos ejemplares y que además dependa de sí misma para su reproducción, tiene mayor trascendencia. La importancia en definitiva depende de la significación de esa molécula en la célula, tal es el caso del DNA.

. Como consecuencia de lo anterior si bien dependiendo de la intensidad de la lesión, sólo cuando ese DNA alterado se manifieste (y lo hará de una manera anómala) podrá apreciarse la lesión, desencadenando procesos irreversibles, importantes, que pueden ocasionar la muerte de la célula.

. Existen sistemas de reparación automática de las lesiones producidas que se disparan como consecuencia de la misma radiación y que son eficaces a determinadas dosis.

Dentro de la organización funcional de los vertebrados - podemos considerar tres tipos de células : las que se están dividiendo y multiplicándose constantemente (epitelio basal del intestino y fracción de Stem Cell activos de los órganos hematopoyéticos), las -

que lo hacen de una manera más o menos continuada (las gónadas) y las que normalmente ni se multiplican ni se dividen una vez que el animal ha alcanzado el estado adulto o bien lo hacen muy lentamente .

Los dos primeros tipos de células van a ser el blanco fundamental de la radiación y las lesiones producidas en ellas se manifestarán rápidamente ya que están en trance de división. No sucede lo mismo con el tercer grupo, en este tipo de células las lesiones tan sólo se manifestarán tanto en cuanto afecten de una manera particular a alguna reacción en concreto, o bien, cuando las dosis sean lo suficientemente altas como para provocar un colapso total en la dinámica celular.

Los vertebrados poseen órganos que cumplen funciones diferentes pero al mismo tiempo relacionadas entre sí mediante una íntima comunicación a través de sus redes arteriales y venosas, enviándose continuamente comunicación e intercambiando material energético. En este sentido, cualquier evento producido en una parte determinada del organismo, puede ser objeto de estudio a partir de las manifestaciones aparecidas por este sistema de intercomunicación en otros muchos, especialmente en los componentes sanguíneos y concretamente, en las proteínas plasmáticas.

Hemos de tener en cuenta, según se ha comprobado en experiencias realizadas sobre proteínas marcadas con isótopos radiactivos, que las proteínas plasmáticas, en virtud de la posibilidad que tienen de atravesar las paredes de los capilares, se encuentran en equilibrio con una cantidad igual de las mismas proteínas situadas en los líquidos intersticiales y en la linfa. Sirven además como elementos de nutrición en el recambio proteico celular a que obliga el metabolismo.

Las proteínas plasmáticas junto con las de los líquidos intersticiales y la linfa constituyen así un sistema proteico, el - de las proteínas extracelulares, que está en íntimo contacto y equi-
librio con los tejidos del organismo que constituyen tanto los orga-
nos formadores de estas proteínas (higado principalmente y retículo
histiocitario y linfoide) como los que podríamos llamar consumido--
res o utilizadores de ellas.

I.2.3. Efecto de la radiación ionizante sobre las proteínas séricas totales.

El efecto inmediato de la radiación gamma sobre la tota-
lidad de las proteínas séricas de los animales es un descenso desde
los dos a los cuatro días subsiguientes a la radiación. Esta dismi-
nución en ocasiones puede venir precedida de una subida pequeña y -
transitoria.

La concentración de albúmina disminuye mucho más que la
de las globulinas y en consecuencia la proporción albúmina/globulina
disminuye. (Cornatzer Engelstad y Davison 1953) ; (Kohn 1950) ; (Kohn
1951) ; (Prosser 1947) ; (Soberman 1951) ; (Stender 1952) ; (Supplee
1952).

La técnica de electroforesis ha permitido un estudio -
más concreto de los cambios producidos en las proteínas séricas : ra-
tas, (Fischer 1955) ; (Glinos 1963) ; (Hohne 1955) ; (Höhne 1952) ;
(Kashkin 1966) ; (Peters 1960) ; (Roesler 1967) ; (Sassen 1963) ; --
(Westphal 1953) ; (Winkler 1956) ; hamster, (Ditzel 1962) ; ratones,
(Grabar 1963) ; (Mathé 1959) ; (Sassen 1966) ; cabras, (Waldschmidt
1961) ; monos, (Leone 1959) ; perros, (Goldwater 1957) ; (Muntz 1949)
; conejos, (Mac Laughlin 1957) ; y el hombre. Todos ellos manifiestan
una disminución en la albúmina y un aumento variable en α y β globu-
linas.

Aunque se notó una ligera caída en la albúmina y una elevación en α_2 globulinas, (Glinos 1963), al cabo de 24 horas de la exposición, los cambios en las proteínas séricas no son normalmente notables hasta los cuatro días después de la exposición.

Las γ globulinas en general decrecen después de la radiación, pero una infección o autoinmune respuesta (Ghossein 1963) ; (Mathé 1959) ; (Sassen 1963) ; puede ocasionalmente causar un aumento en la fracción de globulina (y en prealbúmina).

Las prealbúminas que representan tipos diferentes de proteínas en especies diversas, normalmente decrecen en ratones y ratas, (Sassen 1963, 1966) pero se conoce muy poco acerca de su comportamiento en otras especies.

Se ha observado un aumento en glicoproteínas, (Evans 1968) (Glenn 1960) y especialmente en lipoproteínas de conejos, (Andreoni - 1955) ; (Hayes 1955) ; (Hewitt 1953) ; (Wiehrmann 1958), perros, (Entenman 1955) ; (Herwit 1956) ; y ratones (Rehnborg 1962), irradiados. La opalescencia del suero en conejos irradiados sugiere un aumento en lipoproteínas y es un síntoma de muerte inmediata. (Rosenthal 1949).

El aumento en lipoproteínas puede estar relacionado con la lesión muscular posterior a la radiación, (Milch y col. 1954, 1956) ; (Weiner y col 1955) pero más probablemente refleja la inanición y la incapacidad de los animales irradiados de adaptar su metabolismo al estado de inanición. La dirección y curso temporal de los cambios en las lipoproteínas difiere de unas especies a otras, (Entenman y col. - 1955) ; (Hewitt y col. 1956) ; conejos, (Andreoni y col 1955) ; (Arient y col 1966) ; (Hewitt 1956) y perros, (Goldwater y col 1956). En ratones las lipoproteínas de baja densidad aumentan y las lipoproteínas de densidad alta disminuyen, (Rehnborg y col 1962), pero en conejos, ambas lipoproteínas de baja y alta densidad aumentan. (Hayes y col. 1955) ; (Hewitt 1956).

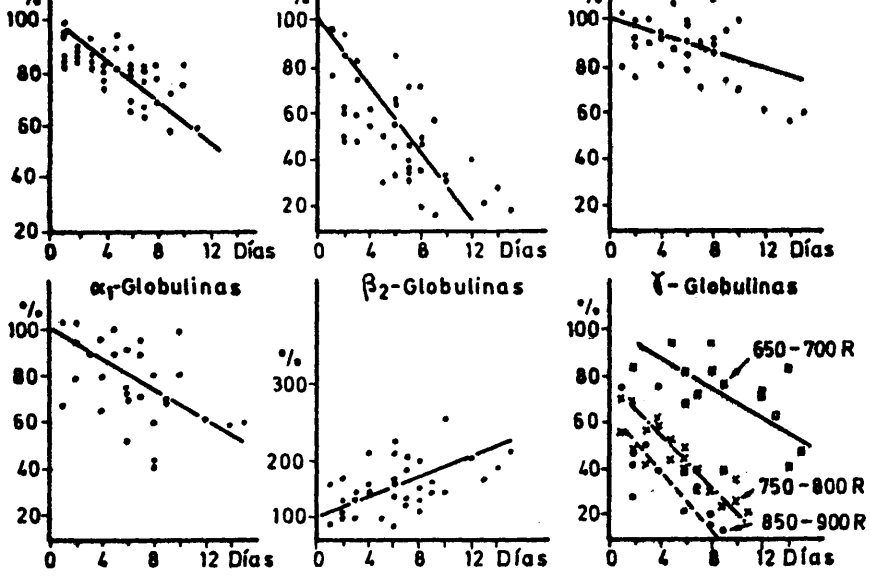
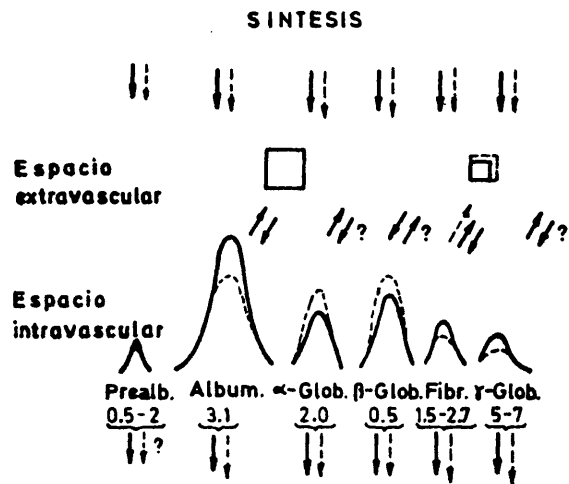


Fig. 7

Efecto de la radiación X sobre las proteínas de ratones en función del tiempo



Hígado 10-20 % x = N
G.I. Tracto 30-50 % x > N
Riñón = 10 % ?
Otros órganos = 20 % ?

Fig. 8

Esquema del metabolismo de proteínas séricas en la rata .

La fg. 7 muestra los cambios en la concentración, en función del tiempo, de : proteínas totales, prealbúmina, albúmina, beta globulinas, y gamma globulinas, en el suero de ratones sometidos a radiación X (600R). Notese que las proteínas totales, albúmina, prealbúmina, alfa y beta globulinas disminuyen, mientras que beta sub-dos globulinas aumentan.

I.2.4. Causas capaces de originar alteraciones en las proteínas séricas despues de la irradiación.

Las variaciones en la concentración de las proteínas del suero pueden proceder de alteraciones en la síntesis, catabolismo ó bien del intercambio entre el espacio intra y extravascular.

La fg. 8 muestra un esquema semicuantitativo, simplificado, del metabolismo de proteínas séricas en la rata. Las proteínas - del espacio intravascular vienen representadas por sus bandas electroforéticas, y las del espacio extravascular (albúmina y fibrinógeno solamente) por cuadrados, hay que advertir que las dimensiones del pool del espacio extravascular son dudosas. Las proporciones de síntesis y catabolismo, vienen aproximadamente indicadas por la longitud de las respectivas flechas. Las cifras que están sobre las flechas, indican - más o menos la mitad del tiempo de vida de las proteínas en días. Los cambios posteriores a la radiación aparecen en línea de puntos y los - controles en línea de trazo continuo.

La síntesis de proteínas séricas ha sido estudiada empleando metionina, lisina, glicocola, fenilalanina, triptofano, etc. marcados como precursores.

La incorporación de metionina al total de proteínas y en - las albúminas, baja despues de la irradiación, (Mehran y col. 1968) ; (Saritskin y col. 1964) ; (Smolichev y col. 1957) ; (Stevens y col. - 1953) ; (Zamayatkina y col. 1964) ; pero en α y β globulinas es normal

o aumenta. (Kollmorgen y col. 1964) ; (Radionov y col. 1959).

Por otro lado la incorporación de fenilalanina ó triptofano en la albúmina es normal en el animal global, (Reuter y col. - 1967), ó en hígado perfundido, (Reuter y col. 1966) ; (Sassen y col. 1965), pero en α y β globulinas está elevado. Cuando la glicocola se utiliza como precursor se da una incorporación alta a los tres días y una incorporación baja en el tiempo subsiguiente a una exposición de 300 r de neutrones. (Baker y col. 1967).

Los conjuntos de alanina y triptofano no aparecen excesivamente alterados en el hígado despues de la radiación, (Reuter y col. 1967), sin embargo el metabolismo de la metionina está probablemente modificado. (Neuwirt y col. 1963). Así, muy posiblemente la síntesis de proteínas séricas no está disminuida inmediatamente despues de la irradiación, en el caso de ciertas fracciones, incluso - puede estar incrementada.

La síntesis de albúmina en hígado perfundido, está inalterada y la de glicoproteínas ácidas aumentó, (John y col. 1968), sin embargo la recuperación albuminoidea en ratas que presentaban un empobrecimiento de albúminas está retardada. (Staehler y col. 1968).

La incorporación de glucosamina a las β globulinas está elevada pero entre fracciones comparables de γ globulinas está ligeramente disminuida. A pesar de la considerable depresión de niveles de anticuerpos en animales irradiados, (Hektoen y col. 1915) ; (Taliaferro y col. 1964), se encontró que la incorporación de triptofano y fenilalanina en las γ globulinas está incrementada despues de la irradiación. (Reuter y col. 1967).

Quizá no todas las γ globulinas portan información inmunológica y el porcentaje de γ globulinas no específicas puede aumentar despues de la irradiación.

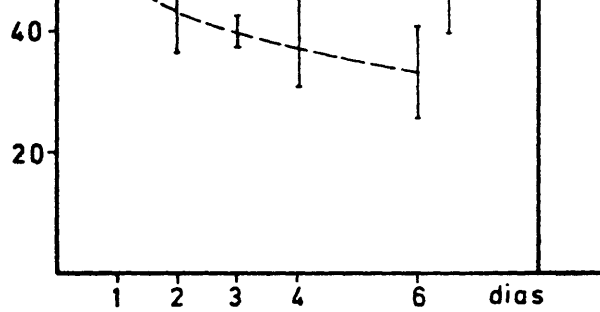
La determinación de la proporción de desaparición de las proteínas marcadas a partir del suero o bien del organismo en general, nos permite evaluar la cantidad de proteínas metabolizadas, así como la pérdida en los compartimentos extravasculares del organismo. La eliminación y destrucción de proteínas por el hígado aislado, no está claramente alterado en ratas irradiadas, (Reuter y col. 1967). Por el contrario las proteínas marcadas, especialmente la albúmina, (Lefaure y col. 1966) ; (Stevens 1953) ; (Szabo y col. 1958), fibrinógeno, (Shaber y col. 1963) ; y γ globulinas desaparecen más rápidamente de la circulación del animal total después de la irradiación, aunque la radioactividad del organismo total no disminuye proporcionalmente (Gerber y col. - 1966) ; (Reuter 1967).

La pérdida de proteínas en el espacio extravascular es una justificación para estas explicaciones, (Shaber 1963). Como se discutió en otra parte la permeabilidad de ciertos tejidos (piel, intestino y cerebro) a las macromoléculas aumenta después de la irradiación, sin embargo medidas directas del espacio extravascular con albúmina marcada indicaron un descenso más bien que un aumento. (Sassen y col. 1968).

En animales irradiados, las proteínas marcadas con ^{131}I y sus productos de degradación, aparecen en el contenido gástrico de donde fueron eliminados, debido en parte a la retención gástrica. (Telia y col. 1969). El recuento para evaluar los productos de degradación de las proteínas en todo el cuerpo no es muy satisfactorio en animales irradiados.

I.2.5. Efecto de las radiaciones ionizantes sobre otras magnitudes del suero de mamíferos.

I.2.5.1. Fosfatasa alcalina.



Variación de la fosfatasa alcalina en función del tiempo postirradiación

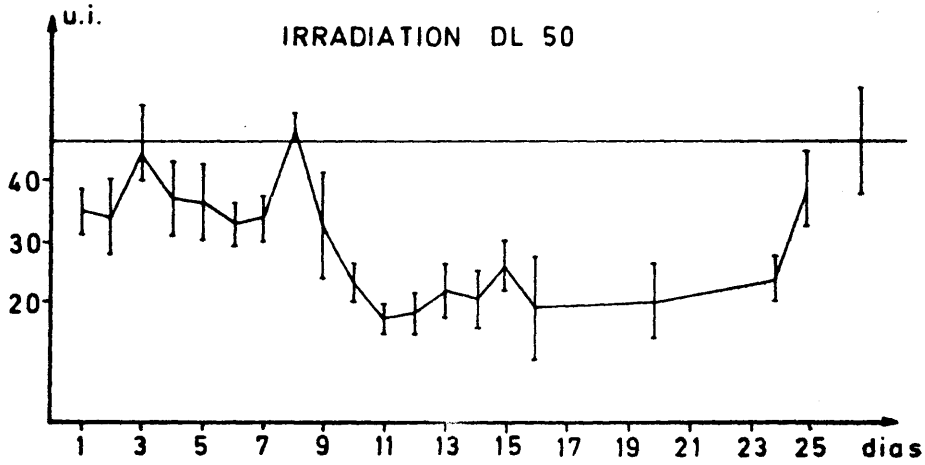


Fig. 9

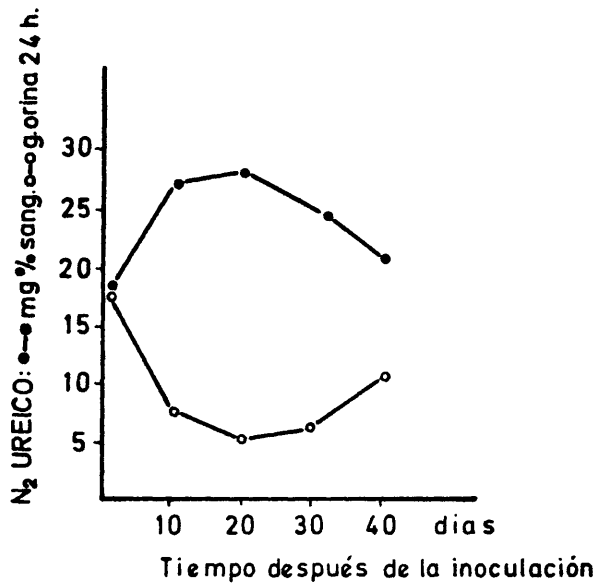


Fig. 10

Variación del N₂ ureico en función del tiempo .

La fosfatasa alcalina del suero de los animales evoluciona al ser sometidos éstos a la radiación ionizante.

En ratones sometidos a la acción de rayos X (600 r), el efecto inmediato consiste en una caída de la concentración en sangre, más pronunciada a partir de la segunda a la sexta hora - postirradiación; posteriormente sufre dos o tres oscilaciones sucesivas seguidas de un descenso muy notable, llegando a menos de la mitad de la concentración inicial 11 días después de la irradiación. Permanece así hasta el día 24 en que asciende para recuperar finalmente el valor del punto de partida al cabo de 25 días (Drouet J. Legrand A. Brunet G. Goyffon M. 1972). fg. 9.

I.2.5.2. Urea.

Otra manifestación subsiguiente a la radiación ionizante de mamíferos, ratas concretamente, es la variación de la concentración de urea en sangre.

Aunque el N_2 procedente de la urea en sangre aumenta - en los periodos de tiempo en que se producen cambios en la concentración de las proteínas séricas, se supone que no es consecuencia de un acelerado catabolismo proteico sino más bien una retención - del metabolito, ya que disminuye paralelamente su eliminación por vía renal (Galarza A. Carriazo D. Feijoo B. 1971). fg. 10.

En el mismo sentido de posible aumento de la concentración de la urea en sangre, apunta Gerber (Gerber G.B. Altman K.I. - 1970) y Hempelmann (Hempelmann L.H. Lisco H. 1952).

I.2.5.3. Hemoglobina.

También la hemoglobina ve alterada su concentración en sangre como efecto inmediato de la radiación ionizante.

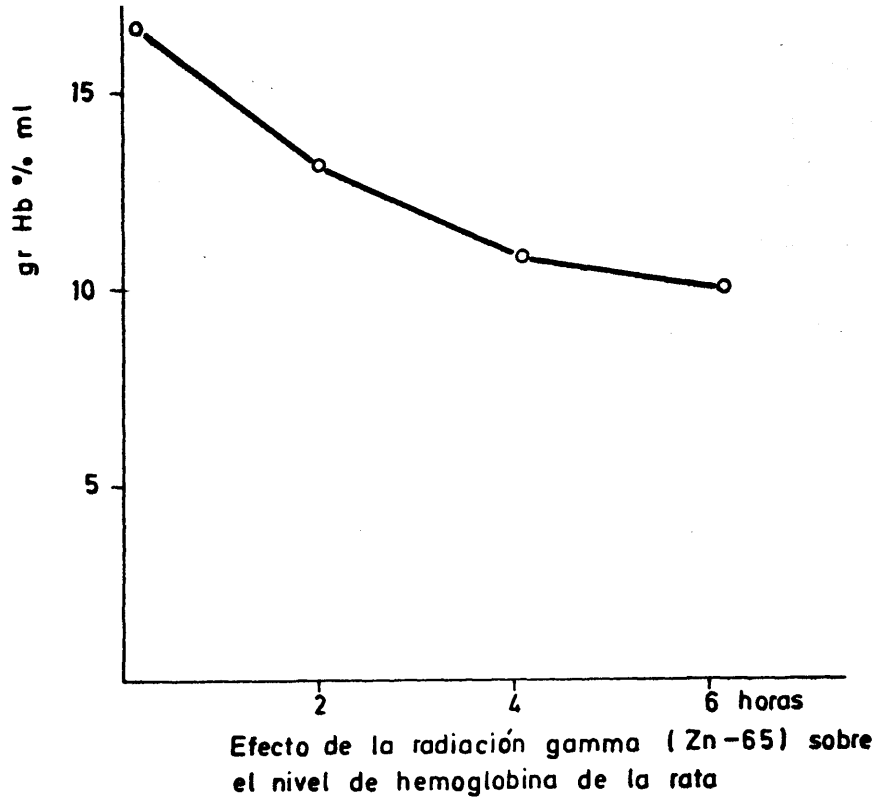


Fig.11

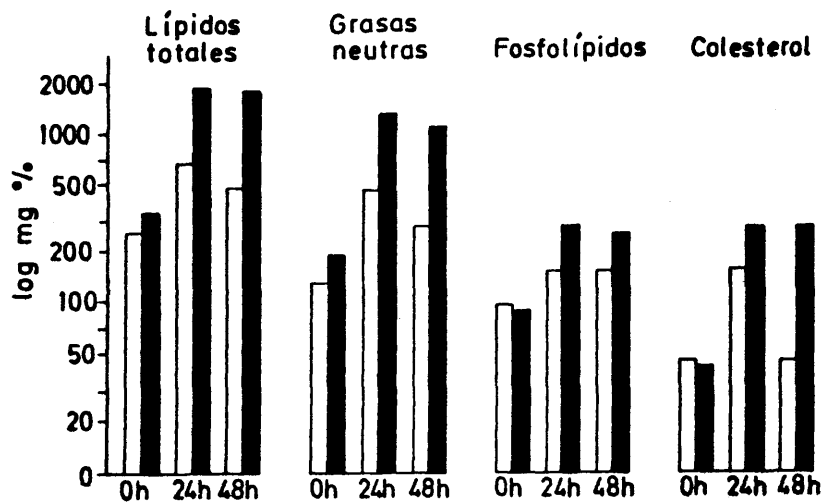


Fig.12

Variación de los niveles de diferentes lípidos séricos de conejos irradiados (1000 rads). Las barras negras y blancas corresponden respectivamente a animales que murieron y que sobrevivieron .

Se trata de ratas blancas sometidas a la radiación ionizante, cuya concentración de hemoglobina en el suero desciende $1/3$ de su valor inicial a lo largo de un periodo de tiempo de 6 - horas despues de la radiación (Galarza A. Carriazo D. Feijoo B. - 1971). fg. 11.

I.2.5.4. Lípidos.

El colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos y lipoproteínas, vienen elevados en sus concentraciones séricas despues de una irradiación total de conejos (Lucio N.R. Simon K.A. 1957).fg.12

El aumento de los lípidos del plasma se debe probablemente a un aumento en la síntesis " de novo ", ya que el palmitato marcado desaparece de la sangre en proporción normal, lo cual indica que su utilización está inalterada. Sin embargo la incorporación de precursores lipídicos viene aumentada (Gerber G.B. Altman K.I. 1970).

La dirección de los cambios y el tiempo en que se producen en las lipoproteínas difieren de unas especies a otras (Entenman 1955) ; (Hewitt 1956). En ratones las lipoproteínas de densidad baja aumentan su concentración despues de la irradiación, en los de densidad alta disminuye la concentración (Rehnborg G.S. y col. 1962).

I.3. EFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE LAS PROTEINAS SERICAS DE PEZ.

I.3.1. Efecto de la radiación γ sobre proteínas séricas totales.

El estudio se realizó sobre "bluegill" (*Lepomis macrochirus*). Se emplearon peces de un año de 50 a 75 cm. de longitud, estos peces fueron climatizados en acuarios a 20°C durante 30 días (Ulrrickson G.U. 1971).

Después de la aclimatación se expusieron a la acción de rayos gamma en tres grupos distintos, unos a 1000 r, otros a 2000 r y finalmente un tercer grupo a 3000 r a razón de 167 r/mtº.

En el análisis final el registro se dividió en tres partes : gamma globulinas, beta globulinas y alfa globulinas complejo albuminoideo. La línea de separación de las α globulinas y albúminas era confusa hasta que el complejo fué considerado como una unidad.

Durante la experiencia murieron veintiun peces del grupo de los 3000 r y nueve del grupo de los 2000 r. Se emplearon solamente datos procedentes de los once primeros días de la experiencia, ya que la mortandad en el grupo de los 3000 r obligó a terminar la experiencia en este grupo al cabo de dicho tiempo.

Como se puede apreciar en la fg. 13 hubo un descenso en el nivel de las proteínas séricas de los peces control durante los diez primeros días, a partir de los cuales dicho nivel aumentó. Al cabo de diecisiete días se alcanzó un nivel equivalente al del punto de partida de la experiencia.

El descenso inicial puede ser una manifestación del manejo y tensión de malla o bien de degradación.

Las proteínas séricas del grupo de peces de 1000 r disminuyeron a lo largo de la experiencia y alcanzaron un nivel --

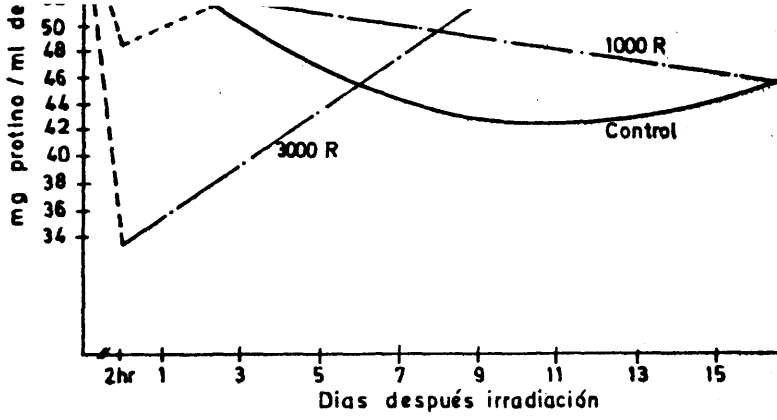


Fig. 13

Efecto de la radiación total sobre las proteínas séricas de " bluegill "

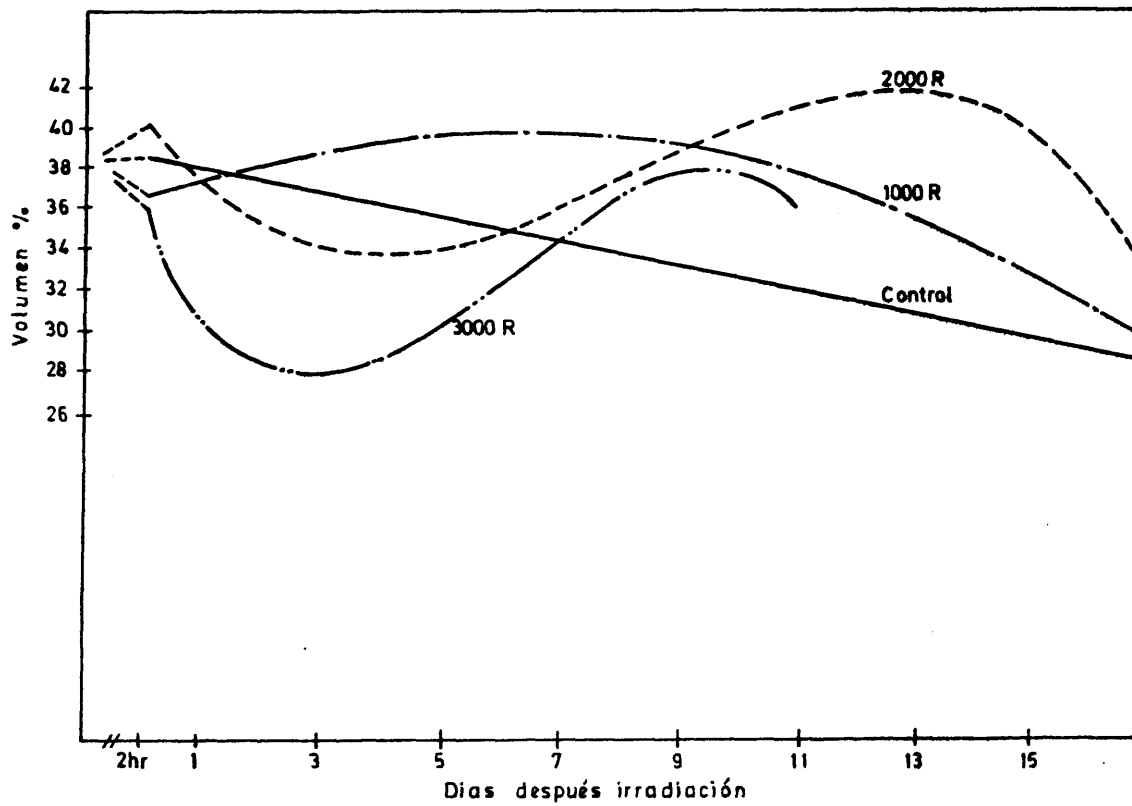


Fig. 14

Efecto de la radiación total sobre el volumen del hematocrito .

significativo, más alto que los peces control después de cinco días.

Las proteínas séricas del grupo de peces de 2000 r disminuyeron suavemente las dos primeras horas, después aumentaron hasta los diez días, siendo su nivel significativamente más alto que el de los peces control desde los siete días hasta el final de la experiencia.

El nivel de proteínas séricas del grupo de peces de 3000 r disminuyó radicalmente en las dos primeras horas, después aumentó en los once días siguientes.

Los peces sometidos a la acción de 3000 r difieren significativamente del grupo de peces del control en cada periodo de prueba, excepto después de 5, 7 y 9 días cuando el nivel ascensional se aproximaba al nivel de control.

I.3.2. Hematocrito.

Los valores del hematocrito de los peces control disminuyeron a lo largo de la experiencia según muestra la fg. 10.

En el grupo de peces de 1000 r el hematocrito aumentó hasta el séptimo día, después disminuyó hasta el final de la experiencia. Las diferencias entre los niveles de hematocrito del grupo de peces de 1000 r y el del grupo de peces control, no fué nunca significativo, más allá de 0.75 de probabilidad.

Los niveles para peces de 2000 y 3000 r disminuyeron durante los tres primeros días, después aumentaron.

Los peces del grupo de los 2000 r no difieren significativamente de los controles hasta los trece o quince días después de la irradiación, mientras que los del grupo de los 3000 r mostraron niveles significativamente más bajos que los controles a partir de los tres a cinco días.

I.3.3. Grupo de peces sometidos a la acción de 1000 r.

Durante las veinticuatro primeras horas siguientes a la radiación no hubo diferencias entre los peces sometidos a 1000 r y los controles. Después de 3 a 5 días el hematocrito y las proteínas totales fueron significativamente más altas que los controles. El incremento en el total de proteínas es debido principalmente a un aumento en β globulinas.

Un aumento en el porcentaje de β globulinas dió lugar a una disminución en el porcentaje de β globulinas-complejo albúminoideo. Sin embargo esto no afectó al área electroforética del complejo o a la cantidad de α globulinas- albúmina en el suero. Este modelo apareció once días después de la irradiación.

En general el grupo de peces sometido a 1000 r difieren exclusivamente de los controles en el porcentaje de las β globulinas, área electroforética total y concentraciones de volumen de β globulina en el suero.

I.3.4. Grupo de peces sometidos a la acción de 2000 r.

Durante las 24 primeras horas descendieron la totalidad de las proteínas séricas, gamma globulinas, beta globulinas, alfa globulinas, albúminas y área electroforética total. Durante esta experiencia murieron seis peces.

Después de tres días las gamma y beta globulinas aumentaron. Durante el resto de la experiencia se notaron aumentos en el hematocrito, proteínas totales, beta globulinas y alfa globulinas - albúminas.

En general podemos decir que los peces del grupo sometidos a 2000 r difieren significativamente de los controles en las proteínas totales, concentración de beta globulinas en el suero y concentración de alfa globulina - albúmina en el suero.

I.3.5. Grupo de peces sometidos a la acción de 3000 r.

La cantidad de proteínas descendió en los peces sometidos a 3000 r en todas las pruebas durante los tres días siguientes a la irradiación. Durante este periodo murieron ocho peces. Cuatro peces murieron entre el quinto y sexto día y nueve entre el décimo y undécimo días.

Como en el grupo de peces sometidos a 2000 r los aumentos ocurrieron a partir del séptimo y hasta el undécimo días.

Aparecen diferencias significativas respecto de los peces del control en beta globulinas y en el complejo de alfa globulina - albúmina.

En general podemos decir que los peces del grupo sometidos a 3000 r respondieron de modo diferente a los controles a un nivel de ≥ 0.90 , en ocho de los doce tests.

I.3.6. Conclusiones.

De la irradiación de todo el cuerpo se infiere una reducción del complejo alfa globulina - albúmina los dos o tres primeros días después de la exposición. A esto siguió un incremento y después un descenso.

Las beta globulinas fué la fracción más sensible y disminuyó radicalmente en las dos primeras horas, después aumentó.

Las gamma globulinas aumentaron durante tres días, después disminuyeron.

Excepto para la fracción de beta globulinas, se observó que se necesitaban exposiciones semiletales para llegar a diferencias significativas entre peces irradiados y los controles. - Las variaciones en la concentración de proteínas estaban en proporción directa con la intensidad de la radiación. Estos resultados - concuerdan con los obtenidos sobre mamíferos por Baker (Baker y -

col. 1963) ; (Winkler y col. 1956) ; y los estudios sobre peces de Epstein (Epstein y col. 1959).

La reducción inicial en la concentración de proteínas, es probablemente consecuencia del aumento de permeabilidad vascular (Mount y col. 1964). Las disminuciones en las fracciones beta, alfa y albúminas y el aumento en gamma globulinas, indican que se redujeron las proteínas de peso molecular más bajo, mientras que aumentaron las proteínas de peso molecular más alto. La pérdida de albúmina podría explicarse por una filtración a través de la pared gastrointestinal, (Birke y col. 1962) ; (Bromfield y col 1964). Estos investigadores concluyeron que la lesión en el sistema de capilaridad intestinal y epitelio gástrico sucedió por una pérdida excesiva de proteínas.

Los animales de experimentación que recibieron 1200 r tenían una excreción urinaria más alta que los controles, indicando así que 1200 r es una dosis umbral.

Después de la irradiación parece ser que se produce una rotura dentro de las largas cadenas de proteínas en fragmentos que poseen una actividad osmótica considerable. Estos fragmentos salen de los tejidos lesionados llevando consigo considerables cantidades de sodio. La pérdida de sodio y proteínas de una manera continuada aumentó la permeabilidad, bajó la presión osmótica y condujo a una pérdida de agua. (Bowers 1951).

En el presente estudio se sospecha que puedan estar lesionados los mecanismos de osmorregulación debido al incremento en el volumen de hematocrito y concentración de proteínas en los grupos de 2000 y 3000 r al ser comparados con los peces control (Ulrickson G.U. 1971).

I.4. EFECTOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE MAMIFEROS.

I.4.1. Tiempo de supervivencia de mamíferos despues de la irradiación.

A fin de encuadrar el estudio sobre peces, se hace una alusión muy somera al efecto producido por estas radiaciones en mamíferos, más concretamente en ratones que es el caso - más ampliamente tratado por los investigadores.

Los animales expuestos a dosis de radiación comprendidas entre menos de 1kr hasta varios kr, morían a los pocos - días de exposición despues de que la capa epitelial del intestino delgado había sido destruida.

El tiempo de supervivencia característico para las - especies : ratón y rata de 3 a 4 días; conejos de indias, hamster y monos alrededor de 5 días, es independiente de la dosis - dentro de la gama total de dosis capaces de ocasionar la muerte gastrointestinal.

Supuesto que la muerte prematura, inmediata, puede - ser evitada, a veces se observa un síndrome gastrointestinal retardado. En estas condiciones las ratas y los ratones mueren al cabo de 5 a 8 días despues de la exposición. (Bond y col. 1965).

Aunque otras regiones del tracto gastrointestinal - sean ligeramente menos radiosensitivas que el intestino delgado, asumen sin embargo un papel más importante en la muerte, solamente en circunstancias especiales, ya que su proporción de reemplazamiento de células es más lento que el del intestino. Así la - irradiación de la región oral o de la cabeza del ratón con 2kr ó más da lugar a la llamada " muerte oral " despues de 9 días, aparentemente porque los animales no son capaces de comer. (Quastler y col. 1959).

I.4.2. Alteraciones morfológicas del intestino delgado de ratas originado por la irradiación.

Algunas células del intestino delgado muestran alteraciones morfológicas después de exposiciones pequeñas, del orden de los 100 r. Los cambios en la población celular llegan a ser altos solamente después de dosis superiores a los 500 r.

Al cabo de un periodo de tiempo comprendido entre las 0 y las 3 horas después de la irradiación se producen las siguientes anomalías :

- . La actividad mitótica queda temporalmente interrumpida, - produciéndose además lesiones en los cromosomas.
- . Aparecen también lesiones en las membranas mitocondrial y nuclear.
- . Las mitocondrias aumentan de volumen.
- . Formación de citolisomas en número superior a los lisosomas.

Entre las 3 y las 24 horas subsiguientes a la irradiación además de las anomalías anteriormente citadas :

- . Sobreviene la muerte de algunas células en la interfase.
- . El núcleo aumenta de volumen.
- . Se produce un aumento relativo del número de células en - forma de copa.
- . Hay alteraciones vasculares, concretamente oclusión.

Después de 1 a 3 días de la irradiación :

- a dosis bajas

- . Se produce una recuperación gradual en la reanudación de la actividad mitótica en las criptas.

- a dosis altas = 1000 r

. Tiene lugar una despoblación progresiva de las criptas y de las vellosidades.

. Las vellosidades aparecen a veces cubiertas por células anómalas.

Después de 3 días subsiguientes a la irradiación.

- a dosis bajas

. Hay una recuperación.

- a dosis altas = 1000 r

. Se produce despoblación de las criptas y de las vellosida--des.

Aunque algunas células del epitelio mueran en la interfase durante la primera hora después de la exposición, este tipo de muerte no es tan importante para el intestino irradiado como la incapacidad de las células para reproducir células hermanas normales y vivas, es la llamada " muerte de reproducción ". (Gerber G.R. Altman K.I., 1970).

I.4.3. Migración de las células del epitelio intestinal después de la radiación.

Ultimamente se ha llegado a un conocimiento más profundo de la cinética celular en el intestino delgado, que ha permitido conocer mejor los cambios histológicos, funcionales y bioquímicos de la renovación celular. (Bond 1965) ; (Patt y col - 1963).

El tiempo de generación en las células del stem en las criptas del intestino delgado de ratón es alrededor de 12 días, de los cuales 7 u 8 son necesarios para la síntesis del DNA.

Algunas de las células recientemente formadas se reproducen, otras se diferencian y se desplazan hacia las vellosidades. Después de cierto tiempo de desplazamiento, alrededor de 2 días, hacia el extremo de la vellosidad, las células son lanzadas al lumen intestinal.

Debido a que después de la irradiación no se forman nuevas células, las vellosidades intestinales llegan a estar des pobladas después de 3 días y el animal muere. Como el desplazamiento de las células desde las vellosidades continúa durante un periodo de tiempo específico, el tiempo de supervivencia en el síndrome gastrointestinal es fundamentalmente independiente de la dosis.

La dosis umbral para el síndrome gastrointestinal puede ser calculada a partir de las siguientes consideraciones - (Hornsey S. col 1963) ; (Vatistas 1968) ; (Withers H.R. 1968).

- . Una cripta contiene 35 células y 7 u 8 criptas aportan células a una vellosidad.
- . Una dosis de 800 a 1000 r bastaría para proporcionar un número suficiente de células incapaces de reproducirse, de tal modo que las restantes no bastarían para mantener la capa epitelial necesitada por las vellosidades para sostener la vida.

La D_0 (dosis letal) de las células de la cripta intestinal no es muy grande, 100 r (Withers y Elkind 1968), lo mismo que las células del stem de médula osea pero las células de la cripta tienen una gran capacidad de reparación (factor de recuperación 60).

Dos consideraciones ponen de manifiesto el papel fundamental de la cinética celular en el síndrome gastrointestinal.

a) Los ratones axénicos, es decir libres de gérmenes, esteriles, tienen una proporción más baja de reemplazamiento celular y un tiempo a través del vello más largo (4.3 días en lugar de 2.1 días) (Matsuzawa y Wilson 1965) que el ratón normal. Probablemente las células son desplazadas más lentamente desde las vellosidades hacia el lumen en ausencia de bacterias. Sin embargo el tiempo de supervivencia después de dosis que producen síndrome gastro intestinal es proporcionalmente más largo (7.3 días en lugar de 3.5 días) y la dosis umbral es a menudo más alta. (Matsuzawa y Wilson 1965).

b) La proporción normal de proliferación celular se altera por irradiación continua pero el epitelio intestinal puede adaptarse rápidamente para dosis relativamente altas (400 r/día) (Lamerton 1966). En tales animales la población celular en las criptas disminuye y las vellosidades se hacen más cortas. Al cabo de pocos días se alcanza un nuevo régimen permanente y el ciclo vital de las células supervivientes se acorta, efecto que puede representar un retorno a un tipo de renovación celular más enérgico. En estas condiciones la capa epitelial se sostiene.

Cuando la irradiación ha terminado las células se regeneran rápidamente y se restablece una población de células epiteliales normal en pocos días. Es probable que el ciclo celular aparezca acortado al regenerarse el epitelio tras una radiación especial. (Gerber G.B.; Altman K.I. 1970).

I.4.4. Metabolismo de macromoléculas en intestino de mamífero irradiado.

Como consecuencia de la pérdida del epitelio intestinal se produce una disminución en el peso de la mucosa, en el contenido de DNA y de proteínas (Conard 1956) ; (Feinstein y Butler 1952) ; (Kay y Entenman 1959) ; (Maisin 1966).

El contenido de DNA es aparentemente un indicador más sensible de la lesión radioactiva en el intestino, (Mole y Temple 1959) que el propio peso.

La incorporación de precursores radioactivos en el DNA se reduce a 10 minutos después de la exposición, (Looney 1966) ; - (Abrams 1951) ; (Maisin 1966) ; (Nygaard y Potter 1959, 1960, 1962); (Sherman y Quastler 1960).

El número de células capaces de sintetizar DNA sigue - siendo el mismo durante este tiempo pero las células en la fase S incorporan menos precursor radioactivo en el DNA, (Looney 1966). - Como resultado el número de células en la fase S se reduce. Hay - que tener en cuenta que la síntesis del DNA después de la irradiación depende no sólo de la dosis, sino también de la proporción de la dosis. (Looney 1966).

La fg. 15 indica la incorporación de timidina tritiada en el DNA, en función del tiempo de exposición a 12.5 r/mt² (círculos) y 300 r, (puntos). La timidina tritiada se inyectó inmediatamente después de la exposición. Adviertase que el efecto de la radiación sobre la síntesis del DNA depende no sólo de la dosis de radiación sino también del tiempo durante el cual se irradia.

Durante las horas subsiguientes a la radiación la incorporación en el DNA disminuye progresivamente, alcanzando un valor mínimo al cabo de 8 horas después de la exposición. Este es el instante en que todas las células que están en la fase S o en G1 - en el momento de la irradiación, han completado la síntesis del - DNA.

El comportamiento subsiguiente a la síntesis del DNA - está determinado por la duración del retraso mitótico y la duración de la regeneración en el epitelio de la cripta.

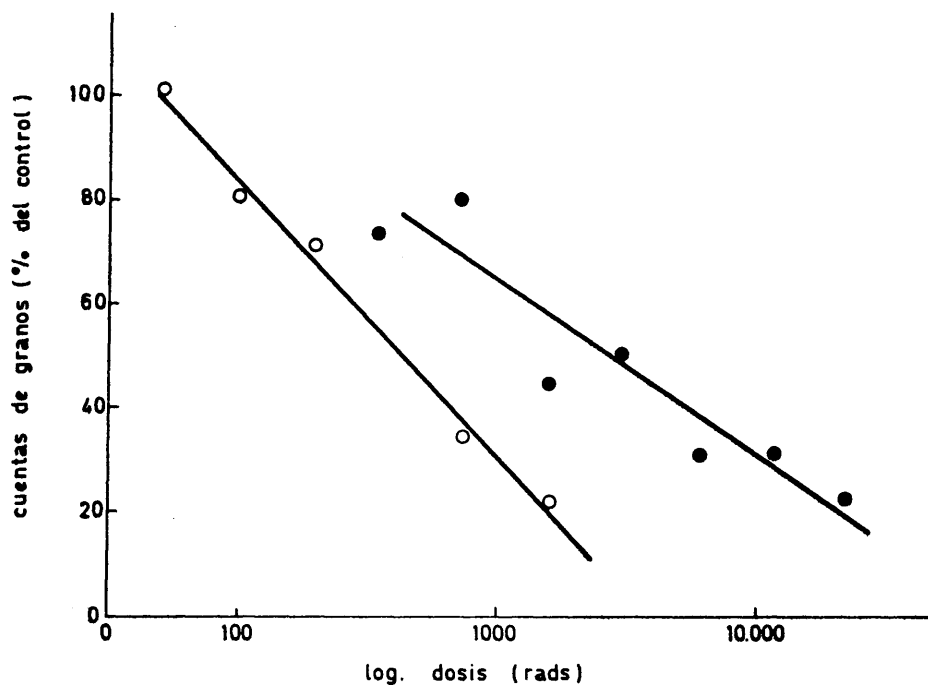


Fig. 15

Incorporación de timidina ^3H en el DNA .

La incorporación de precursores en el RNA, (Abrams - 1951) ; (Maisin 1956), es menos sensible a una acción inmediata de radiación que la incorporación en el DNA. Después de continuar la irradiación la síntesis de RNA disminuye y los precursores de RNA se acumulan. (Rysina 1959).

La síntesis de las proteínas no está alterada inmediatamente después de la irradiación, (Abrams 1951) ; (Gerbaulet 1963) ; (Looney 1966) ; pero disminuye durante el segundo o tercer día en el intestino, (Il'Ina y Petrov 1959) ; (Lipkin y Quastler 1963), cuando las células son ya anómalas y contienen tan sólo unos cuantos ribosomas. Durante la recuperación, la síntesis de proteínas aumenta por encima de lo normal 6 días después de la irradiación con 700 r. (Chaika 1965) ; (Edwards y Gadsden 1964).

I.5. EFECTO DE LA RADIACION IONIZANTE EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE PEZ DORADO CARASSIUS AURATUS.

I.5.1. Tiempo de supervivencia del pez dorado, carassius auratus, despues de la radiación X, influjo de la temperatura.

Se ha dicho que el tiempo de supervivencia de peces, - (Bacq y Alexander 1961) ; ranas, (Patt y Swift 1948) ; y mamíferos invernantes, (Smith y Greman 1951) ; (Doull y Petersen 1952), despues de una exposición total de rayos X, está notablemente umentado por un mantenimiento continuo de los animales en un entorno frio (Hyodo 1965a).

Al contrastar las curvas de mortalidad de peces dorados sometidos a una irradiación de 8 kr de rayos X, mantenidos posteriormente unos, a una temperatura ambiental de 22°C y otros a - 4°C durante un periodo de observación de 200 días siguientes a la irradiación, se llegó a los siguiente resultados :

La mayor parte de los peces dorados que habian sido expuestos totalmente a 8 kr de rayos X, sobrevivieron durante más de cien días si se mantenian en un entorno de 4°C, el resto de los peces igualmente irradiados murieron dentro de los 10 días subsiguientes al ser mantenidos a una temperatura de 22°C. El entorno térmico frio inhibió el desarrollo de la lesión histológica del epitelio - intestinal que ocurrió en un entorno caliente (Hyodo 1965a).

Si los peces irradiados que habian sido mantenidos a - 4°C durante 40 a 100 días se trasladaban a entornos de 22°C morian dentro de los 10 días subsiguientes al traslado, mostrando en el - epitelio intestinal una lesión típica (Hyodo 1965a).

La diferencia en la duración del tiempo de superviven-
cia entre peces mantenidos a 22°C y 4°C está relacionada con la di
ferencia que media entre la irradiación y la aparición de las le--

siones histológicas intestinales en ambos casos. Esto hace suponer que en peces dorados como en mamíferos la lesión intestinal está directamente relacionada con la muerte radioactiva, al menos para dosis comprendidas entre 4 y 32 kr (Hyodo 1965b).

Se observaron alteraciones en la actividad de la fosfatasa ácida y de la fosfatasa alcalina en las células del epitelio intestinal de peces dorados mantenidos a temperaturas diferentes - despues de la radiación X pero no se encontró una correlación directa entre los cambios histoquímicos en la actividad de estas enzimas y el desarrollo de los cambios histológicos del intestino - despues de la irradiación.

Esto hace suponer que probablemente la reducción del número de células epiteliales despues de la irradiación juega un papel más importante en la muerte intestinal radioinducida que el cambio en la actividad de la enzima en las células (Hyodo 1968).

I.5.2. Cambios histológicos en el epitelio intestinal, influjo de la temperatura.

El confinamiento de peces dorados de control, no irradiados a una temperatura de 4°C durante un periodo de 200 días, no puso de manifiesto cambios histológicos perceptibles. Sin embargo en peces irradiados mantenidos a 4°C durante un periodo de tiempo similar, 200 días, se desarrollaron notables lesiones intestinales, si bien al cabo de 100 días de la irradiación, el epitelio intestinal estaba aún escasamente afectado.

Las células epiteliales se ordenaron con regularidad, mostrando cada una un núcleo oval, localizado cerca de la membrana basal. No obstante entre los 40 y 100 días despues de la irradiación

la cromatina del núcleo de las células epiteliales se tiñó fuertemente con hemateína, formando grupos en lugar de estar distribuida por igual en las células del epitelio normal (Hyodo 1965a).

Al cabo de los 200 días, los cambios en el intestino de peces mantenidos a 4°C eran similares a los que presentaban los peces mantenidos a 22°C, ocho o diez días después de la irradiación, a saber :

. Los pliegues de la mucosa intestinal se redujeron en altura, estaban aplanados.

. Las células del epitelio intestinal estaban aumentadas de tamaño pero notablemente disminuidas en número.

. Los núcleos de las células estaban aumentados (Hyodo 1965a).

Está claro que la lesión por irradiación del intestino se desarrolla aún a 4°C, si bien la proporción de desarrollo está intensamente disminuida a esta temperatura tan baja (Hyodo 1965b).

El desarrollo de la lesión por irradiación en animales depende de la proporción del metabolismo celular, tanto, que los tratamientos postirradiatorios que influyen sobre el metabolismo celular pueden alterar la proporción de aparición de los efectos de la radiación ionizante sobre los animales (Bacq y Alexander -- 1961).

I.5.3. Proporción de migración de células epiteliales a diferentes temperaturas.

Varios días después de la inyección de timidina ³H se encontraron algunas células epiteliales marcadas en la zona distal de los plegamientos intestinales. Se vió que la proporción de mi--

gración de células del epitelio intestinal era muy lenta a bajas temperaturas y que la vida de las células llega a ser muy larga.

Se supone que la lesión intestinal por despoblación de células epiteliales puede ser en gran parte responsable de la muerte después de la irradiación con dosis comprendidas entre - los 4 y 32 kr. (Hyodo 1968). Y que probablemente la prolongación del tiempo de supervivencia de peces después de la irradiación - por mantenimiento a temperaturas bajas, sea debido a un retraso en la despoblación de las células intestinales por prolongación del ciclo mitótico y de la vida de las células del epitelio in--testinal.

Por otro lado el porcentaje de las figuras mitóticas marcadas y la proporción de migración de las células marcadas es tá modificado por la irradiación. Está claro pues que el cambio de población celular del epitelio por radiación X está originado principalmente por el cambio en el ciclo mitótico de las células (Hyodo 1968).

I.5.4. Proporción de timidina ³H incorporada por las células del epitelio intestinal durante un periodo de 200 días después de la irradiación.

El examen detallado de autorradiografías de intesti- no de peces no irradiados dentro de las 24 horas después de una inyección de timidina ³H, revelaron que a ambas temperaturas de 22°C y 4°C, el marcado se encontró solamente en las células epi- teliales localizadas en el fondo de los pliegues de la mucosa in- testinal.

También se encontraron solo en esta región del epite- lio intestinal, especialmente en la zona límite entre la parte - de una sola capa y la parte pseudoestratificada del epitelio, fi- guras mitóticas.

Esto hace suponer que la proliferación de las células del epitelio y la síntesis del DNA nuclear tienen lugar en este - area especial del epitelio intestinal.

El marcado alcanzó el máximo en menos de 3 horas cuando los peces se mantenían a una temperatura de 22°C después de la inyección de timidina, pero si la temperatura era de 4°C el máximo se alcanzaba entre las 24 y 44 horas.

Esto indica que la cantidad de timidina ^3H incorporada por las células del epitelio intestinal es más pequeña a 4°C que a 22°C, que el número de células que participan en la etapa de síntesis del DNA por unidad de tiempo es también más pequeño a 4°C que a 22°C, y en definitiva que la síntesis del DNA viene retrasada a baja temperatura (Hyodo 1965b).

A partir de las curvas que dan la variación del número de figuras mitóticas en función del tiempo después de la inyección de timidina ^3H a distintas temperaturas, se llegó a evaluar "grosso modo", la duración de cada uno de los periodos del ciclo mitótico.

Así la duración media del periodo de postsíntesis G_2 a 25°C, 15°C y 6°C era sobre 2, 4 y 44 horas respectivamente, midiendo el tiempo desde la inyección de timidina ^3H hasta la aparición de mitosis marcadas. El periodo de mitosis M a 25°C, 15°C y 6°C era aproximadamente de 2, 4 y 36 horas respectivamente, a partir de la aparición de un % de mitosis marcadas desde 0 a 100 %. - La duración del periodo de síntesis S a 25°C y 15°C fué de 9 y 24 horas respectivamente a partir de las curvas que indican las mitosis marcadas en la primera generación. La duración del periodo S a 6°C es excesivamente larga para ser medida a partir de los datos - de la experiencia.

Estos resultados indican claramente que el ciclo mitótico de las células del epitelio intestinal en el pez dorado se prolonga a temperaturas bajas (Hyodo 1968).

I.5.5. Efectos de la radiación X sobre la síntesis de DNA en pez dorado a temperaturas diferentes.

Si se inyecta a los peces timidina ^3H justamente después de la irradiación con 1, 2 y 8 kr de rayos X y se sacrifican a distintos tiempos después de la inyección, el número de células marcadas no difiere apreciablemente del control no irradiado dentro de un periodo de 3 y 6 horas a 25°C y 15°C respectivamente. Después de este periodo las células marcadas degeneraron, y el número de células marcadas se aproximó a cero dentro de las 24 horas a 25°C o 48 horas a 15°C en el grupo de 8 kr de irradiación.

En el grupo de 1 kr y 2 kr el número de células marcadas se recuperó después de una reducción temporal. La recuperación celular a 15°C tardó más tiempo que a 25°C.

La actividad de síntesis de DNA de las células proliferativas así como su actividad mitótica están completamente inhibidas inmediatamente después de la irradiación con 8 kr. La recuperación a partir de la lesión procedió después de una caída durante 48 a 72 horas a 25°C y 72 a 120 horas a 15°C después de la irradiación con 1 kr o 2 kr en las células epiteliales.

A la vista de los resultados de la fg 16 se aprecia que las células en trance de síntesis de DNA durante la radiación X aparecen bloqueadas en la fase G_2 , entre 3 y 6 horas a 25°C, a 15°C el bloqueo continua siendo efectivo al cabo de 6 a 12 horas después de la irradiación. El tiempo de disminución y recuperación de la actividad mitótica es a 15°C doble que a 25°C.

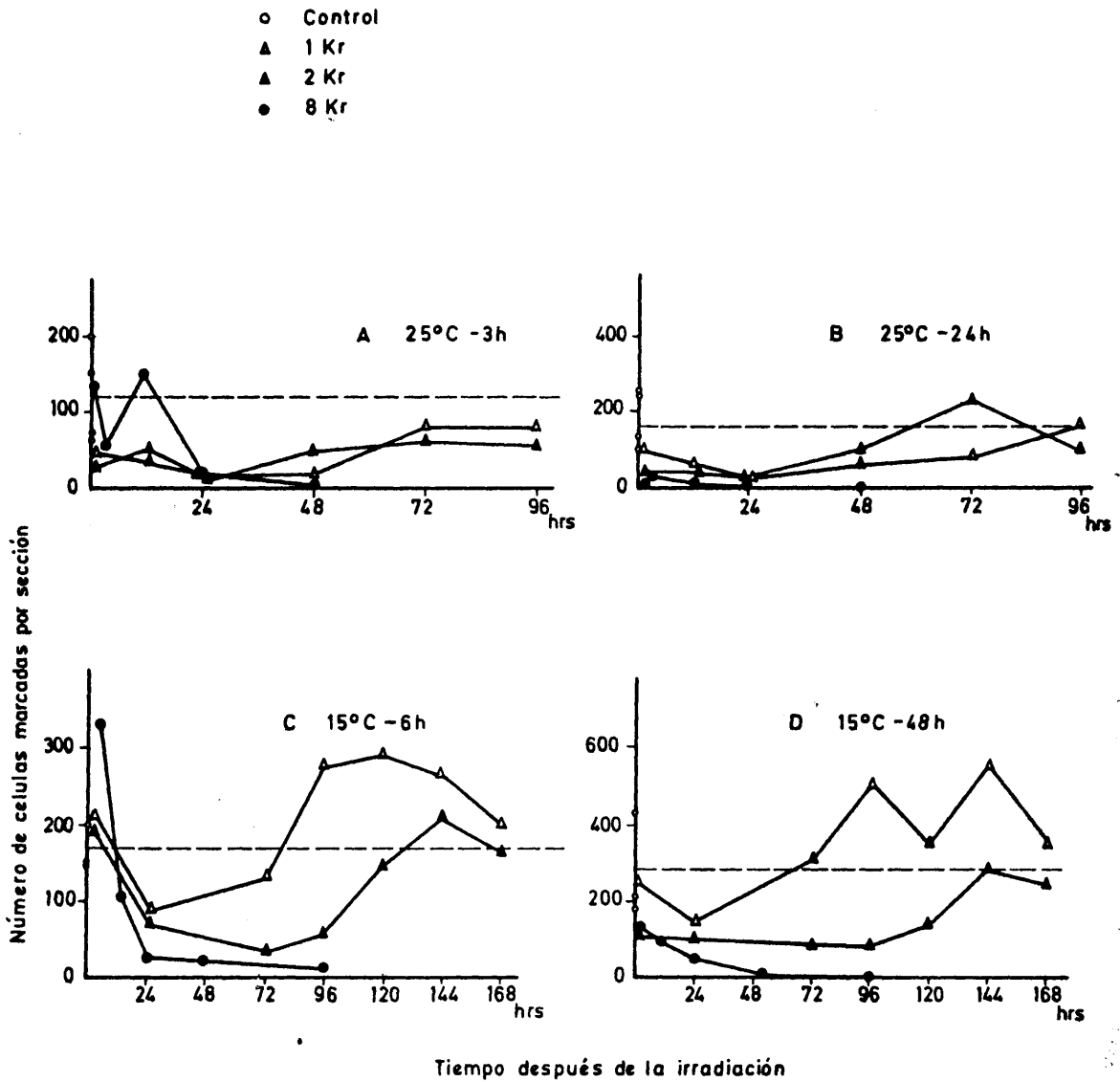


Fig. 16

Variaciones del número de células marcadas en el epitelio intestinal de pez dorado por efecto de la radiación a diferentes temperaturas .

% de mitosis marcadas en el intestino a diferentes temperaturas despues de una irradiación subletal.

Condiciones experimentales		Tiempo despues de la inyección de timina triada (horas)				
		1	3	6	12	24
25°C	Control	1	65	100	39	0
	1KR	0	5	80	87	0
15°C	Control	0	1	90	99	98
	2KR			7	32	100

A partir de las observaciones presentes parece posible que la recuperación encontrada en todo el organismo a los pocos días despues de la irradiación pueda ser debida a la recuperación encontrada en la población celular del epitelio intestinal. (Hyodo Taguchi 1970).

I.5.6. Efecto de la radiación X sobre la proliferación celular en las células del epitelio intestinal de pez dorado, Carassius auratus, a diferentes temperaturas.

Es sobradamente conocido que la radiosensibilidad de las células proliferativas varia durante el ciclo generativo en células de mamíferos "in vitro" (Tolmach y col. 1965) ;(Djorodjevic y Tolmach - 1.967) ; Las experiencias sugieren variaciones en la sensibilidad durante el ciclo celular en células del epitelio intestinal de ratones "in vivo". (Lesher 1967). En peces dorados irradiados con dosis subletales, aparecen tambien ciertos cambios en la radiosensibilidad durante la división (Hyodo 1964).

. Las células que se encuentran en la fase S continúan sintetizando DNA durante la irradiación.

. Las células que se encuentran en la fase G2 están dispuestas para iniciar el proceso de mitosis.

. Las células en trance de mitosis llegan a dividirse pero la fase mitótica viene retrasada.

. La iniciación de síntesis de DNA también viene retrasada inmediatamente después de la irradiación.

. Tanto el retraso de la mitosis, el bloqueo de G2 como el retraso en el proceso de síntesis de DNA, son superados después de un cierto tiempo. El tiempo viene en función de la temperatura y de la dosis de irradiación.

La restauración del régimen normal de proliferación hace pensar que las células más dañadas han sido eliminadas del compartimento de proliferación y que la proporción de eliminación depende también de la temperatura.

El epitelio intestinal es capaz de restablecer una cinética de proliferación celular en régimen permanente después de la recuperación de la lesión por radiación subletal.

Estos resultados coinciden con los hallados en las células del folículo intestinal de ratones en los puntos más importantes, si bien el factor tiempo es completamente distinto (Hyodo y Taguchi 1970).

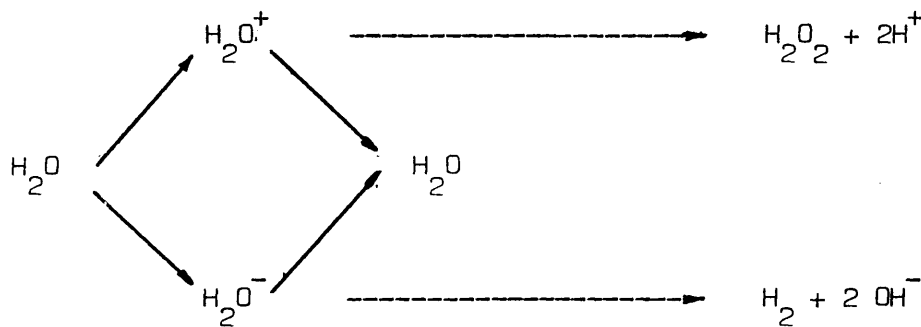
I.6. EFECTO DE LA RADIACION GAMMA SOBRE EL DNA " IN VITRO "

I.6.1. Radiolisis del agua.

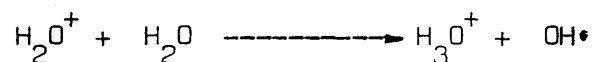
No deja de ser sumamente sugestivo para el investigador, el intento de llegar a un conocimiento exhaustivo de la naturaleza - de las alteraciones moleculares provocadas por las radiaciones y encontrar la evidencia de que dichas alteraciones son la causa responsable de la muerte celular.

El procedimiento inmediato podría consistir en el estudio de los efectos de la radiación in vitro sobre el DNA. Sin embargo que daría aún por demostrar que realmente la célula viva sufre esas mismas alteraciones y ver hasta que punto pueden esas causas ser responsables de los efectos observados en el material vivo.

El efecto inmediato de la irradiación de una solución acuosa sería evidentemente la radiolisis del agua. Weiss en 1.960 propuso una hipótesis para tratar de explicar el mecanismo de la radiolisis - del agua. A través de sus experiencias llegó a la conclusión de que posiblemente existirían dos especies primarias o polarones H_2O^+ y H_2O^- , originados ambos, por una deslocalización de cargas en las redes iónicas.



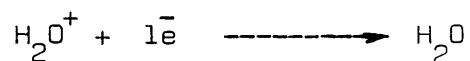
Parece ser que este polarón positivo tiene una vida sumamente corta desapareciendo según la reacción (Hochandel 1964)



La especie oxidante radioinducida en el agua $\text{OH}\cdot$ no presenta naturaleza iónica, se trata de un radical no cargado formado por la reacción del polarón positivo H_2O^+ con el agua. (Hochandel 1968).

Simultáneamente con el polarón se desprende un electrón dotado de gran energía cinética. Mientras este electrón conserve su E_c podrá actuar él mismo como partícula ionizante frente a otras moléculas de agua, aumentando así el número de pares iónicos. Cuando la E_c del electrón tienda a cero aparecen otros procesos que dan origen a especies diversas altamente reactivas.

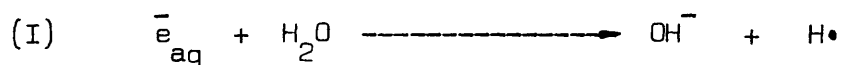
Una primera posibilidad consistiría en la reacción de recombinación con su ión gemelo el polarón positivo H_2O^+ para dar lugar a una molécula de agua superexcitada.



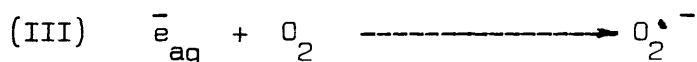
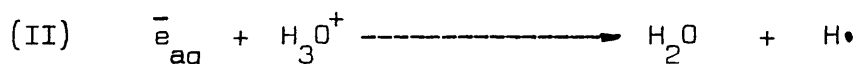
Este agua superexcitada puede a su vez disociarse en dos radicales : $\text{H}\cdot$ y $\text{OH}\cdot$

Puede ocurrir que el electrón consiga salir de la zona de posibilidad de recombinación con su ión gemelo H_2O^+ , en cuyo caso se solvata. Los dipolos de agua forman en torno suyo como una especie de pantalla frente a la interacción con otras cargas, creándose así una

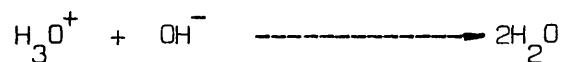
zona de energía potencial mínima. Este electrón solvatado debe su posible existencia como especie reactiva, al valor sumamente bajo de la constante de velocidad de reacción (I) a pH7



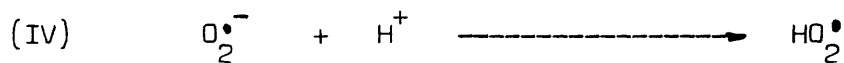
que manifiesta una gran energía de activación implicada en el efecto de pantalla. Así el \bar{e}_{aq} mientras ofrece escasa reactividad frente a moléculas muy abundantes de su entorno, reacciona sin embargo activamente frente a otras especies más escasas, como los iones H_3O^+ , presentes en la solución antes de iniciarse la radiólisis.



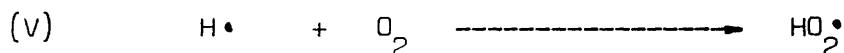
En definitiva el destino del \bar{e}_{aq} depende de las concentraciones de H_3O^+ y O_2 . En medio ácido la vía seguida viene naturalmente dada por la ecuación II. El radical $H\bullet$ es la única especie reductora con vida media suficientemente larga como para poder reaccionar con los solutos. En medio alcalino no hay tal reacción II, el \bar{e}_{aq} permanece inactivo ya que tiene lugar una reacción de neutralización según



La especie $O_2^{\bullet-}$ obtenida a partir de la reacción III actúa sobre los protones de la solución acuosa, dando lugar al radical hidropéroxido HO_2^{\bullet} según la reacción IV



A este ión hidropéroxido también se puede llegar por reacción del O_2 con la otra especie reductora, el H^{\bullet}



Ambas especies reductoras e_{aq}^- y H^{\bullet} desaparecen en presencia de O_2 oxígeno molecular, independientemente del pH de trabajo, originando radicales tales como $O_2^{\bullet-}$ y HO_2^{\bullet} que modifican radicalmente su reactividad frente a los solutos.

La presencia o ausencia de O_2 ni tampoco el pH del medio afectan en absoluto a la naturaleza de la especie oxidante, el radical OH^{\bullet} .

Cabe también la posibilidad de que estos radicales reaccionen entre sí para alcanzar estructuras moleculares estables. Lo inmediato sería la reacción entre la especie reductora y oxidante para dar lugar a la molécula de agua. También tendría lugar la reacción de radicales idénticos originando especies moleculares estables y típicas de la radiólisis del agua, hidrógeno molecular H_2 y agua oxigenada. H_2O_2 .

En la fg.17 se resume gráficamente lo dicho respecto a la dinámica de las reacciones en el seno del agua por efecto de las radiaciones iónicas

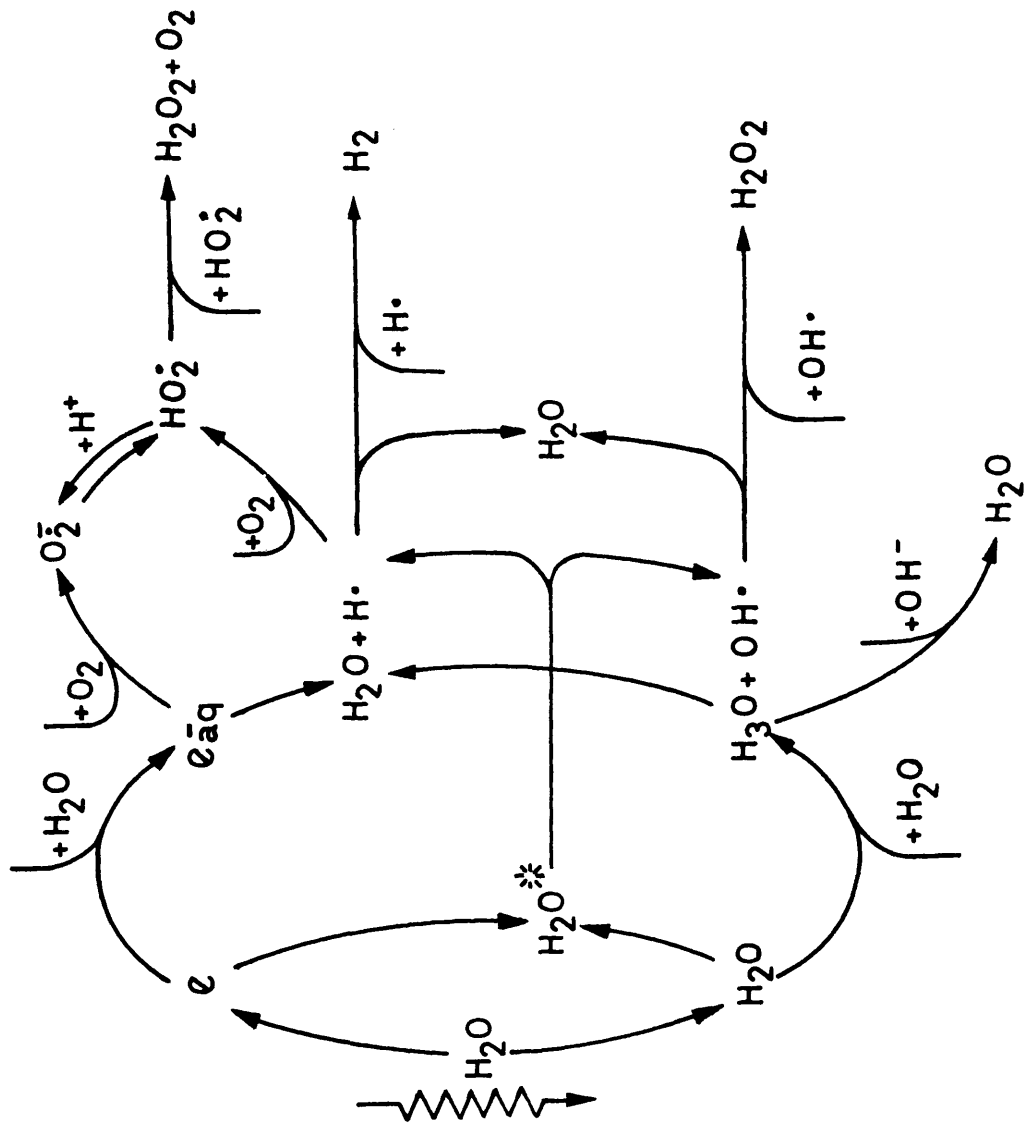


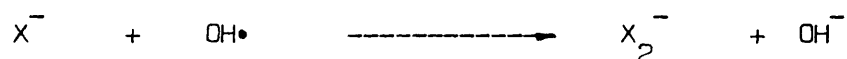
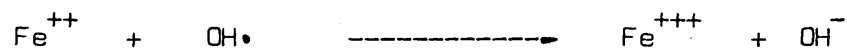
Fig. 17

I.6.2. Mecanismos de reacción del radical OH•

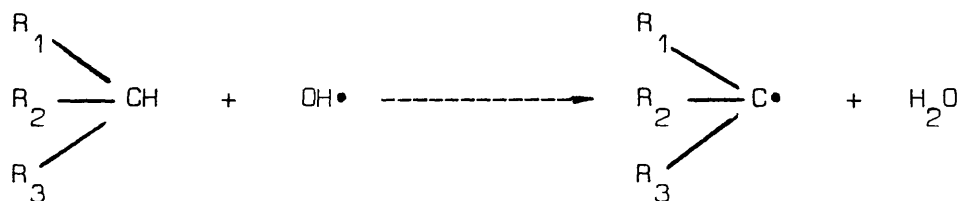
En un intento de simplificación del arduo problema que se presenta al pretender interpretar el mecanismo en los procesos de degradación radiolítica se consideró en primera aproximación - que tan sólo los radicales OH• actuarían como verdaderas especies reactivas, siempre y cuando hubiera en la solución oxígeno molecular disuelto en cantidad suficiente.

Este radical OH• dotado de alto potencial oxidante ofrece tres posibles modalidades de reacción, en virtud de las cuales alcanza la estructura electrónica estable reducida, el ión oxidrilo OH⁻.

- a) Reducción por transferencia electrónica. Se trata de un procedimiento típico frente a iones inorgánicos en general, ya cationes u aniones.



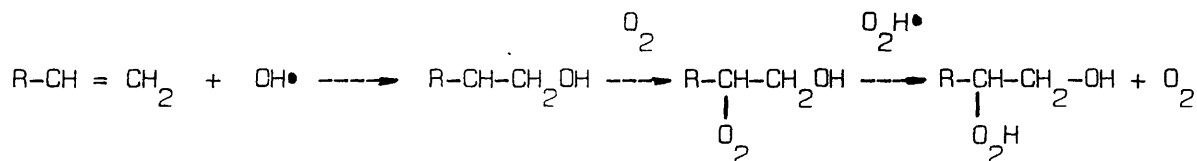
- b) Reducción por transferencia de átomo de hidrógeno. Es el mecanismo normal de reacción frente a solutos orgánicos saturados. Frecuentemente da lugar a reacciones radicales en cadena, por ejem., polimerizaciones radioinducidas



Cuando la reacción tiene lugar en presencia de oxígeno molecular se forman hidroperóxidos.



c) Reducción por adición a insaturaciones. Tratándose de moléculas con insaturaciones olefinicas, el radical queda incorporado al doble enlace etilénico, lo cual normalmente da lugar a reacciones en cadena que producen polimerización. (Dainton - 1948). Estas reacciones en cadena en presencia de oxígeno molecular dan lugar a la formación de hidroxihidroperoxi - derivados. (Scholes y col 1960).



Si la adición se produce en un compuesto aromático, se forma en primer lugar el hidroxiderivado con la ulterior posibilidad de reaccionar en presencia de O_2 . (Daniels y col 1956).

La constante de velocidad de reacción de adición de un compuesto aromático viene en función de la distribución de la densidad electrónica en el compuesto. Sin embargo el orden de magnitud resulta similar al que adquiere esa misma constante en el caso de la hidroxilación radioinducida del benceno.

$k = 4.9 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$. (Dorfman y col 1962).

Tratándose de las bases que componen el DNA las constantes de velocidad de oxidación por el radical $\text{OH}\cdot$ son del mismo orden de magnitud independientemente de que se trate de bases púricas o -pirimidínicas y que se encuentren ya simplemente como bases libres, nucleosidos o nucleotidos. (Scholes 1965).

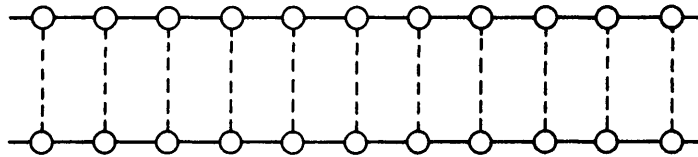
I.6.3. Efectos producidos por el radical $\text{OH}\cdot$ sobre la molecula de DNA.

El primer fenómeno que podemos observar al irradiar DNA "in vitro", consiste en una reducción progresiva del peso molecular medio, que se refleja en cualquier parámetro hidrodinámico: coeficiente de velocidad de sedimentación, viscosidad intrínseca, etc.

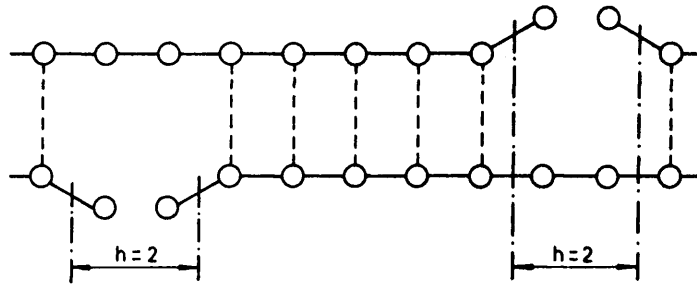
La degradación radiolítica del DNA se produce como consecuencia de una interacción entre los radicales libres radioinducidos en el agua y los componentes de cada una de las cadenas polinucleotídicas, sin especificidad respecto de esos componentes. El resultado de este ataque radical es la discontinuidad de la cadena, es decir - la rotura.

El hecho de la disminución del tamaño de las moleculas - de DNA, su degradación, en suma, hasta alcanzar una distribución homogénea de peso molecular, se debe a la coincidencia aleatoria de dos roturas simples en cadenas opuestas, a una distancia expresada en números pares de nucleotidos, menor que cierto valor h . (Hagen 1967). La fg. 18 muestra las diferentes posibilidades respecto de lo dicho.

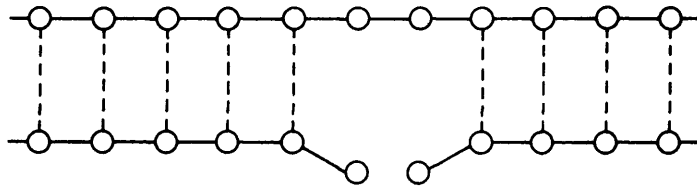
En la fg. 19 aparecen algunas de las posibles vías reactivas después de la adición del radical $\text{OH}\cdot$ al doble enlace 5,6 de una pirimidina. El caso más simple corresponde a la irradiación en -



Estructura bicatenaria mantenida por enlaces de hidrógeno.

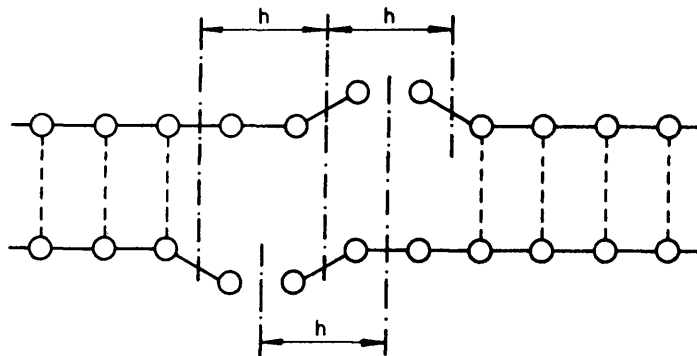


Roturas simples sobre distinta cadena que no conducen a rotura doble.



Rotura de enlace sobre una de las dos cadenas (rotura simple).

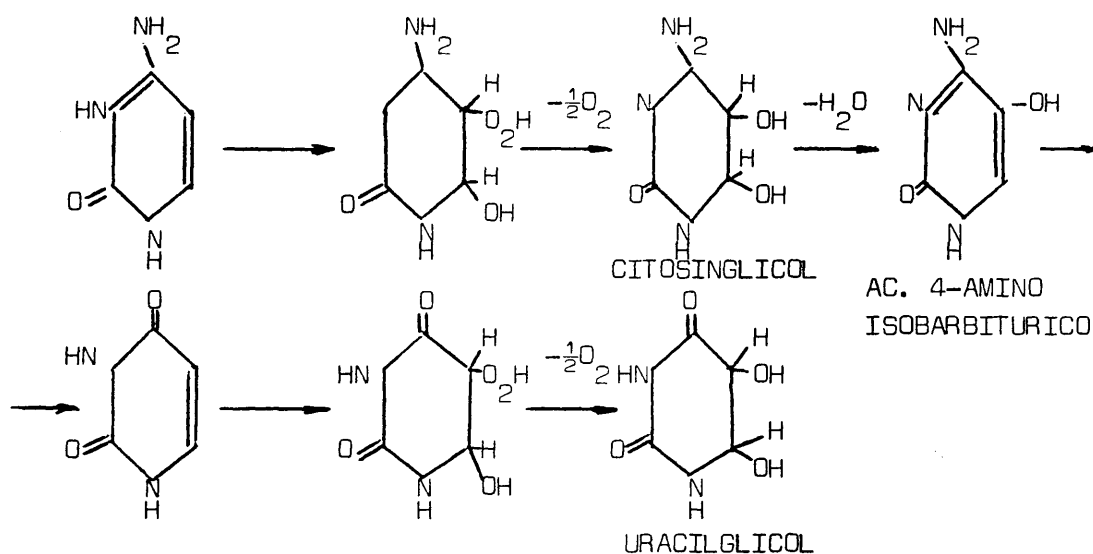
Posibles roturas en la estructura bicatenaria del DNA .



Roturas simples sobre distinta cadena que conducen a rotura doble.

Fig. 18

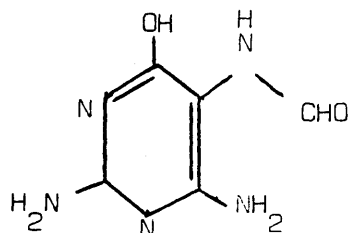
presencia de oxígeno molecular, donde el producto primordial es un hidroxihidroperoxi - derivado. El correspondiente a timina es perfectamente estable a pH neutro, (Scholes y col. 1960) ; (Latarjet y col 1961, 1963) ; (Scholes y col 1956) ; (Daniels y col 1956) ; (Ekert y col 1957, 1959, 1960) ; no así el de citosina y uracilo que se descomponen dando una mezcla de citosinglicol y ac. 4 amino -isobarbiturico en el primer caso y de uracilglicol en el segundo. (Latarjet y col 1963). Estos productos hidroxihidroperoxi - derivados aparecen en mayor proporción pero ciertamente no son los únicos que se producen, parece ser que alcanzan el 50 % de los productos radioinducidos (Scholes 1963).



La radiolisis de las purinas ofrece una situación aún - más oscura, no obstante parece que el radical $OH\bullet$ en presencia de - oxígeno molecular queda incorporado en el doble enlace internuclear, dando origen por posterior adición de oxígeno a un radical hidroxihidro-peroxido. (Scholes 1952) ; (Hems 1960) ; (Ponnamperuma y col 1961)

(Conlay 1963) ; (Hollan y col 1967).

En ausencia de oxígeno la oxidación por el radical OH• parece ser que tiene lugar en el anillo imidazólico, ya que se ha llegado a encontrar el derivado correspondiente de la guanina, el 2,6 diamino-5-formamido-4-hidroxipirimidina. (Hems 1960).



I.6.4. Rotura internucleotídica radioinducida.

A partir de la experimentación pudo demostrarse cómo la alteración radioinducida de las bases no comporta necesariamente la producción de roturas internucleotídicas.

Parece ser que la acción de las especies radicales sobre la desoxirribosa adquiere un relieve notable dentro del mecanismo de rotura internucleotídica. La desoxirribosa puede ser atacada incluso por el radical reductor si bien es cierto que frente a él ofrece una reactividad escasa. Es evidente sin embargo el ataque de la especie oxidante a la desoxirribosa del nucleotido como lo demostraria, la formación de ortofosfato inorgánico, dicho desprendimiento no se produciría en el caso de que el ataque del radical tuviera lugar en la base.

La oxidación por el $\text{OH}\cdot$ del C (3') al formar un grupo carbonilo en posición beta respecto al OH en C (5) parece ser que induciría la hidrólisis del ester fosfato. Este mecanismo así como el que posiblemente se produciría en el caso de que la alteración de la base - provocara la hidrólisis del enlace N-glucosídico aparecen en el esquema de la fg. 20.

Los datos sobre valores de rendimientos radiolíticos (Ulrich y col 1971), indican que en el 80 % de las roturas de enlaces internucleotídicos radioinducidos aparecen terminales de 5' fosfato en el polinucleótido resultante, en un 30 % simultáneamente con los antedichos terminales comparecen bases libres, y en otro 30 % de los casos se liberan nucleótidos alterados. Lo cual parece indicar que las vías de reacción que aparecen en la fg.20 ofrecen eficacia equivalente y que entre todas justificarian el 80 % de los casos de aparición de terminales 5' fosfato.

En resumen a partir de la radiólisis de soluciones de solutos orgánicos así como de la estructura en solución del DNA podemos inferir - las siguientes consideraciones :

a) que el proceso de radiólisis está realizado en definitiva por una - única especie reactiva, el radical $\text{OH}\cdot$ siempre y cuando la solución esté en equilibrio gaseoso con el aire y las concentraciones de soluto sean bajas.

b) en el mecanismo de rotura internucleotídica, el ataque radical a la desoxirribosa adquiere relieve especial, si bien no exclusivo.

c) que entre las cuatro bases no parecen existir diferencias notables de reactividad frente al radical $\text{OH}\cdot$.

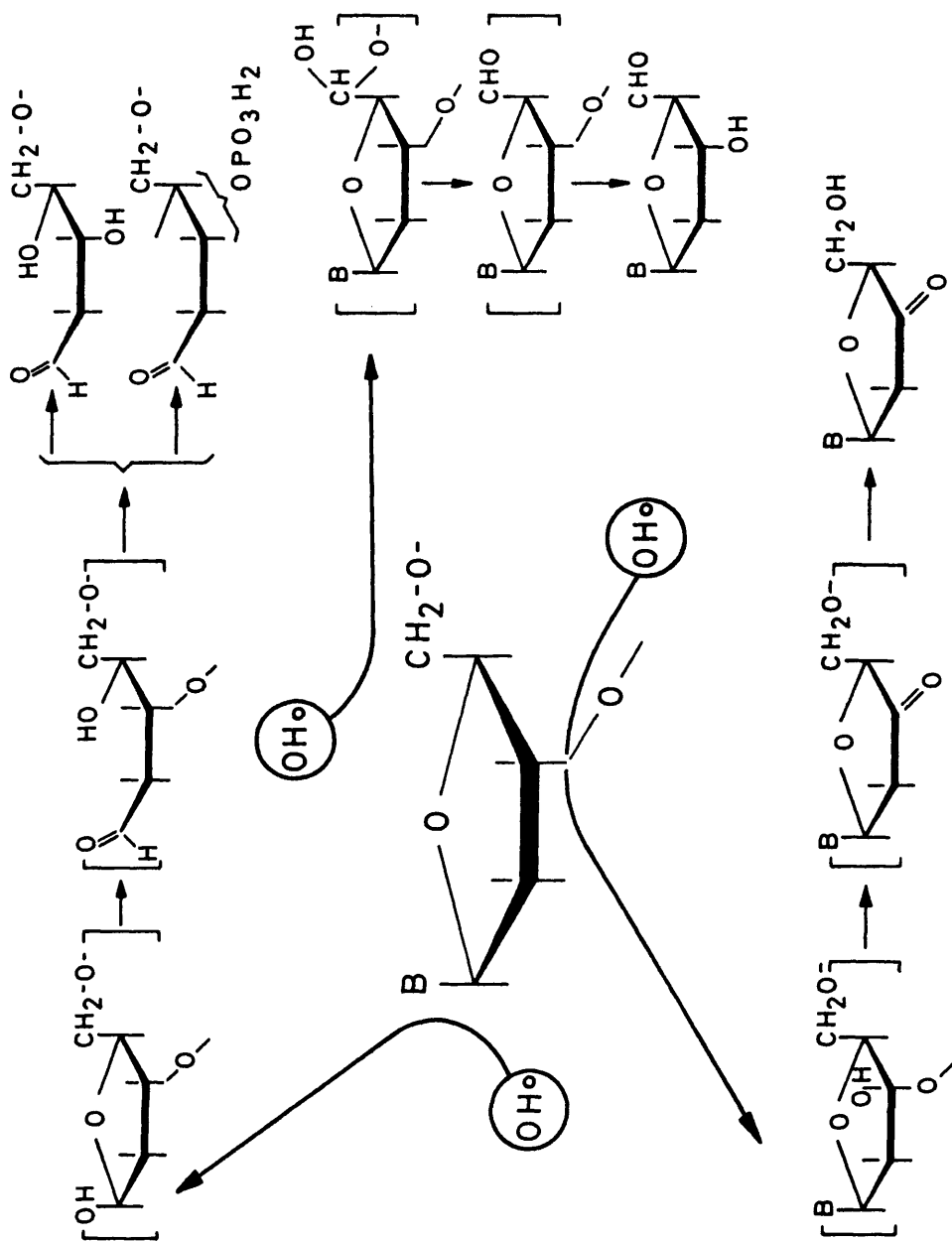


Fig. 20

Posibles vías de acción del radical OH• sobre la desoxirribosa del nucleótido .

d) que a pesar de las roturas de enlace internucleotídico en sus cadenas, el DNA conserva su estructura como macromolécula bicatenaria.

Dada su estructura y teniendo presente lo anteriormente dicho se puede considerar que la molécula de DNA ofrece una reactividad uniforme frente al radical $\text{OH}\cdot$ y por tanto el punto preciso en el biopolímero dónde los radicales oxidantes inducirían la rotura internucleotídica sería seleccionado al azar, la rotura internucleotídica debe suceder estocásticamente.

La rotura internucleotídica no lleva necesariamente implícito la rotura de la doble cadena. Para que esto se produzca ya se dijo anteriormente que es preciso la coincidencia y además enfrentadas, de roturas simples en cada una de las cadenas. Esta coincidencia de las dos roturas sucede estocásticamente y como consecuencia de una desestabilización local. Normalmente se consideran coincidentes, roturas simples en cadenas distintas separadas por $n + 1$ pares de nucleótidos.

I.6.5. Reparación enzimática de la radiolesión en la cadena del DNA.

El fenómeno de la reparación en el caso de radiolesiones en las cadenas del DNA, ha sido más estudiado y está más esclarecido en el caso de radiaciones ultravioleta, que cuando se trata de radiaciones gamma.

Los mecanismos de reparación encargados de corregir los efectos de la irradiación no ofrecen demasiada especificidad respecto a las alteraciones estructurales, excepto en el caso de fotorreactivación, el sistema enzimático se limita a reconocer la localización de la alteración que puede ser de naturaleza muy diversa.

Actualmente se conocen hasta cuatro mecanismos distintos de reparación de posibles lesiones estructurales en la cadena polinucleotídica de DNA.

- . empalme, que reconstruye la cadena polinucleotídica interrumpida por roturas simples.

- . monomerización de los dímeros de pirimidina " in situ " por - desdoblamiento, lo cual requiere la absorción de un fotón dotado de cierta energía.

- . proceso de escisión-resíntesis.

- . recombinación.

Fué en 1966, a raíz de las experiencias de Mc. Grath y Willians, confirmadas por Kaplan (Kaplan 1966), cuando se llegó a la conclusión de que realmente las radiolesiones gamma podían ser reparadas por un proceso postirradiatorio. Si bien actualmente se tiene certeza sobre la reparación de la radiolesión gamma no obstante no se ha conseguido diferenciar con absoluta clarividencia todas y cada una de las etapas del proceso, por lo menos tal y como se conocen en el caso de la radiación ultravioleta.

El proceso de reparación por emplame de discontinuidades polinucleotídicas ha sido puesto de manifiesto con absoluta evidencia, se ha comprobado que las reparaciones vienen realizadas por una enzima, la polinucleotidoligasa, (Weis y col 1967) ; (Geftter y col. 1967) ; (Olivera y col 1967), esto hoy parece fuera de duda. No obstante no ocurre lo mismo con el mecanismo de escisión-resíntesis que no se ha podido poner de manifiesto.

Tambien parece evidente que la reparación de roturas de la cadena polinucleotídica se realiza independientemente de su origen.

Se piensa actualmente que la degradación del DNA inducida por la irradiación es sencillamente un proceso de degradación enzimática con significación fisiológica en la célula y que normalmente está controlada por la regulación genética. Este control es lo que precisamente queda inactivado como consecuencia de la irradiación, en estas condiciones la degradación del DNA alcanza enormes proporciones de consecuencias fatales para la propia célula.

La irradiación actúa como disparador del proceso que continuaría hasta que pudiera ser controlado o bien quedaría definitivamente incontrolado. Los mutantes rec y exc se manifiestan impotentes para recuperar el control del proceso de degradación despues de haber sido disparado por la irradiación u otro agente inductor de roturas simples (Bridges y col. 1968).

El hecho de que la sensibilidad de la célula a la irradiación venga en función de cualquier proceso capaz de inhibir la síntesis de proteínas, parece indicar que la citada síntesis de proteínas es necesaria para recuperar el control sobre el proceso de degradación del DNA.

Sería realmente interesante conocer la naturaleza de las proteínas requeridas para conseguir el control sobre la degradación del DNA pero lamentablemente hasta el presente se ignora. (Frampton 1966) ; (B. Men 1955) ; (Mifetic 1961).

La posibilidad de actuación de la polinucleotido ligasa depende naturalmente de que se llegue a controlar la degradación del DNA lo más pronto posible. Tan sólo entonces la ligasa podría cumplir su misión reparando las roturas simples originadas en las cadenas del DNA.

A la vista de las presentes conclusiones, cabe preguntarse si el mecanismo de transformación de la molécula de DNA celular inserto en el material biológico sería realmente el mismo cuando este material es sometido " in vivo " a la acción de las radiaciones ionizantes. Concretamente, si las roturas simples de la molécula de DNA que se han encontrado como radiolesión primaria " in vitro " serían también las responsables de la muerte celular.

El problema es arduo. En la actualidad según Pollard - (Pollard 1970) existen dificultades insuperables para conseguir la evidencia de tal afirmación.

Una de ellas consiste en las limitaciones encontradas para conseguir macromoléculas de DNA de tamaño aceptable. Simultáneamente con la degradación radiolítica de la molécula de DNA se inicia la degradación enzimática de dicha macromolécula. Ambos procesos de degradación radiolítico y enzimático se solapan, hasta el punto de hacer imposible la diferenciación de los efectos de uno y otro. Otro inconveniente que aumenta la complejidad del problema es el proceso de reparación por empalmes de roturas simples, que se inicia inmediatamente a la irradiación gamma.

Aunque no se ha podido conseguir la evidencia de que las roturas simples en las cadenas de la macromolécula de DNA sean la causa primaria de la muerte celular. El sentir unánime dentro del campo de la investigación, admite que dichas roturas simples en la cadena polinucleotídica son las radiolesiones gamma in vivo de mayor relieve biológico.

I.7. AMINOACIDOS LIBRES EN DIFERENTES ORGANOS ANIMALES.

I.7.1. Aminoacidos libres en tejidos de organismos superiores.

La organización de los seres pluricelulares comporta la presencia de aminoacidos libres en los diferentes tejidos constitucionales. Algunos de estos aminoacidos, los esenciales para la vida de los seres superiores, proceden de la dieta, tales son : lisina, metionina treonina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y triptofano. Hay tambien otros no esenciales que proceden de transformaciones metabólicas como por ejem. arginina, histidina, tirosina, citrulina taurina, etc.

Los seres superiores se alimentan esencialmente de vegetales y animales que poseen proteínas específicas. Estas proteínas - así ingeridas se someten dentro del plan general del metabolismo a la acción catabólica, quedando reducidos en última instancia a sus elementos unitarios, los aminoacidos. El torrente sanguíneo transporta posteriormente dichos aminoacidos a los distintos tejidos del nuevo organismo, que los incorpora.

El conjunto de aminoacidos libres presentes en los tejidos, nos dá idea acerca del turnover y degradación de las proteínas del organismo, tambien aporta información sobre la posible interconversión de unos aminoacidos en otros, y finalmente, algunos de ellos constituyen el material esencial para la elaboración de las proteínas típicas de la especie.

Otros aminoacidos no proteicos están implicados en procesos metabólicos diferentes como biosíntesis de urea, e incluso de aminoacidos proteicos tales como lisina, arginina etc. actuando de intermediarios clave.

Ya en 1924 Bollman, Mann y Magath demostraron la importancia del hígado en el mantenimiento de los niveles normales de aminoácidos en la sangre y en los tejidos. Este órgano está en condiciones de transformar los aminoácidos en urea y evitar de esta forma posibles trastornos originados por el aumento excesivo del nivel de aminoácidos en plasma. El análisis de aminoácidos en el plasma de perros hepatectomizados, por técnicas cromatográficas, detectó un aumento de nivel en 15 aminoácidos o derivados.

En músculo se notó además de un aumento notable en el nivel de glutamina acompañado de una disminución de ácido glutámico, aumento en los niveles de otros aminoácidos.

El efecto de ausencia de hígado sobre los niveles de aminoácidos aparece más claramente en el cerebro que en otros órganos o tejidos. Gran parte del aumento de aminoácidos se debe a la subida de glutamina que aumenta su nivel cinco veces sin el correspondiente descenso de ácido glutámico. En el líquido cerebrospinal su concentración excede con mucho a la del plasma sanguíneo. Estos niveles tan altos de glutamina comportan pequeños pero definitivos aumentos de otros aminoácidos, tales como fenilalanina y tirosina.

La administración intravenosa de grandes cantidades de glucosa suprimió la acumulación de aminoácidos en plasma y músculo de perros hepatectomizados. El efecto de la glucosa consiste en estimular la formación de insulina en el páncreas, que a su vez provoca la síntesis de proteínas a partir de los aminoácidos del plasma y del músculo. En perros sin páncreas pero con hígado no se alcanzan esos niveles tan altos de aminoácidos en el plasma y en los tejidos, debido a la formación de urea por parte del hígado, lo cual viene a

confirmar la idea anteriormente expuesta sobre el efecto de la insulina (Flock y Bollman 1964).

I.7.2. Intercambio de aminoácidos entre plasma y cerebro.

El aumento de aminoácidos en el cerebro está regulado de tal modo que cuando las concentraciones de un cierto número de aminoácidos del plasma sufren un incremento, se produce un intercambio rápido entre plasma y cerebro. Estos hechos que se comprobaron en aminoácidos con funciones ácidas, básicas o neutras tales como ácido glutámico, lisina y leucina, hacen pensar que el tránsito de aminoácidos al cerebro probablemente no esté dirigido exclusivamente por una difusión pasiva.

La proporción de intercambio que es hasta cierto punto proporcional al nivel de aminoácidos en el cerebro, se puede analizar por medio de un trazador administrado por vía intravenosa. No obstante el fenómeno es específico para los distintos aminoácidos, no todos aumentan su intercambio en la misma proporción.

El transporte de aminoácidos se produce no solo a través de la membrana celular, sino de otras varias, la membrana nuclear entre ellas. En el caso concreto del cerebro la complejidad aumenta debido a la complejidad anatómica e histológica del propio órgano. El proceso del transporte cerebral debe considerar toda una serie de membranas : las membranas de los órganos, las membranas de los diferentes tipos de células, además de otros factores típicos del cerebro, tales como procesos celulares, vainas de mielina etc. (Lajtha A. 1962).

I.7.3. Flujo de aminoácidos desde el cerebro

Los mecanismos de transporte y consiguientemente del control de los niveles de metabolito en cerebro, funcionan en ambas direcciones.

Los niveles de sustrato en el cerebro se pueden mantener por debajo de los del plasma bien por medio de una barrera de entrada, por un intercambio tal que para una cierta cantidad de entrada pase una cantidad equivalente en dirección opuesta, o bien por un sistema de permeabilidad selectiva capaz de transportar los sustratos fuera del órgano.

Las diferencias entre las proporciones del plasma y del cerebro en el equilibrio indican las variaciones en la eficiencia de dicho transporte de un sustrato a otro, o al contrario la capacidad del tejido para incorporar cantidades diferentes de los distintos sustratos.

El descenso en los niveles de aminoácidos en el cerebro aún cuando el nivel en el plasma sea más alto puede producirse además de por un transporte activo, por alguna de estas tres causas: - a) incorporación a proteínas. b) transformaciones metabólicas. c) flujo desde una zona cerebral donde el nivel de aminoácidos es más alto que el del plasma.

a) Experiencias realizadas con aminoácidos marcados demostraron que no hay tal incorporación de aminoácidos en exceso a las proteínas, es muy poco probable que haya síntesis neta de proteínas en cerebro adulto que ya no crece. Al cabo de una hora de penetración del material marcado en el cerebro se incorporó tan solo un 8 % a las proteínas.

b) Al estudiar el metabolismo cerebral de los aminoácidos, se comprobó que los aminoácidos marcados estaban presentes como tales en el cerebro, no se lograron encontrar cantidades apreciables de otros metabolitos marcados. Cabría la posibilidad de que la disminución de niveles cerebrales se produjera a través de un metabolismo más lento y una salida rápida del cerebro de los metabolitos formados, en cuyo caso se justificarían la ausencia de productos metabólicos en el cerebro. Una explicación de este tipo es sin embargo muy poco probable ya que los aminoácidos no se metabolizan rápidamente.

c) Los aminoácidos administrados intracerebralmente en lugar de reducirse a la zona inmediata al lugar de administración, se encontraron distribuidos por todo el cerebro. Actualmente no se puede precisar la dirección de los gradientes de concentración de aminoácidos ni en que dimensiones se establece. Se comprobó una desaparición rápida del líquido cerebroespinal, de tal modo que el transporte puede suceder entre cerebro y plasma, cerebro y líquido cerebroespinal o bien entre éste y el plasma.

El flujo de aminoácidos desde el cerebro cuando los niveles del plasma no son elevados, después de la administración intracerebral de cierta dosis, es específico. Los niveles de cada aminoácido fueron descendiendo pero no con la misma intensidad. Estos hechos hacen pensar en la especificidad de los procesos de transporte con la posibilidad del control individual de paso de algún metabolito determinado.

Es posible que exista un transportador distinto para cada aminoácido o grupo de aminoácidos en el cerebro (Lajtha A. 1962).

I.8. EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES SOBRE LOS AMINOACIDOS LIBRES DE ORGANOS ANIMALES.

I.8.1. Efecto de la radiación ionizante sobre los niveles de aminoacidos en cerebelo y cerebro.

Las radiaciones ionizantes producen entre otros muchos efectos alteraciones en el metabolismo animal que se reflejan en variaciones en los niveles normales de aminoacidos libres en los diferentes órganos.

El presente estudio se realizó en cerebro y cerebelo de ratas en periodo de desarrollo desde 2 a 60 días de edad, sometidos a la acción de rayos X (450 R).

En el caso del cerebelo de ratas podemos considerar varios grupos de aminoacidos a) los que muestran un aumento general en función de la edad del animal tales como ácido glutámico, glutamina, GABA y ácido aspártico. b) los que muestran una disminución como taurina, fosfoetanolamina y cistationina c) los que no ofrecen cambios con la edad como alanina, glicocola, treonina y serina.

La radiación X, (450 R), indujo los siguientes cambios. Dentro del grupo del glutámico se produjo un aumento del 95 % en GABA en los 9 días subsiguientes al nacimiento del animal, así como de alanina pero en los últimos estadios del desarrollo ya no se aprecian estos cambios. A los 60 días de vida el nivel del ácido glutámico era más bajo en ratas irradiadas que en las del control, igualmente descendió el nivel de glicocola.

La radiación X no afectó al contenido de aminoacidos de la corteza cerebral, no obstante en la médula cerebral se observaron niveles más altos de GABA, fosfoetanolamina y serina pero las diferencias carecían de significación estadística.

Los cambios inducidos por la radiación X pueden significar alteraciones en el metabolismo y/o retraso aparente de las diferentes poblaciones celulares del cerebro en trance de desarrollo.

El aumento observado en GABA puede reflejar que la radiación X interfiere la transformación de GABA en semialdehído succínico. Los bajos niveles de cistationina en los 9 primeros días de vida pueden indicar que la radiación X inhibió el desarrollo de las células de alto contenido en cistationina.

Así mismo se observó al cabo de 9 días de irradiación - un aumento estadísticamente significativo de urea en todos los tejidos cerebrales en cerebelo este aumento persistió hasta los 22 días de postirradiación, volviendo a valores normales cuando el cerebro estuvo completamente maduro. Como el tránsito cerebro - sangre es - hasta cierto punto posible al cabo de 9 días de vida, un nivel alto de urea en el cerebro puede reflejar un nivel igualmente alto de urea en sangre. (Valcana, Hudson, Tinivas 1972).

II MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES

II.1. Material biológico.

La experimentación que se describe en este trabajo fué realizada en peces dorados, Carassius auratus, adquiridos en establecimientos comerciales de Madrid.

El peso aproximado de los peces estaba comprendido entre los 7 y 15 g. Antes de ser utilizados los peces se conservaron durante un periodo de dos semanas en tanques de aclimatación a una temperatura de 25 ± 1 °C, manteniéndose rigurosamente dicha temperatura a lo largo de todo el proceso experimental.

La densidad de población en los tanques fué en todo momento inferior a 0.3 pez. l^{-1} , garantizándose una adecuada saturación de oxígeno en el agua mediante aireación por borboteo de 0.15 litros de aire por l de agua y hora.

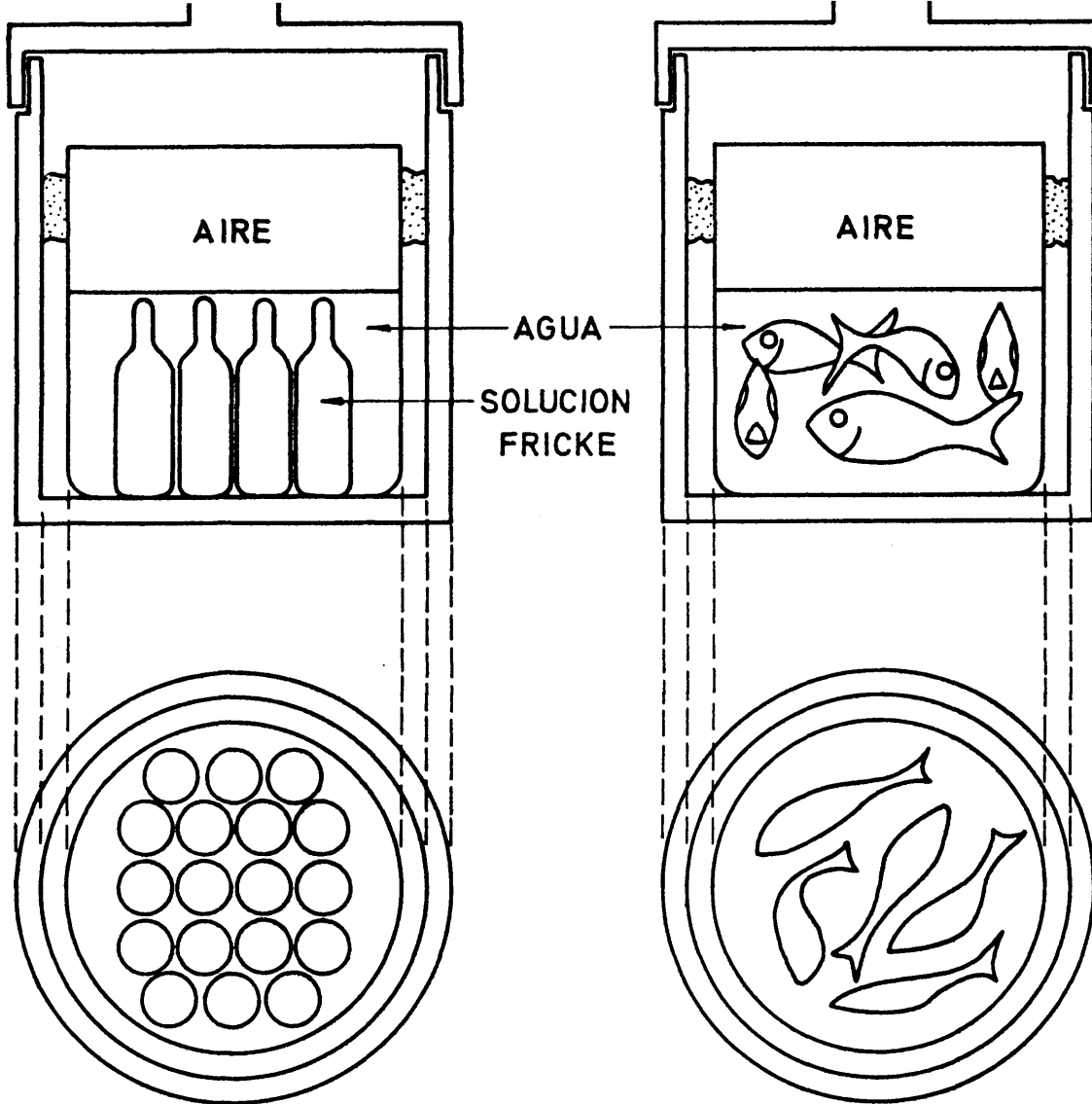
Para la alimentación de los peces se ha utilizado un pienso comercial ordinario que era suministrado una vez al día a razón de unos 30 mg por pez y día.

II.2. Irradiación y dosimetría.

a) Fuente de irradiación.

Se utilizó el dispositivo de irradiación NAYADE de la Sección de Aplicación de Isotopos de la Junta de Energía Nuclear.

Dicha fuente es de tipo piscina y está compuesta por veinticuatro elementos activos de ^{60}Co con una actividad total aproximada actualmente a los 7.000 Ci. Estos elementos activos pueden ser colocados en forma de corona circular, pudiendo obtener así, con precisión una geometría reproducible.



873	580	518	
601	795	623	553
904	720	667	764
685	676	799	1100
755	922	1194	

$$\bar{X} = 763 \pm 183 \text{ rad / ml}$$

Fig.- 21

Dispositivo para la irradiación gamma .

La posibilidad de colocar las muestras a diferentes alturas y la utilización de geometrías de diámetros y número de elementos diferentes hizo posible la irradiación a intensidades de dosis comprendidas entre 2.3 ± 0.6 krd y 10.7 ± 2.6 krd.

b) Condiciones de irradiación.

Los peces, en lotes de cinco ejemplares, se irradiaron dentro de un recipiente cilíndrico y herméticamente cerrado de polimetacrilato. Disponían de un litro de agua para nadar libremente, y sobre ella había otro litro de aire para asegurar la adecuada concentración de oxígeno en el agua durante la irradiación. Las dimensiones del recipiente de irradiación así como la distribución de intensidades de dosis dentro de él aparecen en la fg. 21.

c) Dosimetría.

Para la medida de dosis de irradiación gamma se ha utilizado la dosimetría de Frike (Frike H. y Hart E.J. 1966) ; que es el dosímetro más extensamente usado dentro de la gama de dosímetros químicos actualmente disponibles.

Está basado en que la acción oxidante de la radiación, a través de los radicales radioinducidos, sobre una solución acida de sal ferrosa en agua saturada de aire, produce una cantidad de Fe (III) proporcional a la dosis de radiación recibida.

La determinación de la concentración de Fe (III) producido se hizo por espectrofotometría en un UNICAM SP-700 de doble haz y células de cuarzo, con un paso de luz de un centímetro. Las lecturas se realizan a una longitud de onda de 304 nm. utilizando como blanco la solución dosímetro sin irradiar.

Los cálculos de las dosis se realizan suponiendo que se oxidan un promedio de 15.5 átomos de Fe por cada 100 eV de energía absorbida por la solución (valor de G) y que $\epsilon(\text{Fe (III)}) = 2174 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 23.7°C. Estos datos fueron determinados con gran precisión, (Frike y Hart 1966). El coeficiente de absorción molar del Fe (III) depende de la temperatura.

Es esencial la limpieza de los materiales en contacto con la solución dosímetro. La dosis puede medirse con un error inferior al 2 %.

Los tiempos de irradiación del dosímetro deben ser tales que la dosis recibida no sea superior a 40 krd, intervalo de validez del valor de G utilizado.

d) Preparación de la solución dosimétrica.

La composición de la solución dosimétrica es la siguiente :

Sulfato ferroso amónico	0.001 M
Cloruro sódico	0.001 M
Acido sulfúrico	0.4 M

La adición de cloruro sódico según Frike disminuye la oxidación incontrolada del Fe (II) a través de las impurezas orgánicas, pero aún así debe prestarse gran atención a la limpieza de los materiales y pureza de los reactivos. Una vez preparada la solución se guarda en la oscuridad y a baja temperatura, para evitar así su oxidación.

e) Cálculo de la dosis.

Para calcular la dosis recibida por el dosímetro a partir del espectro del Fe(III) formado durante la irradiación, se utilizan los datos siguientes :

valor de $G = 15.5$

densidad de la solución dosimétrica = 1.024 g/cc

coeficiente de extinción molar del Fe(III) a $23.7^\circ\text{C} =$
 $= 2174 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Con estos datos resulta que la dosis recibida por el dosímetro es :

$$\text{dosis} = 2.8 \times 10^4 \times A/d \text{ rad.}$$

Siendo A la absorbancia medida a 304 nm y a 23.7°C de la solución irradiada con respecto a la solución sin irradiar, y d es el paso óptico expresado en cm .

Cuando las medidas se hacen a una temperatura diferente de 23.7°C la corrección de la dosis leída se hace mediante la expresión :

$$\text{dosis corregida} = \frac{\text{dosis medida a } T^\circ\text{C}}{10.007 (T^\circ\text{C} - 23.7)}$$

donde T es la temperatura de la solución irradiada en el momento de la lectura en el espectrofotómetro, expresada en $^\circ\text{C}$.

f) Dosis suministradas.

Las dosis acumuladas en las irradiaciones realizadas han sido las siguientes :

70 peces en 14 lotes de cinco	$2.3 \pm 0.6 \text{ krd.}$
70 peces en 14 lotes de cinco	$5.3 \pm 1.3 \text{ krd.}$
35 peces en 7 lotes de cinco	$10.7 \pm 2.6 \text{ krd.}$

II.3. Toma de muestras.

A los tiempos oportunos contados a partir de la irradiación y después de haber permanecido en tanques a 25°C, los peces fueron sacrificados para la correspondiente toma de muestras.

La sangre se tomó por punción con un capilar para hematocrito, en la base de las branquias. Seguidamente los capilares fueron centrifugados en un microhematocrito tipo Gril-Cel durante 9 minutos a 11.000 rpm, lo cual permitió la separación de las células sanguíneas y el suero correspondiente a cada lote de peces. Este suero fue más tarde utilizado para las determinaciones electrolíticas disco-gel y restantes determinaciones analíticas que más adelante se detallan. Dada la rapidez con que coagula la sangre de estos peces fue preciso realizar la toma de muestras con cierta agilidad.

Después de sacrificados los peces y a lo largo de todo el proceso de manipulación se mantuvieron en un baño de hielo.

Los intestinos utilizados en el estudio de la biosíntesis de DNA, se obtuvieron por disección, y fueron meticulosamente lavados con solución de ClNa 0.14 M. previamente a su utilización.

II.4. Marcado radioactivo de la biosíntesis de DNA.

Para la biosíntesis de DNA marcado se ha empleado ^3H timidina como trazador. Una hora y media antes del sacrificio de cada pez se le inyectó intraperitonealmente una cantidad de timidina tritiada - proporcional a su tamaño a razón de $2 \mu \text{Ci.g}^{-1}$.

La ^3H -timidina utilizada está marcada en el grupo metilo y procedía del Radiochemical Center (Amershan), siendo su actividad específica de 2 Ci /mmol y su concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Las diluciones oportunas antes de inyectar se hicieron con NaCl 0.14 M.

Durante el tiempo que transcurrió entre la inyección radioactiva y su sacrificio, los peces permanecieron en tanques aislados por razones de contaminación radioactiva, pero en ellos se mantuvo siempre la misma termostatación a 25 ± 1 °C.

II.5. Magnitudes bioquímicas del suero.

II.5.1. Proteínas totales.

Reunidos los sueros procedentes de cinco peces, se realizó la determinación de la concentración en proteínas totales mediante el método de Lowry (Lowry O.H. Rosenbrough N.S. 1951), en una versión adaptada a pequeños volúmenes de muestra (Schacterle G. R. Pollack R.L. 1973).

El método de Lowry está basado en la aparición de color como resultado de la reacción del biuret de las proteínas con el ion Cu en medio alcalino, y la posterior reducción de fosfomolibdico - fosfotúngstico por la tirosina y triptofano presentes en las proteínas tratadas.

Puede ser aplicado al caso de proteínas disueltas en al cali o bien precipitadas en ácido sin más que introducir pequeñas mo dificaciones, es especialmente apto en el caso de :

- . evaluación de proteínas durante fraccionamientos enzi máticos.
- . evaluación global de proteínas tisulares, particularmente cuando no hay que dar valores individuales.
- . medidas de cantidades muy pequeñas de proteínas o bien proteínas sumamente diluidas y proteínas mezcladas con sustancias que contienen nitrógeno.
- . análisis de gran número de muestras proteicas similares, tales como precipitados de antígeno-anticuerpo.

Se preparan los siguientes reactivos :

- A. - Solución de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N
- B. - Solución de CuSO_4 al 0.5 % en tartrato potásico al 1 %
- C. - Solución alcalina de Cu que se obtiene mezclando 50 ml de solución A y 1ml de solución B.
- D. - Reactivo Folin diluido 1/1 con agua destilada.

Paralelamente a la muestra se hizo una determinación de concentraciones de seroalbúmina comprendidas entre 50 μgm y 250 μgm para obtener la curva patrón.

El volumen de muestra es de 1 ml con una concentración previsible de proteínas comprendida en la curva patrón. Se añadieron 5 ml de solución C, agitando y dejando en reposo 10 minutos, ya que si bien la reacción con el Cu no es instantánea, al cabo de ese tiempo es completa.

Se adicionó 0.5 ml de reactivo D, y se agitó inmediatamente, permaneciendo 30 minutos en reposo para conseguir el desarrollo del color. Las proteínas tratadas previamente con Cu alcanzan una coloración máxima frente al reactivo Folin cuando la reducción se hace a pH 10, pero a este pH el reactivo es solamente activo durante un tiempo muy corto. El retraso de unos pocos sgs puede rebajar la intensidad de color.

La disminución en la actividad del reactivo parece estar en función de la desaparición del amarillo original del fosfomolibdato y probablemente es debido a la disociación del fosfato y del molibdato. No obstante el color con las proteínas continua desarrollandose unos minutos despues que el reactivo se hace incapaz de reaccionar con nuevas cantidades de proteínas añadidas. Posiblemente la primera reacción

da lugar a reajustes, ya que el espectro de absorción cambia en tiempos comprendidos entre 3 y 30 min.

La relación color - concentración de proteínas no es lineal.

II.5.2. Fosfatasa alcalina.

Los diferentes métodos para la evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina se basan en las diferencias entre los espectros de absorción de p-nitrofenolfosfato, p-nitrofenolato y p-nitrofenol libre. En nuestro caso se realizó por el micrométodo de Bessey (Bessey O.A. 1946). Está basado en la determinación de la velocidad de hidrólisis del p-nitrofenolfosfato seguida espectrofotométricamente por la liberación de p-nitrofenol.

Después de eliminar el grupo fosfato del p-nitrofenolfosfato para formar p-nitrofenolato, el máximo de absorción varía de 310 m μ a 400 m μ . Al convertir el p-nitrofenolato en p-nitrofenol libre por acidificación, el máximo de absorción varía otra vez.

Como la fosfatasa alcalina tiene un pH elevado, las desviaciones de más de 0.1 unidades de pH pueden afectar significativamente a las lecturas.

En caso de que el suero tenga una concentración de fosfatasa muy alta, se puede reducir el volumen de suero a su mitad e incluso a su cuarta parte sin cambiar otros volúmenes.

El grado de hidrólisis en 30 minutos es proporcional a la concentración de la enzima, pero después de este tiempo no lo es estrictamente, no obstante no conviene prolongar el tiempo de incubación.

En caso de que como consecuencia de la hemólisis, hubiera hemoglobina, sería necesario tener en consideración que ésta absorbe considerablemente menos luz a 415 $m\mu$ que a 40 $m\mu$, lo cual es razón suficiente para preferir la longitud de onda más larga.

El proceso se realiza añadiendo 50 μ l de suero sobre 2 ml de sol. 50 mM tampón de glicina pH 10.5, 0.5 mM $MgCl_2$, 5.5 mM sal sódica de p-nitrofenolfosfato. Se determina la velocidad de hidrólisis a 25°C.

II.5.3. Hemoglobina.

La determinación de la concentración de hemoglobina en el suero se realizó por espectrofotometría del complejo meta hemoglobincianuro (Van Kapen E.J. Zijlstra W.G. 1961).

El mero hecho de que el meta hemoglobin-cianuro sea el único derivado de la hemoglobina que permite la preparación de soluciones standard estables durante meses y a veces años, hace que este compuesto sea preferido a los demás para determinaciones fotométricas de hemoglobina. Otro motivo importante a favor del método es el hecho de que la mayor parte de los derivados pueden ser transformados en meta hemoglobincianuro.

Hay que resaltar también que el desarrollo de color no viene influenciado por la presencia de proteínas plásmicas. Se trata en suma de un procedimiento espectrofotométrico fácil para la determinación de hemoglobina bajo la forma de meta hemoglobincianuro.

La turbidez, debida a las proteínas plasmáticas que precipitan, se evita añadiendo una pequeña cantidad de un detergente (Sterox - SE) que también favorece la lisis rápida de los glóbulos rojos.

50 μ l de suero, se añaden sobre 5 ml de una solución de fosfato dihidrógenopotásico 1mM, 0.75 mM de cianuro potásico y 0.60 mM de ferricianuro potásico.

Posteriormente se determina la absorbancia a 546 nm.

II.5.4. Urea.

La urea en suero se determinó por el método de Fawcett y Scott, (Fawcett J.K. Scott J.E. 1960) basado en la producción del ion amonio por ureasa a partir de la urea del suero y su posterior determinación colorimétrica con fenol, nitroprusiato e hipoclorito en medio alcalino.

La interacción del amoniaco, fenato e hipoclorito produce una curva de absorción que presenta un máximo cuya posición depende de factores tales como concentración de reactivos y presencia de catalizadores. La relación entre concentración y densidad optica es lineal.

Es importante añadir los reactivos rápidamente uno tras otro ya que por cada minuto entre la adición del nitroprusiato y el hipoclorito la densidad optica final disminuye alrededor de 1.5 %. La luz solar tambien produce disminución en la densidad optica, por lo cual es mejor llevar a cabo la reacción donde la luz solar sea mínima o bien desarrollar el color en la oscuridad.

La temperatura ejerce tambien un efecto importante sobre la rapidez e intensidad del desarrollo del color.

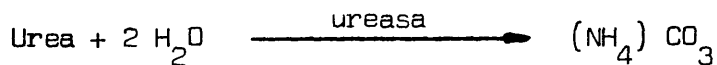
Se ha detectado la interfeerencia por parte de sustancias que ordinariamente se encuentran en el plasma u orina, son cinco - las sustancias que pueden interferir. En realidad de estas cinco - tan solo una, la hemoglobina interfiere seriamente. Aún en concen-- traciones bajas de urea, la interfeerencia es positiva y negativa pa ra altos. Esto indica que la exactitud del método disminuye cuando hay hemolisis.

Cuando se trata de cantidades especialmente grandes de urea, existe la posibilidad de diluir la solución final para la medida de la absorción sin tener que repetir el ensayo desde el principio.

No deja de ser interesante el hecho de que el procedimiento sirva igualmente para plasma, orina u otro material biológico sin modificación especial.

La hidrólisis de la urea se realizó añadiendo 20 μ l de suero sobre 100 μ l de sol. a 2 μ mg/ml de ureasa en 50 mM tampón fosfato pH 6.5 e incubando a 37 °C durante 10 minutos.

El ion amonio liberado se determinó por colorimetria a - 530 - 570 nm despues de desarrollar el color a 37 °C durante 15 minutos en la siguiente mezcla : 50 mM fenol, 0.08 mM nitroprusiato sódico, 6 mM hipoclorito sódico y 0.06 N NaOH.

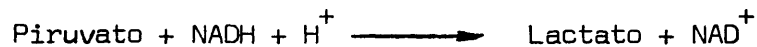


Los iones NH_4^+ reaccionan con fenol e hipoclorito formando un color azul cuya intensidad es proporcional a la concentración de urea.

II.5.5. Gliceridos totales.

Se ha utilizado el micrométodo basado en el procedimiento de Eggstein (Eggstein M. 1966) en el cual, después de una saponificación total por potasa etanólica, se valora enzimáticamente la glicerina por un sistema en el que se fosforila mediante gliceroquinasa en presencia de ATP.

El ADP que se origina en esta reacción es utilizado por la piruvatoquinasa para convertir el fosfoenolpiruvato en ácido pirúvico. Finalmente éste se reduce mediante lacticodeshidrogenasa a lactato con la correspondiente oxidación de NADH a NAD⁺ y consiguiente disminución de absorbancia a 340 nm.



La saponificación se realiza añadiendo 200 μl de suero a 500 μl de solución 0.5 N de potasa alcohólica a 60 - 70 °C durante 20 a 30 minutos.

La determinación espectrofotométrica tiene lugar en una mezcla de reacción de la siguiente composición final : 0.08 M tampon trietanolamina pH 7.6, 3.2 mM MgSO₄, 0.2 mM NADH, 1.3 mM ATP, 0.4 mM PEP.

Respecto a las enzimas 16 $\mu\text{g/ml}$ de lacticodeshidrogenasa, 8 $\mu\text{g/ml}$ de piruvatoquinasa y 16 $\mu\text{g/ml}$ de gliceroquinasa. Antes de la adición de esta última se determinó la absorbancia para tomarla como valor de referencia respecto al cual se calcula la velocidad de reacción.

II. 6. Separación, identificación y cuantización de las proteínas séricas.

Para el estudio de las proteínas de suero se ha utilizado la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida de Davis (Davis B.J. 1964). Para conseguir el cumplimiento de las condiciones de Kohlraus que garantizan una electroforesis en disco se ha utilizado como electrolito una solución 5mM TRIS/ClH y 38 mM de glicina pH 8.3.

Los geles tenían la siguiente composición :

gel inferior.

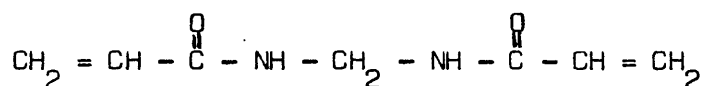
	<u>ml</u>	<u>conc.</u>	<u>conc. final</u>
a) TRIS/ClH pH 9.3	3	1.17 M	145 mM
TEMED		0.128M	16 mM
b) acrilamida	6	28 %	7 %
bisacrilamida		0.75 %	0.19 %
c) persulfato amonico	12	0.14 %	0.07 %
d) agua destilada	3		

gel superior

	<u>ml</u>	<u>conc.</u>	<u>conc. final</u>
a) TRIS/ClH pH 7.6	1	0.5 M	83 mM
TEMED		0.25 M	41 mM
b) riboflavina	1	0.004%	0.0007 %
c) acrilamida	2	10 %	3.33 %
bisacrilamida		2.5 %	0.83 %
d) sacarosa	4	40 %	26.7 %

La electroforesis en gel de poliacrilamida permite aumentar el fraccionamiento de mezclas proteicas por cuanto se combina el fenómeno de migración electrofóretica con el fenómeno de ultracentrifugación molecular, al poder obtener geles sintéticos cuya trama de poro efectivo puede ser ajustada a voluntad desde 400 a 10^8 Å separando componentes de 10.000 a 1.000.000 de peso molecular.

El gel se prepara mezclando en proporciones adecuadas acrilamida y bisacrilamida entre otras sustancias. La metilenbisacrilamida de fórmula



tiene dos extremos con dobles enlaces por lo cual es capaz de polimerizarse e incluir en la cadena otros restos. El grupo $-\text{CH}_2-$ hace de puente entre las dos cadenas de acrilamida.

El polímero estaria formado por cadenas largas con colas de bisacrilamida, colas que a su vez pueden incrustarse en otra cadena dando así lugar a un entrecruzamiento. Debido a este entretejido las cadenas del polímero quedan relativamente fijas, favoreciendo la resistencia mecanica del gel. El tamaño del poro dependerá de lo tupido que sea el entrecruzamiento de cadenas, es decir del nº de cadenas /unidad de volumen.

Los geles de poliacrilamida son termoestables, transparentes, mecanicamente fuertes y quimicamente inertes. Además no existe corriente electroendosmótica pues el gel es inerte en su capacidad de polarización con el agua al paso de la corriente electrica.

Se utilizó un equipo de electroforesis analítica vertical, con tubos de 75 mm de longitud y 6 mm de diametro interior. Se trabajó siempre a intensidad constante de 2.5 mA por tubo durante 2 a 2.5 horas. La temperatura se mantuvo siempre próxima a 15 °C dado el sistema de refrigeración de que dispone el equipo.

Para facilitar la detección de las bandas electroforeticas se procedió al teñido de los geles sumergiendolos por espacio de 2 horas en una solución 0.55 % de negro amido en 7.5 % de ácido acetico. El desteñido del colorante no fijado por las proteínas se conseguía manteniendo los geles en ácido acético al 7.5 % y finalmente sometiendo a una nueva electroforesis con intensidad de 10 mA por tubo y utilizando como electrolito ácido acético al 7.5 %.

La cuantificación de las bandas teñidas se realizó por registro en un microdensitómetro CANALCO, que además del registro proporciona el valor del area bajo cada banda mediante un dispositivo de integración.

Para la identificación de cada banda se ha utilizado el valor de su movilidad relativa a la banda de albúmina, la cual en todos los casos, resultó muy facilmente localizable.

II.7. Determinación de ácidos nucleicos en tejidos.

Para la determinación del contenido tisular en ácidos nucleicos se ha empleado el método clásico de Schmidt-Tannhauser, en una versión actualizada de Munro (Munro H.N. Fleck A. 1966).

En realidad los ácidos nucleicos tienen tres componentes químicos diferentes : bases púricas y pirimidínicas, ribosa o desoxirri**ri**bosa y fósforo. Por tanto los métodos para la determinación de ácidos nucleicos tienen necesariamente que estar basados bien en la valoración del fósforo del extracto, reacciones específicas para las pentosas o en la absorción intensa de rayos ultravioleta por las bases.

Los métodos basados en la absorción de radiaciones ultravioleta y determinación del fósforo, no distinguen entre RNA y DNA, solamente se pueden aplicar cuando ambos ácidos nucleicos se han separado previamente como en el procedimiento de Schmidt-Tannhauser.

El proceso comprende tres partes : a) preparación previa de las muestras de tejidos b) extracción y si es preciso separación de los ácidos nucleicos. c) aplicación de los procedimientos específicos para valorar los ácidos nucleicos en el extracto.

II.7.1. Preparación previa de las muestras de tejido.

Este estadio supone en primer lugar, la toma de muestra del tejido seguido de su desintegración, en unas condiciones tales que las nucleasas queden inhibidas.

Lo normal es homogenizar la muestra de tejido congelado, rapidamente manteniendo el recipiente en una mezcla de agua y hielo. Se trata de cortar el tejido lo más rapidamente posible y homogenizarlo en agua helada operando seguidamente con el homogenado.

II.7.2. Extracción de los ácidos nucleicos proteínas y otras macromoléculas por eliminación de compuestos de bajo peso molecular.

Existen ciertos componentes de los tejidos que pueden interferir en el análisis de los ácidos nucleicos, por ejem. nucleotidos libres y oligonucleotidos.

El procedimiento corrientemente usado para la eliminación de estas sustancias que interfieren consiste en precipitar las proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas con ácido helado, normalmente HClO_4 . Se centrifuga y se separa el sobrenadante que contiene las moléculas de bajo peso molecular. El precipitado suele lavarse varias veces con ácido frio, centrifugando cada vez a fin de que la eliminación sea completa. Estas aguas de lavado se incorporan al sobrenadante anterior.

La experiencia ha demostrado que con el uso de concentra ciones altas de ácido perclórico, se corre el riesgo de eliminar otros materiales ajenos a la fracción normal ácido soluble, se llegó a la - conclusión de que era menester reducir la concentración de perclórico a 0.2 N para eliminar la fracción ácido-soluble, soslayando así el - riesgo de solubilizar RNA.

Si el ácido perclórico está caliente no sólo solubiliza RNA sino también DNA.

II.7.3. Separación de ambos ácidos nucleicos RNA y DNA.

El procedimiento está basado en el hecho de que el ácido nucleico RNA de levaduras se hidroliza con álcali entre 15 y 17 °C en un periodo de tiempo de 24 horas mientras que el ácido nucleico DNA de timo resiste en estas condiciones.

El mecanismo de la diferente resistencia por parte de ambos ácidos nucleicos frente a los alcalis fué aclarado por Fono (Fono A. 1947) y por Brown y Todd (Brown D.M. Todd A.R. 1955). Está basado en el comportamiento diferente con los alcalis del enlace 3-5 fosfo-diester entre nucleotidos adyacentes en el RNA y el DNA.

En el caso del RNA, al exponerlo a la acción de los alcalis se forma un triester cíclico con el grupo hidroxilo en el C (2) de la - ribosa el cual se hidroliza espontáneamente produciendo nucleotidos en 2' ó 3'.

En el caso del DNA la desoxirribosa no tiene el grupo hidro xilo en el C (2) y en consecuencia no puede formar el fosfodiester en 2' ó 3'.

II.7.3.1. Condiciones para la hidrólisis alcalina del RNA.

El hecho de emplear KOH para provocar la hidrólisis alcalina del RNA, radica en que forma un fosfato insoluble entre 0 y 40°C, lo cual permite la eliminación de los iones K^+ de la fracción RNA y la terminación de la hidrólisis, en el momento en que se añade $HClO_4$ para la precipitación del DNA.

En el caso de muestras de tejidos animales, se ha comprobado que las condiciones óptimas para separar todo el RNA en forma ácido soluble exigen tratar las muestras ya procesadas con alcali 0.3 N concretamente KOH, a 37 °C.

En estas condiciones suaves de alcali 0.3 N y a 37 °C los productos de la hidrólisis se transforman rápidamente en compuestos de bajo peso molecular, como se puede apreciar por el hecho de que en un periodo de 1 hora a esta temperatura, el efecto hipercrómico sobre la absorción UV. del RNA es completo.

No obstante algunos oligonucleotidos son resistentes a la hidrólisis alcalina debido al bloqueo por un grupo metilo en el C (2) de la ribosa que impide la formación del fosfodiéster cíclico 2'-3'.

Existen dos tipos de dificultades en la digestión alcalina que afectan a la fracción de RNA y que comienzan a ser más graves a medida que la hidrolisis progresa. Uno consiste en que durante la hidrólisis se puede producir la desaminación de muchas bases, alterando de este modo el espectro de absorción del hidrolizado. Otro es la posible - degradación de varios componentes del tejido a componentes ácido solu- bles debido a la acción del álcali, dichos materiales pueden interferir en la determinación final del RNA.

II.7.3.2. Estabilidad del DNA frente a la digestión alcalina.

La resistencia del DNA a la degradación durante la digestión alcalina ha sido discutida, conviene por ello precisar los límites bajo los que el DNA es capaz de resistir la acción del alcali.

Es posible pensar que el tratamiento en los estadios iniciales del proceso, previos a la valoración del DNA, pueda ocasionar cierta degradación atribuible normalmente a la formación de triésteres cíclicos como en el caso del RNA y consiguientemente aparece algo de DNA en la fracción ácido soluble del hidrolizado.

También se ha estudiado la influencia de la temperatura de incubación alcalina sobre la estabilidad del DNA, comprobando que existe una gama de temperaturas suficientemente amplia dentro de la cual el DNA permanece estable al ser incubado en alcali.

Se puede aceptar que el DNA permanece estable al ser tratado con alcali 1 N a temperaturas inferiores a los 100 °C. Tan solo cuando la pérdida de bases púricas ha dado lugar a la formación de ácido apurínico se corre el riesgo de perder DNA durante la incubación de alcali a 37 °C.

II.7.3.3. Separación de la fracción RNA ácido soluble del hidrolizado.

La separación del RNA y del DNA al final de la digestión alcalina merece una consideración.

En la separación del RNA es preferible emplear HClO_4 que no produce interferencias y además elimina los iones K^+ del hidrolizado en forma de perclorato insoluble. Conviene enfriar el hidrolizado a 0 °C antes de acidular a fin de obtener una precipitación máxima, se acidula hasta obtener una concentración de HClO_4 0.2 N.

Estas condiciones producen una precipitación óptima de proteínas y DNA. El precipitado se lava posteriormente dos veces con HClO_4 0.2 N, llegando de esta manera a completar la separación de RNA y DNA.

II.7.3.4. Tratamiento de la fracción DNA ácido soluble del hidrolizado.

Normalmente antes de aplicar cualquier procedimiento para su valoración, el DNA se disuelve. Esto se consigue en medio fuertemente ácido.

El problema en conexión con el procedimiento de Schmidt-Thannhauser radica en que bajo condiciones suaves no se consigue una extracción total de DNA y si son muy enérgicas se pierde DNA por rotura de la desoxirribosa. La solución es una situación de compromiso a base de HClO_4 0.6 N a 70 °C durante 20 minutos.

II.7.4. Determinación de ácidos nucleicos por absorción UV.

La absorción de luz ultravioleta por las bases púricas y pirimidínicas en la región de 260 μ nos ofrece un medio de evaluar las cantidades de ácidos nucleicos.

Es menester tener en cuenta dos propiedades ópticas importantes de los ácidos nucleicos o los nucleótidos en solución : el efecto hiperacrómico y la naturaleza aditiva de absorción de los nucleótidos en las mezclas.

El efecto hiperacrómico se debe a la liberación de la restricción sobre los orbitales electrónicos de las bases impuesta por las estructuras polinucleotídicas. Resulta además ideal para obtener resultados replicables en el análisis de ácidos nucleicos por medida de UV.

En general se ha aceptado que las propiedades ópticas de las mezclas nucleotídicas son las de los nucleótidos componentes, es to ha encontrado aplicación en la obtención de proporciones de bases en las mezclas de ribonucleótidos y de desoxirribonucleótidos.

Respecto a la evaluación del RNA por absorción UV. ya se ha dicho que la digestión alcalina en el método de Schmidt-Thannhauser da lugar a la liberación de algunos productos de degradación de las - proteínas solubles junto con ribonucleótidos, el grado de contamina- ción se hace progresivamente más grande al aumentar el tiempo de incu- bación y la fuerza del alcali.

A fin de evitar estos inconvenientes se propusieron tres procedimientos :

. Hacer medidas a dos longitudes de onda distintas en el espectro UV. y corregir la lectura a 260 $m\mu$ para el componente proteico.

. Reducir al mínimo la liberación de péptidos, acortando el tiempo de digestión alcalina.

. Separar los peptidos por medio de resinas de cambio de ion o - también por electroforesis.

Las condiciones para la evaluación del DNA aplicando la ab sorción UV. al método de Schmidt-Thannhauser no se han definido con tan ta precisión como las del RNA. Normalmente del precipitado de DNA-pro- teinas obtenido por este procedimiento, se separa el DNA extrayendolo en medio ácido fuerte. Se ha preferido el ácido perclórico al tricloro acético, debido a que este último absorbe más luz ultravioleta.

El problema de aplicar una extracción excesivamente enérgi ca para recuperar integralmente todo el DNA sin solubilizar material peg tídico, se ha comentado ya con anterioridad.

II.8. Extracción, separación analítica y cuantificación de aminoácidos libres en bazo, hígado, cerebro y músculo.

Cada uno de los órganos y fragmentos musculares, en grupos de cinco, correspondientes a peces irradiados y sacrificados a tiempos oportunos, se guardaron separadamente tras la disección, manteniéndolos congelados a -20°C .

Al cabo de un mes como mínimo comenzó el proceso de cada uno de los grupos.

Se homogenizaron con un Virtis en 10 ml de una mezcla de metanol-agua en proporción de 75/25 durante 10 minutos. Durante el proceso de homogenización se mantenía la temperatura baja por medio de un baño de hielo y sal.

Seguidamente se agita el homogenado y se filtra en placa filtrante nº 4, en el congelador a -20°C . El retenido se lava dos veces con mezcla de metanol-agua al 50/50, 18 ml cada vez. Los filtrados reunidos se llevan a sequedad en un rotavapor Evapo-mix, termostatzado, con agitación y bomba de vacío.

El residuo se diluye en 10 ml de agua destilada y se centrifuga 15 minutos a 1000 g, recogiendo el sobrenadante que se lleva hasta sequedad. El residuo se resuspende en 10 ml de agua destilada que posteriormente se llevan a sequedad.

El contenido de aminoácidos libres se introduce en un analizador tipo Durrum modelo D - 500 que ofrece como resultado un registro.

Los picos obtenidos en el registro se identifican con la ayuda del registro correspondiente a una mezcla estandar de aminoácidos.

En total se ha trabajado con 15 aminoácidos libres, que son los que aparecen de forma permanente en todos y cada uno de los diagramas a tiempos diferentes correspondientes a cerebro, músculo, bazo e hígado de pez dorado e irradiado a 2.300 rads.

Los aminoácidos metionina y cisteína aparecen en dos o tres diagramas tan solo y además con una cuantificación muy baja por lo cual se excluyeron del conjunto objeto de estudio.

El analizador estaba especialmente adaptado para la evaluación de aminoácidos procedentes de proteínas y las cuantificaciones que ofrece se refieren siempre a una cantidad determinada de - proteína. Como en nuestro caso se trata de aminoácidos libres en - vez de manejar cantidades absolutas se optó por hallar el % de cada uno de los aminoácidos dentro del conjunto de los quince sometidos a estudio a diferentes tiempos postirradiación.

Los quince aminoácidos considerados son : glicocola, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, ácidos aspártico y glutámico, lisina, arginina, histidina, prolina, fenilalanina y tirosina.

En el caso de algunos aminoácidos; concretamente leucina e isoleucina en bazo a 3 horas postirradiación, arginina en músculo a 1 y 48 horas ha sido necesario interpolar unos valores. El - criterio seguido ha sido el siguiente : Se construyó la curva correspondiente a los valores absolutos de aminoácido que dá directamente el analizador y se adoptaron valores en concordancia con la dirección seguida por la curva.

Los aminoácidos prolina y ácido glutámico no dieron en hígado puntos suficientes como para poder reconstruir la curva con cierto rigor científico por lo cual ha sido preciso prescindir en el cálculo global de estos datos. La omisión de las cuantificaciones correspondientes a estos dos aminoácidos repercutirá indudablemente sobre el tanto por ciento de los restantes elevándolo, condición que habrá de ser tomada en consideración a la hora de enjuiciar y discutir los resultados.

III RESULTADOS Y DISCUSION

III.1. EVOLUCION POSTIRRADIACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS TOTALES EN SUERO DE PEZ DORADO (CARASSIUS AURATUS).

El descenso brusco de la concentración de proteínas totales, es la más inmediata respuesta que se ha detectado en el suero de peces dorados *Carassius auratus*, irradiados. En la fg. 22 puede apreciarse cómo en un periodo de tiempo comprendido entre las 3 y 6 horas consecutivas a la irradiación, dicha concentración ha disminuido hasta valores próximos al 70 % respecto a los peces control. El valor de este descenso así como la rapidez son independientes de la dosis de irradiación.

También se deduce de la fg. 22, que independientemente de las dosis estudiadas se alcanza con posterioridad una recuperación - prácticamente completa de los valores primitivos de concentración de proteínas totales del suero. Por el contrario el retardo en conseguir esta recuperación de concentración de proteínas totales presenta una marcada dependencia con la dosis. Retrasos estimables entre 16 a 18 horas 24 y 48 horas corresponden respectivamente a dosis de irradiación de 2.300, 5.300 y 10.700 rads.

Ambos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Ulrickson (Ulrickson G.B. 1971) sobre "bluegill" (*lepomis macrochirus*).

En el caso de ratones sometidos a dosis del orden de los 600 rads, las proteínas totales caen ininterrumpidamente sin notarse inicio de recuperación aún doce días después de la irradiación (Sassen A. Kennes F. Maisisn J.R. 1966). Sin embargo en peces sometidos a dosis mucho mayores, 2.000 y 3.000 rads, la recuperación tiene lugar dentro de las 16 - 18 horas o 24 horas después de la irradiación, aumentando el tiempo en función de la intensidad de irradiación recibida, según se ha dicho anteriormente.

La recuperación en peces tales como "bluegill" (Ulrickson G.U. 1971) y pez dorado, nuestro caso, es evidentemente mucho más inmediata que en mamíferos, esto hace suponer si los peces poseeran un mecanismo de recuperación proteica ya distinto o simplemente más eficaz que el de los mamíferos.

En la fg. 22 se puede observar también, cómo la recuperación conseguida perdura al menos durante los 9 días consecutivos a la irradiación.

Está claro que aunque cualitativamente análoga, la repercusión de la dosis de 10.700 rads es cuantitativamente distinta. El descenso en concentración continua durante las primeras 24 horas hasta alcanzar el 65 % del valor del control.

La recuperación no se inicia hasta después de las 48 horas, no llegando a alcanzar más de un 90 % del valor de referencia.

III.2. EVOLUCION POSTIRRADIACION DE LA CONCENTRACION DE OTRAS MAGNITUDES BIOQUIMICAS EN EL SUERO DE PEZ DORADO (CARASSIUS AURATUS).

En las fgs. 22 y 23 aparece la evolución de algunas magnitudes bioquímicas del suero de peces irradiados a 2.300 rads.

III.2.1. Fosfatasa alcalina.

La concentración de fosfatasa alcalina así como la de hemoglobina, presentan una evolución que se corresponde muy estrechamente con la de proteínas totales. Tal vez pudiera tenerse en cuenta un incremento transitorio de actividad fosfatásica que aparece al cabo de 1 - 2 horas después de la irradiación, antes de descender bruscamente hasta valores próximos al 50 % de los de referencia fg. 23.

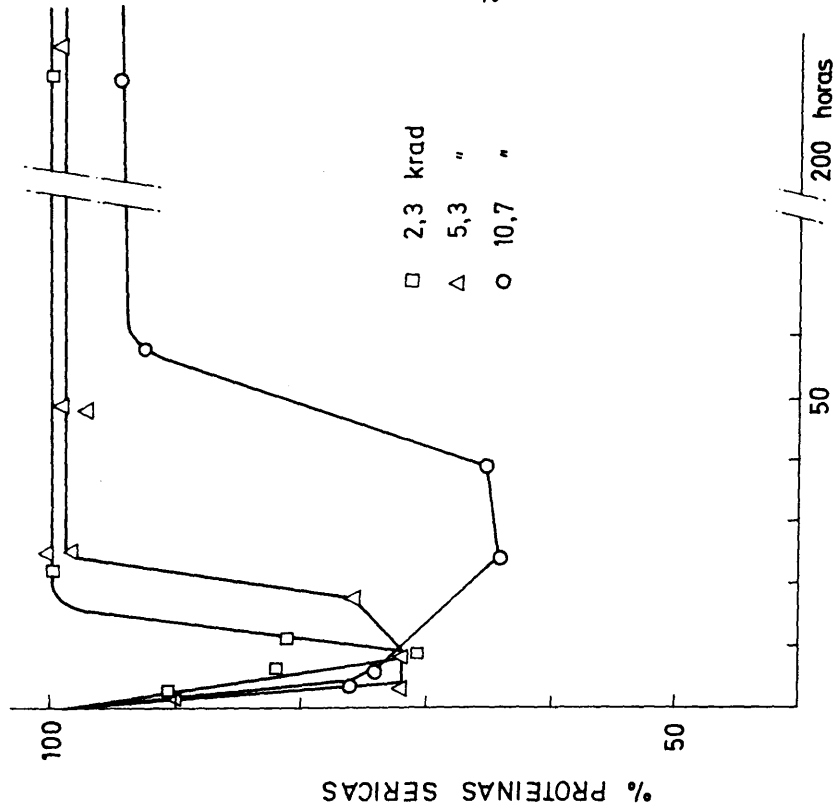


Fig.- 22

Variación de las proteínas séricas totales de pez dorado con la radiación gamma en función del tiempo .

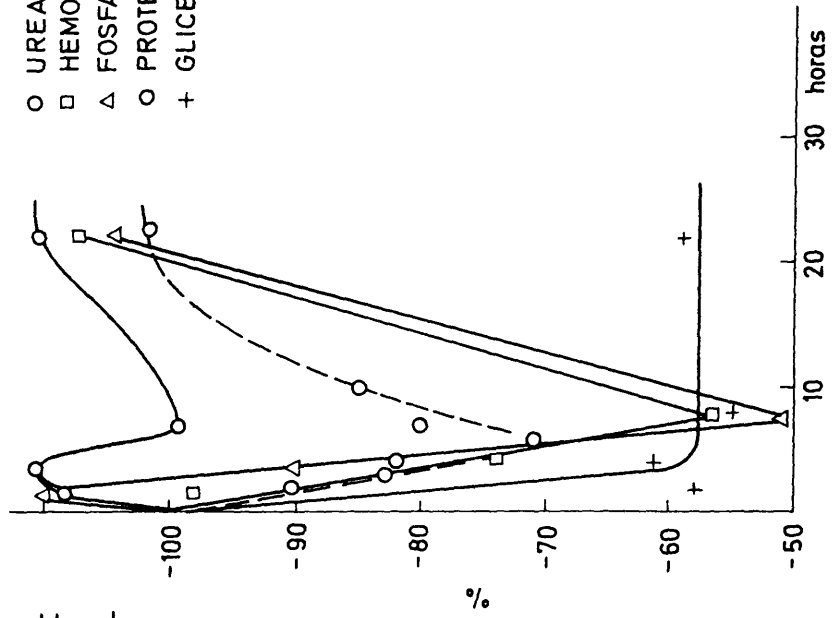


Fig.- 23

Variación de la concentración de otras materias bioquímicas de pez dorado con la radiación gamma en función del tiempo.

120

El proceso postirradiatorio seguido por la fosfatasa alcalina en peces irradiados es análogo al de ratones sometidos a 600 rads, un fuerte descenso en las primeras horas (Drouet J. Legrand A. Brunet G. Goyffon M. 1972). Se manifiesta no obstante el mismo fenómeno que en el caso de las proteínas totales, una recuperación mucho más rápida en los peces que en los ratones. La fosfatasa alcalina de los peces alcanza su valor inicial al cabo de 24 horas mientras que al tratarse de ratones no se consigue dicho nivel hasta las 72 horas.

III.2.2. Hemoglobina.

También la hemoglobina sérica sufre en los peces un proceso de descenso en la concentración idéntico al que sucede en el caso de ratas en las horas inmediatas a la irradiación (Galarza A. Garriazo D. Feijoo B. 1971). Mientras la recuperación en ratas no se inicia aún en la sexta hora de postirradiación, en los peces al cabo de ese tiempo aparece una recuperación tan rápida como su caída fg. 23.

III.2.3. Urea.

La urea sérica de peces irradiados ofrece una subida inicial en su concentración seguida de una serie de fluctuaciones durante las primeras 24 horas, aunque manteniéndose siempre sobre los valores de referencia en animales no irradiados fg. 23.

Esta subida coincide con los resultados obtenidos en ratas blancas (Galarza A. Carriazo D. Feijoo B. 1971), así como con las afirmaciones de Gerber (Gerber G.B. Altman K.I. 1970) y Hempelmann (Hempelmann L.H. Lisco H. Hoffman J.C. 1959). Hay que tener en cuenta

no obstante que el procedimiento de Fawcett J.U. (Fawcett J.U. Scott J.E. 1960) seguido en nuestro trabajo para la evaluación de la urea, viene seriamente interferido por la hemoglobina, la cual no hemos podido evitar nunca en el suero de nuestra experiencia.

III.2.4 Glicéridos.

Los glicéridos del suero de peces dorados irradiados, - disminuyeron de manera inmediata su concentración en solo alguna hora hasta valores del 50 % del inicial, para, a diferencia de las restantes magnitudes no recuperarse en el periodo observado fg. 23.

Estos resultados difieren de los obtenidos en mamíferos, concretamente conejos, donde en general se aprecia una elevación de - todos los lípidos séricos (Gerber G.B. Altman K.I. 1970). En ratones no obstante se produce un descenso en la concentración de lipoproteínas de densidad alta mientras que las de densidad baja suben de concentración (Rehnborg y col. 1962).

III.3. EVOLUCION POSTIRRADIACION DE LOS REGISTROS ELECTROFORETICOS DEL SUERO DE PECES (CARASSIUS AURATUS).

La fg. 24 presenta un conjunto de registros densitométricos de las electroforesis de disco en gel de poliacrilamida, correspondientes a sueros de peces irradiados a 10.700 rads y sacrificados a diferentes tiempos post-irradiación.

La banda de la izquierda, banda (I) corresponde a la albúmina y por ello se ha tomado como punto de referencia a efectos de - identificación de las restantes bandas.

Las alfa-globulinas no han podido ser detectadas ya que por su movilidad electroforética análoga a la de la hemoglobina en las condiciones que hemos trabajado, ha estado sistemáticamente enmascarada por la banda (E) de la hemoglobina.

Las beta-globulinas están representadas por la banda (D) mientras que las gamma-globulinas lo están por las bandas (B+C) y (A), de acuerdo con su menor y mayor peso molecular.

En la tabla 2 y 3 se recogen los resultados de la variación del valor porcentual de cada banda dentro de los respectivos -- electroforegramas, y las movilidades relativas de cada proteína a la banda de albúmina respectivamente. La fg 25 muestra cómo varían las globulinas a diferentes dosis de irradiación en función del tiempo.

Las gamma-globulinas de alto peso molecular, banda (A), parecen no experimentar variación alguna en el caso de 2.300 rads, - pero sí en el caso de dosis altas, 10.700 rads. Este incremento que se presenta a las 7 - 9 horas post-irradiación no parece significativo y desaparece a las 24 horas. A pesar de su baja significación parece corresponderse con la dosis comunicada.

Un incremento similar seguido por un descenso aparece - también en los resultados obtenidos por Ulrickson (Ulrickson G.B. 1971). Parece ser que en el caso de peces se necesitan dosis semiletales de irradiación para llegar a conseguir diferencias significativas respecto de los animales que nos sirven de control.

Tratándose de ratones se produce un descenso inmediato - (Gerber G.B. Altman K.I. 1970).

En el caso de las gamma-globulinas de menor tamaño molecular banda (B+C), es evidente un fuerte descenso desde las primeras horas. Este descenso es tanto más profundo y más rápido cuanto menor es la dosis suministrada.

En el mismo sentido apuntan los resultados obtenidos por Ulrickson en el mencionado trabajo sobre "bluegill".

En el caso de 2.300 rads, la proporción de estas gamma-globulinas se reduce a un tercio de las de los valores de referencia durante la primera hora. Por el contrario con 10.700 rads, el descenso tiene lugar a lo largo de las primeras 24-48 horas y representa una reducción a la mitad. La dosis de 5.300 rads presenta un comportamiento intermedio. En cualquiera de los tres casos parece iniciarse una lenta recuperación hacia los valores primitivos.

Las beta-globulinas, banda (D) se comportan de forma simétrica a las del grupo anterior ya que en las tres dosis estudiadas se produce un marcado incremento tanto mayor y tanto más inmediato - cuanto menor es la dosis suministrada. Así a 2.300 rads se duplica su porcentaje en un periodo de tiempo comprendido entre las 4 y 6 horas mientras que a dosis de 10.700 rads solo aumenta en un 50 % en un periodo de tiempo de 48 a 50 horas. En el caso de 5.300 rads el máximo se presenta a las 24 horas. También en los tres casos se observa una progresiva vuelta a los valores de referencia.

En el caso de "bluegill" (Ulrickson G.B. 1971) se produce un descenso inicial durante las dos primeras horas seguido de un aumento inmediato.

En otras especies animales el aumento de las beta-globulinas se produce inmediatamente después de la irradiación.

No se han presentado las variaciones del porcentaje de la banda de albúmina, precisamente porque apenas varían ni con la dosis ni con el tiempo post-irradiación.

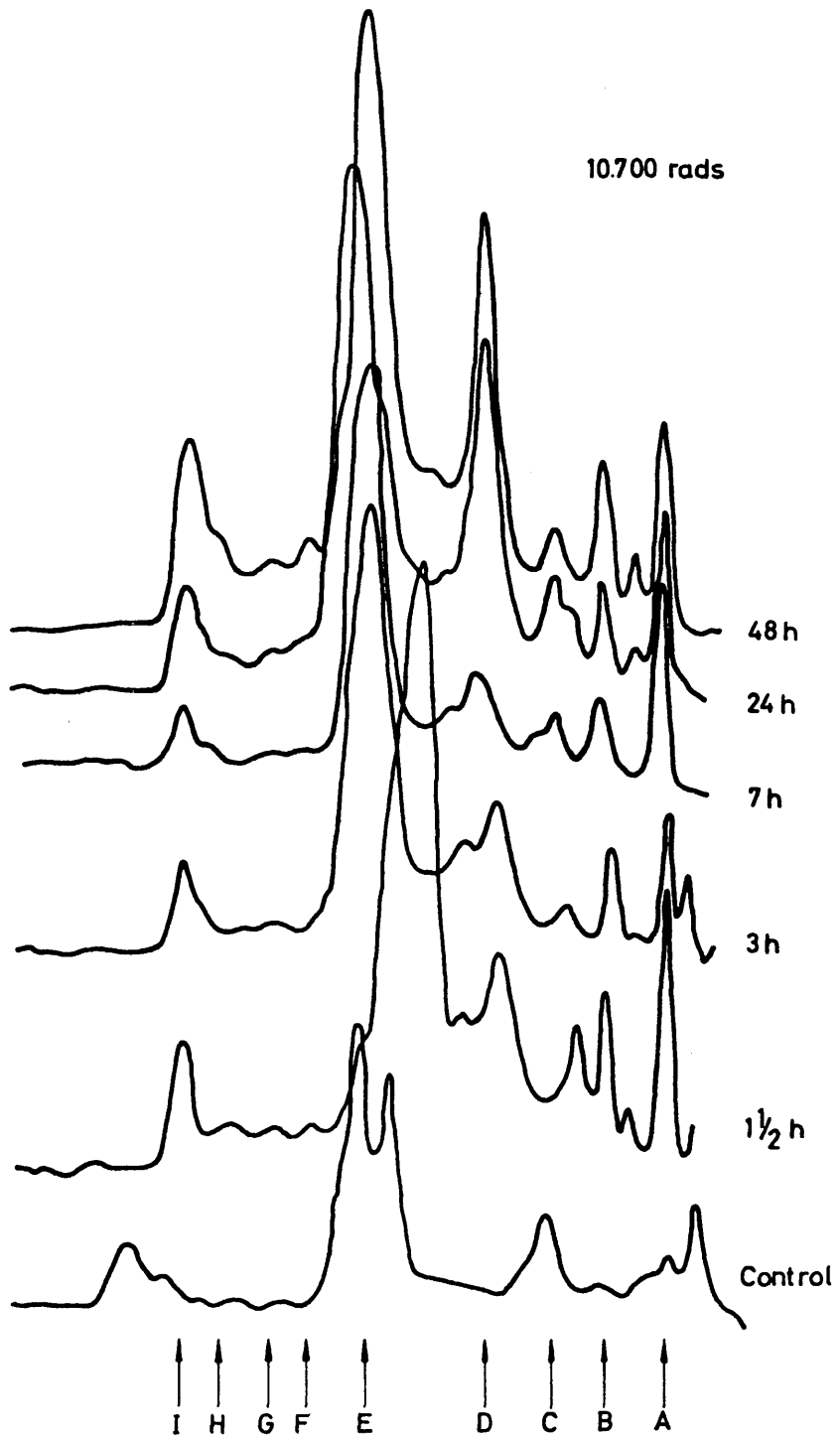


Fig-24

Registros densitométricos de electroforesis disco-gel en poliacrilamida correspondientes a suero de peces sometidos a radiación ionizante .

% - Table 2 10.300 rads.

	CONTROL	1.5 horas	3h. 15'	7 horas	24 horas	48 horas
A	6.60	5.61	5.73	7.40	5.22	4.48
	1.72	1.28	1.30		1.20	1.12
B	8.3	4.85	4.97	4.44	4.14	4.48
C	7.99	5.02	5.21	6.66	6.35	4.10
D	10	10.42	10.85	11.1	19.50	15.30
	2.58	4.43	7.32	5.52	5.52	10
E	34.66	40.22	42.76	43.20	35.83	38.81
	3.04	5.46	3.46			
F	3.04	2.86	2.39	4.44	2.75	3.73
G	2.03	2.45	1.89	2.96	2.32	2.99
H	3.24	2.56	2.63	1.48	1.92	3.73
I	7.40	5.93	7.04	5.92	5.71	8.36
		1.23	1.44		1.20	
		0.32			1.50	
		0.32	1.22		1.20	

RFs TABLA 3 10.700 rads.

	CONTROL	1.5 HORAS	3 HORAS 15'	7 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
A	00.0	0.00	00.0	0.00	0.00	0.00
	187±5	77	35 75.55		65.6	72.1
B	138±75	130	136	127	129.5	136
	188±6 219.2	187.5	224.5	232	233	228.5
D	261.5 285.25					
	374.75	343	369	389	379	377
E	607 669	419	433	434	482	485.5
		533	616	602	602 662	610 651
F		705.0	695	747	759	724
		794.0	807.5	817	839	830.5
H	895.5	891.5	879.5	925	943	919.5
	943.5					
I	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0
		1035	1144			
		1277			1200	
		1375	1239		1358	

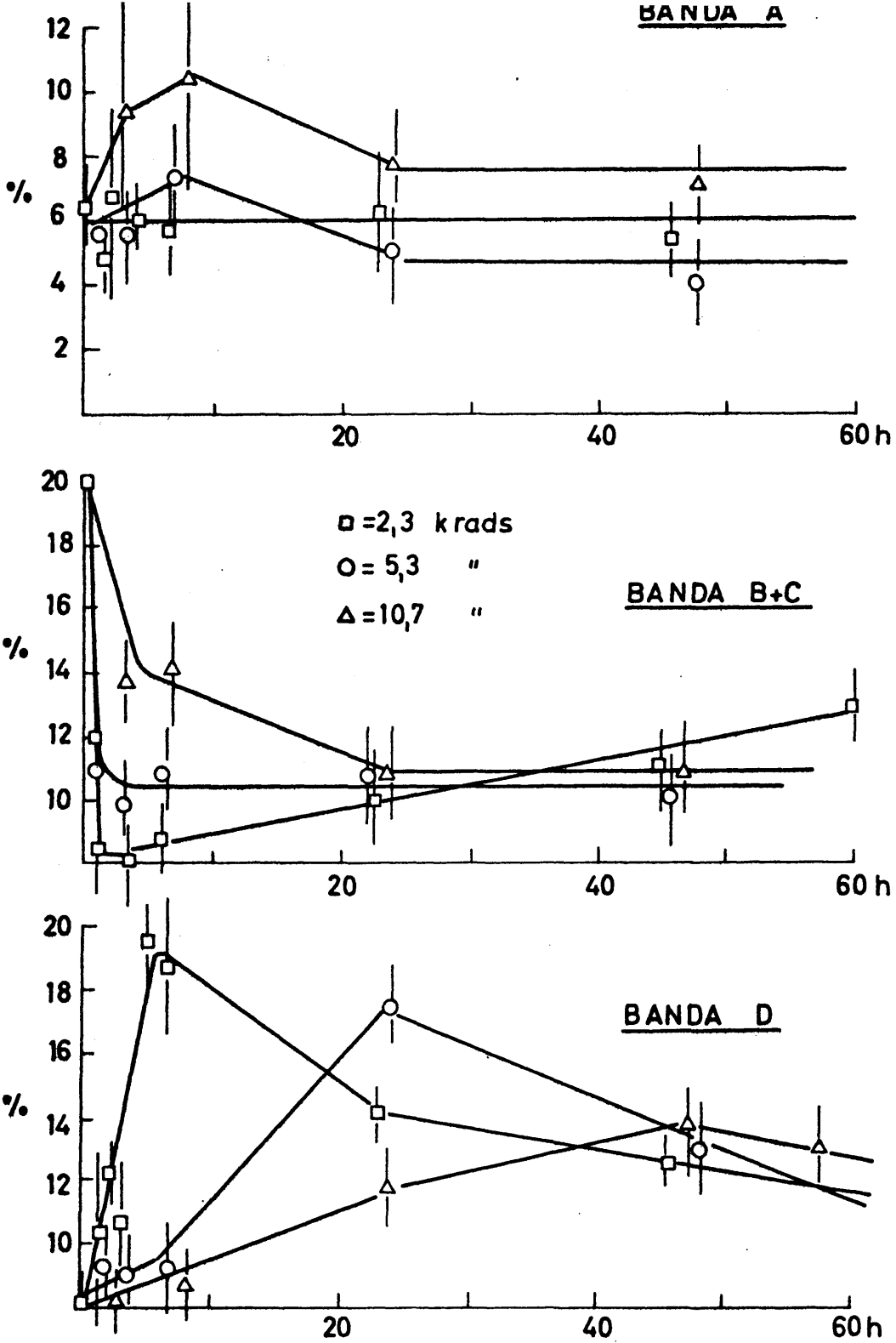


Fig.-25

Variación de las γ globulinas de alto y bajo Pm. bandas A y (B+C) globulinas banda D, en suero de pez dorado con la radiación

Se podría resumir diciendo que lo más notable en la alteración del espectro electroforético de las proteínas séricas de los peces irradiados, en función de dosis y tiempo transcurrido son los tres aspectos siguientes :

- a) La alteración es tanto más marcada y tanto más inmediata cuanto menor es la dosis administrada, al menos en el intervalo de dosis estudiado.
- b) La alteración tiene lugar principalmente en el incremento del porcentaje de beta-globulinas y en la disminución del correspondiente a las gamma-globulinas de bajo peso molecular.
- c) A más de dos días después de la irradiación o a dosis del orden de la decena de ~~k~~krads, en cualquier momento el espectro electroforético del suero apenas presenta anomalías.

III.4. EVOLUCION POST-IRRADIACION DE LA BIOSINTESIS DE DNA EN EL INTESTINO DE PEZ DORADO (CARASSIUS AURATUS)

La determinación del contenido en DNA del intestino de los peces irradiados, proporcionó dos informaciones distintas :

Por un lado la comparación de los porcentajes de las fracciones ácido soluble y de DNA hace posible evaluar el grado de polimerización de los polidesoxirribonucleotidos presentes en las células. Por otro el cálculo por centelleo líquido de la cantidad de timidina radioactiva incorporada permite estimar la velocidad de biosíntesis del DNA, la cual es correlacionable con la velocidad de proliferación celular en el tejido.

En la serie de 2.300 rads se aprecia un ascenso continuado de la fracción AS desde las primeras horas, ascenso que alcanza - su punto máximo al cabo de las 30 horas, manteniendose más o menos - al mismo nivel hasta 48 horas subsiguientes a la irradiación, fg. 26 A.

El DNA por su parte tras un aumento inicial culminado al cabo de 4 horas de irradiación, inicia una bajada recobrando su valor normal a las 15 horas, continua despues el descenso hasta las 29 horas en que alcanza un nivel del orden del 30 % y que conserva aún 48 horas despues de la irradiación, fg. 26 C.

La serie de 5.300 rads ofrece en las medidas espectrofo-
tométricas un aumento paulatino de la fracción AS hasta trascurridas las 29 horas en que se estabiliza hasta las 48 horas observadas fg. 26 A.

La fracción DNA sufre un descenso continuado desde las primeras horas que se prolonga hasta las 48 horas siguientes a la irradiación sin manifestar síntomas aparentes de recuperación al menos en este lapso de tiempo fg. 26 C.

En la serie de 10.700 rads se aprecia un aumento en la fracción AS desde las primeras horas que llega a su valor máximo a las 48 horas para descender despues paulatinamente fg. 26 A.

Mientras tanto el DNA que ha permanecido practicamente estable en las primeras horas comienza a descender a partir de las 7 horas para llegar a un valor mínimo a las 24 horas, iniciando seguidamente la recuperación. Por contaje en centelleo líquido se observó un descenso brusco en la síntesis de DNA en las primeras horas, recuperando-se dicha actividad entre las 24 y 48 horas fg. 26 C.

La fracción RNA manifiesta sucesivos y leves descensos y aumentos de proporción que tienden a estabilizarse al cabo de cierto tiempo en valores normales. Dicha estabilización no se alcanza antes de 8 horas para la dosis de 2.300 rads, 48 horas para 5.300 rads y de 56 a 100 horas para 10.700 rads. Fg. 26 B.

A la vista de las gráficas hay que constatar dos hechos :

1º No aparecen diferencias sistematicas entre las dosis administradas en ninguna de las tres gráficas correspondientes a las fracciones de AS, RNA y DNA. Da la impresión de que los datos numéricos no tienen gran significado.

2º Considerando cada fracción separadamente, fg 26 A, B, C, se puede apreciar que la fracción de RNA prácticamente no cambia por la acción de la radiación, sin embargo sí varían las fracciones de AS y DNA. La fracción de DNA desciende desde las primeras horas hasta las 48 horas siguientes a la irradiación mientras que la fracción AS durante ese mismo tiempo asciende, su variación es pues complementaria. Posteriormente a estos sucesos ambos tienden a la normalidad.

La explicación de todo esto se podría encontrar, considerando el hecho como algo paralelo a lo que se ha comprobado que sucede en las bacterias (Bridges y col 1968).

En estos organismos la radiación ionizante actúa como disparador de un proceso fisiológico de degradación de DNA que despues de iniciado se continua por si mismo hasta que llega a ser detenido por un control que se supone sea la regulación genética. Existen tambien en las bacterias mecanismos de reparación que "limpian" las cadenas de DNA degradadas en las zonas afectadas y las ponen en condiciones idoneas para reanudar la polimerización correcta, es decir la reparación.

□ 2,3 K rads
 △ 5,3 K rads
 ○ 10,7 K rads

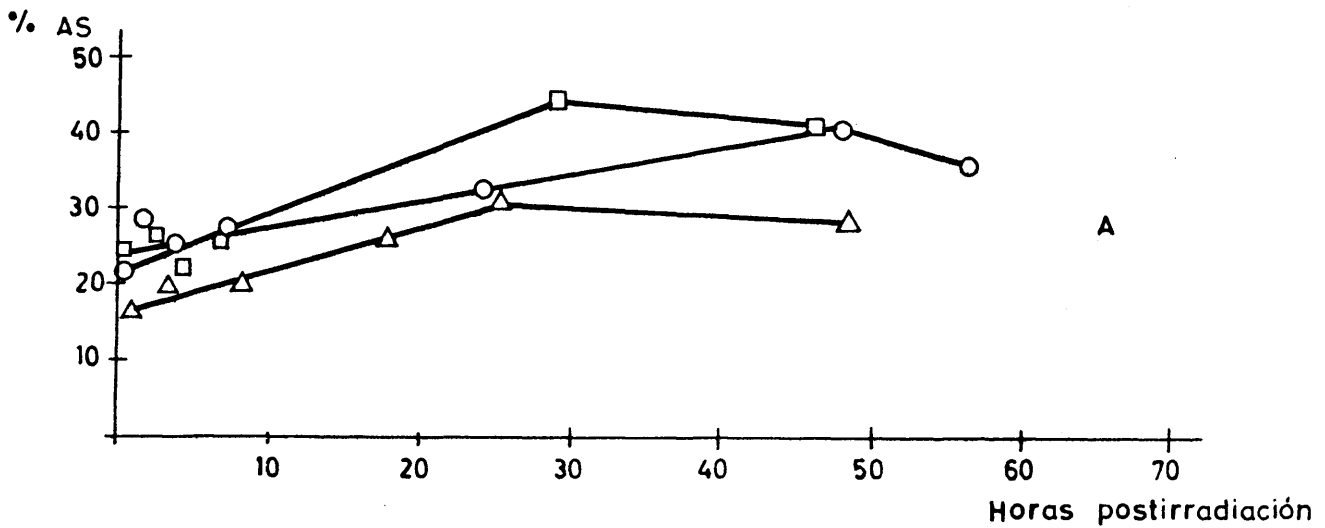
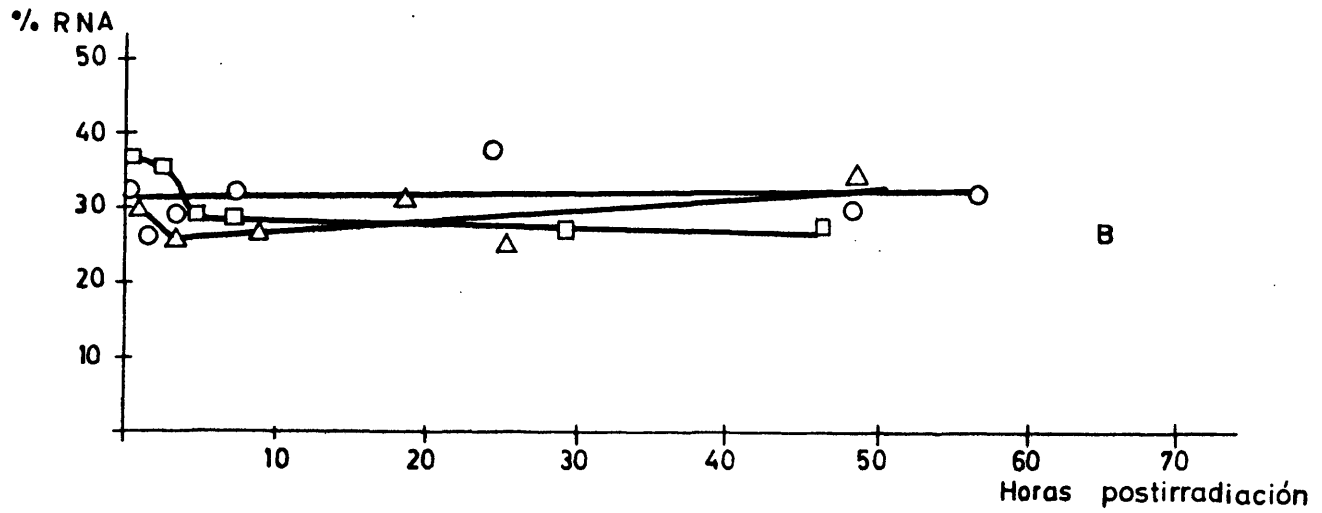
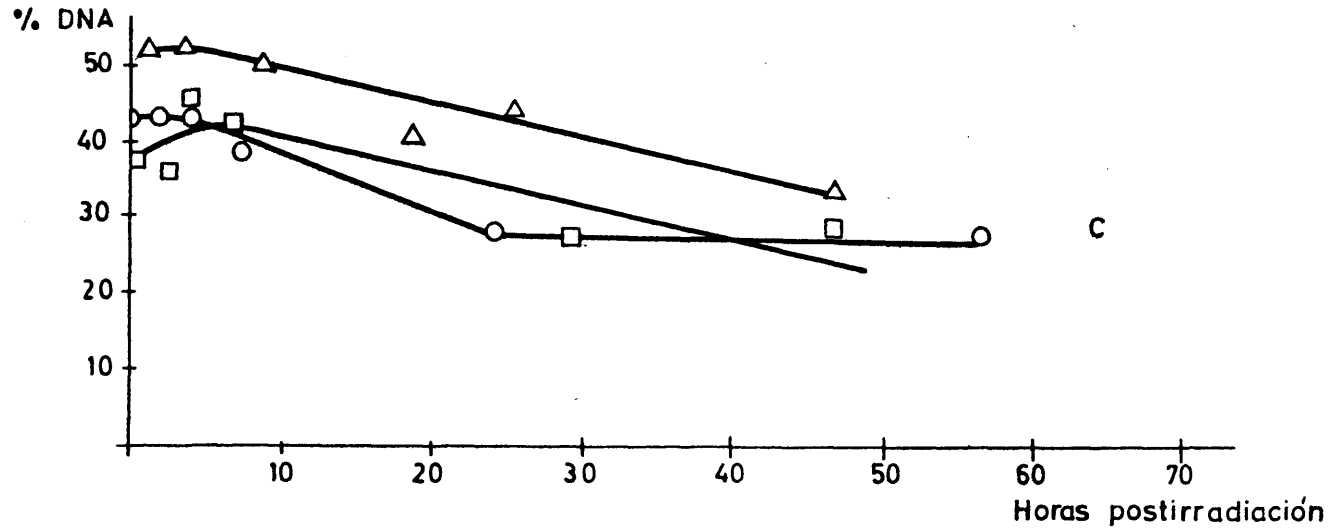


Fig.26

Efecto de la radiación ionizante sobre la concentración de DNA , RNA y AS en función del tiempo en intestino de pez dorado .

Si por determinadas circunstancias esos procesos de degradación del DNA no logran detenerse sobreviene la muerte de la célula.

Se presume en nuestro caso que la irradiación actúa como agente inductor de la despolimerización del DNA, por analogía a lo que sucede en las bacterias. Una dosis del orden de los 2.000 rads basta entonces para iniciar el proceso de despolimerización, sin que dosis superiores del orden de los 5.000 o 10.000 rads produzcan efectos mucho más notables como se confirma en nuestros resultados.

Respecto del punto 2º es necesario considerar que el mecanismo de degradación del DNA no afecta para nada al RNA, que no es atacado por estos procesos fisiológicos de degradación, y en consecuencia no sufre fluctuaciones de consideración.

El m-RNA y el t-RNA son cuantitativamente poco significativos dentro del conjunto organizado de la célula, sin embargo el r-RNA posee una significación cuantitativa mucho mayor, es muy abundante. Dado el método seguido para procesar y analizar el tejido intestinal de los peces, el de Schmidt-Thannhauser, el RNA que se analiza es sin duda el r-RNA, que por ser muy abundante apenas ofrece variaciones por efecto de la radiación ionizante.

La fg. 27 pone en evidencia que la biosíntesis de DNA en el intestino de los peces irradiados, se detuvo brusca y casi totalmente en solo una hora después de la irradiación. Dicha actividad metabólica se recupera posteriormente pero tan lentamente que al cabo de 72 horas es todavía menor que el 40 % del valor de referencia en el caso de 2.300 rads y del 20 % en el caso de 10.700 rads. Incluso 6 días despues de la irradiación, la biosíntesis de DNA en el intestino presenta sólo 3/4 de la velocidad normal.

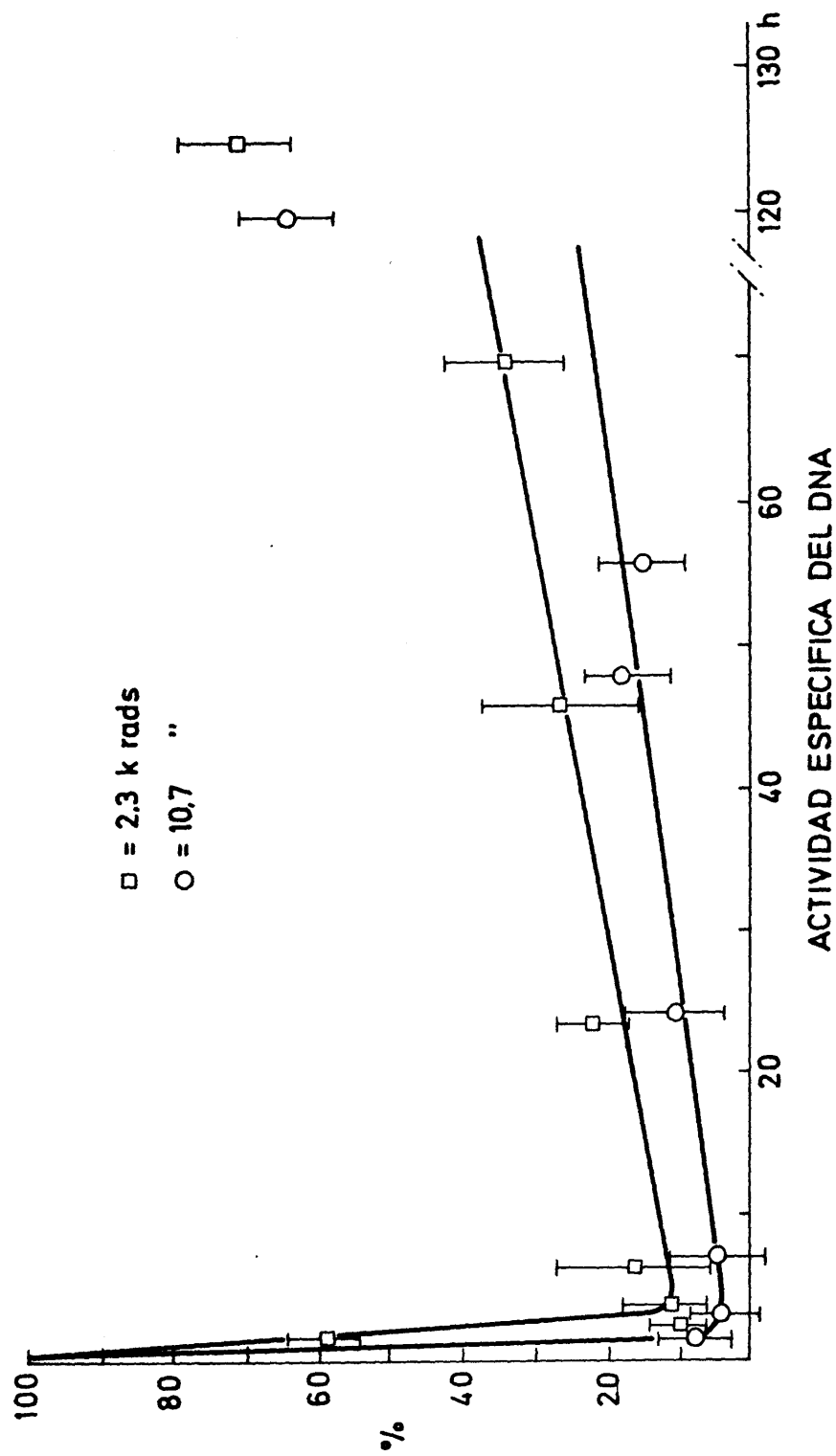


Fig. 27

Variación de la actividad específica del DNA en función del tiempo postirradiación a distintas dosis .

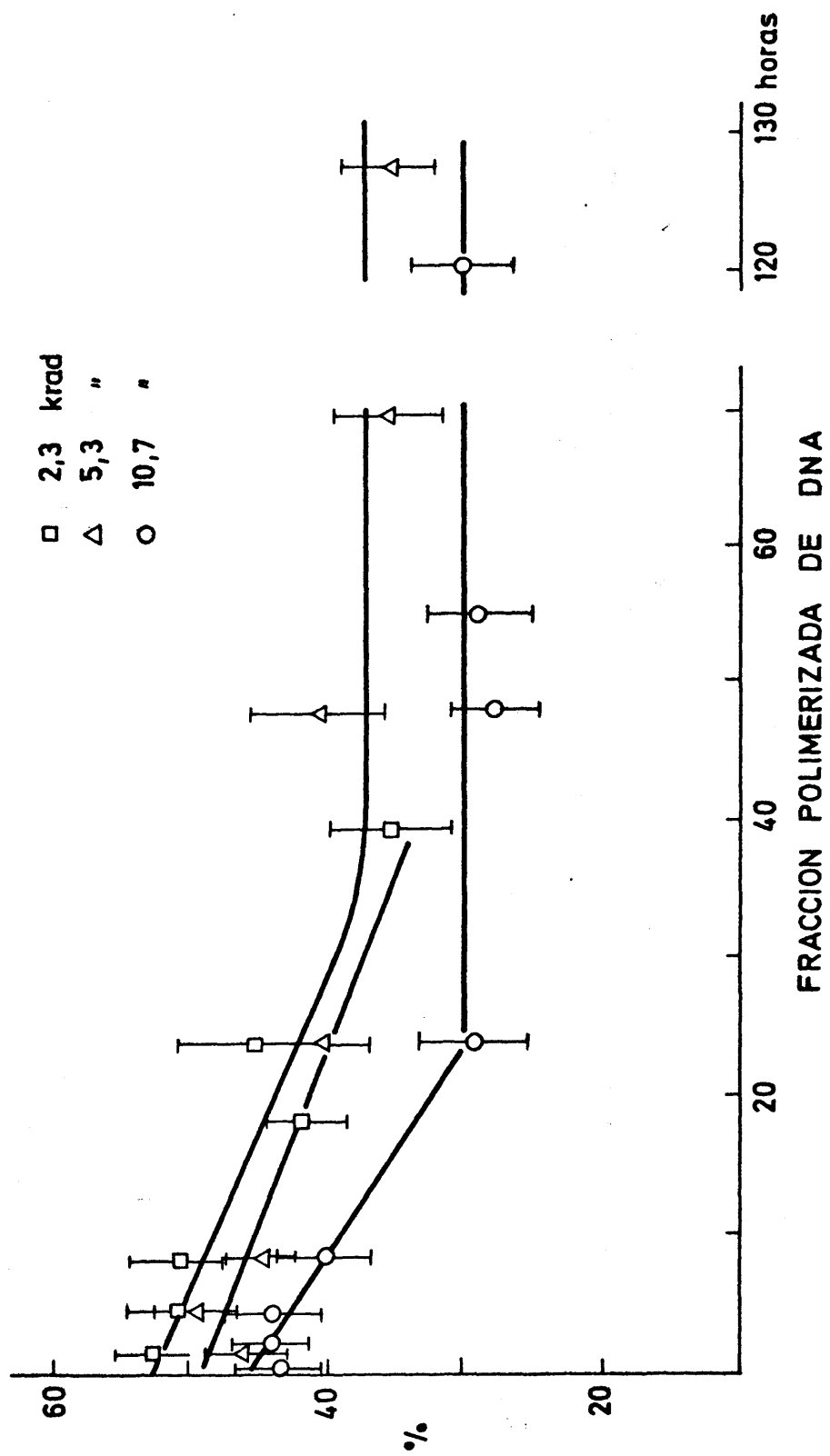


Fig.28

Variación de la fracción polimerizada del DNA con el tiempo postirradiación a distintas dosis .

Respecto a la fracción polimerizada del DNA en las células del intestino, nos informa la fg. 28. En ella se observa que a partir de 3 a 6 horas inmediatas a la irradiación y con independencia de las dosis administradas, se produce una pérdida de fracción de DNA de alto peso molecular que a las 24-48 horas queda reducida a casi la mitad de su valor normal permaneciendo así al menos durante 6 días.

III.5. Evolución del porcentaje relativo de aminoácidos libres en cerebro, músculo, bazo e hígado de pez dorado, Carassius auratus, tras la irradiación.

Las gráficas de las fgs. 29, 30, 31, 32 y 33 muestran las variaciones que tienen lugar por efecto de la radiación gamma de peces dorados, en el % de cada uno de los aminoácidos libres que integran el grupo de quince y que son objeto de estudio en cerebro, músculo, bazo e hígado respectivamente. Los quince aminoácidos citados son los siguientes : glicocola, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, ácidos glutámico y aspártico, lisina, arginina, histidina, prolina, tirosina y fenilalanina. La dosis a que fueron sometidos los peces es de 2.300 rads.

La interpretación de estas gráficas puede centrarse en dos puntos concretamente : la crítica de la forma de cada una de las curvas y una consideración de su nivel global.

En cerebro puede apreciarse la existencia de un conjunto de aminoácidos libres cuyas concentraciones relativas dentro de las 48 horas postirradiación aparecen siempre por debajo del 5 %, tales son : - histidina, acd. aspártico, treonina, tirosina, prolina, fenilalanina, - leucina, valina, arginina e isoleucina. Otros se encuentran en torno a la zona del 10 % como lisina, glicocola y serina. Finalmente otros dos alanina y ácido glutámico, se encuentran en una concentración entre 15 y 20 %.

La variación más notable es la de alanina, donde se nota un ascenso claro, el ácido glutámico ofrece un máximo a las 25 horas postirradiación, también en las curvas de histidina y prolina puede apreciarse un leve descenso.

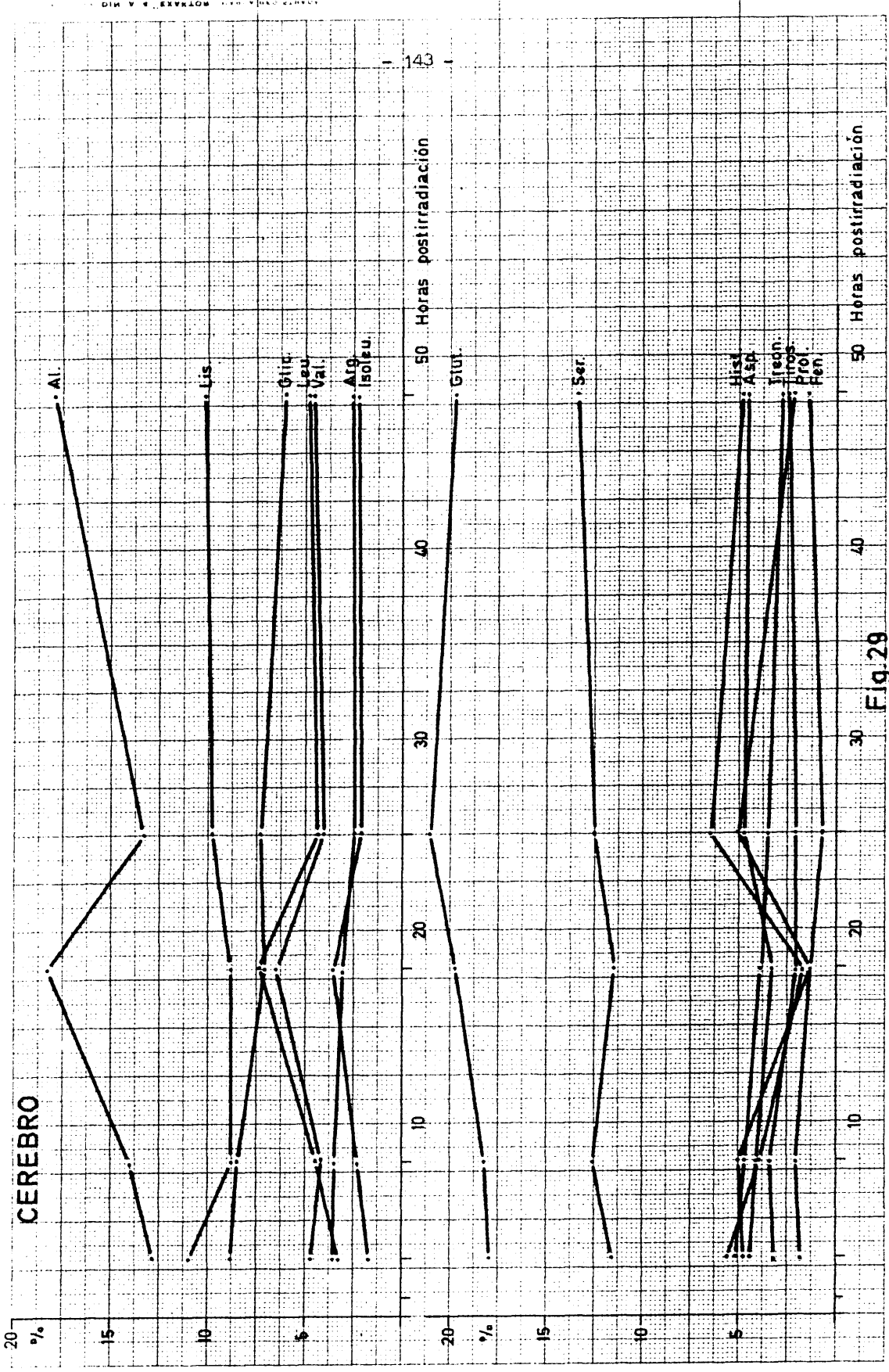
Los aminoácidos leucina, valina, isoleucina, arginina, - tirosina, ácidos aspártico y glutámico, treonina y prolina, ofrecen en músculo una concentración alrededor del 5 % y en algún caso inferior. Serina, histidina, lisina y alanina alcanzan concentraciones en torno al 10 % y glicocola y fenilalanina están entre 15 y 20 % durante las 48 horas postirradiación que duró su control.

En músculo se aprecia un incremento en fenilalanina que alcanzó un máximo entre las 8 y 18 horas postirradiación, un leve as censo en prolina, serina, alanina y lisina. Los demás no manifiestan particularidad alguna que merezca ser tenida en consideración.

En el bazo los aminoácidos fenilalanina, tirosina, histidi na, treonina, prolina, arginina, isoleucina, valina y leucina alcanzan concentraciones en torno al 5 % e inferiores. El nivel de serina, gli- cocola, lisina y alanina oscila entre un 10 y un 15 %. Finalmente el - ácido glutámico logra una concentración entre 15 y 25 % dentro de las 48 horas postirradiación.

El incremento más fuerte y por tanto con mayor significación, corresponde al ácido glutámico, le siguen en nivel inferior lisi na y quizá **pro**lina. Alanina acusa un leve descenso y los demás no presen tan variaciones significativas.

Excepto serina y alanina que alcanzan concentraciones entre 15 y 37 % durante las 48 horas postirradiación objeto de control, los -



Evolución del porcentaje relativo de aminoácidos libres en cerebro de pez dorado irradiado (2300r) con el tiempo

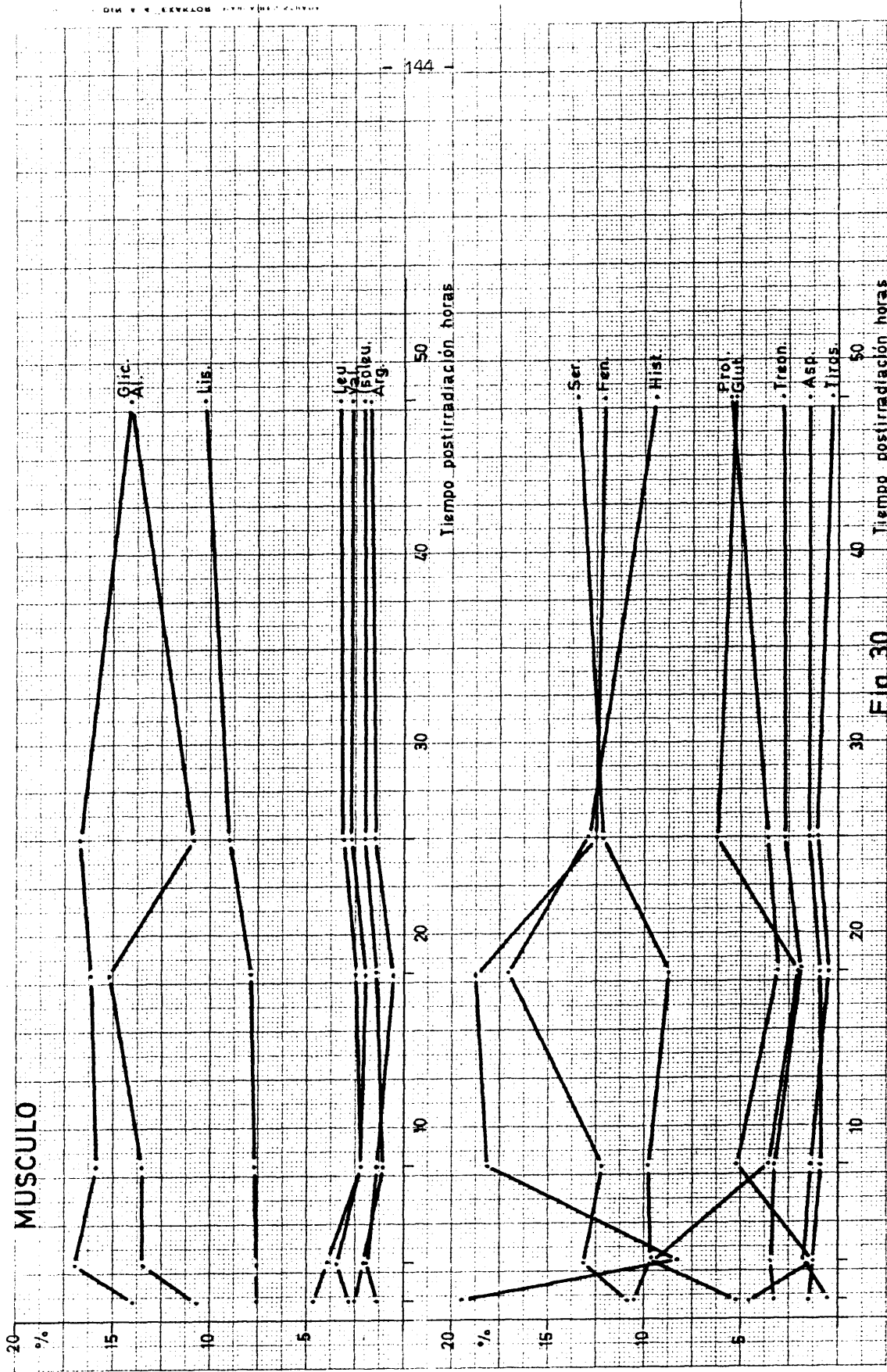
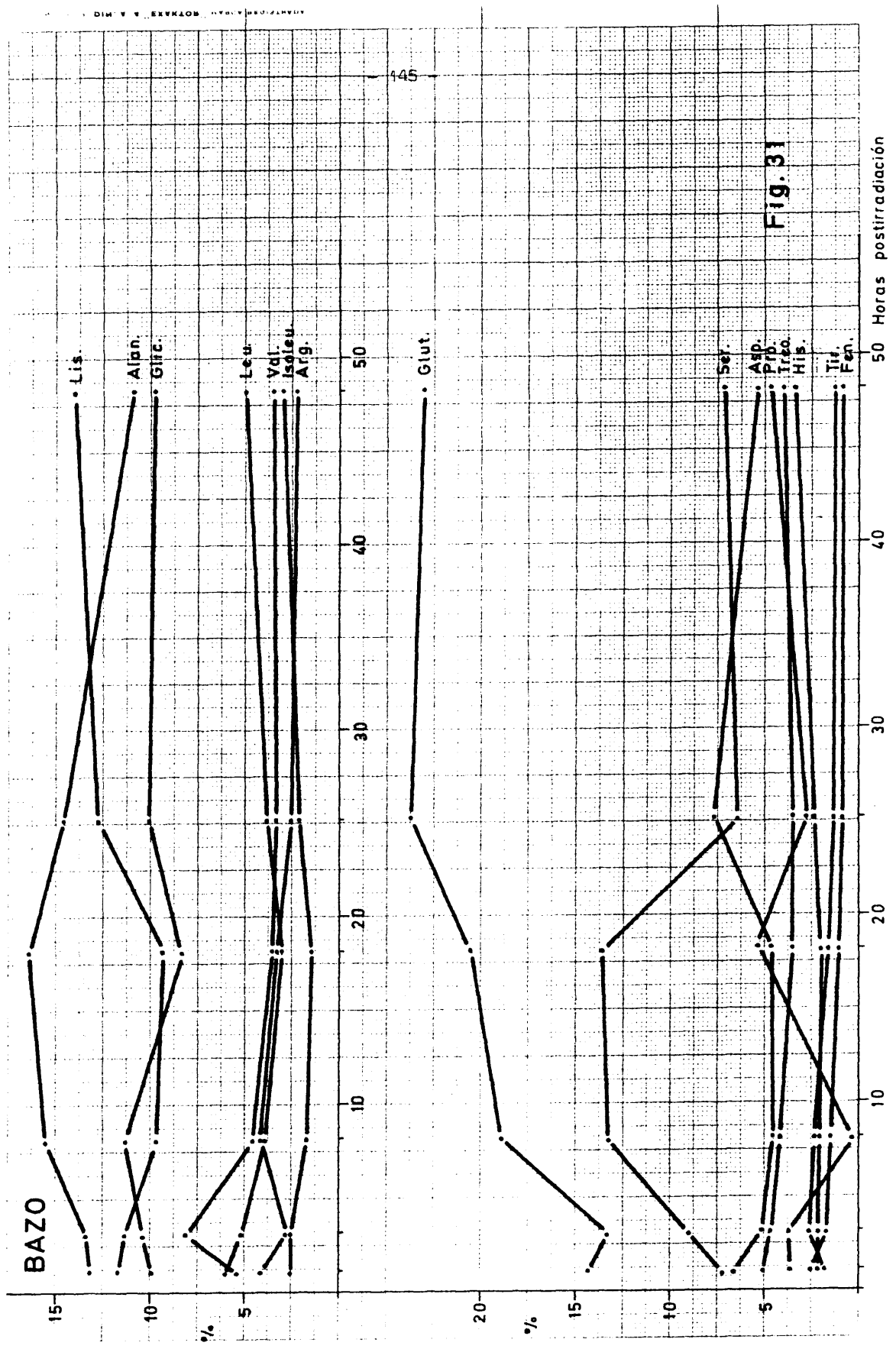


Fig. 30

Evolución del porcentaje relativo de aminoácidos libres en músculo de pez dorado irradiado (2300r) con el tiempo



Evolución del porcentaje relativo de aminoácidos libres en bazo de pez dorado irradiado (2300r) con el tiempo

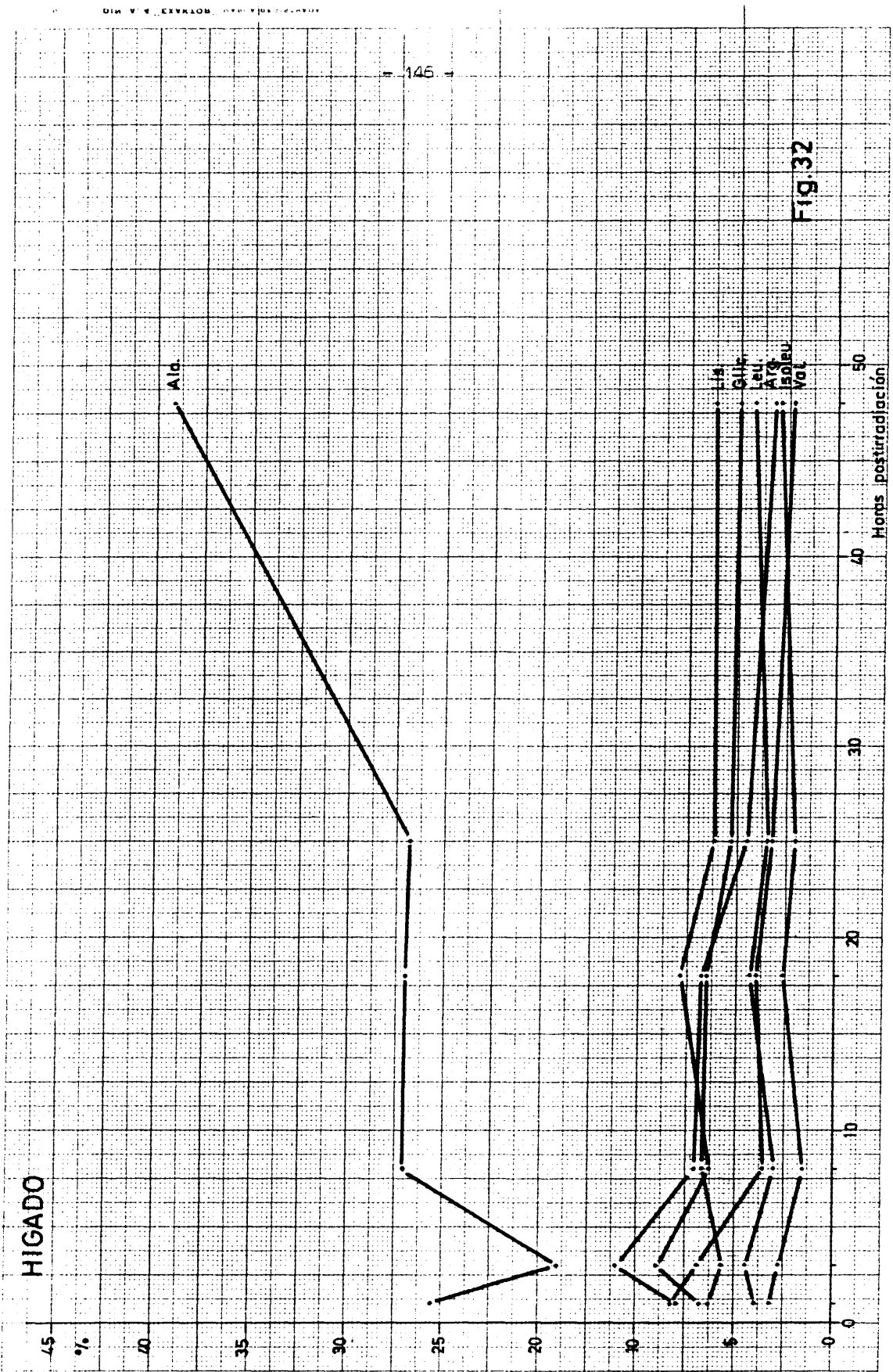


FIG.32

Evolución del porcentaje relativo de aminoácidos libres en hígado de pez dorado irradiado (2300r) con el tiempo

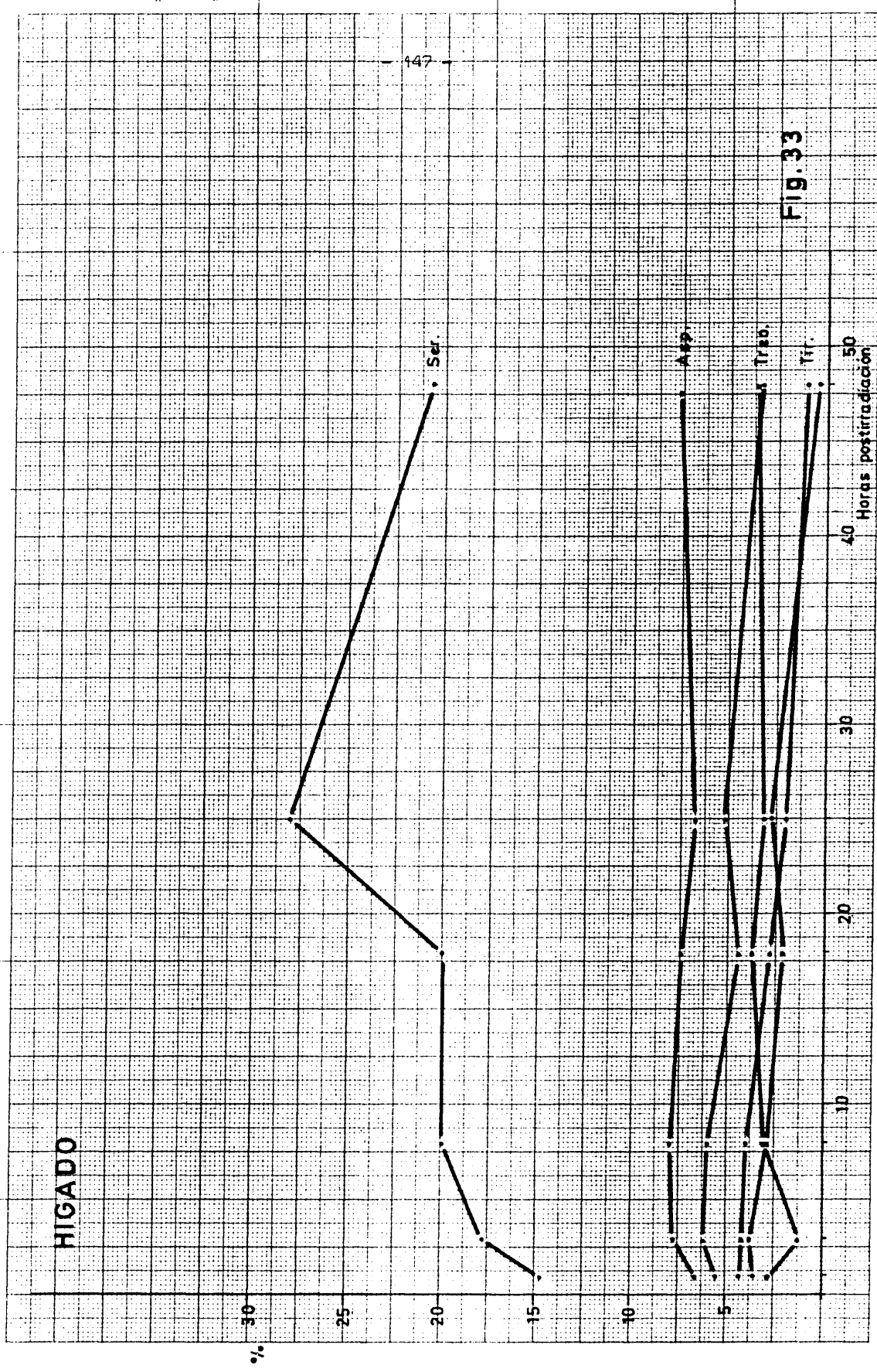


Fig. 33

Evolución del porcentaje relativo de aminoácidos libres en hígado de pez dorado irradiado (2300r) con el tiempo

once aminoácidos restantes no llegan a conseguir en hígado concentraciones superiores al 7 u 8 %. Probablemente el hecho ya citado en la parte II de MATERIALES Y METODOS de esta Tesis, de que no conste en el registro la cuantificación de los aminoácidos prolina y ácido glutámico a pesar de que si aparecen los picos correspondientes, influye en el calculo del % de los restantes, elevandolos. Muy posiblemente estos aminoácidos que alcanzan el 8 % en sus concentraciones, se moverian normalmente en torno al 5 % y las concentraciones de los otros dos, serina y alanina, serian tambien en cierto grado inferiores si bien siempre estarian por encima de los anteriores.

Serina muestra un incremento que alcanza un máximo a las 25 horas, en forma más aguda asciende la curva de alanina. Estas son las dos variaciones que parecen ofrecer mayor significación en hígado, los once aminoácidos restantes no presentan nada destacable.

La relación ácido / base de aminoácidos glutámico, aspártico y lisina, arginina como muestra la fg. 34 tampoco ofrece particularidades dignas de mención en bazo, cerebro e hígado, tan solo en el caso del músculo la curva sugiere cierta posible complementariedad entre lisina y ácido glutámico.

En conjunto puede afirmarse que en el cerebro predominan las concentraciones relativas de alanina y ácido glutámico, en músculo la glicocola y fenilalanina superan al resto de aminoácidos, en bazo es el ácido glutámico, serina y alanina ofrecen en el hígado concentraciones relativas muy por encima de los demás.

Ciertamente el análisis de los porcentajes relativos de los quince aminoácidos objeto de estudio ofrece variaciones pero carentes de significación en la mayor parte de los casos a esta dosis de -- irradiación de 2.300 rads. Tan solo alanina en cerebro fenilalanina en músculo, ácido glutámico en bazo y serina y alanina en hígado parecen hacer excepción.

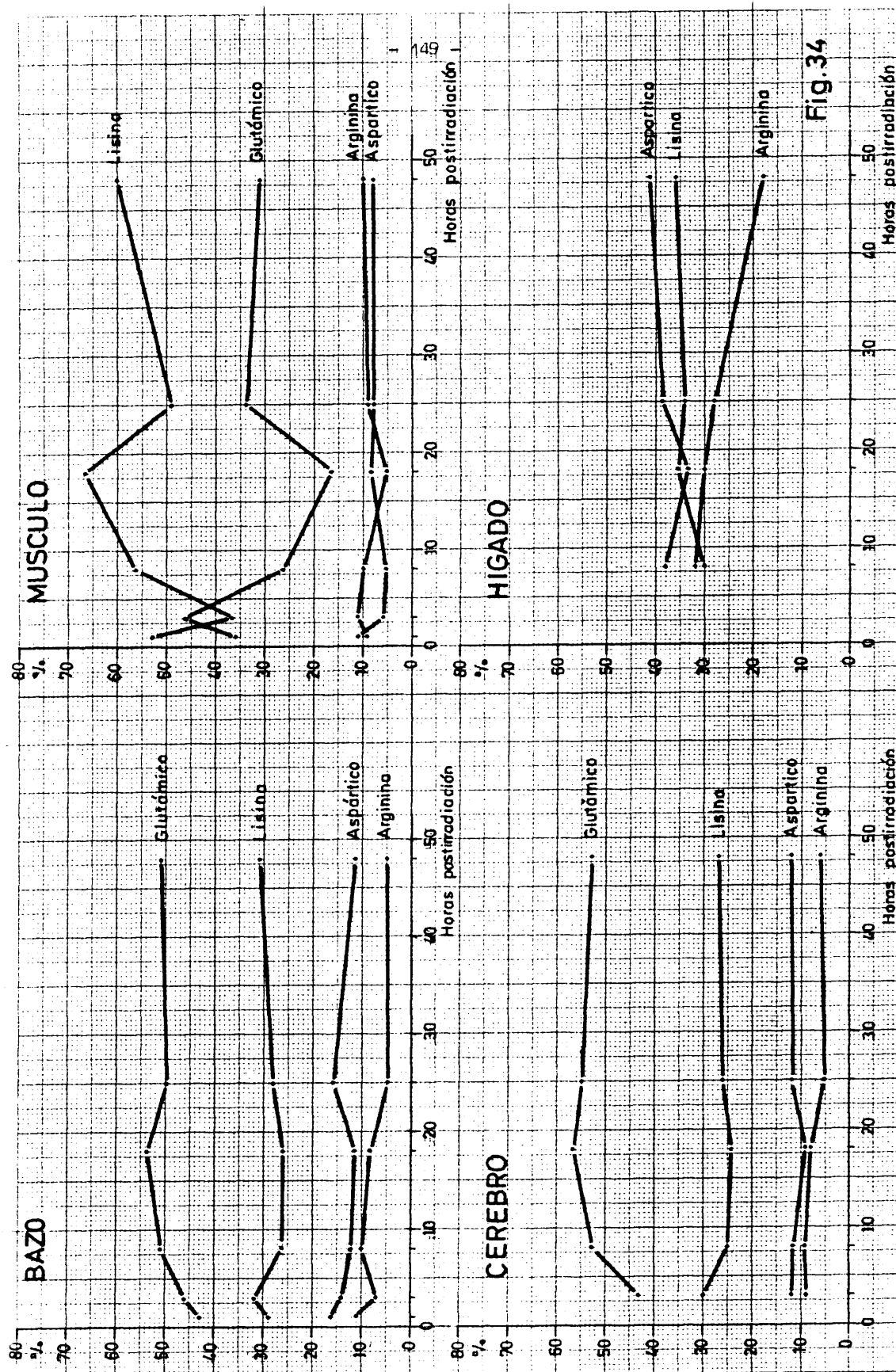


Fig. 34

Evolución del porcentaje relativo de aminoácidos libres ácido/base de pez dorado irradiado (2300r) con el tiempo

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio de la evolución de las alteraciones de las proteínas séricas en peces Carassius auratus, irradiados, conducen a la conclusión de que la radiolesión en - estos animales presenta una sintomatología muy equivalente a la que se conoce en el caso de un amplio número de especies tales como : ratas, hamster, ratones, monos, perros, conejos y el hombre.

Ninguno de los efectos citados es privativo de los peces sino que forma parte de un síndrome muy generalizado. Es posible sin embargo que la intensidad de alguno de ellos pueda considerarse excepcional.

La disminución brusca e inmediata de la concentración de proteínas séricas totales es fenómeno claramente descrito en el caso de mamíferos irradiados. En nuestros resultados sin embargo llama la atención tanto la intensidad de la disminución de la concentración - como su carácter transitorio, y especialmente el hecho de que la rapidez con que tiene lugar la recuperación de los valores de concentración primitivos, depende marcadamente de las dosis recibidas. Todo parece reflejar la intervención de un sistema de control de concentración de proteínas en plasma que es perturbado inmediatamente - por la irradiación y que se recupera de esta perturbación con una histéresis tanto mayor cuanto lo es la dosis administrada.

Parece posible excluir la hipótesis de que una lisis de heritrocitos, consecuente a la irradiación, pudiera jugar un papel - importante en la interpretación de la disminución de la concentración detectada. La circunstancia de que las concentraciones de hemoglobina y de fosfatasa alcalina en el suero evolucionen paralelamente a la - concentración total de proteínas hace plausible esta idea.

Por el contrario la citada disminución de concentración es más fácilmente interpretable como resultado de una brusca variación del volumen plasmático relacionado bien con una variación de permeabilidad a nivel de las branquias, bien con una variación de espacio extravascular provocado por una modificación de permeabilidad celular más generalizada. El corto periodo de tiempo, tan solo algunas horas, necesario para que después de un periodo de latencia proporcional a la dosis se recuperen los valores primitivos de concentración, hace también pensar en una alteración de permeabilidad más que en modificaciones de la biosíntesis de proteínas, en el momento de proponer un mecanismo para este sistema de control.

Por otro lado las alteraciones de permeabilidad vascular de este tipo han sido postuladas como explicación a la dilución de proteínas en plasma en el síndrome de irradiación de mamíferos.

La incidencia de la radiación gamma sobre los niveles de aminoácidos libres en cerebro, bazo, músculo e hígado de peces dorados (*Carassius auratus*) no parece provocar modificaciones significativas a esta dosis de 2.300 rads. durante el periodo de tiempo que fueron observados, 48 horas postirradiación. Tan solo el ascenso de alanina en cerebro, fenilalanina en músculo, ácido glutámico en bazo y alanina y serina en hígado pueden tener cierta significación.

Se puede concluir por tanto :

1º.- Que esta disminución súbita, brusca y transitoria de la concentración de las proteínas séricas parece ser más intensa en los peces que en los mamíferos, pero que en ambos casos puede estar correlacionada con alteraciones de permeabilidad celular inducida por la irradiación. En este sentido parece síntoma relevante el hecho de -

que la más profunda variación que se ha detectado, es precisamente la correspondiente a concentración de glicéridos en el suero de peces irradiados.

2º.- La evolución de las variaciones observadas en las concentra--ciones relativas de las diferentes fracciones de proteínas séricas, es también totalmente comparable con las estudiadas en mamíferos. Existe coincidencia en el incremento relativo de las beta-globulinas y en el descenso de las gamma globulinas de bajo peso molecular. Por el contrario no se ha detectado la disminución de albúmina co--rrespondiente a la que se describe en mamíferos.

Para la interpretación de este fenómeno de variación de la concentración relativa de las distintas fracciones de proteínas séricas consecuente a una irradiación, resulta también muy adecuada la proposición de una alteración de permeabilidad vascular que provoca una extravasación selectiva de las proteínas de menor peso molecular. Así se ha hecho en la interpretación selectiva en el caso de cobayas en los que el fenómeno presenta su máximo en las prime--ras horas postirradiación.

3º.- Contribuyen a reforzar la completa analogía del síndrome de - irradiación en peces con el correspondiente de mamíferos, nuestros resultados respecto a las consecuencias de la irradiación en la - síntesis de DNA en el epitelio intestinal. Su inmediata y total in--hibición así como su tan lenta recuperación que conduce practicamente a la irreversibilidad de la lesión, son equiparables a la radio--lesión intestinal en mamíferos.

4º.- Con menor claridad pero en el mismo sentido apuntan los resultados correspondientes a la actuación de los procesos de degradación del DNA altamente polimerizado que se ponen en marcha como consecuencia de la irradiación.

5º.- No se observa una repercusión radical y estadísticamente significativa de la radiación gamma sobre los niveles de aminoácidos libres de cerebro, músculo, bazo, e hígado en pez dorado. Carassius auratus a la dosis y tiempo estudiados. No obstante aparecen incrementos que pueden ser en cierto grado significativos tales como alanina en cerebro, fenilalanina en músculo, ácido glutámico en bazo y alanina y serina en hígado.

BIBLIOGRAFIA

ABRAMS R. 1951
Effect of X-Rays on nucleic acid and protein synthesis
Arch. Biochem 30 90

ADAMOVA L.G. NOVIKOV G.G. 1973
Serum protein composition in herbivorous fishes
Mosk. Gos. Univ. in Lomonosova Moscow USSR
Biol. Nauki 16 5 44-49

ANDREONI O. DOMPE M. RUSSO A.M. 1955
Ric. Sci. Suppl. 25 1393

ARIENT M. DIENSTBIER Z. SHEJBAL J. 1966
Minerva Fisionucl. 7 57

BAC Z.M. ALEXANDER P. 1961
The essential role of metabolism in the development of the lesions
Fundamentals of Radiobiology p 3-5. Pergamon Press Oxford London

BAILEY R.E. 1957
The effect of estradiol on serum calcium phosphorus and protein of gold
fish
J. Exp. Zool 136 355-469

BAKER D.G. CARSTEN A.L. SAFFORD C. 1963
A method of characterizing protein changes in serum after X-irradiation
Rad. Res. 20 (3) 131-422

BAKER D.G. CARSTEN A.L. JAHN A. MC FADYEN D. 1967
Plasma protein synthesis following neutron irradiation
Rad. Res. 32 265

BESSEY O.A. 1946

A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimetres of serum.

J. Biol. Chem. 164 321

BILLEN D. HEWITT R. 1955

Physiological aspects of modification and restoration of chromosomal synthesis in bacteria after X-irradiation

J. Bacteriol. 90 1218-1225

BIRKE G. LILJEDAHL S. PLANTIN L. WETTERFORS J. 1962

Acute radiation injury physiopathological aspects of the massive leakage of albumin into the gastrointestinal tract.

Nature 194 1243-45

BOND V.P. FLIEDNER T.M. ARCHAMBEAU J.O. 1965

Mammalian radiation lethally

Academic Press New York

BOOKE H.E. 1964

A review of variations found in fish serum proteins

New York Fish Game J. 11 (1) 47-57

BOUCK G.R. BALL R.C. 1965

Influence of a diurnal oxygen pulse on fish serum proteins

Trans. Amer. Fish. Soc. 94 (4) 363-70

BOUK G.R. BALL R.C. 1966

Influence of capture methods on blood characteristics and mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)

Trans. Am. Fish. Soc. 95 (2) 170-176

BOWERS J.S. SCOTT K.G. 1951

Distribution and excretion of electrolyte after acute whole body irradiation injury. II Studies of radio sodium

Proc. Soc. Explt. Bio. Med. 78 648-52

- BRIDGES B.A. MUNSON R.J. 1968
Genetic radiation damage and its repair in *Escherichia coli*. Current
topic.
Rad. Res. 4 95
- BROMFIELD A. DYKES P. 1964
Radiation induced protein leakage into the small intestine
Nature 201 633-34
- BROWN D.M. TODD A.R. FRIED M. 1955
Nucleotides. The stepwise degradation of polyribonucleotides : Model
experiments.
J. Chem. Soc. 2206.
- BUHLER D.R. 1963
Studies on fish hemoglobins chinook salmon and rainbow trout
J. Biol. Chem. 238 (5) 1665-1674
- COMMON R.M. Mc. KINLEY W.P. MAN W.A. 1953
Filter paper electrophoresis of avian serum proteins
Science. Wash. 118 86-89
- CONARD R.A. 1956
Some effects of ionizing radiation on the physiology of the gastroin-
testinal tract.
Rad. Res. 5 167
- CONLAY J.J. 1963
Effect of ionizing radiation on the adenine in aerated and de-aerated
aqueous solutions.
Nature 197 1963
- CORNATZER W.E. ENGELSTAD O.D. DAVISON J.P. 1953
Effect of whole body X-irradiation on blood constituents
Am. J. Physiol. 175 153

CRANDALL C.A. GOODNIGHT C.J. 1963

The effects of sub-lethal concentrations of several toxicants to the common guppy (*Lebistes reticulatus*)

Trans. Am. Microscop. Soc. 82 (1) 59-73

ORENSHAW J.W. 1962

Variation in the serum albumins and other blood proteins of turtles of the kinosternidae

Physiol. Zool. 35 157-161

CHAIKA YA. P. 1965

Biol. Deistvie Radiatsii L'vovsk. Go. Univ. 3 10

GHANDRESAKAR N. 1959

Blood proteins of some indian freshwater fish

Proc. Indian. Acad. Sci. 49 377-385

CHERKASHCHENKO M.I. KUSHNIRUK V.O. BENEDIYUK G.O. GLADUNKO I.I.

STEFANIK YU.K. 1972

Quantitative and qualitative composition of serum proteins of fish, amphibians, reptiles, birds and mammals

Zh. Biol. Khim. Abst. n°4F 1024

DAINTON F.S. 1948

On the existence of free atoms and radicals in water and aqueous solutions subjected to ionizing radiation

J. Phys. Chem. 52 490

DANIELS M. SCHOLLES G. WEISS J.J. 1956

Chemical action of ionizing radiations in solution. Effect of molecular oxygen in the irradiation of aqueous solutions with X-rays

DANIELS M. SCHOLLES G. WEISS J. WHEELER C.M. 1957

Chemical action of ionizing radiations in solution. Degradation of deoxyribonucleic acid in aqueous solution by irradiation with X-rays

J. Chem. Soc. p226

DAVIS B.J. 1964

Disc electrophoresis. II Methods and applications to human serum proteins

Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 404-427

DEERTINGER H. JUNG H. 1970

Molecular Radiation Biology. Springer-Verlag Berlin.

DEUTSCH H.F. GOODLE M.B. 1945

J. Biol. Chem. 161 1 - 20

DITZEL J. 1962

The effect of total body X-irradiation on serum proteins in the hamster

Rad. Res. 17 694

DJORDJEVIC B. TOLMACH L.J. 1967

X-ray sensitivity of HeLa S₃ cells in the G₂ phase, comparison of two methods of synchronization.

Biophys. J. 7 77-91

DORFMAN L.M. TAUB I.A. BUHLER R.E. 1962

Pulse radiolysis studies I. Transient spectra and reaction - rate - constants in irradiated aqueous solutions of benzene

J. Chem. Phys. 36 3051

DOUDOROFF P. KATZ M. 1953

Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish. II The metals, as salts

Sewage Ind. Wastes 25 (7) 802-839

DOULL J. PETERSEN D.F. DUBOIS K.P. 1952

Effect of X-irradiation on citellus tridecemlineatus

Federation Proc. 11 340

DRILLON A. 1954

Etude des lipoprotides sériques chez quelques poissons au moyen
d'electrophorèse sur papier

C.r. hebd. Seanc. Soc. Biol. 238 940-942

DROUET J. LEGRAND A. BRUNET G. GOYFFON M. 1972

La phosphatasemie alcaline au cours des lésions radio-combinées chez
la souris.

Compt. Rend. Soc. Biol. 166 (10) 1270-73

EDWARDS C.H. GADSDEN E.L. EDWARD G.A. 1964

Effect of irradiation on the tissue uptake of methionine-2-C¹⁴ and -
methionine methyl-C¹⁴

Rad. Res. 22 116

EGGSTEIN M. 1966

Zuverlässigkeit der Methode, andere Neutralfettbestimmungen, Normalwer-
te für Triglyceride und Glycerin im menschlichen Blut

Klin. Wschz 44 267

EKERT B. MONIER R. 1957

Peroxydation de la thymine par les rayons X.

Ann. Inst. Pasteur 92 556

EKERT B. MONIER R. 1959

Structure of thymine hydroperoxide produced by X-irradiation

Nature 184 B.A. 58

EKERT B. MONIER R. 1960

Effect of X-rays on cytosine in aerated aqueous solution

Nature 188 309

ENTEMMAN C. NEVE R.A. SUPPLEE H. OLMSTED C.A. 1955

Effects of X-irradiation on lipide metabolism I. Plasma phospholipide-
levels in several species

Arch. Biochem. Biophys. 59 97

EPSHTEIN Y.A. LAVROSKAYA N.F. 1959

Effect of ionizing radiation on the protein metabolism of fish
Biochem. (USSR) 24 549-55

EVANS A.S. QUINN F.A. BROWN J.A. STRIKE T.A. 1968

Effect of ionizing radiation on total protein-bound neutral hexoses
in the plasma of mice
Rad, Res. 36 128

FAWCETT J.K. SCOTT J.E. 1960

A rapid and precise method for the determination of urea
J. Clin. Path. 13 156

FEINSTEIN R.N. BUTLER C.L. 1952

Effect of whole body X-irradiation on rat intestine and intestinal
nucleoprotein
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 79 181

FINE J.M. BOFFA G.A. DRILHON A. 1963

The proteins of eel serum
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 114 651-654

FISCHER M.A. MAGEE M.Z. COULTER E.P. 1955

Studies on the serum proteins of the X-irradiation rat.
Arch. Biochem. Biophys 56 66

FLECK A. MUNRO H.N. 1962

The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-
Tannhauser procedure for nucleic acid estimation
Biochim. Biophys. Acta 55 571

FLEMMING H. 1958

Untersuchungen über die Bluteiweisskörper gesunder und bauchwasser-
suchtskranker Karpfen
Z. Fish. N.F. 7 91-152

FLOCK E.V. BOLLMAN J.L. 1962

Free amino acids in plasma, brain and muscle following hepatectomy
Amino acid pools. Distribution, formation and function of free amino
acids

Elsevier publishing company. Amsterdam - London - New York. 1962

FOND A. 1947

Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. 24 A n° 34

FRAMPTON E.W. BILLEN D. 1966

X-ray induced degradation of deoxyribonucleic acid in a poliauxotrophic
bacterium.

Rad. Res. 28 109 - 120

FRIKE H. HART E.J. 1966

Radiation Dosimetry Ed. F.H. Attix W.C. Roesch. Academic Press New
York Vol. 2.

FROMM P.O. SCHIFFMAN R.H. 1958

Toxic action of hexavalent chromium on largemouth bass

J. Wildlife Management 22 (1) 40 - 44

FROMM P.O. STOKES R.M. 1962

Assimilation and metabolism of chromium by trout

J. Water Pollution Control Federation 34 (11) 1151-1155

FUJIYA M. 1961

Use of electrophoretic serum separations in fish studies

J. Water Poll. Cont. Fed. 33 250-57

GEFTER M.L. BECKER A. HURWITZ J. 1967

The enzymatic repair of DNA. II Characterization of phage-induced sea
lase.

P.N.A.S.U.S. 58 1462-1433

GERBAULET K. MAURER W. BRÜCKNER J. 1963

Autoradiographische Untersuchung über die Inkorporation von ^3H amino
säuren im Zellkern während der G₀ - Phase und der S- Phase bei
Biochem. Biophys. Acta 68 462¹

GERBER G.B. ALTMAN K.I. 1970 a

Radiation Biochemistry. Eds. K.I. Altaman G.B. Gerber S. Okada. Acade
mic Press Vol II 248 ; 80 ;

GERBER G.B. REMY-DEFRAIGNE J. 1966

DNA - metabolism in perfused organs. II Incorporation into DNA and
catabolism of thymidine at different levels of substrate by normal
and X-irradiated liver and intestine.

GHOSSEIN N.A. AZAR H.A. WILLIAMS J. 1963

Histologic changes with obserbations on circulating Lymphocytes and
serum protein fractions in adult mice.

Am. J. Pathol. 43 369

GLENN W.G. 1960

Serum changes in small primates exposed to acute whole-body Co^{60} radia
tion.

Rad. Res. 13 691

GLINOS A.D. 1963

Protein composition and growth-promoting activity of the serum after
whole-body X-irradiation at different ages.

Rad. Res. 19 286

GLINOS A.D. 1963

Rad. Res. 19 286

GOLWATER W.H. ENTENMAN C. 1957

Nature of serum protein changes in the X-irradiated dog

Am. J. Physiol. 188 409

GOLDWATER W.H. ENTENMAN C. 1956
Effect of X-irradiation on lipid metabolism. III Dog serum lipoproteins
Rad. Res. 4 243

GRABAR P. KASHKIN K.P. COURCON J. 1963
Modifications des constituants du sérum de souris après irradiation
létale.
Rev. Franç. Etudes Clin. Biol. 8 565

HAGEN U. 1967
Determination of single and double breaks in irradiated DNA from the
distribution of molecular weight.
Biochem. Biophys. Acta 134 45

HARPER H.A. 1965
Review of Physiological Chemistry 10th. Ed. Blackwell. Oxford.

HARRIS J.E. 1971
Some aspects of the immune response of cyprinid fish with particular
reference to their helminth parasites.
Ph. D. thesis. University of Exeter.

HARRIS J.E. 1974
Electrophoretic patterns of blood serum proteins of the cyprinid fish
(leuciscus, leuciscus).
Comp. Biochem. Physiol. B. 48 (3B) 389-399

HASHIMOTO K. MATSUURA F. 1959
Multiple hemoglobins in fish.
Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 24 (9) 719-23

HAYES T.L. HEWITT J.E. 1955
Serum lipoproteins as an indication of survival time in the X-irradiated rabbit.
Am. J. Physiol. 181 280

HEKTOEN J. 1915
J. Infect. Diseases 17 415

HEMPELMANN L.H. LISCO H. HOFFMAN J.C. 1959
Ann. Internal. Med. 36 279

HEMS G. 1960
Effects of ionizing radiation on aqueous solutions of Inosine and Adenosine
Rad. Res. 13 777

HEMS G. 1960
Chemical effects of ionizing radiation on deoxyribonucleic acid in dilute aqueous solution
Nature 186 710

HEWITT J.E. HAYES T.L. 1956
X-irradiation and lipoprotein metabolism in various species.
Am. J. Physiol 185 257

HOCHANADEL C.J. 1962
Photolysis of dilute hydrogen peroxide solution in the presence of dissolved hydrogen and oxygen. Evidence relating to the nature of the hydroxyl radical and the hydrogen atom produced in the radiolysis of water.
Rad. Res. 17 286

HOCHANADEL C.J. 1964
Radiation chemistry of polyfunctional simple molecules. Discussion
Rad. Res. Suppl. 4 150

HOLLAND G.A. LASATER J.E. NEWMANN E.D. ELDRIGE W.E. 1960
Toxic effects of organic and inorganic pollutants on young salmon and trout.
State Wash. Dept. Fish. Res. Bull. n°5 pg 233

HOLLAND J. GARRISON W.M. 1967

Identification of a specific mode of oxidation in the radiolysis of the purine bases in oxygenated aqueous solutions

J. Phys. Chem. 71 462

HONE G. KÜNKEL H.A. ANGER R. 1955

Die Serumeiweisskörper der Ratte nach Röntgenganzbestrahlung mit 3000 r

Klin. Wochschr. 33 284

HONE G. JASTER R. KÜNKEL H.A. 1952

Electrophoretische Untersuchungen am Serum röntgenbestrahlter Ratten.

Klin. Wochschr. 30 952

HORNSEY S. VATISTAS S. 1963

Some characteristics of the survival curve of crypt cells of the small intestine of the mouse deduced after whole-body X-irradiation.

Brit. J. Radiol. 36 795

HUMN J.B. 1967

Res. Rep. U.S. Fish. Wildl. Serv. 72 1-32

HYODO Y. 1964

Effect of X-irradiation on the intestinal epithelium of the goldfish *Carassius auratus* I histological changes in the intestine of irradiated fish.

Annotations Zool. Japan 37 104-111

HYODO YASUKO 1965 a

Effect of X-irradiation on the intestinal epithelium of the goldfish *Carassius auratus*

Rad. Res. 24 133-141

HYODO YASUKO 1965 b

Development of intestinal damage after X-irradiation and ³H thymidine incorporation into intestinal epithelial cells of irradiated goldfish *Carassius auratus* at different temperatures.

Rad. Res. 26 383-394

HYODO Y. TAGUCHI 1968

Gastrointestinal Radiation Injury M.F. Sullivan Ed. 120-126
Excerpta Medic. Foundation Amsterdam

HYODO Y. TAGUCHI 1970

Effect of X-irradiation on DNA synthesis and cell proliferation in
the intestinal epithelial cells of goldfish at different temperatures
with special reference to recovery process
Rad. Res. 41 568-78

IL'INA L.I. PETROV R.V. 1959

Tsitologiya 1 289

JOHN D.W. MILLER L.L. 1968

Effect of whole-body X-irradiation of rats on net synthesis of albu-
min, fibrinogen, λ_1 - acid glycoprotein and α_2 globin (acute phase glo-
bulin) by the isolated, perfused rat liver.

J. Biol. Chem. 243 268

van KAPEN E.J. ZIJLSTRA W.G. 1961

Standardization of hemoglobinometry II The hemoglobincyanide method.
Clin. Chim. Acta. 6 538

KAPLAN H. S. 1966

DNA - strand scission and loss of viability after X-irradiation of
normal and sensitized bacterial cells.

P.N.A. S.U.S. 55 1442-46

KASHKIN K.P. ALESANDROVA S.V. 1966

Byul. Experimen. Biol. i Med. 62 57

KAY R.E. ENTENMAN C. 1959

Weight nitrogen and DNA content in small intestine mucosa of rats
exposed to X-rays.

Am. J. Physiol. 197 13

KHAILOV K.M. 1963

Electrophoretic study of blood plasma proteins in coldfish
Trudymurmansk. Biol. Inst. 4 202-207

KIRISPUN A. 1964 a

On proteins fractions and their sexual differences in blood serum of
some food-fishes of the Estonian SSR
S.S.R. Eesti NSV Teaduske Akad. Toimetised. Biol. Seeria. 13 45-54

KIRISPUN A. 1964 b

On seasonal changes in the blood serum protein fractions of fishes
Ibid. 13(4) 279-83

KOHN H.I. 1950

Changes in blood plasma of guinea pig during acute radiation syndrome
Am. J. Physiol. 162 703.

KOHN H.I. 1951

Changes in composition of blood plasma of the rat during acute radiation
syndrome and their partial mitigation by Dibenamina and cortin
Am. J. Physiol. 165 27.

KRAUEL K.K. RIDGWAY G.J. 1963

Immuno-electrophoresis of red salmon (*Onchorhynchus nerka*) serum
Inst. Archs. Allergy appl. Immun 23 246-53

KOLLMORGEN G.M. OSBORNE J.W. 1964

Population kinetics of neoplastic mast cells (P_{815} Y) after X-irradiation.

Rad. Res. 22 206

LAJTHA A.

Cerebral passage of free amino acids

Amino acid pools. Distribution, Formation and function of free amino acids
Elsevier publishing company. Amsterdam - London - New York 1962

LAMERTON L.F. 1966

Cell proliferation under continuous irradiation.

Rad. Res. 27 119

LATARJET R. EKERT B. APELGOT S. REYBEYROTTE N. 1961

Etudes radiobiochimiques sur L'ADN

J. Chem. Phys 58 1046

LATARJET R. EKERT B. DEMERSEMAN P. 1963

Peroxidation of nucleic acids by radiation biological implications

Rad. Res. Suppl. 3 247

LEFAURE J. CIER J. CIER A. 1966

Sur le catabolisme de l'albumine sérique chez le lapin irradié

Compt. Rend. Soc. Biol. 160 2367

LEONE C.A. HARTNETT A.R. CRIST R. MC. BETH C.

Paper electrophoretic analyses of sera from irradiated rhesus monkeys

Rad. Res. 10 357

LEPKOVSKY S. 1929

The distribution of serum and plasma proteins in fish

J. Biol. Chem. 85 667-673

LESHER S. 1967

Compensatory reactions in intestinal crypt cells after 300 roentgens of Cobalt-60 gamma irradiation

Rad. Res. 32 510-19

LIPKIN M. QUASTLER H. MUGGIA F. 1963

Protein synthesis in the irradiated intestine on the mouse

Rad. Res. 19 277

LOONEY W.B. 1966

The effects of radiation on DNA synthesis in the liver and intestines given at two different dose rate.

Inter. J. Radiation Biol. 10 97

LOVE M.R. 1970

The Chemical Biology of fishes. Academic Press. London

LOWRY O.H. ROSENBROUGH N.S. FARR A.L. RANDALL S.R. 1951

Protein measurement with the Folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193 265 - 75

LUCIO N.R. SIMON K.A. 1957

Rad. Res. 7 79

LUCKYANENKO V.I. ERMOLIN G.A. SEDOV S.I. POPOV A.V. 1967

Protein spectrum of the blood serum of fishes of the sturgeon family as show by disc electrophoresis in poliacrilamide gel.

Dokl. Akad. Nauk. Sci. SSSR 174 227-29

LYSAK A. WOJCIUK 1960

Electrophoretic investigations on the blood of carp fed with food containing various protein amounts.

Acta Hidrobiol. 2 (1) 49 - 61

Mc. CULLY K.A. MAW W.A. COMMON R.H. 1959

Zone electrophoresis of the proteins of the fowl's serum and egg yolk

Can. J. Biochem. Physiol. 37 1457 - 68

Mc. GRATZ R.A. WILLIAMS R.W. SWARZENDRUBER D.C. 1966

Biophys. J. 6 113-122

Mc. GRATZ R.A. WILLIAMS R.W. 1966
Reconstruction in vivo of irradiated Escherichia Coli deoxyribonucleic
Acid, the rejoining of broken pieces.
Nature 212 534-35

Mc. KINLEY W.P. OLLIVER W.F. MAW W.A. COMMON R.H. 1953
Filter paper electrophoresis of serum proteins of the domestic fowl
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84 346-51

Mc. LAUGHLIN M.M. NURY F.S. BRENT R.L. 1957
Abstracts of paper presented before the Radiation Research Society Rochester
ter. The evaluation of serum protein changes after single and repeated -
doses of X-ray.
Rad. Res. 7 436

MAISIN J.R. 1966
Radiation radioprotecteur et syndrome gastrointestinal. G. Thone.
Liège.

MARRIAN D.H. SPIECER V.L. 1951
Purine incorporation into pentose nucleotides of the rat.
J. Biol. Chem. 189-533

MATHE G. PAYS M. BOURDON R. MAROTEAUX P. 1959
Effects comparés sur les gamma globulines sériques de doses subléthales
et léthales d'irradiation X.
Rev. Franç. Etudes Clin. Biol. 4 272

MATSUZAWA T. WILSON R. 1965
The intestinal mucosa of germfree mice afte whole-body X-irradiation
with 3 kiloroentgens.
Rad. Res. 25 15

MEHRAN A.R. LOISELLE T.M. 1968
Incorporation de L - Threonine et de L-Methionine dans les proteins du
plasma chez le lapin irradié
Arch. Intern. Physiol. Biochim. 76 91

- MEISNER H.M. HICKMAN C.P. 1962
Effect of temperature and photoperiod on the serum proteins of the
rainbow trout (*salmo gairdneri*)
Can. J. Zool. 40 127-30
- MILCH L.I. YARNELL R.A. STINSON J.V. COLLINS J.V. ROBINSON L.G.
CROYE B.L. CHANG S.S.M. 1954
Relationship between blood lipids and radiation injury in rabbits
Science 120 713
- MILCH L.J. STINSON J.V. ALBAUM H.G. 1956
Plasma lipoproteins and muscle adenosinetriphosphate in rabbits after
local irradiation
Rad. Res. 4 321
- MILCH L.J. ALBAUM H.G. 1956
Serum transaminase activity in X-irradiated rabbits
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 93 595
- MILETIC B. KUCAN Z. DRACULIC M. ZAJEA L. 1961
Effect of chloramphenicol on the biosynthesis of DNA in X-irradiated
Escherichia Coli B.
Biochim. Biophys. Res. Communen 4 348-52
- MINGOT B.F. 1972
Aspectos macromoleculares de la degradación radiolítica del DNA en so
lución.
Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias
España.
- MOLE R.M. TEMPLE D.M. 1959
The DNA content of the small intestine as a quantitative measure of
damage and recovery after whole-body irradiation
Inter. J. Rad. Biol. 1 28
- MOLLER D. NAEVDAL G. 1966
Serum transferrins of some gadoid fishes
Nature 210 317-18

MOORE D.H. 1945

Species differences in serum protein patterns

J. Biol. Chem. 161 21-32

MOUNT D. BRUCE W.R. 1964

Local plasma volume and vascular permeability of rabbit skin after irradiation.

Rad. Res. 23 (3) 430-45

MUNRO H.N. FLECK A. 1966

Methods of biochemical analysis Ed. Glick. Interscience Pub. Vol 14
p. 159

MUNTZ J.A. BARRON E.S.G. PROSSER C.L. 1949

Studies of the mechanism of action of ionizing radiations. The plasma proteins of dogs after X-ray

Arch. Biochem 23 434

NEUWIRT J. POKORNY Z. BOROVA J. SULC K. 1963

Die Einwirkung ionisierender Strahlung auf den Eiweisschwefel radiosensibler Gewebe.

Strahlentherapie 120 308

NYGAARD O.F. POTTER R.L. 1959

Effect of X-irradiation on DNA metabolism in various tissues of the rat. Incorporation of ¹⁴C - thimidine into DNA during the first 24 hours post-irradiation.

Rad. Res. 10 462

NYGAARD O.F. POTTER R.L. 1960

Effect of X-irradiation on DNA metabolism in various tissues of the rat. II Recovery after sublethal doses of irradiation.

Rad. Res. 12 120

NYGAARD O.F. POTTER R.L. 1960

Effect of X-irradiation on DNA metabolism in various tissues of the rat
III Retention of labelled DNA in normal and irradiated animals.

Rad. Res. 12 131

NYGAARD O.F. POTTER R.L. 1962

Effect of radiation on DNA metabolism in various tissues of the rat.
IV Early effects.

Rad. Res. 16 243

NYMAN L. 1965

Species specific proteins in freshwater fishes and their suitability for
a protein-toxonomy

Hereditas 53 117-26

OLIVERA B.M. LEHMAN I.R. 1967

Linkage of polynucleotides through phosphodiester bonds by an enzyme
from Escherichia Coli

P.N.A. S.U.S. 57 1426-33

PLANAS J. GRAS J. 1957

Estudio sobre las proteínas plásmicas de peces de agua dulce (Barbus
fluviatilis, Cuv. y Leuciscus cephalus L.)

Rev. Españ. Fisiol. 13 nº 1 17-24

PATT H.M. SWIFT M.N. TYREE E.B. 1948

Influence of temperature on the response of frogs to X-irradiation

Am. J. Physiol. 155 388-92

PATT H.M. QUASTLER H. 1963

Radiation Effects on cell renewal and related systems

Physiol. Rev. 43 357

PAYNE R.H. CHILD A.R. FORREST A. 1971

Geographical variation in the atlantic salmon

Nature Lond. 231 250-52

PETERS K. BAUER R. 1960

Untersuchungen über die Wirkung unterschiedlicher Strahlenqualitäten
und Strahlendosen auf das Serumweiß und Blutbild von Ratten
Strahlentherapie 113 553

POLLARD E.C. 1970

The effect of ionizing radiation on the molecular biology of Escherichia
Coli.

Rad. Res. 6 51

PONNAMPERUMA C.A. LEMMON R.A. BENNET E.L. CALVIN M. 1961

Deamination of adenine by ionizing radiation

Science 134 113

PROSSER C.L. PAINTER E.E. LISCO H. BRUES A.M. JACOBSON L.O.

SWIFT M.N. 1947

The clinical sequence of physiological effects of ionizing radiation
in animals.

Radiology 49 299

QUASTLER H. ZUCKER M. 1959

The hierarchy of modes of radiation death in specifically protected mice

Rad. Res. 10 402

RALL D.P. SCHWAB P. ZUBROD C.G. 1961

Alteration of plasma proteins at metamorphosis in the lamprey (Petro
myzon marinus dosatus)

Science 133 (3448) 273-80

REHNBORG C.S. ASHIKAWA J.K. NICHOLS A.V. 1962

Comparison of the effects of whole-body X-irradiation and fasting on
the plasma lipids of mice.

Rad. Res. 16 360

REUTER A.M. GERBER G.B. ALTMAN K.I. DEKNUDT G. KENNES F. 1966

Einbau von C¹⁴ und H³-Tryptophan in verschiedene Serumproteine durch
die isolierte, perfundierte, normale und bestrahlte Leber

Klin. Wochschr 44 1310

REUTER A.M. GERBER G.B. KENNES F. REMY-DEFRAIGNE J. 1967

Catabolism of serum proteins after X-irradiation

Rad. Res. 30 725

REUTER A.M. SASSEN A. KENNES F. 1967

Incorporation of labelled aminoacids into serum and tissue proteins from normal and X-irradiated mice.

Rad. Res. 30 445

RODIONOV V.M. CHDINOVSKIKH A.V. ANTOKOL'SKAYA Z.A. LOBODA L.A.

1959

Byul. Eksperim. Biol. i Med. 47 43

ROSENTHAL R.L. 1949

Opalescence of serum after total body X-irradiation as a prognostic sign of death

Science 110 43

RÖSLER B. REICHEL G. 1967

Veränderungen des Serumweißbildes der Ratte nach Röntgen-Ganzkörperbestrahlung. Kombinierte Untersuchungen mit Hilfe der Papier und der Stärkegel-Electrophorese

Radiobiol. Radiotherap 8 239

SAEZ R.M. DAVILA C. 1974

Tesis doctoral. Univer. Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. España.

SAITO K. 1957

Biochemical studies on the fish blood. VIII On the electrophoretic analysis of serum proteins.

Bull. Japan. Soc. Scient. Fish. 22 752-59

SAITO K. 1957

Biochemical studies on the fish blood. X On the seasonal variation of serum protein components of cultured fish.

Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 22 (12) 768-72

SARITSKIN I.V. ZELEMSKI V.B. 1964
Ukr. Biokhim. Zh. 36 14

SASSEN A. KENNES F. MAISIN J.R. 1963
Etude des modifications proteiques du serum de rat après une irradiation totale.
Compt. Rend. Soc. Biol. 157 1122

SASSEN A. GERBER G.B. KENNES F. REMY-DEFRAIGNE J. 1965
Incorporation of ³H - Phenilalanine into serum proteins by perfused liver of normal and X - irradiated rats.
Rad. Res. 25 158

SASSEN A. KENNES F. MAISIN J.R. 1966
Roentgen irradiation effects on mouse proteins
Acta. Radiol. Therapy. Phys. Biol. 4 97

SCOTT J.F. 1956
J. Histochem. Cytochem 4 1

SCHAETERLE G.R. POLLACK R.L. 1973
A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material.
Analyt. Biochem 51 634-55

SCHOLES G. WEISS I. 1952
Exptl. Cell. Res. Suppl. 2 219

SCHOLES G. WEIS J. WHEELER C.M. 1956
Formation of hydroperoxides from nucleic acide by irradiation with X-rays in aqueous systems.
Nature 178 157

SCHOLES G. WARD I.F. WEISS J.J. 1960
Mechanism of radiation - induced degradation of nucleic acids.
J. Mol. Biol. 2 379

SCHOLES G. WEISS J.J. 1960
Organic hydroxy-hydroperoxides, a class of hydroperoxides formed under
the influence of ionizing radiations.
Nature 185 305

SCHOLES G. 1963
The radiation chemistry of aqueous solutions of nucleic acids and nucleoproteins.
Prog. Biophys. Md. Biol. 13 59

SCHOLES G. SHAW P. WILSON R.L. EBERT M. 1965
Pulse radiolysis Ed. M. Ebert J.P. Keene A.J. Swallow J.H. Baxendale.
Academic Press. New York 1965 p. 151

SCHUMANN G.O. 1959
An electrophoretic survey of multiple hemoglobins in some fresh water fishes.
Rept. Inst. Freshwater Res. Drottningholm 40 176-97

SHABER G.S. MILLER L.L. 1963
Studies on fibrinogen turnover before and after whole-body X-irradiation
in the rat.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 113 346

SHERMAN F.G. QUASTLER H. 1960
DNA synthesis in irradiated intestinal epithelium
Exptl. Cell. Res. 19 343

SHIREMAN JEROME V. 1974
Serum protein variability in bluegills (*Lepomis macrochirus*) Rafinesque
from Iowa Farm. Ponds.
Trans Amer. Fish. Soc. 103 (3) 630-2

SMITH F. GREMAN M.M. 1951

Effect of hibernation upon survival time following whole-body irradiation in the marmot (*marmota monax*)

Science 113 686

SMOLICHEV E.P. 1957

Tr. Vses. Konf. po Med. Radiol. Moscow p 100.

SNIESZKO S.F. MILLER J.A. ATHERTON C.R. 1966

Selected hematological and biochemical tests performed with blood and serum of adult rainbow trout (*salmo gairdneri*) with a high incidence of hepatoma.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 136 191-210

SOBERMAN R.J. KEATING R.P. MAXWELL R.D. 1951

Effect of acute whole-body X-irradiation upon water and electrolyte balance.

Am. J. Physiol. 164 450

SONG C. ANDRESON R. TABACHINICK J. 1966

Early effects of beta irradiation on dermal vascular permeability to plasma proteins.

Rad. Res. 27 604-615

SORVACHEV K.F. 1957

Changes in proteins of carp blood serum during hibernation

Biokhimiya 22 872-77

STAHLER F. OTTEN G. 1968

Frühveränderungen der Plasmaproteine nach isolierter Bestrahlung der Leber.

Strahlentherapie 136 718

STENDER H. ELBERT O. 1952

Strahlentherapie 89 275

STEVENS K.M. GRAY I. SCHWARTZ M.S. LICHTER R.T. HIGHLAND G.P.
1953

Catabolism of antibody and of serum albumin and globulin
Am. J. Physiol. 175 147

STEVENS K.M. GRAY I. SCHWARTZ M.S. LICHTER R.I. HIGHLAND G.P.
DUBOIS K.G. 1953

Effects of irradiation on anabolism of antibody and of serum albumin and
globulin.
Am. J. Physiol. 175 141

SUMMERFELT R.C. 1964

Blood proteins, their pattern variations and functions in the golden
shiner (*Notemigonus crysoleucas*, Cyprinidae)
Ph. D. thesis, University of Southern Illinois

SUMMERFELT R.C. 1966

Homology of serum proteins of golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*)
and man.
Trans. Am. Fish. Soc. 95 272-79

SUPPLEE H. HAUSSCHILD J.D. ENTENMAN C. 1952

Plasma proteins and plasma volume in rats following total-body X-irra-
diation.
Am. J. Physiol. 169 483

SZABO G. MAGYAR Z. KERTAI P. ZADORY E. 1958

Die Wirkung von Ganzkörper Röntgenbestrahlung auf die Kapilar Permea-
bilität und auf den Eiweissrücktransport aus dem Gewebe.
Z.Ges. Exptl. Med. 130 452

TALIAFERRO W.H. TALIAFERRO L.G. JAROSLOW B.N. 1964

Radiation and immune mechanisms. Academic Press. New. York

TELIA M. SASSENI A. REUTER A.M. KENNES F. MAISIN J.R. 1969

Influence du tube digestif sur le catabolisme de la serum-albumine
chez la souris normale ou irradiée.

THOMAS M.L. Mc CRIMMON H.R. 1964
Variability in paper electrophoretic patterns of the serum of landlocked
sea lamprey (*Petromyzon marinus*)
Linnaeus J. Fish. Res. Bd. Canada 21 (2) 239-46

THURSTONE R.O. 1967
Electrophoretic patterns of blood serum proteins from rainbow trout
(*Salmo gairdneri*)
J. Fish. Res. Bd. Canada 24 (10) 2169-88

TOLMACH L.J. TERASINA T. PHILLIPS R.A. 1965
X-ray sensitivity changes during the division cycle of He La cells and
anomalous survival kinetics of developing microcolonies.
M.D. Anderson Symposium. Cellular radiation Biology 376-96. Williams
and Wilkins Baltimore. Maryland 1965

TSUYUKI H. ROBERTS E. VASTONE W.E. 1965
Comparative zone electropherograms of muscle myogens and blood hemoglo
bins of marine and freshwater vertebrates and their application to sys
tematics.
J. Fish. Res. Bd. Canada 21 (2) 239-46

TSUYUKI H. ROBERTS E. 1966
Interspecies relationship within the genus (*Oncorhynchus*) based on
biochemical systematics.
J. Fish. Res. Bd. Canada 23 (1) 101-107

ULRICKSON G.U. 1971
Radiation effects on serum proteins, hematocrits, electrophoretic
patterns, and protein components in the bluegill (*Lepomis macrochirus*)
Oak Ridge National Lab. T.N. 1971 (CONF - 710501 - P₂) 1100-1105

ULRICH M. HAGEN U. 1971
Base liberation and concomitant reactions in irradiated DNA solutions.
Intern. J. Radiat. Biol. 19 507

- VALCANA T. HUDSON D. TIMIVAS P.S. 1972
Effects of X-irradiation on the content of amino acids in the developing rat cerebellum.
J. of Neurochemistry 19 2229-32
- VANSTONE W.E. CHUNG-WAI HO F. 1961
Plasma proteins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) as separated by zone electrophoresis
J. Fish. Res. Bd. Can. 18 393-99
- VATISTAS S. HERDAN A. ELLIS R.F. 1966
Proc. Symp. Gastrointestinal radiation injury p 433. Excerpta Med. Found Amsterdam 1968
- WALDSCHMIDT-LEITZ E. KELLER L. 1961
Z. Physiol. Chem. 323-88
- WANNEMACHER R.W. BANKS W.L. 1965
Biochem. 11 320
- WEINER N. ALBAUM H.G. MILCH L.J. 1955
Time trend of lipoproteinemia after radiation injury
Arch. Pathol. 60 621
- WEISS B. RICHARDSON C.C. 1967
Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. Repair of single strand breaks in DNA by an enzyme system from *Escherichia Coli* infected with T₄ bacteriophage
P.N.A. S.U.S. 57 1021-23
- WEST C.D. TODD W.R. MASON S.S. von BRUGGEN J.T. 1967
Textbook of Biochemistry 4th. Ed. Collier-Macmillan. London

WESTPHAL U. PRIEST S.G. STETS J.F. SELDEN G.L. 1953
Influence of whole-body X-irradiation cold exposure and experimental
acidosis on protein composition and azorubin-binding capacity of rat
serum
Am. J. Physiol 175 424

WILKINS N.P. 1967
Polymorphism of whole blood proteins in the cod (*Gadus morhua* L.)
J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer. 31 77-88

WILSON S.H. HILL H.Z. HOAGLAND M.B. 1967
Physiology of rat liver polysomes protein synthesis by stable polysomes
Biochem. J. 103 567-572

WINKLER C. PASCHKE G. 1956
Protein content and composition of rat serum as related to amount of
whole-body X-irradiation
Rad. Res. 5 (1) 156-61

WITHERS H.R. ELKIND M.M. 1968
Dose-survival characteristics of epithelial cells of mouse intestinal
mucosa.
Radiology 91 1001

ZAMAYATKINA O.G. 1964
Vopr. Med. Khim. 10 362.