

MUSEO NACIONAL DE HISTORIA NATURAL
MONTEVIDEO - URUGUAY

PUBLICACION EXTRA

N.º 28

4



Archivos
de la Sociedad
de Biología
de Montevideo

Vol. XXVI

1963 - 1964

Estudio con el microscopio electrónico de los ovocitos normales de la rata prepúber¹

G. H. VAZQUEZ NIN y J. ROBERTO SOTELO

INTRODUCCION.— Los ovarios de mamíferos han sido bastante estudiados con el microscopio electrónico; por ejemplo, Sotelo y Porter (1959), Sotelo (1959), Odor (1960), Franchi (1960), Szollosi y Rís (1961), Izquierdo y Vial (1962), Franchi y Mandl (1962), estudiaron la rata blanca; el cobayo fue estudiado por Anderson y Beams (1960); el conejo por Blanchette (1961) y por Trujillo-Cenóz y Sotelo (1959); el humano por Wartenberg y Stegner (1960), el ratón por Yamada y col. (1957). Todos los estudios mencionados se refieren a ovocitos u óvulos fecundados y a etapas muy tempranas del desarrollo ovárico. La etapa intermedia, o sea el período prepuberal comprendido aproximadamente entre la interrupción de la meiosis y su recomienzo (madurez) no ha sido explorada aún.

MATERIALES Y METODOS.— Se usaron ratas blancas de 6 a 60 días de edad de la cepa mantenida en el Instituto. Entre 6 y 30 días la diferencia de edad de los animales estudiados fue de 1 día; entre 30 y 60, la diferencia fue de 5 días. Los ovarios se fijaron en tetróxido de osmio, se incluyeron en n-butilmetacrilato o araldita y fueron coloreados en un micrótopo modelo Porter-Blum. Los cortes finos fueron efectuados con acetato de uranio o citrato de plomo. Los microscopios electrónicos utilizados para el examen del material son: EMU 2C (RCA) y Elmiskop I (Siemens). Parte del material fue cortado a $\frac{1}{2}$ ó 1μ y examinado con un microscopio Ortholux equipado con dispositivo de contraste de fase.

OBSERVACIONES.— El núcleo no será descrito, pues no presenta particularidades diferentes a las ya conocidas (Sotelo y Porter, 1959). La estructura del citoplasma coincide en general con lo ya descrito en ovocitos adultos por los mismos autores. Sin embargo, en el material presentemente estudiado, las relaciones del aparato de Golgi con el retículo endoplásmico (R. E.) se pueden observar con más detalles. En ovocitos primordiales se encontró que las vesículas que forman la parte periférica del complejo golgiano se continúan sin transición con las vesículas que existen dispersas por todo el citoplasma y que corresponden a un retículo endoplásmico poco diferenciado (ver fig. 1).

¹ Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Departamento de Ultraestructura Celular. Montevideo, Uruguay.

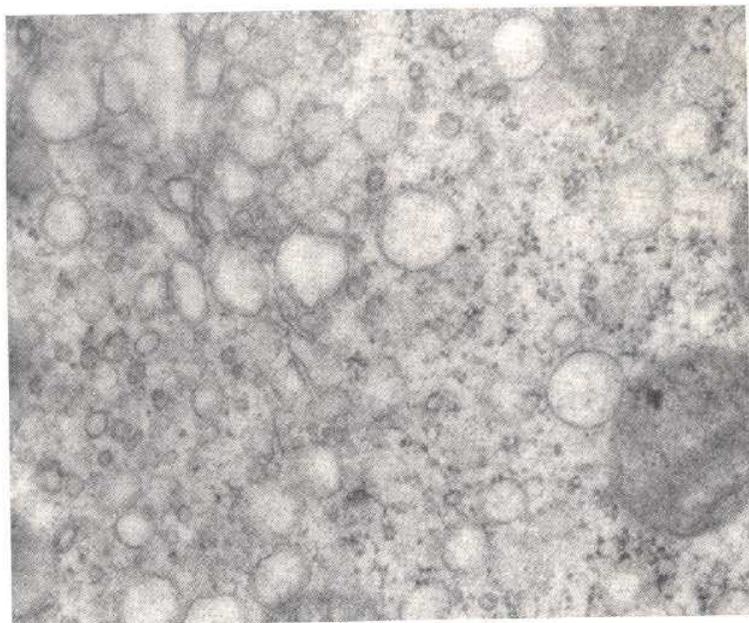


Fig. 1.—Periferia del complejo de Golgi de un ovocito de un folículo primordial. No hay diferencia entre las vesículas pertenecientes al complejo y las del R. E. Obsérvese que ambos sistemas poseen dos tipos de vesículas netamente diferenciables por el tamaño. Rata de 5 días de edad. 50.000 X.



Fig. 2.—Dos cuerpos multivesiculares mostrando las vesículas internas, la membrana, las vesículas externas y entre estas dos últimas una estructura radial osmiófila. Rata de 22 días. 81.000 X.

Los cu
y Porter (C
en crecimi
serva que
veces por 1
muy osmió

La exi
cuencia. L
cuerpo, apa
cuerpo (Pa
tivesiculare

Desde
del ovocito
los ovocitos
vesículas h
pequeñas e
estas vesicu

Esta de
males jóven
plasma es n
las vesículas



folículo pri-
s al complejo
s de vesículas
lad. 50.000 X.



s internas, la
una estructura

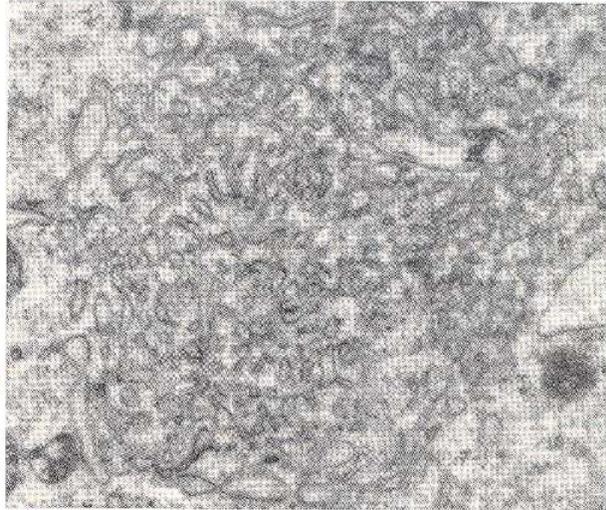


Fig. 3.—Ovario de rata de 30 días. Un acúmulo de vesículas, túbulos y cisternas en un ovocito en crecimiento. 32.500 X.

Los cuerpos multivesiculares descritos con detalle en el trabajo de Sotelo y Porter (1959) sobre ovocitos de rata adulta, son abundantes en los ovocitos en crecimiento; son escasos, en cambio, en los folículos primordiales. Se observa que el llamado "nucleoide" (Sotelo y Porter, l. c.) está constituido a veces por un grupo compacto de vesículas, rodeadas por una sustancia amorfa, muy osmiófila.

La existencia de cuerpos multivesiculares dehiscentes es observada con frecuencia. La sustancia osmiófila que a menudo rodea la membrana limitante del cuerpo, aparece formada por filamentos orientados radialmente con respecto al cuerpo (Palay, 1963) (ver fig. 2). Las vesículas externas de los cuerpos multivesiculares se confunden con las vesículas integrantes del retículo endoplásmico.

Desde el punto de vista de la estructura de este último componente, la vida del ovocito se puede dividir en dos períodos. En el primer período se incluyen los ovocitos de folículos primordiales, en ellos el retículo está representado por vesículas homogéneamente distribuidas. Estas vesículas son de dos tipos, unas pequeñas entre 30 y 60 m μ y otras grandes 200-300 m μ (fig. 1). Sólo parte de estas vesículas poseen gránulos adheridos a la superficie externa.

Esta descripción corresponde a los ovocitos de folículos primordiales de animales jóvenes; en los primordiales de animales cercanos a la pubertad, el citoplasma es más rico en gránulos densos y son notoriamente menos abundantes las vesículas.

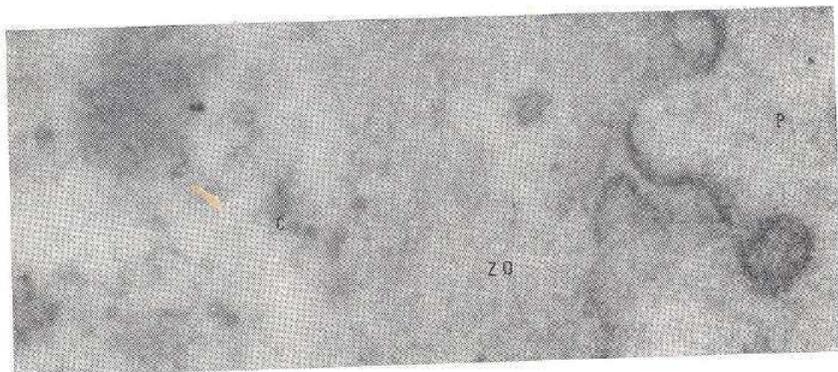


Fig. 4.— Un trozo de la corteza de un ovocito de rata de 33 días mostrando la zona osmiófila (ZO), el citoplasma con gránulos densos (C) y la pelúcida (P). 120.000 \times .

El segundo período se extiende desde el comienzo del crecimiento hasta la maduración del folículo. Se observaron durante este período tres tipos de R. E.: a) el convencional; b) vesículas o sáculos similares a los vistos en el primordial; c) agrupaciones de sáculos.

a) Está formado por cisternas agrupadas linealmente o concéntricamente, estas agrupaciones se ven en el microscopio óptico como cuerpos coloreables con cristal violeta. Rebhun (1956, 1961), Afzelius (1957), André y Rouiller (1957) han descrito agrupaciones similares en ovocitos de invertebrados.

b) El tipo lacunar es igual al del primer período y puede coexistir con los elementos descritos en el párrafo anterior.

c) Las agrupaciones de sáculos aparecen a menudo en ovocitos en crecimiento. Cada sáculo es de tamaño variado y en su mayoría son ovales, a veces están unidos por conductos y se entremezclan en la periferia de dichos acúmulos con las vesículas del R. E. (ver fig. 3). Las agrupaciones son también coloreables con cristal violeta.

En inmediata relación con la membrana celular y penetrando en la microvellosidades, se encontró una capa osmiófila discontinua, del tipo que Odor (1960) describió en los ovocitos de rata. Un detalle de interés es que la sustancia que compone esta capa desplaza de la corteza a los otros componentes del citoplasma (ver fig. 4). A gran aumento se observa que está constituida por finos filamentos más densos que los que comúnmente se ven en la matriz citoplásmica.

DISCUSION.— Los trabajos de los autores mencionados en la introducción, discuten ampliamente la estructura y relaciones de los componentes del citoplasma de los ovocitos. En esta breve nota se juzga que solamente existe interés en comentar algunos de los elementos estudiados, como por ejemplo: los cuerpos multivesiculares, el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico.

CUERPOS M
dos puntos: a)

En ovocitos
en cualquier z
triolo que se h
confirma las ex
así como Novik
multivesiculare;
ran membranas
Esta hipótesis
que existen no
vesículas, no p
plasma están e
no aparece com
llas con exclus

Las vesícu
cuentemente as
plasma con los
permite admiti

RETÍCULO
tremezclamient
de Golgi localí
resulta por ge
las vesículas f
las comúnment

La escuela
cia de continu
Zeigler y Dalt
Essner (1962)
desde el autor
el R. E. y el G
de uno en el t

En el segi
renciadas. Es
riores, no fue
Esto indicaría
ovocitos primo
males prepúbe
animales adult

RESUMEN
50 ratas prepú

En los ov
sentado por un

CUERPOS MULTIVESICULARES.—Su significado es aún oscuro y se discuten dos puntos: a) el origen; b) el significado de estos cuerpos.

En ovocitos de folículos primordiales, los cuerpos multivesiculares aparecen en cualquier zona del citoplasma sin presentar estrecha relación con el centriolo que se halla en la zona del complejo de Golgi. Esta observación no confirma las experiencias de Rebhun (1960) en *Spissula solidissima*. Este autor así como Novikoff (1961), interpretan la membrana incompleta de los cuerpos multivesiculares que descargan sus vesículas hacia el citoplasma, como si fueran membranas preformadas que rodean y encierran un grupo de vesículas. Esta hipótesis está en desacuerdo con los siguientes hechos: los "nucleoides" que existen normalmente en estos cuerpos y que son descargados junto con las vesículas, no preexisten libres en el citoplasma; las vesículas libres en el citoplasma están entremezcladas con gránulos y otros componentes de la matriz; no aparece comprensible cómo podrían ser rodeadas por la membrana sólo aquellas con exclusión de éstos.

Las vesículas liberadas por descarga, así como aquellas que se hallan frecuentemente asociadas a los cuerpos multivesiculares, se confunden en el citoplasma con los elementos indiferenciados del R. E. Esta similitud morfológica permite admitir que pueden ser formas diferentes de un mismo sistema.

RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.—En el primer período llama la atención el entremezclamiento de las vesículas del retículo endoplásmico con las del complejo de Golgi localizado. Dalton y Félix (1953) piensan que el complejo de Golgi resulta por gemación de las cisternas del R. E. Clermont (1956) sostiene que las vesículas formadas en el aparato de Golgi se separan de él y dan lugar a las comúnmente llamadas vesículas del R. E.

La escuela de Porter y Palade (1956, 1957, 1961), sostiene la existencia de continuidad entre el R. E. y el complejo de Golgi. Más recientemente, Zeigler y Dalton (1962) desde el punto de vista ultraestructural, Novikoff y Essner (1962) desde el punto de vista histoquímico y Warshawsky y col. (1963) desde el autorradiográfico, sostienen la tesis de que las comunicaciones entre el R. E. y el Golgi son transitorias y resultan de la incorporación de elementos de uno en el otro sistema.

En el segundo período, el retículo endoplásmico muestra formas más diferenciadas. Es interesante hacer notar que las formas descritas en pasajes anteriores, no fueron vistas en animales adultos (estudiados por varios autores). Esto indicaría que el R. E. pasa de la forma indiferenciada que existe en los ovocitos primordiales, a la más elaborada de los ovocitos en crecimiento (animales prepúberes) y vuelve a desdiferenciarse en los ovocitos en crecimiento de animales adultos. El R. E. retomaría las formas elaboradas en los blastómeros.

RESUMEN.—Se examinaron con el microscopio electrónico los ovarios de 50 ratas prepúberes de 6 a 60 días de edad.

En los ovocitos de folículos primarios el retículo endoplásmico está representado por un sistema lacunar que se entremezcla con los elementos vesicula-

res del complejo de Golgi. En los ovocitos en crecimiento se ve frecuentemente: cisternas convencionales con partículas adheridas, cavidades lacunares, grupos de vesículas, cisternas concéntricas.

Se describe el complejo de Golgi, se discute sus relaciones con el R. E. y se admite que ambos sistemas son continuos.

Se encuentra que los cuerpos multivesiculares son iguales a los existentes en los ovocitos de rata adulta. Se presentan pruebas morfológicas que sostienen que los cuerpos multivesiculares con la membrana incompleta están en proceso de descargar su contenido.

Se describe una estructura fibrilar en la zona osmiófila cortical.

SUMMARY.—The ovaries of 50 pre-puberal rats (6 to 60 days old), were examined with the electron microscope.

In the oocytes of the primary follicle, the endoplasmic reticulum is represented by a lacunar system which intermixes with the vesicular elements of the Golgi complex. In growing oocytes, conventional cisternae with attached particles, lacunar cavities, clumps of vesicles and concentric cisternae are frequently seen.

The Golgi complex is described and its relationships with the E. R. are discussed, it is admitted that both systems are continuous.

Multivesicular bodies are found similar to those existing in adult rat oocytes. Morphological proofs to support that the Mvbs with incomplete membrane are in the state of releasing their content are presented.

Fibrillar structure of the cortical osmiophilic zone is described.

BIBLIOGRAFIA

- AFZELIUS, B. A.—Electron Microscopy of Golgi Elements in Sea Urchin Eggs. *Exp. Cell. Res.*, 1956, 11: 67-85.
- ANDERSON, E. and BEAMS, H. W.—Cytological observations on the fine structure of the guinea pig ovary with special reference to the oogonium, primary oocyte and associated follicle cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 1957, 3: 977-984.
- ANDRE, J. and ROUILLER, C.—The ultrastructure of the vitelline body in the oocyte of the spider *Tegenaria parietina*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 5: 432-446.
- BLANCHETTE, E. J.—A study of the fine structure of the rabbit primary oocyte. *J. Ultrastruct. Res.*, 1961, 5: 349-363.
- CLERMONT, Y.—The Golgi zone of the rat spermatid and its role in the formation of cytoplasmic vesicles. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, Suppl. 2, 119-122.
- DALTON, A. J. and FELIX, M. D.—A study of the Golgi substance and ergastoplasm in a series of mammalian cell types. *Leyden Symp. Fine Struct. Cell (Interscience)*, 1955.
- ESSNER, E. and NOVIKOFF, A.—Cytological studies on two functional hepatomas. Interrelations of endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and lysosomes. *J. Cell. Biol.*, 1962, 15: 289-312.

NOVIKOFF, A.
chet an
ODOR, L. D.
ova in
PALADE, G.
Suppl. 2
PALAY, S. J.
Biol., 19
PORTER, K.
1957, 17
PORTER, K.
Mirsky,
REBHUN, L.
II. Fine
REBHUN, L.
Trans. N
REBHUN, L.
of inver
SOTELO, J.
J. Bioph
TRUJILLO-C
follicle c
Cytol., 1
WARSHAWSKI
proteins
determin
WARTENBERG
struktur
YAMADA, E.
oocyte in
1957, 4:

- NOVIKOFF, A. B.—Lysosomes and related particles. In: *The Cell*. Edited by J. Brachet and A. Mirsky, Academic Press, 1961, vol. 2.
- ODOR, L. D.—Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 7: 567-576.
- PALADE, G. E.—The endoplasmic reticulum. *J. of Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, Suppl. 2, 85-98.
- PALAY, S. J.—Multivesicular bodies in Purkinje cells of the rat's cerebellum. *J. Cell. Biol.*, 1963, 19: 54A-55A.
- PORTER, K. R.—The submicroscopic morphology of protoplasm. *The Harvey Lectures*, 1957, 175-227.
- PORTER, K. R.—The Ground Substance. In: *The Cell*. Edited by J. Brachet and A. Mirsky, Academic Press, 1961, vol. 2.
- REBHUN, L.—Electron microscopy of basophilic structures of some invertebrate oocytes. II. Fine structure of the yolk nuclei. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, 2: 159-170.
- REBHUN, L.—Aster associated particles in the cleavage of marine invertebrate eggs. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 90: 357-380.
- REBHUN, L.—Some electron microscope observations on membranous basophilic elements of invertebrate eggs. *J. Ultrastruct. Res.*, 1961, 5: 208-225.
- SOTELO, J. R. and PORTER, K. R.—An electron microscope study of the rat ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, 5: 327-342.
- TRUJILLO-CENOZ, O. and SOTELO, J. R.—Relationships of the ovular surface with follicle cells and origin of the zona pellucida in rabbit oocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, 2: 347-350.
- WARSHAWSKY, H.; LEBLOND, C. P. and DROZ, B.—Synthesis and migration of proteins in the cells of the exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautographs. *J. Cell. Biol.*, 1963, 16: 1-28.
- WARTENBERG, H. and STEGNER, H. E.—Über die elektronenmikroskopische Feinstruktur des menschlichen Ovarialeies. *Z. Zellforsch.*, 1960, 52: 450-474.
- YAMADA, E.; MUTA, T.; MOTOMURA, A. and KOGA, H.—The fine structure of oocyte in the mouse ovary studied with electron microscope. *Kurume Med. J.* 1957, 4: 148-171.

Estudio de la atresia ovular con el microscopio electrónico¹

G. H. VAZQUEZ NIN y J. ROBERTO SOTELO

INTRODUCCION.— El proceso de la atresia folicular ha sido poco estudiado con el microscopio electrónico. Con respecto al ovocito hay dos referencias: Franchi y Mandl (1962) que estudian la degeneración de los ovocitos en el último período fetal y en seguida del nacimiento y Odor (1960) que menciona figuras mielínicas en ovocitos de animales prepúberes. Ambos estudios han sido realizados en rata.

Como ya lo señalara Ingram (1962), el papel de los estudios modernos es el de reconocer cuáles son los primeros estadios de la atresia. El microscopio electrónico por su poder resolutivo es ideal para esta clase de investigación.

Los estudios ópticos muestran (Beaumont y Mandl, 1962) que la atresia comienza en la etapa de oogonia y continúa toda la vida (ver las revisiones de Pincus, 1936 e Ingram, 1962). Se han seleccionado para este estudio la edad juvenil por el elevado número de ovocitos que se encuentran en atresia en estos ovarios prepúberes.

MATERIAL Y METODOS.— Se usaron ratas blancas de 6 a 60 días de edad de la cepa mantenida en el Instituto. Entre 6 y 30 días, la diferencia de edad de los animales estudiados fue de 1 día; entre 30 y 60, la diferencia fue de 5 días. Los ovarios se fijaron en tetróxido de osmio, se incluyeron en n-butilmetacrilato o araldita y fueron coloreados con acetato de uranio o citrato de plomo. Los cortes finos fueron efectuados en un micrótopo modelo Porter-Blum, los microscopios electrónicos utilizados para el examen del material son: EMU 2C (RCA) y Elmiskop I (Siemens). Parte del material fue cortado a $\frac{1}{2}$ ó 1μ y examinado con un microscopio Ortholux equipado con dispositivo de contraste de fase.

OBSERVACIONES.— Se describirán únicamente los aspectos iniciales de los diferentes procesos, ya que los más avanzados son bien conocidos de los microscopistas ópticos.

Los procesos alterativos que se observan se pueden esquematizar en los siguientes grupos: 1º) Cambios que afectan las relaciones del ovocito con las

1. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Departamento de Ultraestructura Celular. Montevideo, Uruguay.

células foliculares. 2º) Alteración en los ovocitos: a) cambios que dañan predominantemente los componentes citoplasmáticos; b) alteraciones que involucran núcleo y citoplasma: segmentación anómala.

1º) Aparecen dos tipos de células foliculares, un tipo cuyo citoplasma es basófilo y que aparece denso en el microscopio electrónico. Las células están aplastadas, sus contornos son cóncavos y forman una red tridimensional entre

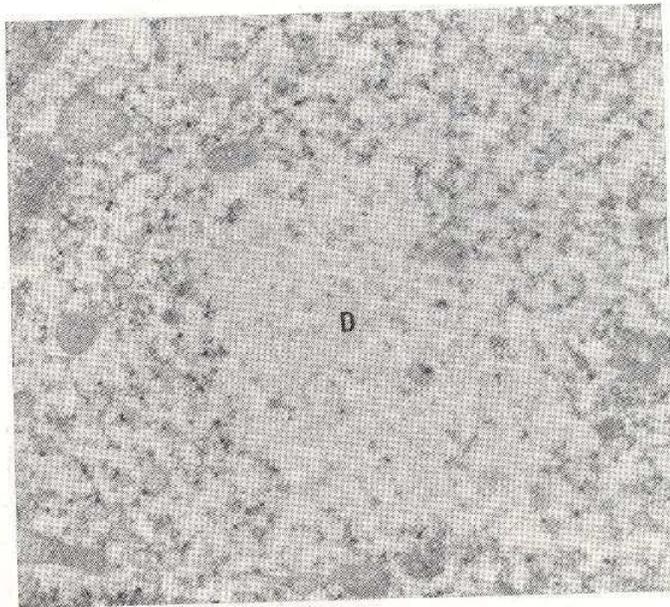


Fig. 1.—La zona clara de forma oval —D— corresponde al comienzo del estado lamelar de la matriz que aún es amorfa. Rata de 24 días. 20.000 X.

ellas. Las otras células son redondeadas, su citoplasma claro y están desprovistas de gránulos densos. Estas células ocupan los espacios libres de la red formada por el tipo anterior y sus contornos son convexos.

Las prolongaciones de estas células a menudo desaparecen al comienzo del proceso atrésico. En otros casos son las microvellosidades ovulares las que desaparecen primero.

2º) a) El proceso de degeneración citoplasmática puede realizarse en varias formas. Uno de los más notorios es el que consiste en una disposición lamelar de la matriz, que es amorfa en los ovocitos normales. Comienzan por aparecer en el citoplasma una o más áreas nebulosas desprovistas de organoides o gránulos densos (ver fig. 1). Luego aparecen fibrillas desordenadas que más

tardé se transforman en láminas. Cuando el proceso es completo se ven campos donde se agrupan series de no menos de 10 láminas paralelas entre sí. A alta magnificación se ve que la lámina tiene una estructura a dobles estrias paralelas entre sí (ver fig. 2).

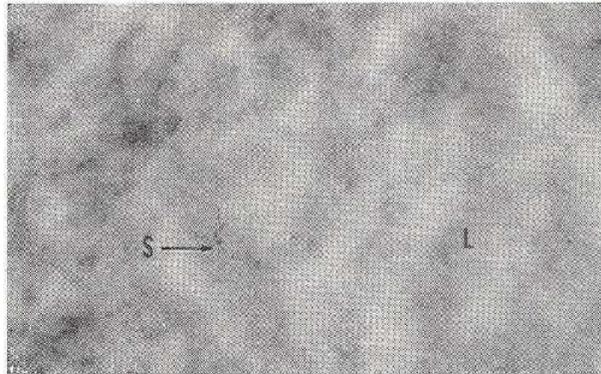


Fig. 2.—Grupo de laminillas vistas a 71,000 aumentos, mostrando la composición estriada. L, laminillas; S, estrias. Rata normal de 21 días.

La disposición lamelar no se acompaña "ab initio" de otros cambios que indiquen el proceso de atresia que comienza.

Otras alteraciones citoplasmáticas que aparecen a menudo son: disminución del número de mitocondrias, pérdida de los gránulos densos.

Los cuerpos multivesiculares aparecen alterados; unas veces se observa en su interior una formación estratificada osmiófila parecida a las figuras mielínicas, otras veces se encuentran cuerpos que contienen material denso dentro de las vesículas.

Los gránulos corticales son un componente citoplasmático que no aparece en los ovocitos normales. Están compuestos por una membrana trilaminar y una sustancia intensamente osmiófila. La membrana puede faltar total o parcialmente. Hadek (1963) encontró cuerpos muy similares en ovocitos maduros de coneja.

29) b) La existencia de folículos conteniendo óvulos segmentados es muy bien conocida por los microscopistas ópticos (ver revisión de Pincus, 1936). Se observa con contraste de fase, ovocitos divididos en hasta 8 segmentos o pseudoblastómeros a veces iguales, a veces desiguales en tamaño. Los blastómeros y las células foliculares aparecen en estados de degeneración más o menos avanzados (ver fig. 3).

La zona pelúcida aparece vacía de prolongaciones y despegada de los segmentos o pseudoblastómeros por un espacio de deutoplasmólisis, como se ve nor-

ven campos
de sí. A alta
estrias parale-

malmente en los ovocitos en el período de maduración y fertilización (van der Stricht, 1923; Odor, 1960) (Lams, 1913; Sotelo y Porter, 1959). Los segmentos pueden aparecer nucleados, binucleados o anucleados.

En el nucleoplasma se ven gránulos de gran densidad electrónica y la membrana nuclear muestra, además de la doble membrana convencional, numerosos sáculos en contacto con ella, que son indistinguibles de las lagunas del retículo endoplásmico.

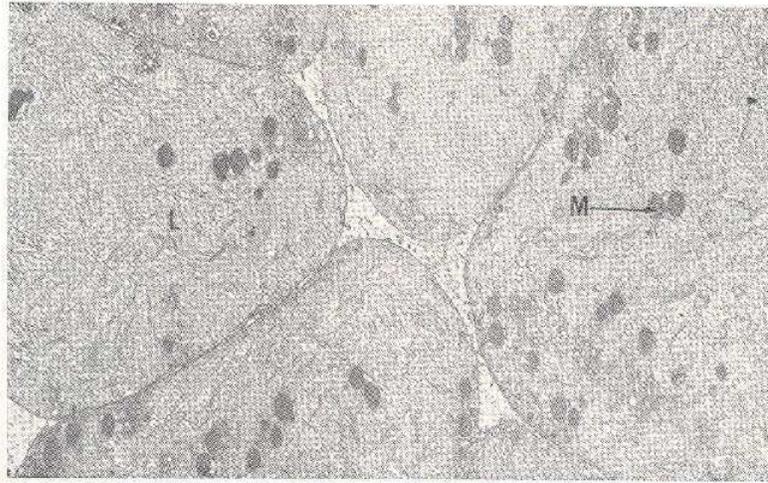


Fig. 3.—Parte central de un ovocito segmentado. Se ven seis segmentos. Todos ellos presentan signos de degeneración, tales como la disposición lamelar de la matriz —L— y mitocondrias fuertemente osmiófilas —M—. Los segmentos muestran tendencia a redondearse y separarse.
Rata de 29 días. 5.200 X.

Las mitocondrias aparecen muy osmiófilas y no se distinguen las crestas.

Los componentes del retículo pueden ser lagunas o cisternas, muchas veces éstas últimas están dilatadas. Los elementos de Golgi son muy escasos, en contraste con la gran cantidad que se ven en la segmentación normal. Los cuerpos multivesiculares aparecen alterados como fue descrito más arriba.

DISCUSION.— Los primeros estadios morfológicos de la atresia no se pueden correlacionar con fenómenos que tengan lugar en otras células, tal vez porque el ovocito es una célula con caracteres propios. Un ejemplo de esto, es el estado lamelar de la matriz. El hecho de que haya pequeñas alineaciones de gránulos de la matriz en huevos en segmentación (Izquierdo y Vial, 1962)

do la
días.

cambios que

disminución

se observa en
guras mielí-
tenso dentro

no aparece
minar y una
il o parcial
maduros de

ados es muy
ncus, 1936).
segmentos o
os blastóme-
nás o menos

de los seg-
o se ve nor-

y la normalidad que presenta el resto del ovocito cuando se produce la ordenación de la matriz, hace pensar que este fenómeno puede tener carácter regresivo en unos casos y terminar en total degeneración del citoplasma en otros. La ausencia o gran disminución de las prolongaciones en la pelúcida es un sintoma de atresia muy seguro y temprano, se podría pensar en una relación metabólica entre las células foliculares y el ovocito. Sin embargo, Mancini y col. (1963) demostraron que las proteínas difunden entre las células foliculares hasta el ovocito por lo que esta relación no aparece muy clara aún.

Se debe destacar la relativa independencia de parte de los componentes citoplasmáticos para alterarse, permaneciendo el resto aparentemente sano y la variabilidad en el orden en que se suceden los cambios; así por ejemplo, aparecen ovocitos segmentados en un avanzado estado atrésico sin ordenación lamelar y ordenación lamelar sin ninguna alteración ni ovular ni folicular. Se hace notar también que la alteración mitocondrial más frecuentemente observada fue el aumento de opacidad de la matriz mitocondrial, en contraste con el aumento de tamaño con redondeo que es habitual en casi todos los otros procesos de degeneración de las mitocondrias.

Los fenómenos atrésicos en muchos casos repiten abortivamente los cambios que ocurren en la activación normal por madurez o fertilización, así como la segmentación, o las laminillas de la matriz, la pseudodeutoplasmólisis y las modificaciones de las prolongaciones del ovocito o de las células foliculares.

RESUMEN.— Se estudian los procesos atrésicos en la rata blanca prepúber.

Las células foliculares alteradas aparecen osmiófilas, cóncavas y delgadas o gruesas claras y redondeadas. En ambos tipos son escasas las prolongaciones que atraviesan la pelúcida.

Las alteraciones que presenta el ovocito pueden ser: aparición de ordenación lamelar en la matriz; desaparición de las microvellosidades; degeneración de las mitocondrias y cuerpos multivesiculares; aparición de los gránulos corticales y finalmente segmentación del núcleo y del citoplasma. El orden en que aparecen estas alteraciones es variable y puede existir más de una en un mismo ovocito.

Se discute la aparición de detalles que se asemejan a algunos aspectos de los ovarios normales en desarrollo.

SUMMARY.— Atresia is studied in the prepuberal white rat.

Damaged follicular cells appear either dense and with concave profil or with clear cytoplasm and with a rounded shape. Both types have only scarce prolongations in the zona pellucida.

The oocytes present: lamelar disposition of the matrix; absence of microvilli, degeneration of mitochondria and multivesicular bodies; appearance of cortical granules and nuclear and cytoplasmic segmentation. The order of appearance of these alterations is variable and more than one may exist in one oocyte.

Details of structure were found in the atresic oocytes recalling the development of the normal fecundated egg.

BEAU
FRAN
INGR.
IZQUI
LAMS,
MANC
ODOR,
PINCUI
SOTEL
J.
STRICE
pé
brí

BIBLIOGRAFIA

- BEAUMONT, H. and MANDL, A.—A quantitative cytological study of oögonia and oocytes in the foetal and neo-natal rat. *Proc. Roy. Soc.*, 1962, 155: 557-574.
- FRANCHI, L. and MANDL, A.—The ultrastructure of oögonia and oocytes in foetal and neonatal rat. *Proc. Roy. Soc.*, 1962, 157: 99-114.
- INGRAM, D. L.—Atresia. In: *The Ovary*. Edited by Sir Solly Zuckerman, Academic Press, 1962, vol. 1.
- IZQUIERDO, L. and VIAL, J. D.—Electron microscope observations on the early development of the rat. *Z. Zellforsch.*, 1962, 56: 157-179.
- LAMS, H.—Étude de l'oeuf de cobaye aux premiers stades de l'embryogenèse. *Arch. Biol.*, 1913, 28: 229.
- MANCINI, R. E.; VILAR, O.; HEINRICH, S. J.; DAVIDSON, O. W. and ALVAREZ, B.—Transference of circulating labelled serum proteins to the follicle of the rat ovary. *J. Histochem. Cytochem.*, 1963, 11: 80-88.
- ODOR, L. D.—Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 7: 567-576.
- PINCUS, G.—*The eggs of mammals*. The MacMillan Co., 1936.
- SOTELO, J. R. and PORTER, K. R.—An electron microscope study of the rat ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, 5: 327-342.
- STRICHT, O. Van der.—Étude comparée des ovules des mammifères aux différentes périodes de l'ovogenèse d'après les travaux du Laboratoire d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Gaud. *Arch. Biol. Liège*, 1923, 33: 229-300.

Heparinemia endógena y sensibilidad a la heparina en pacientes arterioescleróticos¹

D. BENNATI, C. W. GHIGGINO y M. GARCIA-RIZZO

INTRODUCCION.—Debido a la importancia que se atribuye a la hipercoagulabilidad en la patogenia de la arterioesclerosis, hemos querido estudiar la tendencia trombótica, mediante la sensibilidad a la heparina exógena y las variaciones de la heparinemia endógena en sujetos arterioescleróticos, comparando resultados con los obtenidos de testigos normales de distintas edades.

MÉTODOS DE ESTUDIO.—A) SENSIBILIDAD A LA HEPARINA EXÓGENA.—Se estudió por diversas técnicas, tanto para valorar el efecto de la heparina sobre la coagulabilidad global [método de Marbet y Winterstein (1)], como para estudiar la influencia de la heparina sobre cada una de las fases de la coagulación.

I) *Sensibilidad a la heparina* (método con sangre total de Marbet y Winterstein). Se utilizó sangre total citratada (9 ml. de sangre y 1 ml. de citrato de sodio al 3.8%), extraída por punción venosa de vena cefálica del codo.

Solución de cloruro de calcio M/40.

Solución de heparina cálcica que contiene 0,2 U.I./ml. de heparina [preparada a partir de heparina comercial (de 5.000 U.I./ml.) en suero fisiológico].

Tubos de 8 mm. de diámetro colocados en baño a 37° C.

Descripción de la técnica: Se ponen tres tubos a 37° C., en los cuales se coloca 0,5 ml. de sangre total citratada.

En el primer tubo se agrega 0,5 ml. de cloruro de calcio M/40 y se toma el tiempo de recalcificación. En los otros dos se agrega 0,5 ml. de la solución de heparina cálcica, y en este instante se pone en marcha el cronómetro, inclinando el tubo cada 30 segundos hasta la aparición del coágulo.

Fundamento del método: Consiste en medir el tiempo de recalcificación de la sangre total, con y sin el agregado de una cantidad standard de heparina. La diferencia entre uno y otro tiempo, medida en segundos, establece la sensibilidad a la heparina de la sangre testada.

II) *Estudio de la sensibilidad a la heparina en cada una de las fases de la coagulación.* Para esto hemos utilizado métodos personales que los detallaremos a continuación, cuyo fundamento es similar al de la técnica de Marbet.

1. Trabajo realizado en el Laboratorio de Hematología del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina.

1) *Estudio de la sensibilidad a la heparina en la primera etapa:* Para esto se utilizó el test basado en el tiempo de cefalina con y sin heparina.

Descripción de la técnica: En dos tubos se coloca 0,5 ml. de plasma citratado. Al número 1, se le agrega además, 0,5 ml. de cefalina 1/100 y 0,5 ml. de cloruro de calcio M/40. A partir de este momento, inclinándolo el tubo cada 15 segundos, se toma el tiempo de coagulación. Al tubo número 2, se le agrega 0,05 de heparina (5 U.I./ml.) y 0,5 ml. de cloruro de calcio M/40. Como en el anterior, a partir de este momento se toma el tiempo de aparición de la red de fibrina como punto final.

2) *Estudio de la sensibilidad a la heparina en la segunda fase de la coagulación:* Se estudió mediante el tiempo de protrombina en una etapa (según Quick), determinándose los valores de ese tiempo, con un plasma testigo normal y un plasma a investigar, antes y después del agregado de una cantidad standard de heparina.

Descripción de la técnica: Consiste en dos partes: en un tubo, se procede a realizar un tiempo de Quick standard (0,1 ml. de plasma citratado —2.500 revoluciones por minuto/10 minutos—, 0,1 ml. de tromboplastina de cerebro humano y 0,1 ml. de cloruro de calcio M/40).

En otros dos tubos, se realiza un tiempo de Quick modificado: en el primer tubo se agrega al plasma citratado, 0,05 ml. de una solución de heparina en S.F. con 12,5 U.I./ml.; en el segundo tubo se agrega 0,05 ml. de una solución de heparina en S.F. con 25 U.I./ml. Luego de inclinar cada tubo, se mide el tiempo de coagulación, tomando como punto final la aparición de una red de fibrina.

3) *Estudio de la sensibilidad a la heparina en la tercera fase de la coagulación:* Se realizó mediante el tiempo de trombina con y sin heparina.

Descripción de la técnica: Se ponen cuatro tubos con 0,2 ml. de plasma citratado, en un baño a 37° C. En los dos primeros, se realiza un tiempo de trombina con 0,2 ml. de trombina (1 U.I./ml.) preparada a partir de una solución salina stock de trombina bovina purificada Parke-Davis que contiene 100 U.I./ml. Se toma el tiempo de coagulación.

En los otros dos tubos, se coloca 0,05 ml. de heparina (1 U.I./ml.) y se le agrega 0,2 ml. de trombina (1 U.I./ml.). Inmediatamente se toma el tiempo de formación del coágulo plasmático.

B) **HEPARINEMIA ENDÓGENA.**—Se dosificó por medio del test protamina-heparina de Allen (2), procediéndose de la siguiente manera: esta prueba consiste en determinar la mínima cantidad de protamina necesaria para coagular una muestra de sangre a testar, a la que previamente se le agrega una cantidad standard de heparina. Se fundamenta en la propiedad que presenta el sulfato de protamina de combinarse con las sustancias heparínicas, neutralizando la acción anticoagulante de las mismas; de modo que la cantidad de protamina requerida para producir la coagulación será directamente proporcional a la cantidad de heparina existente en la muestra de sangre examinada.

La técnica empleada, original de Allen, consiste en preparar una serie de 10 tubos test conteniendo cantidades crecientes (de 0,02 a 0,2 ml.) de sulfato de protamina "Roche" en solución acuosa al 0,1 gr. %.

En cada tubo se agrega luego 1 ml. de la sangre a testar, la cual ha sido previamente heparinizada inmediatamente después de su extracción, de la siguiente manera: se coloca en un tubo de ensayo 0,1 ml. de una solución salina de heparina al 1% y luego se agrega 10,9 ml. de sangre, de manera de completar un volumen de 11 ml. La lectura de la prueba se hace, luego de dejar los tubos una hora a temperatura ambiente, anotando como punto final la mínima cantidad de protamina que ha determinado la formación de un coágulo. Según Allen, este punto final (título de protamina) es de 0,14 mg. para el hombre.

RESULTADOS.—A) SENSIBILIDAD A LA HEPARINA EXÓGENA.

I) TEST PARA LA DETECCIÓN GLOBAL DE LA SENSIBILIDAD A LA HEPARINA

(Valores promediales y extremos de la curva)

	Sin heparina	Con heparina
Testigos	2 m. 11 s. (1 m. 20 - 3 m. 20)	4 m. (1 m. 50 - 6 m. 50)
Pacientes	2 m. (1 m. - 3 m.)	2 m. 52 s. (55 s. - 4 m. 30)

II) ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LA HEPARINA EN CADA UNA DE LAS FASES DE LA COAGULACION

Primera etapa: Técnica basada en el tiempo de cefalina

	Tubo 1 (s. h.)	Tubo 2 (0,05 hep.)	Tubo 3 (0,1 hep.)
Testigos	1 m. 11 s. (36 s. - 1 m. 50)	2 m. (1 m. - 3 m.)	3 m. 11 s. (1 m. - 5 m.)
Pacientes	1 m. 1 s. (34 s. - 1 m. 40)	2 m. 21 s. (1 m. 12 - 4 m.)	3 m. (1 m. 15 - 4 m.)

Testigos

Pacientes

CON
a la hepa
dad de ca
que se ha
una *dism*
constante

RESU
nemia enc
trombótica
La se
en cada u
Se ob
y sobre to
el tiempo

una serie de
ml.) de sulfato

la cual ha sido
ción, de la si-
solución salina
anera de com-
luego de dejar
to final la mí-
de un coágulo.
4 mg. para el

Segunda etapa: Técnica basada en el tiempo de protrombina

	Sin hep.	Hep. 12,5 U. I./ml.	Hep. 25 U. I./ml.
Testigos	18 s.	1 m. 16 s.	1 m. 55 s.
Pacientes	18 s.	53 s.	1 m. 14 s.

Tercera etapa: Técnica en base a tiempo de trombina

	Sin heparina	Con heparina
Testigos	31 s.	3 m. 17 s.
Pacientes	32 s.	2 m. 16 s.

B) HEPARINEMIA ENDÓGENA.—Test protamina-heparina:

Testigos	0,06 mg. de protamina
Pacientes	0,04 mg. de protamina

CONCLUSIONES.— Se observa una evidente disminución de la sensibilidad a la heparina global por la técnica de Marbet y Winterstein y de la sensibilidad de cada una de las fases de la coagulación, sobre todo de la última fase que se ha testado por la técnica basada en el tiempo de trombina. Hay además, una disminución de la heparinemia endógena, que aunque no muy intensa es constante comparada con los resultados obtenidos en sujetos normales.

RESUMEN.— Se estudia la sensibilidad a la heparina exógena y la heparinemia endógena en sujetos arterioescleróticos, con el fin de evaluar la tendencia trombótica en los mismos.

La sensibilidad a la heparina se valora por distintos métodos, analizándola en cada una de las fases de la coagulación.

Se observa una evidente disminución de la sensibilidad global a la heparina y sobre todo, de la sensibilidad en la tercera fase de la coagulación (basada en el tiempo de trombina).

Tubo 3
(0,1 hep.)
3 m. 11 s.
(1 m. - 5 m.)
3 m.
(1 m. 15 - 4 m.)

La heparinemia endógena también mostró variaciones significativas consistentes en una disminución constante aunque no muy marcada, comparada en todos los casos con los resultados en sujetos normales.

Estos resultados traducen una evidente tendencia trombótica y están acordes con la teoría trombogénica de la arterioesclerosis.

SUMMARY.—The sensibility to exogen heparin and to endogen heparinemia is studied in arteriosclerotic patients, in order to evaluate their thrombotic tendency.

Heparin sensibility is evaluated by different methods, analyzing it in each one of the coagulation phases.

An evident diminution of the global heparin sensibility is observed, specially in the third coagulation phase.

Endogen heparinemia also showed constant and significative changes compared with the results in normal subjects.

These results traduce an evident thrombotic tendency, and are in agreement with the thrombogenic theory of arteriosclerosis.

Se agradece a los Laboratorios Hoffman-La Roche y Eduardo Marquez Castro, por habernos proporcionado sulfato de protamina y trombina bovina tópicos. Se agradece también, al Dr. Jorge Dubra y al Servicio de Cardiología del Hospital Maciel, dirigido por el Dr. Isasi, por habernos enviado pacientes para realizar estos trabajos.

BIBLIOGRAFIA

1. MARBET, R. y WINTERSTEIN, A.— Estudio de la sensibilidad a la heparina. Hoffmann-La Roche, 1954 (Basel).
2. ALLEN, J. G.; MOULDER, P. V.; ELGHAMMER, R. M.; BURTON, M. D.; GROSSMAN, J.; McKEEN, Ch. L.; SANDERSON, M.; EGNER, W. and CROSBIE, J. M.—*J. Lab. Clin. Med.*, 1949, 34: 473.

Estudio de la fibrinólisis

inducida en el perro por el shock peptónico y su inhibición por el Iniprol (C. Y. 66 Choay)¹

D. BENNATI, C. W. GHIGGINO y M. GARCIA-RIZZO

INTRODUCCION.—Continuando con el estudio de las modificaciones sanguíneas desencadenadas en el estado de shock peptónico (1), en este trabajo abordamos el problema del estudio de la actividad lítica del plasma (fibrinogenolítica y fibrinolítica) luego de la administración intravenosa de peptona.

Los datos bibliográficos sobre este problema son muy escasos e incompletos. Moll (1903) (2) había observado en perros intactos una disminución notable, pero transitoria, del fibrinógeno luego de administrar peptona a razón de 50 cg./kg. de peso. Poco después, Nolf (1904) (3) observa intensa fibrinólisis cuando se administra peptona a perros hepatectomizados, administrando esta última a razón de 30 cg./kg. de peso. El mismo Nolf (1928) (4) describe nuevamente el efecto fibrinolítico luego de la inyección de peptona en su preparado "perro anterior" (animal en el cual se ha realizado una ligadura de la aorta torácica y de la vena cava inferior, inmediatamente por arriba del diafragma), en el cual el hígado queda separado de la circulación.

Rocha e Silva y colab. (1946) (5) y Scroggie y colab. (1947) (6) observan actividad proteolítica en la sangre extraída durante el estado de shock peptónico en el animal intacto cuando se le agrega protamina, y fibrinólisis espontánea en el shock peptónico producido en el preparado de "perro anterior".

Ungar y Mist (1949) (7) observaron que el agregado de peptona "in vitro" al suero de cobayo origina una rápida activación de la profibrinolisisina, pero simultáneamente la enzima activada se combina con la antifibrinolisisina, lo que hace que la actividad fibrinolítica sea fugaz, desapareciendo en pocos minutos.

Ungar y Damgaard (1953) (8), en observaciones posteriores sobre la activación proteolítica de la profibrinolisisina del suero de cobayo determinada por la adición de peptona y ciertas sustancias de alto peso molecular (agentes anafilactoides), llaman la atención referente al hecho de que la peptona, a diferencia de la estreptoquinasa no activa la profibrinolisisina purificada, lo que induce a pensar que la activación del tipo anafilactoide requiere la intervención

¹ Trabajo realizado en el Laboratorio de Hematología del Departamento de Fisiología que dirige el Prof. Dr. D. Bennati. Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

de un sistema enzimático distinto al involucrado en la activación estreptoquinásica. Posteriormente, Olesen (1957, 1960) (9, 10) confirma, empleando diferente método, los resultados de Ungar y Mist, referente al desarrollo de una actividad fibrinolítica en el suero de cobayo con el agregado de peptona; y en un trabajo posterior (1961) (11), el mismo Olesen demuestra que la activación por la peptona del sistema fibrinolítico del plasma humano, es similar a la activación del suero de cobayo.

Como se puede observar en la bibliografía a nuestro alcance, la mayoría de los trabajos sobre peptona y fibrinólisis se refieren a experiencias "in vitro", no existiendo ningún estudio referente a la actividad fibrinolítica durante el shock peptónico, "in vitro" y en el animal entero, tampoco se ha ensayado ningún inhibidor farmacológico o enzimático de la fibrinólisis para tratar de contrarrestar la actividad lítica desarrollada.

En el presente trabajo se estudian las variaciones de la actividad lítica del plasma durante el shock peptónico y se ensaya un inhibidor enzimático de la plasmína (Iniprol, C. Y. 66 Choay) con el fin de obtener mayor información sobre el tema.

MATERIAL Y METODOS.— Los experimentos se realizaron utilizando 28 perros mestizos de ambos sexos. La peptona White se administró por vía intravenosa en inyección rápida, en una dosis única de 100 mg./kg. de peso. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca, antes, a los 5, 10, 15, 20 y 30 minutos de la inyección de peptona. Dado que se trabajó en perros no anestesiados, la intensidad y la evolución del shock fue seguido por las modificaciones del tiempo de coagulación (método de Lee-White).

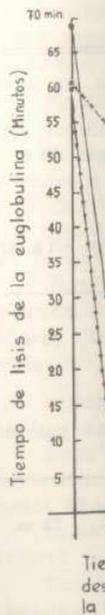
La actividad fibrinolítica de la sangre fue investigada en cada muestra mediante el "test de lisis de la euglobulina" de von Kaulla (12).

En las cuatro experiencias en que se administró el Iniprol (C. Y. 66 Choay), este inhibidor de la proteólisis fue dado en una inyección única de 1 millón de unidades, administrada conjuntamente con la peptona en dos experiencias y, en otras dos, 5 minutos después.

RESULTADOS.— Las variaciones del test de lisis de la euglobulina, aparecen resumidas en el cuadro adjunto (fig. 1). En el mismo se observa, además, los valores correspondientes, en cada momento, del tiempo de coagulación, índice de la intensidad y evolución del shock (fig. 2). Aparecen además, los valores obtenidos en los casos en que se administró el Iniprol (C. Y. 66 Choay). En todos los casos se expresan valores promedios.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es evidente que en el estado de shock peptónico ocurre un aumento de la actividad lítica de la sangre. El tiempo de lisis de la euglobulina se acorta progresivamente hasta alcanzar su valor mínimo a los 10 minutos de administrada la peptona y prácticamente se normaliza a los 30 minutos.

Estas modificaciones del tiempo de lisis de la euglobulina, no son paralelas a las modificaciones del tiempo de coagulación dado que, como se puede observar en el cuadro adjunto, el tiempo de coagulación permanece prolongado aún a los 30 minutos de administrada la peptona. La administración de Iniprol,



en todos los casos se expresan valores promedios. En todos los casos se expresan valores promedios.

DISC
pancreático
mina (13)
bloqueando

reptoquiná-
o diferente
e una acti-
tona; y en
activación
miliar a la

la mayoría
ias "in vi-
ca durante
a ensayado
tratar de

d lítica del
ático de la
nformación

lizando 28
vía intra-
peso. Las
5, 10, 15,
en perros
do por las

la muestra

66 Choay),
e 1 millón
eriencias y.

ulina, apa-
ra, además,
ilación, in-
demás, los
66 Choay).

o de shock
tiempo de
lor mínimo
ormaliza a

son parale-
o se puede
prolongado
de Iniprol,

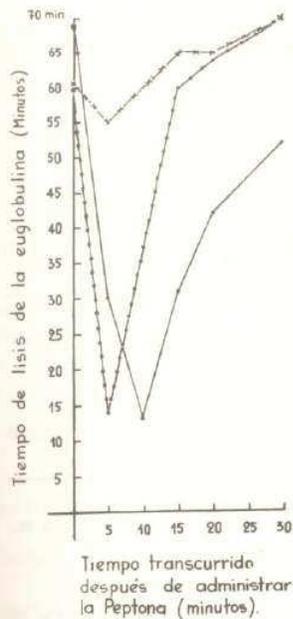


Fig. 1.

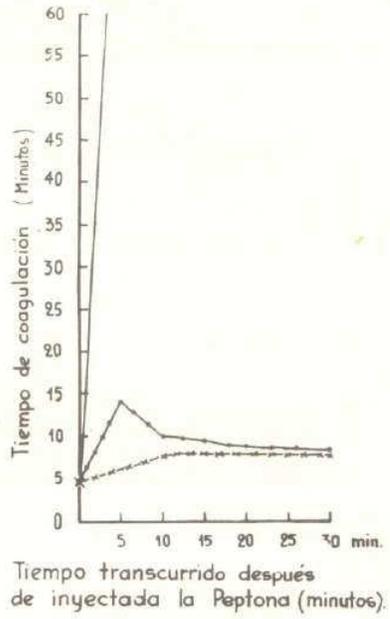


Fig. 2.

Fig. 1.—Test de lisis de la euglobulina. (von Kaulla.)
— Curva normal luego de la administración de peptona.
●—● Iniprol inyectado 5 minutos después de la peptona.
—x— Iniprol y peptona en inyección simultánea.

Fig. 2.—Tiempo de coagulación. (Lee-White.)
— Curva normal luego de la administración de peptona.
●—● Iniprol inyectado 5 minutos después de la peptona.
—x— Iniprol y peptona en inyección simultánea.

en todos los casos, contrarrestó de manera variable, el aumento de la actividad lítica, inhibiéndola prácticamente de manera completa cuando se administró conjuntamente con la peptona y reduciéndola de manera evidente cuando se administró 5 minutos después de la peptona.

Otro hecho de interés es la inhibición del alargamiento del tiempo de coagulación por el Iniprol. Esta inhibición, aunque intensa, no es completa.

DISCUSION.—En este estudio, hemos querido probar si el Iniprol, enzima pancreática, a la que conocemos su acción inhibitoria específica sobre la plasmina (13) (1960), actúa sobre la fibrinólisis inducida por la peptona, "in vivo", bloqueándola en forma total.

SHOCK PEPTONICO

		Antes	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	30 min.
Perros sin Iniprol	Fibrinólisis	64 m.	30 m.	13 m.	31 m.	42 m.	52 m.
	T. de coagulación	3 m. 30	>1 h. 30				
Iniprol a los 5 min.	Fibrinólisis	58 m.	14 m.	37 m.	60 m.	65 m.	70 m.
	T. de coagulación	4 m. 50	18 m.	14 m.	9 m. 30	8 m. 40	8 m. 20
Iniprol y Peptona	Fibrinólisis	59 m.	55 m.	60 m.	66 m.	62 m.	72 m.
	T. de coagulación	4 m. 20	9 m. 30	8 m. 40	8 m. 20	8 m.	6 m. 30

Destacamos que no hemos encontrado bibliografía acerca de este tipo de trabajo experimental "in vivo", que emplee como activador del plasminógeno, el shock peptónico, salvo nuestro estudio anterior sobre fibrinólisis y shock peptónico (1). Todas las investigaciones sobre el tema, se han realizado la mayor parte "in vitro" o "in vivo", agregando protamina a la sangre espontáneamente incoagulable; como se sabe actualmente, que la protamina posee actividad fibrinolítica, consideramos a este tipo de experiencias, no específicas para el estudio de este tema.

De acuerdo a los datos obtenidos, quedaria demostrado que existe una actividad lítica aumentada por la peptona, y que la plasmina es inactivada por el Iniprol, enzima de acción específica sobre las peptidasas, reacción que, según otros autores (13) (1960), bloquea, de manera estequiométrica, el centro activo de estas enzimas (plasmina), formando un complejo enzima-inhibidor.

CONCLUSIONES.— De lo que antecede se infiere: 1º) que existe un evidente aumento de la actividad lítica de la sangre durante el shock peptónico; 2º) que este fenómeno aparece rápidamente, alcanza su máximo a los 10 minutos de inyectada la peptona y prácticamente desaparece a los 30 minutos; 3º) que el mecanismo de dicho fenómeno es aparentemente de origen enzimático, ya que es inhibido por el Iniprol; y 4º) que la administración de Iniprol

no sólo t
tiene, ad
el tiempo

RESI

ma durar

Se c

máximo

actividad

dia hora

de la lisi

Tam

alargamie

tónico. E

coagulaci

SUM

(using th

Lysis

injection

pears 30

Lysis

Iniprol.

This

tion time

factors ir

Se a

utilizadas

1. BENI

2. MOLI

3. NOLI

4. NOLI

5. ROCH

6. SCRO

7. UNGA

8. UNGA

9. OLES

10. OLES

11. OLES

12. Von I

13. VAIR

N

no sólo tiende a normalizar las desviaciones del sistema fibrinolítico, sino que tiene, además, efecto sobre la coagulabilidad sanguínea, tendiendo a normalizar el tiempo de coagulación.

RESUMEN.—Se estudia las modificaciones de la actividad lítica del plasma durante el shock peptónico, empleando el test de lisis de la euglobulina.

Se comprueba que el tiempo de lisis se acorta rápidamente, alcanzando su máximo a los 10 minutos de inyectada la peptona, siendo este aumento de la actividad lítica relativamente fugaz, ya que prácticamente desaparece a la media hora de administrada la peptona. Se comprueba, además, que este aumento de la lisis es de naturaleza enzimática, ya que es inhibido por el Iniprol.

También se observa que esta enzima proteolítica bloquea en gran parte el alargamiento del tiempo de coagulación que acompaña al estado de shock peptónico. Esto podría deberse a la inhibición de la lisis de otros factores de la coagulación, hipótesis que deberá ser confirmada con datos adicionales.

SUMMARY.—The changes of the lytic activity during peptonic shock (using the euglobulin lysis test) were studied.

Lysis time quickly shortens reaching its maximum 10 minutes after peptone injection. The increase of lytic activity, is relatively transitory because it disappears 30 minutes after injection.

Lysis increase is due to enzymatic activity, because it is inhibited by Iniprol.

This proteolytic enzyme considerably inhibits the increase of the coagulation time provoked by peptonic shock. This action would be make for others factors involved in coagulation.

Se agradece al Laboratorio Choay, por habernos enviado las muestras de Iniprol utilizadas en este experimento.

BIBLIOGRAFIA

1. BENNATI, D. y GHIGGINO, C. W.—*Soc. Biol. de Mont.*, 28-V-1959. (En prensa.)
2. MOLL.—Citado por Nolf.
3. NOLF, P.—*Arch. Internat. Physiol.*, 1904, 2: 1-11.
4. NOLF, P.—1938.
5. ROCHA e SILVA, M. y TEXEIRA, R. M.—*Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 1946, 61: 376.
6. SCROGGIE, A. E.; JAKES, L. B.; ROCHA e SILVA, M.—*Proc. Soc. Exp. Med.*, 1947, 66: 326-331.
7. UNGAR, G. and MIST, S. M.—*J. Exp. Med.*, 1949, 90: 30-51.
8. UNGAR, G.; DAMGAARD, E. and HUMMEL, F. P.—*J. Exp. Med.*, 1953 98 (4): 291-303.
9. OLESEN, E. S.—*Act Physiol. Scand.*, 1957, 41: 187-193.
10. OLESEN, E. S.—*Acta Pharmacol. (Kbh)*, 1960, 17: 191-199.
11. OLESEN, E. S.—*Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1961, 13: 410-415.
12. Von KAULLA and KURT, N.—*Am. J. Clin. Path.*, 1958, 29: 104-112.
13. VAIREL, E.; THELY, M. et CHOAY, J.—*La Semaine des Hôpitaux* 36e. année. N° 24, 30 juin, 1960, 675-677.

Alternancia y seudoalternancia
causadas por corte de los nervios vagos
y/o denervación de los senos carotídeos¹

H. MAZZELLA, L. GUEMBERENA DE CASACUBERTA y S. FABIUS

Observaciones de Wiggers (1) y otros, han mostrado que la sección de los vagos en el cuello del perro provoca a veces además de taquicardia, una seudoalternancia del pulso arterial. Efectuamos comprobaciones similares, sea al cortar los vagos, sea al sumar a este proceder la oclusión de las carótidas o la denervación de los senos carotídeos.

METODOS.— Se trabajó en perros anestesiados con cloralosa o con pentobarbital. Se registraba la presión arterial y la del ventrículo derecho o izquierdo mediante electromanómetros conectados a los canales del Poly-viso Sanborn; se agregó el registro electrocardiográfico en D_I o D_{II}.

RESULTADOS.— Se define la alternancia "verdadera" como aquella en que el intervalo entre el pulso arterial fuerte y el débil es igual, y la seudoalternancia como aquella en que el intervalo entre dos pulsaciones arteriales es desigual, debido a una sístole prematura. La metoxamina y la efedrina provocan en el perro anestesiado seudoalternancia [Ellis (2)].

Comprobamos que el corte de los vagos en la región cervical iba seguido de mayor frecuencia cardíaca y, en algunos casos, se registró seudoalternancia (fig. 1). No se comprobó verdadera alternancia por sección vagal. En dos perros había seudoalternancia antes del corte de los vagos; desconocemos su causa.

La oclusión de las carótidas primitivas durante un minuto, después de la sección de los vagos en la región cervical, provocó en algunos casos, seudoalternancia, y en otros, alternancia verdadera. A veces, los efectos se mezclaron; por ejemplo, un ritmo cardíaco de bigeminismo se sustituía por pocos latidos de alternancia verdadera. En estos casos la amplitud del pulso que seguía al prematuro era mayor que antes del bigeminismo.

Durante la alternancia vera, la diferencia de presión del pulso fuerte comparado con el débil varió entre pocos mm. de Hg en unos experimentos, hasta

¹. Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

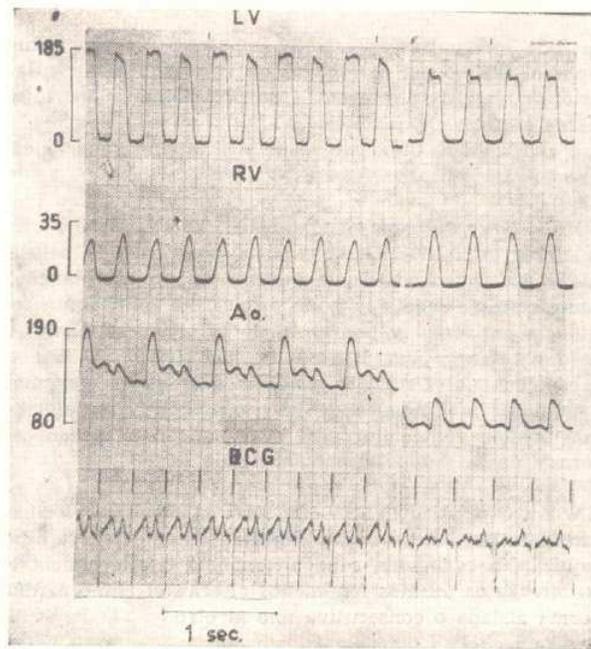


Fig. 1.—Perro cloralosado. A izquierda: taquicardia, hipertensión arterial y pseudoalternancia provocadas por la sección de los nervios vagos y la oclusión de las carótidas primitivas. A derecha: después de la desoclusión carotídea. LV, registro de la presión del ventrículo izquierdo mediante catéter introducido por la carótida primitiva izquierda. RV, presión en el ventrículo derecho mediante catéter introducido por la vena yugular derecha. Ao, presión intraaórtica. ECG, electrocardiograma en D_{II}. Ordenadas en mm. Hg; abscisas, 1 segundo.

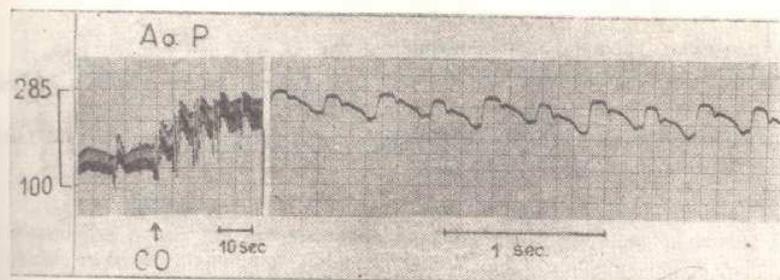


Fig. 2.—Perro cloralosado. Alternancia consecutiva al corte de los vagos y pinzamiento de las carótidas primitivas. A izquierda: CO, oclusión de carótida derecha; a derecha: pulso arterial alternante durante la oclusión. Ao. P, presión en la aorta, mediante catéter introducido por la carótida primitiva izquierda.

la ausencia de toda una pulsación arterial en otros. En este último resultado se comprobó, por el ECG o por el registro de la presión ventricular, que había habido una sístole cuya escasa intensidad no provocaba la apertura de las válvulas semilunares aórticas.

En algunas experiencias hubo alternancia simultánea, mecánica y eléctrica, o sea en la presión del pulso y en el ECG.

DISCUSION.— Los resultados tienden a indicar que en el perro anestesiado el stress circulatorio impuesto por la sección vagal más la oclusión o denervación carótidosinusal, pueden inducir bigeminismo o alternancia transitorias. Dicho stress, en efecto, se debe a la gran taquicardia coincidente con el aumento de la resistencia periférica y por tanto de la presión arterial, todo lo cual eleva el trabajo cardíaco. [Ver Heymans and Neil (3).] Los experimentos muestran que es necesario el registro *simultáneo* de varios fenómenos cardioarteriales para desglosar la dinámica de las variaciones circulatorias estudiadas. Los trazados de presión ventricular y el ECG indican el origen cardíaco de la alternancia vera y de la pseudoalternancia estudiadas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.— La sección vagal y la oclusión o denervación sinocarótideas pueden provocar, simultáneamente con la hipertensión arterial y la taquicardia conocidas, pseudoalternancia o alternancia verdadera de origen ventricular. Estos últimos fenómenos alteran el ritmo cardíaco, sea apareciendo en forma aislada o consecutiva uno al otro.

SUMMARY AND CONCLUSIONS.— Vagi nerves section and occlusion of both common carotids, or sinusal carotid denervation, provoke in addition to the well-known hypertension and tachycardia, ventricular alternans or pseudoalternans. These last phenomena modify the cardiac rhythm appearing sometimes isolated or consecutive.

BIBLIOGRAFIA

1. WIGGERS, C. J.— Physiology in Health and Disease. Lea and Febiger, 1944.
2. ELLIS, C. H. and KRAMER Jr., A. W.— Drug Induced Pulsus Alternans in Dogs. Proc. Soc. Exper. Biol. and Medicine, 1959, 100: 733-735.
3. HEYMANS, C. and NEIL, E.— Reflexogenic Areas of the Vascular System. Little, Brown and Co. Ed., Boston, 1958.

Una reacción de aglutinación
en el diagnóstico de tuberculosis y otras enfermedades¹

N. PRADINES BRAZIL, H. F. LABORDE y C. L. LEGNANI

INTRODUCCION.— Cuando estudiábamos experimentalmente la reacción de Fleischauer en la leche (19, 20), hicimos algunas comprobaciones que nos indujeron a investigar la naturaleza del fenómeno biológico que la provocaba.

Por medio de dicha reacción, en la parte superior del tubo con leche de animales brucelosos se obtiene un anillo o disco de antígeno de Brucellas teñidas.

Vimos entonces que la citada reacción, no sólo se lograba con la técnica de la hematoxilina recomendada por su autor, sino que podía hacerse con otros colorantes, siempre que la tinción fuera adecuada.

Pero lo esencial era que el fenómeno ocurría porque los glóbulos de grasa, sustancia química inespecífica, estaban recubiertos por una capa de globulina específica, la que se asociaba a las células teñidas del antígeno correspondiente. La ascensión de los glóbulos grasos aglutinados con las Brucellas teñidas del antígeno, provocaba la formación de una capa coloreada en la parte superior del contenido lácteo del tubo.

Resumiendo: sustancia orgánica (glóbulos grasos) envuelta o impregnada con los anticuerpos específicos, aglutinaba a las células antigénicas correspondientes.

Conclusiones:

- 1) Hay sustancias que adsorben anticuerpos.
- 2) Ellas pueden participar en el fenómeno antígeno-anticuerpo sin interferir en su desarrollo.
- 3) Posibilitan la realización de una reacción diagnóstica de carácter inmunitario, actuando solamente como sustrato.

Estos antecedentes nos llevaron a sostener la hipótesis según la cual, si invirtiéramos el orden del proceso descrito, sería posible aplicar la reacción de aglutinación en el diagnóstico de enfermedades en las cuales no se había logrado hacerlo debido a dificultades de orden práctico.

1. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Microbiología. Montevideo, Uruguay.

Pensamos adsorber con sustancias inactivas a los antígenos específicos y no a los anticuerpos, enfrentando luego estas sustancias o partículas adsorbentes saturadas antigénicamente a los sueros específicos con sus correspondientes anticuerpos.

Desechamos el uso de los glóbulos rojos impregnados, preconizado por Middlebrook y Dubos (18), Boyden (2) y otros (4, 6, 8, 11, 12, 15, 16, 21, 22), ya que los hematíes, no siempre idénticos en su estructura química, podrían crear dificultades serias si se asociaran a otros compuestos capaces de sustituir las características químicas de los anticuerpos y dar lugar a fenómenos de inespecificidad (1, 3, 7, 10, 13, 14, 23).

Nos propusimos entonces buscar otro substrato portador de los antígenos. Intentamos "desantigenizar" células bacterianas; elegimos la *Escherichia coli*, pero las dificultades para comprobar la total desaparición de sus características antigénicas nos hizo desistir de ese propósito.

Tratamos de obtener una partícula suficientemente pequeña como para permitir: una adecuada dispersión, ausencia de aglutinación espontánea y sedimentación temprana, capacidad adsorbente adecuada para recibir la cantidad de antígeno necesaria y superar la acción de la gravedad sobre cada partícula usada.

Fue así que estudiamos la posibilidad de emplear diversas partículas, tales como emulsiones aceitosas, colodión, negro de humo, caolín (5, 24, 25), bálsamo de Canadá, agar, hidróxido de aluminio y óxidos minerales porfirizados. Algunas debimos abandonarlas porque los medios de que disponíamos para usarlas no nos permitían obtener los resultados que eran de esperarse. Finalmente optamos por el negro de humo y las conclusiones que presentamos en este trabajo fueron obtenidas con dichas partículas.

Una característica esencial de nuestro método es que no extraemos el antígeno de tuberculina (17), sino que lo hacemos directamente del bacilo tuberculoso.

MATERIALES Y METODOS.— Como ensayo preliminar comenzamos por tratar una suspensión de *Brucella abortus* 1119 al 12% en peso, en solución al 12% de cloruro de sodio y matadas por una temperatura de 65-68° C. durante 60 minutos, por las ondas sónicas de un oscilador Raytheon a 10 Kc/s y a una potencia de salida de 70 w. durante un máximo de 60 minutos. Comprobamos la ruptura de las células mediante la observación microscópica; para salvar la posibilidad de un error, centrifugamos durante 60 minutos a 3.000 RPM. Usamos sólo el sobrenadante para preparar el antígeno. Este lo obtuvimos adsorbiendo sobre partículas de negro de humo el lisado sónico de las *Brucellas*. El negro de humo usado se distingue en el comercio con la siguiente característica: Cabot Mogul A 1.95 C. U. F. T. La dispersión del carbón en agua es difícil. A fin de aumentarla probamos el tratamiento por ondas sónicas de soluciones jabonosas, con detergentes y de cloruro de sodio al 12%. Optamos por esta última, ya que la presencia del cloruro de sodio no disminuía la capacidad de adsorción de las partículas o la especificidad antigénica, como ocurría con los detergentes y jabones. Hecha la dispersión de carbón, obtuvimos partículas de tamaño inferior a 1 micra (la mayoría estaba entre 0,2 y 0,5 micras). Con esta suspensión y el lisado sónico, preparamos el antígeno, poniéndolos en con-

Cuadro I

Sueros	Cantidad	Aglutinación rápida +	Aglutinación lenta +	% rápida +	% total +
Tuberculosos:					
Humanos	127	80	45	63	98,4
Bovinos 1	7				
Brucelosos:					
Humanos	15	No se hizo.	0		0
Bovinos 1	3				
Hidatídicos:					
Humanos	4	No se hizo.	0		0
Bovinos	8	No se hizo.	0		0
Sifilíticos	8	No se hizo.	0		0
Normales					
Humanos	32	No se hizo.	0		0

1. Ver cuadro II y conclusiones sobre inespecificidad de sueros de bovinos en producción.

Cuadro II

SUEROS BOVINOS TUBERCULOSOS
(Animales en producción láctea)

Nº	Aglutinación rápida BK	Huddleson
1	+ 1/200	—
2	+ 1/400	+ 1/50
3	+ 1/200	—
4	+ 1/800	+ 1/400
5	+ 1/400	—
6	+ 1/320	—
7	+ 1/160	+ 1/100

tacto durante una noche a 4° C., a fin de obtener, seguramente, una adsorción completa. Posteriormente se obtuvo el antígeno haciendo actuar el oscilador durante 1 hora a 10 Kc/s y 50 w. sobre la mezcla del lisado sónico de Brucellas y 0,3% de negro de humo. Por último se trataron conjuntamente células bacterianas, carbón y solución salina al 12% (esta última para evitar la aglutinación espontánea al efectuar la reacción) por las ondas sónicas. Esta es la técnica usada.

Se efectuaron entonces las reacciones con sueros de enfermos brucelosos y de personas sanas. Los resultados obtenidos en los ensayos practicados en placa fueron concluyentes: hubo franca aglutinación con los primeros y reacción negativa con los segundos. Esto nos mostraba que la hipótesis inicial era correcta al lograr resultados positivos de diagnóstico serológico. Dejamos el antígeno de Brucellas para estudiar las aplicaciones de este mecanismo de reacción en serodiagnóstico de tuberculosis, donde usaríamos un antígeno obtenido por lisis y adsorbido en negro de humo.

ANTÍGENO.— Cultivamos varias cepas de bacilo tuberculoso humano: 2563, 2661, 2885 EN, 2975, 2977, 3007, 3030, 3178, 3201, 3218, obtenidas en el Laboratorio Clínico de la Colonia Sanatorial G. Saint Bois. Con ellas hicimos un pool para realizar los primeros ensayos, pero luego continuamos trabajando con la cepa 2661. Los bacilos, luego de cultivados durante dos meses en Sauton, fueron calentados a 100° C. durante 20 minutos y más tarde suspendidos en solución estéril al 12% de cloruro de sodio, en una relación de 12% en peso de células húmedas. Se sometió esta suspensión a la acción del oscilador a una frecuencia de 10 Kc/s durante 60 minutos, a una potencia de salida de 50 w. Luego observamos al microscopio la ausencia de células enteras o fragmentos de ellas. Para considerarla adecuada a nuestros ensayos centrifugamos la suspensión a 3.000 RPM durante 1 hora, a fin de eliminar las bacterias íntegras y fragmentos sedimentables que pudieran persistir. Para ese lisado sónico también se estudiaron diferentes maneras de dispersar las partículas de carbón. Optamos por la suspensión de carbón dispersado por ondas sónicas.

Preparamos entonces el antígeno, haciendo actuar el oscilador durante 1 hora a 10 Kc/s y 50 w. sobre la mezcla del lisado sónico de bacilo tuberculoso y 0,3% de negro de humo. Como última etapa obtuvimos el antígeno tratando en forma conjunta con el oscilador la mezcla de bacilo tuberculoso, negro de humo al 0,3% y solución salina al 12%.

TÉCNICA DE LA REACCIÓN.— A) *Reacción rápida*: La efectuamos de acuerdo a la técnica rápida de Huddleson para brucelosis (9). Colocábamos sobre una lámina de vidrio cuadrículada cantidades de suero de 0,08, 0,04, 0,02, 0,01 ml. Luego agregábamos una gota de nuestro antígeno, con una pipeta calibrada para formar gotas de 0,03 ml. Inmediatamente mezclábamos, usando una varilla de vidrio, el suero con el antígeno y hacíamos la lectura a los 5 y 10 minutos. La lámina permanecía a temperatura ambiente. Entre una reacción y otra se limpiaba la varilla con un algodón seco. El título de la reacción lo establecíamos, según el tamaño de los grumos y la limpidez del fondo, en +; ++; +++; ++++. Los resultados son los presentados en los cuadros correspondientes.

Nº

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

Quadro III

SUEROS HUMANOS TUBERCULOSOS

Nº	Aglutinación rápida	Aglutinación lenta	Nº	Aglutinación rápida	Aglutinación lenta
1	+++ 1/200		40	—	+ 1/20
2	+++ 1/100		41	++ 1/200	
3	++ 1/100		42	+ 1/200	
4	Contaminado		43	++ 1/200	
5	+++ 1/50		44	—	+ 1/20
6	++ 1/100		45	—	++ 1/20
7	++ 1/200		46	+ 1/25	
8	++ 1/100		47	+ 1/25	
9	++ 1/50		48	+ 1/200	
10	+ 1/50		49	—	++ 1/20
11	—	+ 1/25	50	—	+ 1/20
12	++ 1/50		51	—	+ 1/20
13	+++ 1/100		52	—	++ 1/20
14	+ 1/25		53	+ 1/50	
15	+ 1/200		54	+ 1/25	
16	+ 1/100		55	+ 1/50	
17	++ 1/100		56	—	+ 1/20
18	+++ 1/50		57	++ 1/50	
19	—	+ 1/10	58	—	+ 1/20
20	++ 1/50		59	—	+ 1/20
21	+ 1/200		60	+ 1/50	
22	—	++ 1/20	61	+ 1/50	
23	+ 1/100		62	+ 1/50	
24	—	+ 1/20	63	+ 1/50	
25	+ 1/50		64	+ 1/50	
26	+ 1/25		65	—	++ 1/20
27	—	++ 1/20	66	+ 1/100	
28	—	+ 1/20	67	+ 1/50	
29	+ 1/50		68	+ 1/25	
30	—	+ 1/20	69	+ 1/100	
31	+ 1/50		70	—	+ 1/20
32	+ 1/200		71	—	+ 1/20
33	+ 1/50		72	—	++ 1/20
34	+ 1/50		73	+ 1/100	
35	—	+ 1/20	74	+ 1/100	
36	+ 1/50		75	+ 1/25	
37	+ 1/100		76	+ 1/25	
38	+ 1/50		77	+ 1/50	
39	+ 1/200		78	—	++ 1/20

(Continuación de Cuadro III)

Nº	Aglutinación rápida	Aglutinación lenta	Nº	Aglutinación rápida	Aglutinación lenta
79	—	++ 1/20	104	+ 1/25	
80	+ 1/50		105	+ 1/25	
81	—	++ 1/20	106	—	++ 1/20
82	+ 1/100		107	—	++ 1/20
83	—	+++ 1/20	108	—	++ 1/20
84	+++ 1/100		109	+ 1/50	
85	+ 1/50		110	+ 1/50	
86	—	++ 1/20	111	+++ 1/100	
87	+ 1/25		112	—	++ 1/20
88	—	++ 1/20	113	+ 1/100	
89	—	+++ 1/20	114	+ 1/25	
90	—	++ 1/20	115	—	++ 1/20
91	—	++ 1/20	116	—	++ 1/20
92	—	+ 1/20	117	—	++ 1/20
93	+ 1/25		118	+ 1/100	
94	+ 1/25		119	++ 1/50	
95	+ 1/100		120	+++ 1/25	
96	+ 1/50		121	++ 1/200	
97	++ 1/50		122	++ 1/25	
98	—	+++ 1/20	123	—	++ 1/20
99	—	++ 1/20	124	—	
100	+ 1/25		125	—	
101	—	++ 1/20	126	+ 1/100	
102	—	++ 1/20	127	+ 1/25	
103	—	+ 1/20	128	+ 1/25	

B) *Reacción lenta*: Colocábamos en tubos de hemólisis, 1 ml. de suero a investigar, diluido previamente a 1/10, 1/20, 1/25 y le agregábamos una gota de 0,03 ml. de antígeno. La reacción se leía después de una incubación de 5 horas a 37° C. También se distinguían, según el tamaño de los grumos y la limpidez del medio, +, ++, +++, +++++. Los resultados se ven en los mismos cuadros.

RESULTADOS.— De 127 sueros humanos tuberculosos, 125 fueron positivos (98,4% positivos); 80 solamente lo fueron a la reacción rápida (63%).

De 7 sueros de vacas en lactación tuberculino-positivas, todos ellos fueron positivos a la reacción rápida a títulos de 1/160 hasta 1/800; ensayos posteriores muestran, en los sueros de vacas en producción, un fenómeno de inespecificidad actualmente en estudio.

Se practicó en 32 sueros de adultos normales la reacción lenta, obteniéndose 32 negativos (100% negativos).

Se practicó la reacción lenta para tuberculosis en 15 sueros humanos brucelosos con Huddleson positiva, obteniéndose resultados negativos en todos ellos (100% negativos).

Doce sueros hidáticos (4 humanos y 8 bovinos de carne) fueron todos negativos a la reacción lenta (100% negativos).

CONCLUSIONES.— Se comprueba que las partículas de negro de humo son un soporte adecuado para adsorber antígenos, que pueden ser usados en reacciones de aglutinación y anillo para diagnóstico de tuberculosis y brucelosis.

El antígeno para la seroaglutinación brucelosa es positivo frente a sueros Huddleson positivos y negativo con los sueros normales.

El antígeno para la seroaglutinación tuberculosa es aglutinado a títulos muy variados por todos los sueros de humanos hospitalizados como tuberculosos.

Los sueros de personas adultas normales son negativos a ambos antígenos.

Los sueros humanos brucelosos, hidatídicos y Wassermann positivos, son negativos a la reacción de aglutinación para tuberculosis.

Estos hechos demuestran que la especificidad en sueros humanos llega al 100%.

La reacción rápida podrá ser superada una vez titulado el antígeno, ya que fueron consideradas negativas las reacciones positivas débiles.

RESUMEN.— Se presenta un antígeno para seroaglutinación brucelosa obtenido por dispersión sónica de negro de humo en un lisado sónico de *Brucella abortus*. Dicho antígeno es aglutinado por todos los sueros brucelosos.

Se presenta también un antígeno para seroaglutinación tuberculosa obtenido por el tratamiento sónico simultáneo del bacilo tuberculoso y negro de humo. Este antígeno es aglutinado por todos los sueros tuberculosos.

Todos los sueros normales, excepto los de vacas en producción, fueron negativos a ambas reacciones.

Los sueros humanos brucelosos, hidatídicos y Wassermann positivos, no aglutinaron el antígeno tuberculoso.

Hay una gran variedad de títulos aglutinantes en las diversas reacciones.

SUMMARY.— The authors present an antigen for brucellous seroagglutination, obtained by sonic dispersion of lamp black in a sonic lysate of *Br. abortus*; this antigen is agglutinated by all brucellous sera and not by the normal ones.

It is also presented an antigen for tuberculous seroagglutination, obtained by simultaneous sonic treatment of tubercle bacilli and lamp black; this antigen is agglutinated by all tuberculous sera.

All normal sera, except those of cows in production, were negative to both antigens.

Brucellous, hydatidic and Wassermann positive human sera did not agglutinate the tuberculous antigen.

There is a great variety of titles in the different reactions.

BIBLIOGRAFIA

1. ADCOCK, J.; HALEY, R. R. y DAVEY, W. N.—*J. Lab. Clin. Med.*, 1951, 38: 736.
2. BOYDEN, S.—*J. Exper. Med.*, 1951, 93: 107.
3. CELANO, G.—*Riv. Ist. Sierot. Ital.*, 1952, 27: 282.
4. CHANG, H. T.; TSAI, J. S. y CHIU, F. H.—*Clin. Med. J.*, 1952, 70: 27.
5. ENDO, K. y YAMASAKI, M.—*Iryo (Jap.)*, 1962, 16: 364.
6. GERNEZ RIEUX, C. y TACQUET, A.—*Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1951, 4: 17.
7. GERSTL, B.; KIRSCH, D. y colab.—*J. Lab. Clin. Med.*, 1954, 44: 443.
8. HALL, W. H. y MANION, R. E.—*J. Clin. Invest.*, 1951, 30: 1542.
9. HUDDLESON, I. F.—*Tech. Bull. Mich. Agric. Sta.*, 1932, N° 123.
10. KERTAY, N.—*Acta Microbiol. Acad. Sci. Hungaricae*, 1958, 5 (2): 165.
11. LIN, S. C.—*Jour. Med. Sci.*, 1959, 6 (3-4): 235.
12. LUCENTINI, L. y BOISVERT, H.—*Ann. Inst. Pasteur*, 1951, 82: 55.
13. LUCENTINI, L. e IOLI, G.—*Polielfnico*, 1952, 59: 2.
14. MADSEN, S. T. y OEDING, P. A.—*Acta Tuber. Scand.*, 1952, 27: 249.
15. MAILLARD, E. R. y GAGLIARDO, F. J.—*Amer. Rev. Tuberc.*, 1951, 64: 675.
16. MEYNELL, G. G.—*J. Path. Bact.*, 1952, 64: 647.
17. MIDDLEBROOK, G.—*Bull. N. York Acad. Med.*, 1952, 28: 474.
18. MIDDLEBROOK, G. y DUBOS, R. J.—*J. Exper. Med.*, 1948, 88: 521.
19. PRADINES BRAZIL, N.—*Mem. 1er. Congr. Nac. de la Bruc.*, Montevideo, 1947, 60.
20. PRADINES BRAZIL, N.—*Revista de Med. Veter.*, 1951, 5: 1250.
21. SCHWARTZ, B. y colab.—*Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, 66: 594.
22. SENAULT, R.—*C. Rend. Soc. Biol.*, 1952, 146: 750.
23. SOHIER, R.—*Arg. V Congr. Inst. Microb.*, 1958, 1: 158.
24. TAKAHASHI, Y.—*Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1962, 85: 708.
25. TAKAHASHI, Y. y FUKAE, H.—*Comp. Rend. Soc. Biol. (Paris)*, 1960, 154: 692.

—

Agradecemos la colaboración de los Dres. Pablo Purriel, Antonio Pena, J. Canela Freijó, J. Ottonelli, R. Lombardo, J. de Freitas, J. C. Bacigalupi, B. Szyfres, H. Trenchi y A. Eскурra, quienes nos proporcionaron sueros y cepas para esta investigación.

IN
alenta
lidad c
dula c
desde
individ

M
ejempl
ducció
mol 16
en par
ción se
Cajal-C
siguien
Alcian-
previa
cordón
según
heimer
ron (3)
mismo,
gánicas
de von
polariza
de Ver
Sweet,

1.
de Hum
2.
tología.

51, 38: 736.

27.

4: 17.

64: 675.

o, 1947, 60.

, 154: 692

J. Canceles,
s, H. Tren-
vestigación.

Histología e histoquímica de la glándula coclear de *Ampullaria canaliculata* (Lam.)¹

JORGE PAULETE-VANRELL² y SUSANA SCAGLIA DE PAULETE

INTRODUCCION.—Continuando con nuestros trabajos anteriores (4, 5), y alentados por los resultados que obtuvimos en nuestras investigaciones, la finalidad que condiciona esta comunicación es la descripción histológica de la glándula coclear de *Ampullaria canaliculata* (Lam.) y la localización topográfica, desde un punto de vista histoquímico, de cada uno de los compuestos que hemos individualizado con anterioridad mediante técnicas bioquímicas.

MATERIAL Y METODOS.—Se emplearon ocho glándulas cocleares de ejemplares adultos de *Ampullaria canaliculata* (Lam.), en período de reproducción. El material se fijó en formol 10% a temperatura ambiente, en formol 10% helado y en acetona fría, los cortes se efectuaron luego de inclusión en parafina y para algunas técnicas, por congelación. Como técnicas de coloración se emplearon para *morfología general*: hematoxilina-eosina, tricrómico de Cajal-Gallego. La valoración cualitativa histoquímica se hizo de acuerdo a las siguientes técnicas: *Proteínas*: verde de metilo pironina. *Polisacáridos*: P. A. S.; Alcian-blue; solución de Giemsa; azul de toluidina a pH 5, con y sin digestión previa por hialuronidasa testicular, durante tiempos variables a 37° C., usando cordón umbilical como control de técnica; digestión salivar, todos estos métodos según Pearse (6). *Lípidos*: sudán negro B; sudán III; rojo escarlata de Herxheimer. *Carotenoides*: ácido sulfúrico concentrado; lugol, ambos según Langeon (3). *Diastasas*: *Fosfatasa alcalina*: método de Gómori y variante rápida del mismo, según Laguens (2). *Fosfatasa ácida*: método de Gómori. *Sustancias inorgánicas*: *Calcio*: rojo de alizarina S; ácido sulfúrico 1/3; ácido oxálico; método de von Kossa; precipitación por el oxalato de amonio; microincineración y luz polarizada. *Tejido conjuntivo*: método de van Gieson. *Fibras, elásticas*: método de Verhoeff. *Colágenas*: tricrómico de Cajal-Gallego; de *reticulina*: Gordon & Sweet, según Clayden (1); Iturriza. *Alcaloides*: Reichl y Mikosch.

1. Trabajo del Departamento de Anatomía Microscópica y Citología de la Facultad de Humanidades y Ciencias; Juan L. Cuestas 1525, Montevideo, Uruguay.

2. Ayudante de Investigación del Departamento de Anatomía Microscópica y Citología.

RESULTADOS.—El estudio histológico de la glándula coclear permite afirmar que es una glándula túbuloacinososa, la cual está constituida por dos partes distintas: un parénquima y un estroma.

PARÉNQUIMA (figs. 1, 2, 3 y 4).—El parénquima glandular se puede dividir, con una finalidad puramente explicativa, en dos claras porciones: la una secretora, los ácinos, y la otra excretora, el sistema canalicular.

Los ácinos (figs. 1 y 2) están formados por una capa de células, más o menos piramidales, fuertemente basófilas, de núcleo basal. El estudio histoquímico de estos elementos muestra reacciones específicas frente al P. A. S., intensamente positiva en forma de gránulos dispersos en todo el citoplasma (fig. 1); coloración franca por el Alcian-blue, con idéntica topografía que la anterior; metacromasia difusa, frente al azul de toluidina y a la solución de Giemsa, uniformemente distribuida en el citoplasma y que no desaparece luego de la digestión celular por la hialuronidasa. La digestión por ptialina tampoco introduce modificaciones en la intensidad de la reacción del P. A. S. A más de esto, las células muestran también reacciones intensamente positivas, en forma de gránulos intracitoplásmicos, frente a los colorantes para lípidos (fig. 2), reacción que no se extingue luego del tratamiento sucesivo de los tejidos con una secuencia de solventes orgánicos constituida por: acetona fría, acetona 37° C., alcohol etílico 37° C., cloroformo adicionado de metanol a 37° C. y xilol a 37° C.

Los túbulos (figs. 3 y 4), que constituyen el sistema excretor de la glándula, tienen una estructura variable en su trayecto. Se inician entre las células acinosas en forma de tenues canales (*canaliculos secretores intercelulares*), éstos se reúnen para constituir los *conductos intralobulillares* o *conductos intercalares*, caracterizados porque sus paredes están formadas por células acinosas propiamente dichas. Estos conductillos intralobulillares se abren a su vez en los *conductos interlobulillares*, recubiertos por un epitelio bajo, monoestratificado, cilíndrico, ciliado, sin células caliciformes. Este epitelio presenta reacción de P. A. S. fuertemente positiva como finas granulaciones apicales en sus células y, asimismo, reacción positiva frente al Alcian-blue, siendo metacromáticas con el azul de toluidina. También este epitelio muestra granulaciones intracitoplásmicas de lipoproteínas. El epitelio no se apoya sobre una membrana basal y está casi en inmediato contacto, apenas separado por una delgada capa de conectivo intersticial, de los ácinos subyacentes. Estos conductos, poco a poco, al continuar su trayecto modifican su estructura, al tiempo que aumentan su calibre y el grosor de su pared. El epitelio se transforma de monoestratificado en pseudoestratificado, cilíndrico, ciliado, con células caliciformes en algunas partes y deja de estar en inmediato contacto con los ácinos subyacentes, de los que ahora aparece separado por una capa cada vez más espesa cuanto más nos alejamos de la zona de transición. Esta está constituida por varias capas de células poliédricas por la mutua compresión, de citoplasma relativamente escaso en virtud de que poseen grandes vacuolas que llegan a veces a relegar el núcleo a la periferia. El análisis histoquímico muestra reacción positiva intensa para mucopolisacáridos ácidos en el citoplasma de las mismas; sus vacuolas presentan dos contenidos distintos: algunas, las menos, están repletas de lípidos, las demás, se evidencian como grandes lagunas metacromáticas. Estos canales que

lear permite
fida por dos

puede divi-
ones; la una

lulas, más o
dio histoquí-
A. S., inten-
ma (fig. 1);
la anterior;
Giemsa, uni-
de la diges-
co introduce
de esto, las
rma de grá-
2), reacción
con una se-
tona 37° C.,
y xilol a

de la glán-
e las célula
(lares), éstos
ps intercala-
cinosas pro-
vez en los
estratificado,
reacción de
sus células
máticas con
ntracitoplás-
ana basal y
capa de co-
o a poco, al
tan su cali-
atificado en
lgunas par-
de los que
más nos ale-
s de células
e escaso en
r el núcleo
ntensa para
blas presen-
lpidos, las
canales que

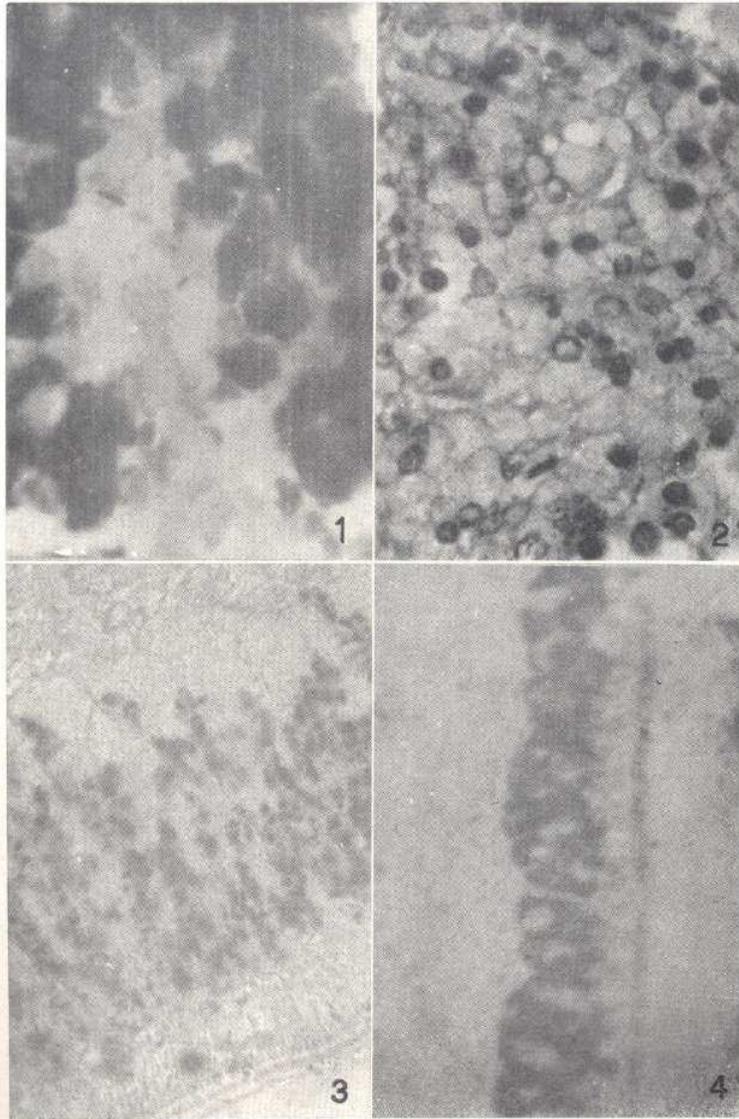


Fig. 1: Reacción de PAS positiva en las células acinosas. Fig. 2: Coloración de lipoproteínas por el sudán negro B, en forma de finos gránulos intracitoplásmicos. Fig. 3: Reacción positiva para carotenoides en el subepitelio del ducto excretor principal. Fig. 4: Intensa pironinofilia en las vacuolas del subepitelio y en el polo apical de las células epiteliales que recubren el ducto excretor principal.

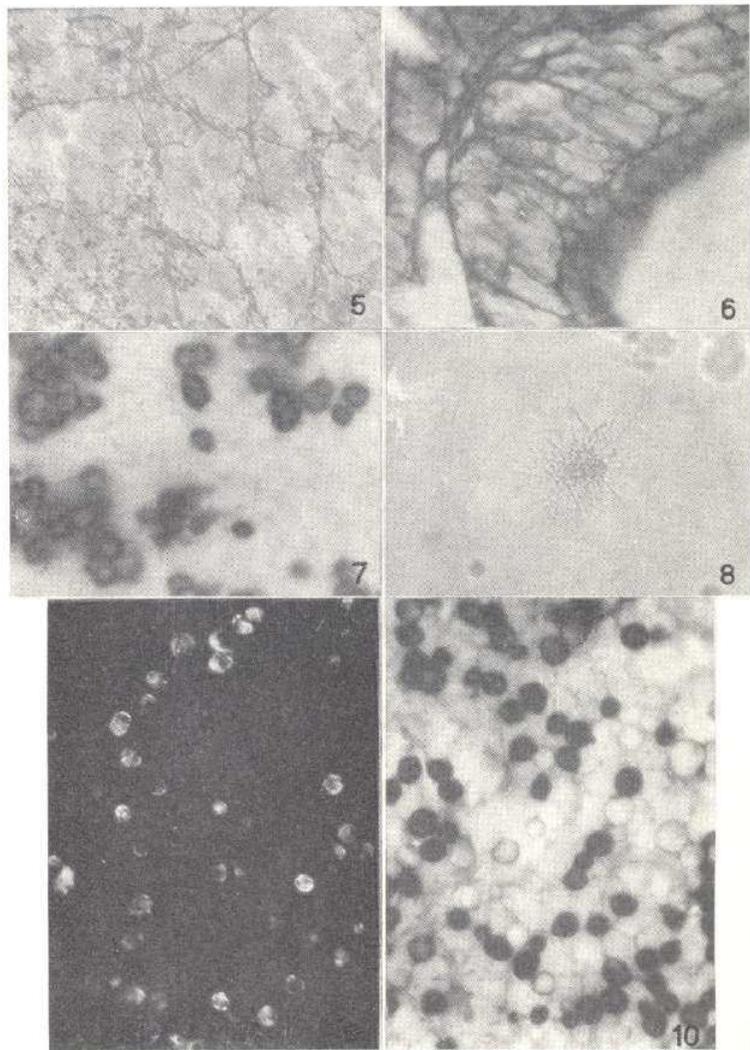


Fig. 5: Red de reticulina, escasa, en el estroma interacinoso. Fig. 6: Malla reticulínica más densa en la zona subepitelial de los ductos excretores. Fig. 7: Reacción positiva para calcio con el rojo de Alizarina en las formaciones cristalinas del estroma. Fig. 8: Formación de cristales de sulfato de calcio insoluble en la periferia de una de las formaciones cálcicas aislada. Fig. 9: Birrefringencia frente a la luz polarizada de los depósitos cálcicos antes mencionados. Fig. 10: Reacción de Gómori para fosfatasas alcalinas localizadas en algunas de las esférulas cristalinas de calcio, en forma intensamente positiva y negativa por completo en algunas otras.

hemos descrito, serían los conductos interlobulares que volcarían su contenido en el *ducto excretor principal* que los va recibiendo en su trayecto. Morfológicamente, la pared del ducto excretor principal, es muy similar a la de los conductos interlobulares, con un epitelio de revestimiento idéntico apoyado sobre el mismo tejido de aspecto adiposo, de células grandes, poliédricas, que difiere de los conductos antes mencionados solamente en su mayor espesor y en la presencia de reacciones histoquímicas francamente positivas para carotenoides en muchas de sus vacuolas y en tenues canaliculos intercelulares (fig. 3) y para proteínas, siendo esas vacuolas intensamente pironinófilas (fig. 4). Este canal vuelca el producto de secreción en la luz del oviducto, que atraviesa la glándula.

ESTROMA (figs. 5, 6, 7, 8, 9 y 10).—El estroma de la glándula es pobre. Los ácinos contactan muy estrechamente entre sí y, escasamente en algunos casos, dejan lugar para tenues hilillos de tejido conjuntivo evidenciable por el método de van Gieson. Los elementos de sostén se hallan reducidos a escasas fibras de reticulina que rodean los ácinos (fig. 5) y forman una cubierta más espesa a los canaliculos intra e interlobulillares (fig. 6). No hay fibras elásticas, ni colágenas. Llama la atención, por último, la presencia de formaciones redondeadas u ovals, refringentes, que no se tiñen por los colorantes habituales o, cuando más, tan sólo una delgada cutícula superficial. Topográficamente, se hallan entre los ácinos produciendo deformaciones en sus células, que se adaptan a su superficie. El estudio histoquímico muestra que tienen intensa reacción para el calcio con el rojo de alizarina (fig. 7) y el método de von Kossa, lo que se comprueba por microincineración y formación de cristales de sulfato de calcio insoluble (yeso) (fig. 8), al agregar ácido sulfúrico. Con esta última técnica se aprecia un importante desprendimiento de burbujas, verdadera efervescencia, a partir de las formaciones cálcicas. Asimismo, la mayoría de ellas presentan birrefringencia con la luz polarizada (fig. 9). Muchas de estas esférulas muestran reacciones positivas para fosfatasas alcalinas, aunque no la totalidad de las mismas. Resulta muy significativo que de todas esas formaciones redondeadas, las que dan reacción positiva para la fosfatasa alcalina, no presentan actividad óptica, en tanto que las que desvían la luz polarizada no presentan reacción positiva, ni aún en su periferia. En ninguna de nuestras preparaciones obtuvimos reacciones positivas para fosfatasas ácidas. Las demás reacciones histoquímicas que hemos aplicado sobre estas formaciones han sido negativas: solamente la reacción de P. A. S. ha sido positiva en el tejido circundante del depósito cálcico, pero nunca en su cutícula periférica (fig. 1). Resulta imposible de topografiar, histoquímicamente, la reacción de Reichl & Mikosch, ya que las tabletas que se producen, indicando una reacción positiva para alcaloides, son demasiado grandes, lo que no permite localizarlas en su origen. La coloración rosada que ofrece la técnica mencionada es completamente difusa, no haciendo factible la detección en un punto histológico determinado.

DISCUSION.—Si bien este estudio no introduce grandes modificaciones estructurales en lo que a morfología de las glándulas túbuloacinosas compuestas se refiere, permite apreciar algunos hechos significativos desde un punto

de vista histoquímico. La mayoría de ellos, sin embargo, son parcial o totalmente superponibles con los hallazgos bioquímicos que nosotros mismos realizásemos (4, 5, 9).

De los hechos positivos que arroja el análisis histoquímico de la glándula sorprende la abundancia de mucopolisacáridos, los cuales se manifiestan como ácidos frente a diversas reacciones. Esto se aviene a confirmar lo sostenido por Hylton Scott (8) al denominarla glándula albuminipara, ya que en los huevos del gastrópodo hemos hallado también gran riqueza de estas sustancias. Lo mismo acontece para los lípidos, unidos en su mayoría a proteínas, para constituir lipoproteínas, de donde que no sean extraíbles por los solventes orgánicos, incapaces de romper dicho enlace.

Deseamos acotar que la falta de localización de la reacción de Reichl & Mikosch, no nos permite precisar en qué punto de la glándula radica la génesis de alcaloides, los que, por el análisis químico, se han identificado como veratrina (4, 5).

A pesar de que consideramos, según expresásemos anteriormente, que la denominación correcta de esta glándula es la que propone Hylton Scott de glándula albuminipara o glándula del albúmen, resulta innegable la vinculación que dicha víscera posee con la cóclea o, a lo menos, con el calcio coclear, del que bien podría ser reservorio hasta el momento de mayor necesidad, en el cual sería cedido a las glándulas adecuadas que se hallan avanzado más el tracto genital. En apoyo de lo dicho anteriormente, se encuentra la reacción positiva para fosfatasa alcalinas, la cual habla de una movilización del calcio en más o en menos. A más, la riqueza en depósitos cálcicos se hace mayor a medida que se aproxima el período activo del animal y, más concretamente, la época de puesta. Esto, indirectamente, comprobaría la verosimilitud de las afirmaciones anteriores.

RESUMEN.— Los autores llevan a cabo un estudio sistemático de la histología e histoquímica de la glándula coclear de *Ampullaria canaliculata* (Lam.). Determinan, de esta manera que, estructuralmente, se trata de una glándula túbuloacinososa compuesta y localizan por medio de diversas reacciones los componentes químicos que tienen papeles importantes en su fisiología y que son superponibles a los hallazgos bioquímicos realizados previamente. La riqueza, en el estroma de dicha glándula, de formaciones cálcicas, redondeadas y cristalinas, abogan, aun cuando la glándula coclear no es la productora de la cóclea, en favor de una estrecha relación entre este órgano y el metabolismo cálcico del molusco.

SUMMARY.— The authors have carried out a systematic study on the histology and histochemistry of the coclear gland of *Ampullaria canaliculata* (Lam.). By this way, they found that it has an alveole-tubular structure; they localized, using several histochemical reactions the substances, having importance in its physiology. The results are similar to the findings obtained previously at a biochemical level. The high amounts, in the gland stroma, of crystalline, round shaped, calcic formations, allows to think that the gland is related to the calcium metabolism of the mollusk.

1. CLAYDE
Lond
2. LAGUEN
3. LANGER
4. PAULETI
bre l
Mont
5. PAULETI
de la
Jorn
6. PEARSE,
7. PREECE,
1959.
8. SCOTT, M
9. VAZ FER
Rev. J

BIBLIOGRAFIA

1. CLAYDEN, E. C.—Practical Section Cutting and Staining. J. & A. Churchill Ltd., London, 1951.
2. LAGUENS, R. P.—Arch. Hist. Norm. y Patol., 1958, 7 (2): 217-220.
3. LANGERON, M.—Précis de Microscopie. Masson & Cie. éditeurs, Paris, 1949.
4. PAULETE-VANRELL, J. y SCAGLIA DE PAULETE, S.—Estudios bioquímicos sobre las huevos de *Ampullaria canaliculata* (Lam.). Presentado en Soc. Biol. de Montevideo, reunión científica 26-VI-1963.
5. PAULETE-VANRELL, J. y SCAGLIA DE PAULETE, S.—Química e histoquímica de la glándula coclear de *Ampullaria canaliculata* (Lam.). Presentado en VIII Jorn. Univ. Gaúchas de Debat. Biol., Pôrto Alegre, Brasil, 23-30/X/1963.
6. PEARSE, A. G. E.—Histoquímica. Ed. Aguilar, Madrid, 1960.
7. PREECE, A.—A Manual for Histologic Technicians. Little, Brown & Co., Boston, 1959.
8. SCOTT, M. I. Hylton.—Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat. Bs. As., 1957, 3 (5): 231-379.
9. VAZ FERREIRA, R.; PAULETE-VANRELL, J. y SCAGLIA DE PAULETE, S.—Rev. Fac. Hum. y Cienc., Montevideo, 1963. (En prensa.)

Eco-etología de la reproducción
en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876¹

RAUL VAZ-FERREIRA, BLANCA SIERRA DE SORIANO
y SUSANA SCAGLIA DE PAULETE

INTRODUCCION.— Se describen en forma resumida los caracteres de los ambientes habitados por especies del género *Cynolebias* Steind. en el Uruguay y los mecanismos de adecuación a los mismos, hallados mediante estudios de laboratorio, en lo que se refiere a la esfera reproductiva.

MATERIAL, TRABAJOS DE CAMPO Y DE LABORATORIO.— Se empleó material hallado en el Uruguay de *C. bellottii*, *C. nigripinnis*, *C. melanotoenia*, *C. viarius*, *C. cheradophilus* y *C. luteoflammulatus* (estas tres últimas descritas por nosotros en Com. Zool. Mus. Montevideo, N° 102).

Los estudios de campo se realizaron en excursiones periódicas, entre diciembre de 1961 y diciembre de 1963, a los departamentos de Rocha y de Colonia, en que se registraron: diámetros, profundidad, conexiones, transparencia, temperatura, pH y condiciones de la flora y fauna de 22 masas de agua habitadas por *Cynolebias* y se recogieron muestras de agua, de piso, de flora y de fauna para ulterior estudio en el laboratorio.

Las muestras de piso consistieron cada una de ellas de aproximadamente 1 kilogramo, correspondiendo a profundidades de tierra de entre 0 y 5,5 y 10, y 10 y 15 cm.

En el laboratorio se estudiaron y determinaron: sedimentos y concentraciones iónicas en el agua obtenida; muestras de flora y fauna; composición de las muestras de piso; presencia de huevos en el residuo del lavado de las mismas en tul de nylon; estado de desarrollo de los embriones en los huevos obtenidos; etología reproductora de los adultos en acuarios; proceso de nacimiento y de locomoción larvaria (20 observaciones), colocando huevos embrionados en turba entre dos láminas de vidrio separadas entre sí 3 mm. y saturando el medio con agua.

¹. Trabajo del Departamento de Zoología Vertebrados de la Facultad de Humanidades y Ciencias, Lindolfo Cuestas 1525, Montevideo Uruguay; realizado con colaboración del Ay. Juan Soriano-Señorans, del Departamento de Geografía Física y Biológica de la misma.

RESULTADOS.—I) CARACTERÍSTICAS DE LOS MEDIOS HÍDRICOS HABITADOS. Entre 22 masas de agua, 19 mostraron ser temporales y el resto permanentes, pero conectadas periódicamente o unidas con masas temporales.

Agua dulce con transparencia para disco blanco fluctuando entre 6 cm. y más de un metro; pH: entre 5.7 y 9.2; potasio: debajo de 1/50.000; sodio: debajo de 1/4.000.

Las dimensiones variaron entre 315 m. × 35 m. de superficie con menos de un metro de profundidad y 80 ml. (huellas de ganado).

Las masas temporales mostraron períodos de:

a) *Desecación*: Ocurrió entre noviembre y mayo, abarcando desde cinco meses a menos de uno, variando hasta en más de dos meses las fechas iniciales y/o terminales. La capa superficial se seca y retrae, permaneciendo desnuda en algunos casos, en otros es cubierta por detritus de vegetación acuática, o por invasión de flora terrestre circundante; a mayor profundidad, la humedad mantiene valores mayores.

Las muestras tomadas a diferentes profundidades en dos charcos del Departamento de Colonia, y en tres del Departamento de Rocha, nos permitió hallar huevos de cinco especies de *Cynolebias* a profundidades entre 0 y 15 cm. en concentraciones máximas de hasta 4,4 huevos por dm³.

Los huevos se encontraron embrionados en su casi totalidad, hallándose, en muestras obtenidas en febrero, fases comprendidas entre blastodermo y formación del canal neural.

b) *Incremento del nivel*: Se inició entre abril y junio, registrándose una máxima duración de tres meses y una mínima de menos de un mes²; en este período aparecieron juveniles de *Cynolebias* y numerosos *Rotifera*, *Branchiopoda*, *Ostracoda*, *Copepoda* y *Amphipoda*.

c) *Máximo nivel*: Ocurrieron conexiones con otras masas temporales o permanentes de aguas próximas, encontrándose *Cynolebias* en las temporales y las permanentes y, en la temporal, especies hasta ese período sólo colectadas en permanentes [listadas en Vaz-Ferreira, Sierra de Soriano y Soriano-Señorans (1)].

d) *Regresión*: Se produjo la desconexión con las otras masas temporales o permanentes y la muerte de la totalidad de la fauna de *Cynolebias* y de peces plurianuales; las masas permanentes se redujeron de volumen, muriendo toda la población de las especies anuales y también una fracción importante de la población de las especies plurianuales.

II) CARACTERES REPRODUCTORES ESPECIALIZADOS OBSERVADOS EN EL LABORATORIO.—a) *En la duración del ciclo vital*: En *Cynolebias bellottii* se observó la puesta y fertilización por ejemplares de 60 días de edad; alcanzando éstos la talla máxima a los 90 días y muriendo a edades entre nueve meses y un año.

b) *En los moldes fijos del comportamiento reproductor*: *C. bellotti*, *C. nigripinnis*, *C. adloffii*, *C. viarius*, *C. luteoflammulatus* y *C. cheradophilus*, mostraron la siguiente sucesión de moldes motores asociados a la reproducción:

2. El ciclo de los charcos no siempre coincide con la variación de los valores pluviométricos, ya que es la resultante de por lo menos tres factores: lluvia, ingreso de agua de napas subterráneas y evaporación.

El macho adulto, en presencia de hembras, efectúa: vibraciones de las aletas dorsal, caudal y anal (puestas en extensión total); desplazamientos rápidos alternados con detenciones o cambios de dirección bruscos; y reiterada actitud de penetración del suelo con el cuerpo oblicuo, 45° a 90° respecto al piso, introduciendo a veces el hocico en él.

Las hembras se acercan y lo siguen, poniéndose en contacto con el flanco de éste.

Después de un periodo variable en que el macho reitera el despliegue, y durante el cual adquiere la máxima acentuación de diseño y de cromaticidad, se realiza la penetración en el suelo, mediante enérgicos movimientos a lo largo de las aletas dorsal y anal, y de pedúnculo y aleta caudal.

La hembra lo sigue adosándose a su flanco, con el extremo del hocico a nivel, aproximadamente, de las pectorales de éste. La pareja llega a profundidades variables y permanece allí períodos de hasta 45 segundos (observación en *C. bellottii*) emergiendo en general, en puntos y momentos separados la hembra y el macho.

c) *En el desarrollo embrionario intraovo*: Huevos embrionados extraídos de los pisos secos continuaron el desarrollo hasta la reabsorción total de la vesícula vitelina [postlarva según la nomenclatura de Hubbs (2)].

El alcance de este periodo postlarvario intraovo, requirió, a las temperaturas ambientales (entre 12,0° C. y 22,0° C.), tiempos siempre mayores de tres meses; en el caso de una muestra de huevos de *C. nigripinnis*, se observó, al año de permanecer en turba, el desarrollo completo en algunos embriones y, en otros, estadios anteriores a la formación del cristalino.

d) *En el periodo intraovo de la postlarva*: La postlarva permaneció casi inmóvil (postlarva latente) y llegó a sobrevivir hasta 90 días.

e) *En el nacimiento*: Saturando el medio con agua, la postlarva realizó movimientos giratorios y de extensión axial que se acompañaron de incremento de los diámetros del huevo (fig. 1, a, b), y de adelgazamiento de su membrana; unos 30 minutos después la membrana fue rota por el segmento caudal terminal (fig. 1, c), que emergió, comenzando el nacimiento, que concluyó con la exteriorización de cuerpo y cabeza.

f) *En el desplazamiento postnatal*: En el limo, la postlarva se desplazó hacia atrás, mediante movimientos caudales, con las aletas pectorales sobre la cabeza (fig. 1, d, e, f) (3,4) atravesando el trecho que la separaba del agua, en la que se introdujo (fig. 1, g).

DISCUSION.— La temprana aparición de postlarvas y juveniles de *Cynolebias* en las masas temporales y su ausencia durante los mismos períodos en las masas permanentes, en las cuales sólo aparecieron después de establecerse conexiones transitorias o uniones con masas temporales, permite afirmar que, en los casos estudiados, la reproducción de *Cynolebias* no tuvo lugar o no se realizó exitosamente en las masas permanentes.

Algunos de los fenómenos descritos en este trabajo, constituyen un sistema especializado de adecuación a la vida en masas temporales de agua, en que par-

las aletas
 idos alter-
 actitud de
 iso, intro-
 el flanco
 pliegue, y
 maticidad,
 a lo largo
 el hocico a
 profundi-
 rvación en
 as la hem-
 traídos de
 la vesícula
 temperatu-
 es de tres
 observó, al
 briones y,
 aneció casi
 rva realizó
 incremento
 membrana;
 idal termi-
 yó con la
 e desplazó
 es sobre la
 del agua,
 de *Cynole-*
 dos en las
 cerse cone-
 que, en los
 se realizó
 un sistema
 n que par-

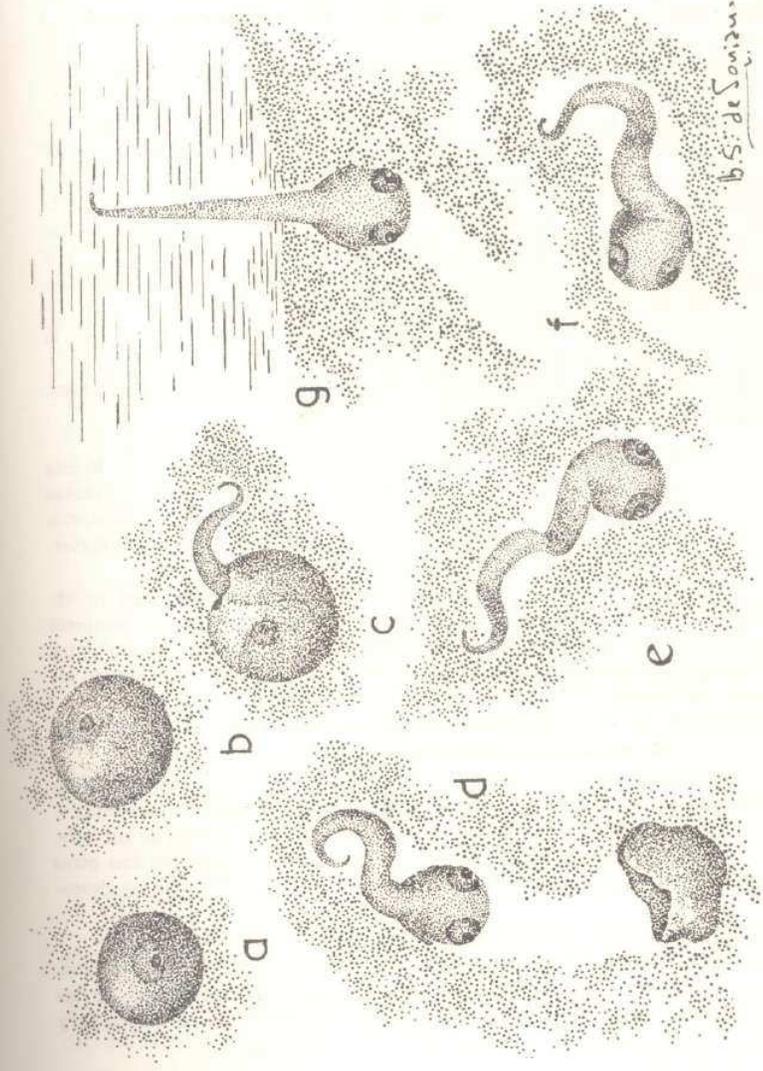


Fig. 1.—*Cynolebias cheradophilus*: a, huevo en limo seco (en el centro se advierte uno de los ojos de la postlarva); b, el mismo una hora y media después de haber saturado el limo con agua, mostrando incremento de sus diámetros; c, nacimiento iniciado por ruptura de la membrana, efectuada por la cola; d, e, f, desplazamiento retrógrado de la postlarva a través del limo, realizado mediante propulsión caudal; g, introducción en el agua de la postlarva.

tipican estructuras y mecanismos fisiológicos y etológicos, de los adultos, de los huevos y embriones, y de las postlarvas, cuyos valores de sobrevivencia y caracteres son los siguientes:

Temprana madurez reproductora, posibilitando ciclo ontogénico acorde a la duración de los charcos.

Moldes etológicos³ de puesta permitiendo ubicar huevos por debajo de la superficie del piso, donde se conserva mayor humedad.

Resistencia de los huevos a la desecación [demostrada en este trabajo por su hallazgo en los pisos de charcos secos que confirma la hipótesis de varios autores (8, 9, 10, 11)], permitiendo la sobrevivencia a la desecación.

Prolongación del período de desarrollo y viabilidad del embrión y de la postlarva dentro del huevo [debido a pausas en el desarrollo, análogas a las demostradas experimentalmente en otros Cyprinodóntidos por Peters (12), y a existencia de "embrión latente" (13), que aquí denominamos postlarva latente], permitiendo el retardo del nacimiento hasta el momento adecuado.

Nacimiento como respuesta a modificaciones del medio producidas por la saturación con agua, condicionando dicho nacimiento a la inundación.

Capacidad de locomoción retrógrada y forma cuneiforme de las postlarvas, permitiendo a éstas atravesar el piso y alcanzar el agua.

RESUMEN.— Se estudian durante dos años en los departamentos de Rocha y de Colonia (Uruguay), condiciones físicas, químicas y faunísticas de 22 masas de agua habitadas por especies de *Cynolebias* Steindachner y, en laboratorio, muestras de piso conteniendo huevos, desarrollo y comportamiento reproductor, de varias especies de este género obtenidas en el Uruguay.

Los medios hídricos tienen extensiones entre aproximadamente 300 m. de diámetro máximo y 10 cm. de mínimo, profundidades generalmente menores de un metro; agua dulce con transparencia para disco blanco fluctuando entre 6 cm. y más de un metro; pH oscilando entre 5.7 y 9.2; potasio por debajo de 1/50.000; sodio por debajo de 1/4.000.

Se encontró en 19 carácter temporal y en 3 carácter permanente con conexiones periódicas o uniones masas temporales.

En las temporales se encontraron períodos de: a) desecación, variando entre cinco meses y menos de un mes, que ocurre dentro del período noviembre-mayo; b) incremento del nivel variando entre tres meses y menos de un mes, que se inició entre abril y junio; c) máximo nivel, en que se conectan con otras masas temporales y/o permanentes; d) regresión en que se producen las desconexiones.

El estudio en laboratorio del material de *Cynolebias* obtenido, mostró:

- a) Maduración reproductora precoz: 60 días de edad en *C. bellottii* Steind.
- b) Moldes fijos del comportamiento, consistentes en: vibraciones de las aletas dorsal caudal y anal, rápidos desplazamientos y cambios de dirección y

3. Estos moldes son, en nuestras especies, semejantes a los anteriormente estudiados (5, 6) en *C. bellottii*, *C. nigripinnis* y *C. adloffii*, y diferentes a los descritos (7) para *C. whitei*.

reiterada actitud de penetración en el suelo, realizadas por el macho; seguimiento por las hembras; penetración del suelo por la pareja, con recorrido debajo del piso y emergencia ulterior del macho y hembra separadamente.

c) La presencia de huevos de *Cynolebias* en muestras de piso de los charcos secos, extraídas a profundidades comprendidas entre 0 y 15 cm., conteniendo distintos estadios embrionarios para una misma muestra.

d) La existencia de embriones vivos en huevos que permanecieron en turba durante más de un año.

e) Un período de nacimiento diferido (postlarva latente).

f) Nacimiento precedido del incremento de los diámetros del huevo y del adelgazamiento de la membrana, producido por ruptura de ésta con el extremo caudal de la postlarva.

g) Desplazamiento a través del limo de la postlarva, realizado hacia atrás mediante movimientos propulsores de la cola.

BIBLIOGRAFIA

1. VAZ-FERREIRA, R.; SIERRA DE SORIANO, B. y SORIANO-SEÑORANS, J.— Ecología de vertebrados en aguas dulces temporales del Uruguay. Resumen en: Proc. XVI Internat. Congr. Zool., 1963, 1: 251.
2. HUBBS, C. L.— Terminology of early stages of fishes. Copeia, 1943, 260.
3. VAZ-FERREIRA, R.; SIERRA DE SORIANO, B. and SCAGLIA DE PAULETE, S. Reverse locomotion and normal escape effort of post-larval *Cynolebias* in peaty soil. Aquarium J., 1963, 34: 508-510.
4. VAZ-FERREIRA, R.; SIERRA DE SORIANO, B. y SCAGLIA DE PAULETE, S. Eclósión y propulsión caudal subterránea retrógrada de las postlarvas de *Cynolebias* Steind. (Pisces, Cyprinodontidae). Neotropica, 1963, 9 (30): 111-112.
5. FOERSCH, W.— Observing the soilbreeders. Aquarium, Philadelphia, 1956, 25: 190-191.
6. MEDER, E.— *Cynolebias bellottii* Steind. (unter Berücksichtigung des *C. nigripinnis* Regan). Aquar. Terrar. Z., 1953, 6: 169-172; 197-201.
7. CARVALHO, A. L. DE.— Notas para o conhecimento da biologia dos peixes anuais. Rev. Brasil. Biol., 1957, 17: 459-466.
8. THOMAS, K.— Searching for the Argentina Pearl Fish (*Cynolebias bellottii*). Aquarium, Philadelphia, 1933, 2: 105-109.
9. THOMAS, K.— More concerning *Cynolebias bellottii*. Aquarium, Philadelphia, 1933, 2: 145-146.
10. LADIGES, W.— Der Fish in der Landschaft. Wenzel & Sohn, Braunschweig, 1951, 182 pp.
11. MYERS, G. S.— Annual fishes. Aquarium J., 1952, 23: 125-141.
12. PETERS, N.— Embryonale Anpassungen oviparer Zahnkarpfen aus periodisch austrocknenden Gewässern. Int. Rev. ges. Hydrobiol., 1963, 48: 257-313.
13. HARRINGTON, R. W.— Delayed hatching in stranded eggs of marsh killifish, *Fundulus confluentus*. Ecology, 1959, 40: 430-437.

Evolución del cromosoma sexual en *Schistocerca infumata*¹

FRANCISCO A. SAEZ y GLAUCIA PEREZ-MOSQUERA

INTRODUCCION.— Es un hecho conocido que el cromosoma sexual de los ortópteros acrididos presenta una configuración característica que lo individualiza durante los distintos estadios de la espermatogénesis.

La mayoría de los estudios llevados a cabo en este grupo de acrididos, han puesto de manifiesto que durante la profase meiótica el cromosoma sexual presenta una configuración piriforme, fuertemente condensada, heteropicnótica positiva, que lo destaca nítidamente de los autosomas, que en esta etapa se hallan con sus cromonemas extendidos y en estado isopicnótico, es decir, en heteropicnosis negativa. Sin embargo, la claridad de las imágenes presentadas por *Schistocerca infumata*, nos permite afirmar que ese aspecto vesicular compacto, aparentemente homogéneo, encierra una estructura que se manifiesta mejor, más nítidamente por medio de pretratamientos, la cual no difiere en general de la que exhibe cualquier autosoma, sea o no heteropicnótico.

Paralelamente se ha tratado de establecer si existe alguna relación entre el material nucleolar y el cromosoma sexual en determinadas etapas de la profase meiótica, para lo cual se emplearon técnicas citoquímicas adecuadas.

MATERIAL Y METODOS.— *Schistocerca infumata* (Scudder) es una especie que habita sobre arbustos en las orillas de los montes, con amplia distribución en todo el Uruguay y sur del Brasil. Puede hallarse asimismo, en los parques y jardines de Montevideo sobre plantas de *Dahlia* que le sirven de alimento. Se encuentran adultos durante todo el año y se supone que desovan a fines de invierno, dando ninfas de color verde (Bruch, 1939).

Se estudiaron varios ejemplares machos recogidos en distintas zonas de Montevideo, con técnicas que permitieran dilucidar la estructura y los cambios que se producen en el curso de la evolución del cromosoma sexual durante la gametogénesis.

Una parte de las gónadas fue sometida a uno de los pretratamientos indicados: a) amoníaco al 0,25 durante 30 minutos; b) agua destilada a 56° C. durante 20 minutos; c) solución de NaCl al 0,50% durante 10 minutos.

1. Departamento de Citogenética, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Av. Italia 3318, Montevideo.

Todo el material se fijó en 3/1 (3 partes de alcohol 100° y 1 parte de ácido acético glacial) o en 2/1 (2 partes de alcohol 100° y 1 parte de ácido acético glacial).

Los mejores resultados se obtuvieron con pretratamiento en NaCl y fijación en 2/1.

El estudio se hizo en aplastados teñidos con hematoxilina acética férrica según Saez (1950) y Feulgen.

Para la fotografía se empleó un microscopio Ortholux con óptica apocromática y el accesorio Microibs con el cono reductor de 1 1/3; se usó película Microfile.

RESULTADOS.— Se estudió la evolución del cromosoma sexual durante la gametogénesis desde el periodo gonial hasta las espermatidas, dedicando especial atención a los cambios observados durante la profase meiótica.

ESPERMATOGONIAS.— La aloclia del cromosoma sexual se pone de manifiesto en esta generación, puesto que sus espirales se hallan en un ciclo diferente al de los autosomas (figs. 1 y 2). Estos últimos exhiben una estructura helicoidal laxa, que puede ser debida a las espirales remanentes provenientes de

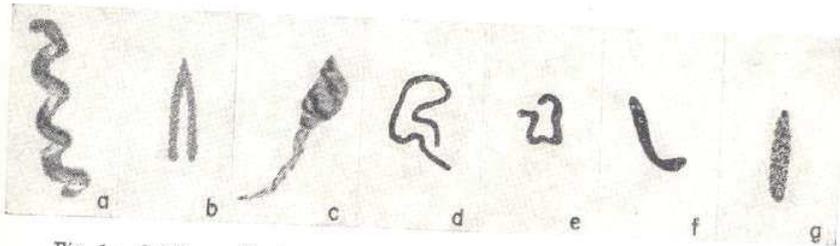
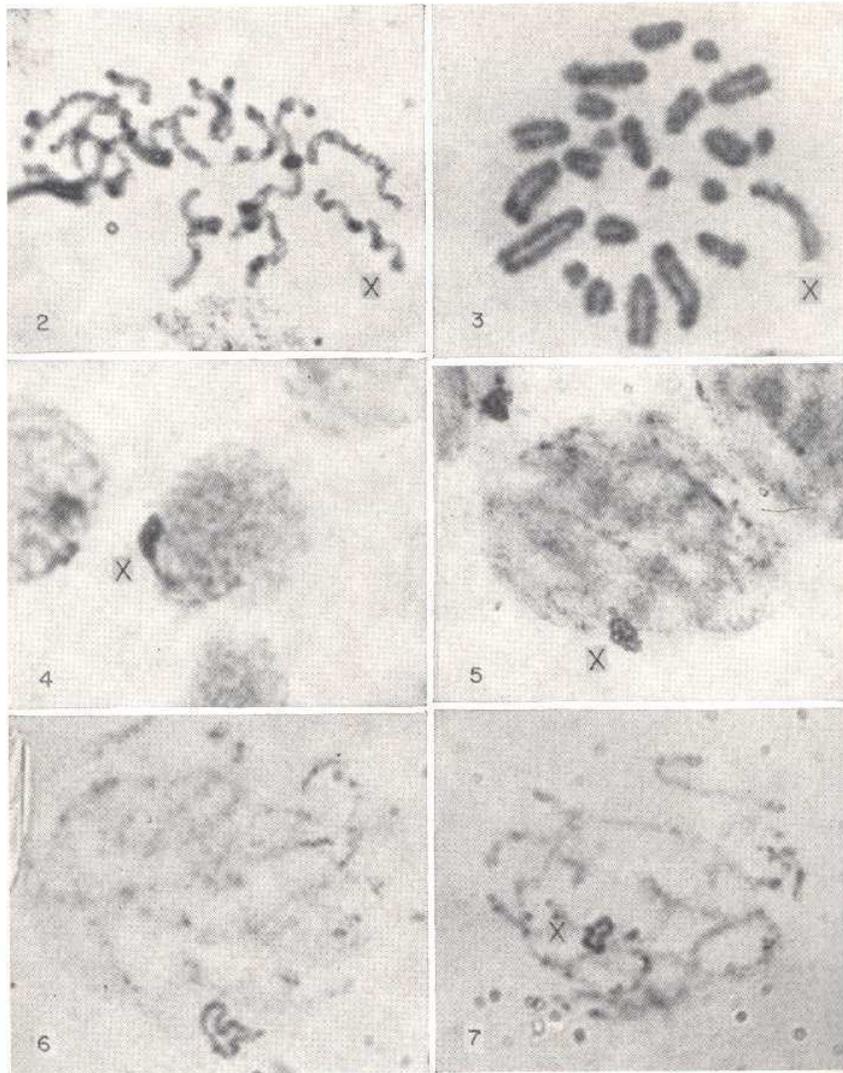


Fig. 1.— Configuración del cromosoma sexual en diferentes estadios: a) profase espermatogonial; b) metafase gonial; c) leptonema; d) paquinema temprano; e) paquinema medio; f) diplonema; g) metafase I.

las etapas anafásicas de la división anterior, o a un estadio profásico inicial de la primera generación gonial, puesto que no es posible precisar a qué generación gonial correspondería. Pero lo que importa en este caso es la característica estructura deferencial que presenta el cromosoma sexual y los autosomas.

METAFASE GONIAL.— En este estadio el cromosoma sexual presenta heteropícnosis negativa, mientras que los autosomas han adquirido su máxima concentración cromatinica, es decir, han alcanzado el estado compacto típico de esta etapa del ciclo mitótico (figs. 3 y 1 b).

PROFASE MEIÓTICA.— *Leptonema:* Las observaciones en material teñido con hematoxilina acética, permiten distinguir en la profase temprana al cromosoma sexual formando un conglomerado heterogéneo, con un extremo libre que se prolonga en delgado filamento, cuya extremidad se pierde en la cavidad nuclear (figs. 1 c y 4). No podemos decir que exista una ubicación precisa, ya que se observó en distintas posiciones dentro del núcleo.



En n
 efectivam
 bre sí m

Paqu
 a individ
 tanto, en
 como un
 cuanto a
 Naylor (c
 configura

Dipl
 este estad
 experime
 En esta
 de herrac
 próximos

En e
 en cruz
 quiasmas
 tura heli
 sado, con
 autosoma
 nido de
 cromoson
 que progr
 tra una l
 este elem

MER.
 concentra
 Todos los
 mo plano
 sico hacia

Fig.
 espi
 Fig.
 Nót
 enet
 que
 nosi
 no h
 coíd
 rant
 que
 que
 eron
 med

En material pretratado se puso de manifiesto que esa configuración encierra efectivamente, el cromosoma sexual con su estructura helicoidal replegado sobre sí mismo (fig. 5).

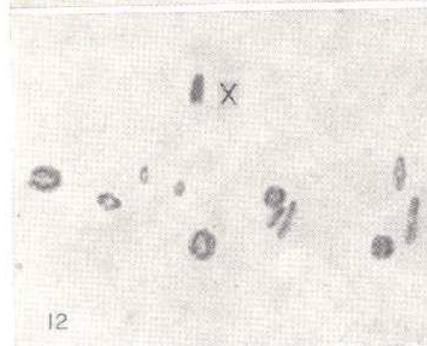
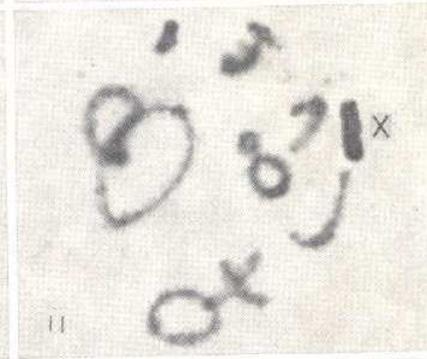
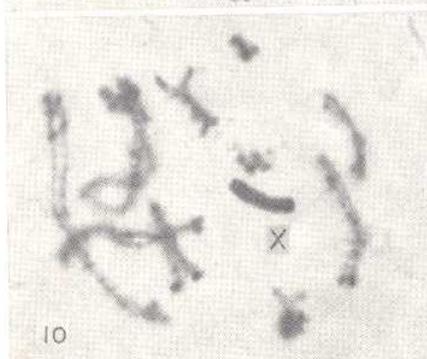
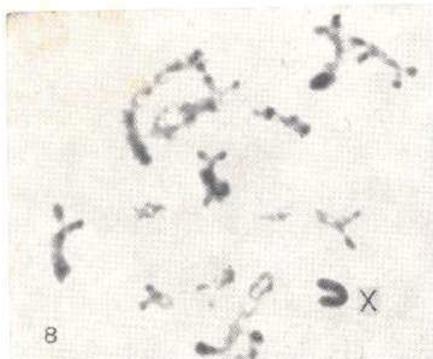
Paquinema: En el paquinema temprano, cuando los autosomas comienzan a individualizarse, el cromosoma sexual se encuentra ya condensado y, por tanto, en heteropienosis positiva, con una estructura precisa, ya que se observa como un filamento largo bien teñido y sinuoso, sin que exista constancia en cuanto a su posición en el núcleo (figs. 1 d y 6). En la figura 5, de John y Naylor (1961), sobre *Schistocerca gregaria*, el cromosoma sexual presenta una configuración que se asemeja a la descrita en el presente trabajo.

Diplonema: Al comienzo de la repulsión de los homólogos, característico de este estadio, el cromosoma sexual se presenta bien condensado, luego de haber experimentado una contracción lineal que lo reduce en su tamaño (fig. 1 f). En esta etapa su configuración es variable, pues en unos casos adopta forma de herradura, en otros la de S abierta o bien flexionada con los extremos muy próximos entre sí (figs. 8 y 9).

En el diploténico medio los bivalentes muestran sus típicas configuraciones en cruz o en círculo (fig. 11), debido a la posición en que se encuentran los quiasmas. Todos los bivalentes tienen bordes irregulares que denotan su estructura helicoidal. El cromosoma sexual se presenta blastoniforme y bien condensado, contrastando su estado heteropicnótico positivo con respecto a los demás autosomas que uniformemente se hallan menos teñidos debido a que su contenido de ácido nucleico es menor (figs. 10 y 11), en este momento, que la del cromosoma sexual. Esta diferencia de cromaticidad va disminuyendo a medida que progresa la profase. Al finalizar el diploténico, el cromosoma sexual muestra una hendidura longitudinal que separa las dos cromátidas componentes de este elemento (fig. 11).

METAFASE I.— Llegados a este estadio los bivalentes alcanzan su máxima concentración cromatinica, mostrándose compactos y con sus bordes nítidos. Todos los bivalentes se ordenan en la placa ecuatorial, manteniéndose en el mismo plano en tanto que el cromosoma sexual se adelanta en su movimiento anafásico hacia uno de los polos (fig. 12).

Fig. 2: Profase espermatogonial; se observa la diferencia existente entre las espirales de los autosomas y la del cromosoma sexual, indicado por una X.
Fig. 3: Metafase espermatogonial en vista polar con sus 23 cromosomas. Nótese la menor concentración cromatinica del cromosoma sexual X que se encuentra en heteropienosis negativa en contraste con los demás autosomas que están en isopienosis.
Fig. 4: Leptonema. El cromosoma X en heteropienosis positiva muestra su estructura compacta tal como se presenta cuando no ha sido sometido a pretratamiento que permita revelar su estructura helicoidal.
Fig. 5: Leptonema en un núcleo pretratado con NaCl al 0,5% durante 20 minutos. Se observa la estructura heterogénea del cromosoma sexual que se halla en heteropienosis positiva.
Fig. 6: Paquinema temprano en el que puede verse la configuración filamentososa en heteropienosis positiva del cromosoma sexual. Igual tratamiento que en la figura 5.
Fig. 7: Paquinema medio. El cromosoma sexual se halla más condensado que en los estadios anteriores y mantiene su estructura filamentososa.



La observación cuidadosa revela que la estructura del cromosoma sexual difiere de la de los bivalentes autosómicos, ya que muestra su contorno irregular (fig. 1 g). Su coloración, si bien es intensa, no alcanza el mismo grado que la de los demás cromosomas del complejo. Esos hechos son signo de que la estructura espiralada del cromosoma sexual es menos compacta que la demostrada por los autosomas, por lo que se infiere que el ciclo de espiralización tiene una cronología característica y diferencial, que la distingue de los autosomas.

ANAFASE I.—Durante la anafase I, se encuentran dos grupos cromosómicos, tal como era de esperar, uno de ellos con once cromosomas y el otro con doce.

El cromosoma sexual no presenta en este estadio heterocromaticidad diferencial, por lo menos en nuestras preparaciones, pero se le puede identificar en la mayoría de los casos por su ubicación precediendo al grupo autosómico (fig. 13).

METAFASE II.—Durante este estadio no fue posible distinguir al cromosoma sexual por hallarse en isopcnosis como los demás autosomas.

ANAFASE II.—Las anafases II en vista polar se presentan de dos clases: con once y con doce elementos. En este estadio también se observa isopcnosis del sexual con relación a los autosomas y, por tanto, resulta imposible individualizarlo.

ESPERMÁTIDAS.—Una vez reconstruido el núcleo, después de la segunda división meiótica, encontramos que en los primeros estadios de las espermátidas resulta imposible reconocer individualmente a los autosomas. La cromatina se halla repartida presentándose difusa en la esfera nuclear, en tanto que el cromosoma sexual se destaca por su configuración particular. Dicha configuración consiste en un conglomerado formado por el filamento cromosómico (cromonema), dispuesto en apretado helicoide (figs. 14 y 15).

A medida que avanza la espermatogénesis se reduce el diámetro de las espermátidas, mientras que el cromosoma sexual aparece como un cuerpo fuertemente heteropcnótico, presentando una estructura heterogénea formada por las circunvoluciones del cromonema que aún en este estadio mantiene su configuración filamentososa típica (figs. 16 y 17).

DISCUSION.—A) **ESTRUCTURA HELICOIDAL DEL CROMOSOMA SEXUAL.**—La estructura helicoidal durante el ciclo mitótico (espermatogonial) ha sido observada por diversos autores: Mohr (1916) en *Locusta*, Wenrich (1916), Winiwar-

Fig. 8: Diplonema inicial. El cromosoma sexual contraído linealmente, continúa en heteropcnosis positivo. **Fig. 9:** Mismo estadio que en la figura 8. El cromosoma sexual presenta configuración anular con sus extremos en íntimo contacto. **Fig. 10:** Diplonema en que puede observarse la configuración típica de los bivalentes y del cromosoma constituido por dos cromátidas. **Fig. 11:** Diplonema final en que se observa la terminalización de algunos bivalentes. El cromosoma sexual se halla en su máxima condensación. **Fig. 12:** Metafase I. Los autosomas están alineados en la placa ecuatorial, mientras que el cromosoma sexual se adelanta en su movimiento hacia uno de los polos, presentando su contorno irregular. **Fig. 13:** Anafase I. Dos grupos cromosómicos correspondientes a los dos polos anafásicos. Puede verse en uno de ellos, al cromosoma sexual adelantado al grupo autosómico.

ter (1931) en *Tettigonia albifrons*, White (1940) en algunos acridios y tetigónidos, Coleman (1943) en *Chortophaga*, Sze (1946) en *Phlaeoba infumata*.

La estructura helicoidal del cromosoma sexual, tal como se presenta en nuestro material, a través de los ciclos gonial y meiótico muy probablemente debe corresponder a la espiral mayor del cromonema. La espiral menor, observada por Coleman (1943) en *Chortophaga viridifasciata* durante el paquinema, no ha podido ser individualizada por nosotros. Sólo hemos puesto de manifiesto, en algunos casos, una estriación transversal a lo largo de la espiral mayor del cromonema, la cual podría corresponder a la espiral menor. Esta estriación, observada por nosotros en otras especies de acridios, es más evidente durante la metafase I, cuando el cromosoma sexual se encuentra en heteropiconosis negativa, fenómeno éste que es concomitante con la destorsión de la espiral mayor.

Resulta difícil admitir que el aumento del diámetro del cromosoma sexual obedece a la presencia de una espiral menor superpuesta a la espiral mayor, o a una acumulación de ADN. Este problema requeriría una investigación más exhaustiva con técnicas adecuadas.

B) COMPORTAMIENTO HETEROPICNÓTICO DEL CROMOSOMA SEXUAL.— Es indudable, y así lo hemos sostenido (Saez, 1963), que el fenómeno de heteropiconosis que se pone en evidencia por la reactividad diferencial de los colorantes que acusan mayor o menor concentración cromatínica en todo el cromosoma o en parte del mismo, constituye una signo que refleja un estado funcional diferente. De ahí que lo más verosímil sea considerar que la heteropiconosis posee un ritmo de espiralización distinto del resto de los cromosomas que obedece a un estado fisiológico particular.

La heteropiconosis ha sido asociada íntimamente con una clase especial de cromatina, la heterocromatina, término que fue empleado por Heitz al descubrir y formular el concepto acerca de una mayor o menor concentración cromatínica (cromosomas o segmentos cromosómicos heteropiconóticos), con respecto a la eucromatina que caracteriza a los cromosomas comunes o autosomas. Esto condujo a la generalización teórica acerca de la inactividad génica de los cromosomas o sus partes por heterocromatización.

En nuestro material, el cromosoma sexual sufre modificaciones consistentes en su mayor o menor afinidad tintorial durante el ciclo de la gametogénesis, lo cual es un signo de su íntima relación con cambios fisiológicos profundos en el transcurso de dicho ciclo.

La heteropiconosis de un cromosoma, positiva o negativa (grueso o delgado y desteñido o compacto), es el resultado de su espiralización diferencial que, a su vez, puede estar controlada por una mayor o menor concentración de las nucleoproteínas que lo integran. El momento fisiológico dentro del ciclo celular y el estado funcional del tejido, influyen o reflejan las variaciones de comportamiento de la heterocromatina. No son cambios de la constitución del cromosoma, sino cambios de su función.

Los estudios autorradiográficos acerca de la actividad diferencial del cromosoma sexual, con respecto a los autosomas, suministran una evidencia que apoya esta interpretación. En este sentido, el cromosoma sexual sirve de control dando información sobre el estado de síntesis en que se encuentra la heterocromatina con respecto a la eucromatina, es decir, a los autosomas.

os y tetigó-
fumata.
presenta en
blemente
enor, obser-
paquinema,
le manifies-
piral mayor
a estriación,
nte durante
cnosis nega-
piral mayor.
soma sexual
al mayor, o
igación más

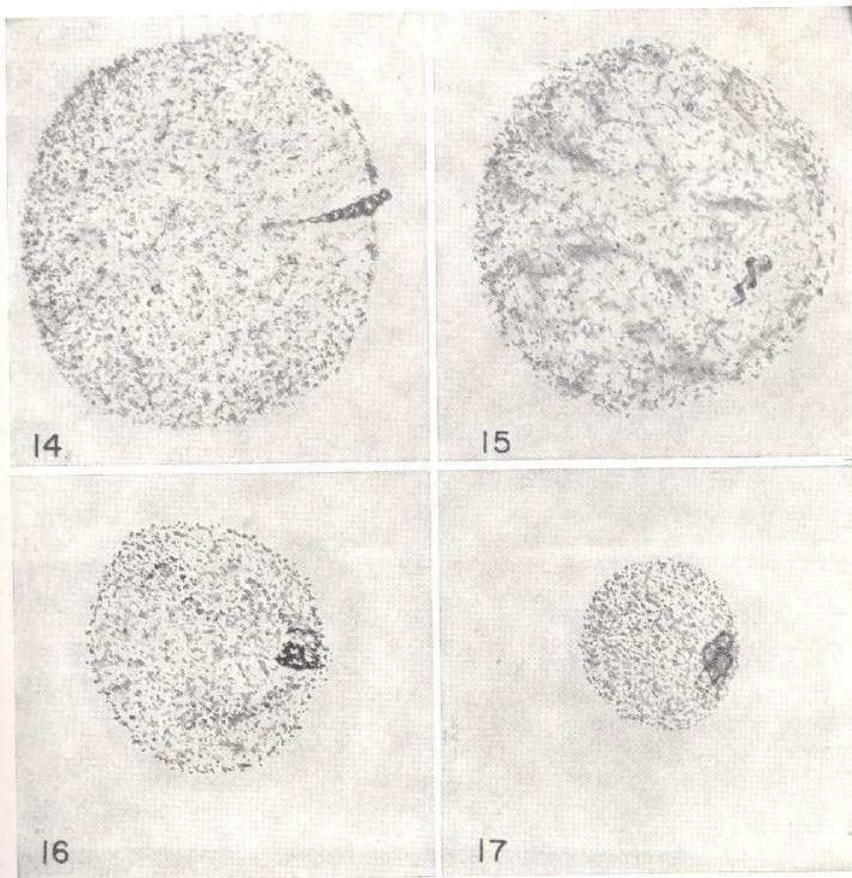
AL.— Es in-
e heteropic-
s colorantes
romosoma o
cional dife-
cnosis posee
bedece a un

especial de
al descubrir
cromatínica
specto a la
s. Esto con-
los cromos-

consistentes
ogénesis, lo
rofundos en

o o lelgado
rencial que,
ación de las
ciclo celu-
nes de com-
ión del cro-

ial del cro-
idencia que
rve de con-
tra la hete-
as.



Figs. 14 y 15: Espermátidas. Los autosomas no pueden individualizarse; el cromosoma sexual se observa como un conglomerado formado por el cromonema. Figs. 16 y 17: Espermátida más avanzada. Puede comprobarse la reducción del diámetro nuclear con relación a los estadios anteriores. El cromosoma sexual en heteropienosis positiva, conservando su estructura heterogénea.

Lima de Faría (1961) lo ha demostrado mediante el empleo de timidina tritiada, conjuntamente con el análisis citofotométrico. Halló este autor que el cromosoma sexual de *Melanoplus* y *Chortophaga*, sintetiza el ADN más tarde que los autosomas. El estudio citofotométrico en preparaciones tratadas por la técnica de Feulgen, realizado en los mismos estadios, concuerda con la determinación antedicha. Quiere decir entonces que hay más ADN por unidad de área en la heterocromatina que en la eucromatina a través de la profase meiótica durante el paquinema.

Ha sido sugerido por White (1961) que el ADN eucromático, consistiría en pares de nucleótidos de adenina-timina y citosina-guanina, ordenados en una gran variedad de secuencias. El ADN heterocromático consistiría principalmente en una sola clase de dichos pares, ya sea A-T o C-G; de este modo la heterocromatina compacta estaría constituida por pares de nucleótidos A-T, mientras que la heterocromatina difusa lo estaría por pares C-G o viceversa.

Si la heteropiconosis positiva, que presenta el cromosoma sexual durante la profase meiótica, que sería a nuestro juicio heterocromatina compacta, obedece a lo supuesto por White, está aún por demostrarse, pero de todos modos es interesante el sentido fisiológico de esta interpretación.

Recientes investigaciones (Crosby Longwell, 1961), sobre determinación interferométrica del espesor del cromosoma en regiones eucromáticas y heterocromáticas, pueden aportar evidencia adicional acerca de si el grado de heteropiconosis obedece a una afinidad diferencial por los colorantes o al grado relativo de retardo óptico.

En este orden de hechos, un reciente trabajo de Henderson (1963) muestra que el cromosoma sexual, tal como lo revela el análisis con uridina tritiada, durante la primera y segunda profase meiótica no sintetiza ARN, en tanto que los autosomas presentan actividad sintetizante a través de toda la profase meiótica, lo cual pone de manifiesto la actividad diferencial entre el cromosoma sexual y los autosomas.

C) CROMOSOMA SEXUAL Y NUCLÉOLO.— Las características morfológicas del cromosoma sexual que se observan en la profase meiótica, han sido interpretadas por la mayoría de los autores como un cuerpo compacto vesicular que se destaca nítidamente durante el leptonema y paquinema. Se ha pensado que esta configuración vesicular obedece al hecho de hallarse constituida por la asociación de material nucleolar con el cromosoma sexual. De manera que dicho cromosoma se hallaría incluido en la masa nucleolar.

Nuestras observaciones han revelado que esa estructura no obedece al hecho de hallarse material nucleolar, puesto que con las diferentes técnicas empleadas hasta el momento y especialmente por el Feulgen, dicho material sólo reacciona positivamente por este último método. Sze (1946) hizo notar esta circunstancia, aunque no indicó que fuera observada por él.

Por otra parte es notorio en la mayoría de los ortópteros que, en las etapas de la profase meiótica temprana el nucléolo se encuentra generalmente ubicado a distinta distancia del cromosoma sexual y que ambos elementos, aún estando en contigüidad, pueden diferenciarse netamente por su distinta electividad cuando se emplean técnicas adecuadas.

Esto ha sido puesto en evidencia por Saez (1952-55) en *Chortophaga* y *Melanoplus*, mediante el empleo del Azur B combinado con el estudio citofotométrico. En ambos casos el cromosoma sexual y el nucléolo se comportan de modo distinto, manteniendo su individualidad durante la profase meiótica.

Estudios recientes sobre la ultraestructura del cromosoma sexual, realizados por Sotelo y sus colaboradores (1961, 1964), han puesto en evidencia que en el *Grillus argentinus* el cromosoma sexual y el nucléolo se hallan íntimamente asociados, adheridos podría decirse, sin mezclar sus componentes al principio de

la profase, esta asociación se inicia en el paquinema y se termina al final del diplonema. Consiste este fenómeno en el pasaje de filamentos de uno a otro elemento, lo que da como resultado que el nucléolo contiene filamentos de naturaleza cromosómica. Además, en el paquinema el nucléolo emite una prolongación consistente en una hilera cilíndrica de los mismos filamentos y una unidad axial. Al final del diplonema la asociación nucléolo-cromosoma está constituida por un cuerpo complejo en cuya estructura no se reconocen ni el nucléolo, ni el cromosoma de etapas anteriores.

En otros acridios, sin embargo, estudiados por Sotelo, no se halló interconexión entre cromosoma sexual y nucléolo, no obstante encontrarse en contacto en algunas etapas de la profase meiótica. Pero en una especie de arácnidos este mismo autor halló un cuerpo bandeado, similar en estructura al cromosoma sexual del grillo.

En este orden de ideas, cabe recordar lo que acontece en los mamíferos. La condensación de los cromosomas sexuales X Y en este grupo, en un cuerpo heteropicnótico, comienza en la última telofase espermatogonial y se la observa hasta el final del paquinema.

El bivalente sexual X Y de los mamíferos se halla incluido en una vesícula, la vesícula sexual, llamada por Makino (1941) anfinucléolo. Esta vesícula, de la que luego emergen los cromosomas X Y al final de la profase y que contiene material nucleolar, se desintegra al final de esta etapa. La vesícula sexual fue interpretada como un nucléolo, en el cual se hallan incluidos los cromosomas X Y en íntima asociación. Slizynski (1949, 1955a, 1955b, 1960) y Griffen (1955, 1960) consideran que la vesícula sexual es un nucléolo que se halla unido al bivalente X Y por uno de sus extremos durante el paquinema. En la rata suelen hallarse, ocasionalmente, casos en que el par X Y se encuentra liberado de la vesícula sexual, tal como fue observado por Geyer-Duszyniska (1963) (fig. 3 de su trabajo). Pero esto no significa que la vesícula sexual sea una entidad independiente de los cromosomas X Y. Coincide con esta observación, lo demostrado anteriormente por Ohno, Kaplan y Kinoshita (1956), respecto a la presencia de apreciable cantidad de ARN en la vesícula sexual de la rata. Estos autores pusieron de manifiesto que la vesícula que encierra los cromosomas sexuales, si bien está constituida por ARN, no corresponde al nucléolo. La persistencia de dicha vesícula hasta el diplonema y la desaparición del o los nucléolos antes del paquinema, es el argumento principal en que se basan para sostener que la vesícula rica en ARN está asociada con la heteropicnosis de los cromosomas sexuales y no tiene relación con el nucléolo.

RESUMEN.— Se llevó a cabo un estudio sobre la evolución del cromosoma sexual en *Schistocerca infumata* (Orthoptera: acrididae). El cariotipo está compuesto por 23 cromosomas acrocéntricos ($2n \delta = 22 + X$).

La información obtenida en esta investigación, pone de manifiesto que el cromosoma sexual presenta aloclicia diferencial en los distintos estadios de la espermatogénesis, ya sea por su estado de concentración o por su grado de espiralización. Durante la profase presenta estructura helicoidal laxa y heteropicnosis negativa en la metafase.

En el transcurso de la profase meiótica es cuando el cromosoma sexual manifiesta su estructura heterogénea constituido por un cromonema enroscado y heteropicnótico positivo, el cual, a medida que avanza la profase, se resuelve en un elemento filamentosamente compacto que se contrae paulatinamente manteniendo su heteropicnosis positiva, contrastando con la isopicnosis de los autosomas. La primera metafase meiótica encuentra al cromosoma sexual más despiralizado que los autosomas y en franca heteropicnosis negativa, en oposición a los autosomas que en esta etapa adquieren su máxima concentración.

En la anafase I, metafase II y anafase II todos los cromosomas, incluso el sexual, se hallan en isopicnosis y, por tanto, este último no se diferencia de los autosomas.

En las espermátidas se destaca el cromosoma sexual por su configuración, constituida por un cromonema enrollado que, a medida que avanza la espermiogénesis, evoluciona transformándose en un cuerpo fuertemente heteropicnótico que mantiene su estructura filamentosamente, en tanto que disminuye el diámetro de la espermátida.

En cuanto a la posible relación existente entre el material nucleolar y el cromosoma sexual, no hemos hallado evidencia que indique que la masa compacta que caracteriza al cromosoma sexual durante el leptonema, zigonema y paquinema, obedezca a estar incluido o mezclado con el nucléolo, ya que ambos elementos pueden diferenciarse por su electividad citoquímica. De manera que el nucléolo o material constituido por ARN forma una entidad independiente del cromosoma sexual que no se mezcla en ninguna de las etapas de la profase meiótica.

SUMMARY.—A study of the evolution of the sex chromosome during meiosis in *Schistocerca infumata* [with a karyotype of $2n (\delta) = 23$ acrocentric chromosomes with X-O type of sex determination] has shown that in the different stages of spermatogenesis the sex chromosome presents a differential allocyclic behaviour. The difference may be due either to its condensed state or to differences in spiralization.

At prophase I it is heterogeneous in composition and shows a loose helical structure. It is seen as a coiled positively heteropycnotic chromonema which changes during prophase into a thread-like compact element. At the end of prophase the element has acquired a condensed appearance. Its positive heteropycnosis contrast with the autosome isopycnosis. At metaphase I, the sex chromosome is less spiralized than the autosomes and is negatively heteropycnotic.

At anaphase I, metaphase II and anaphase II, all the chromosomes including the sexual one are in isopycnosis; in consequence it is not distinguished by its staining properties.

In the spermatids the sex chromosome is easily differentiated. It is formed by a coiled chromonema which as maturation advances keeps its filamentous structure while evolving into a heteropycnotic body with concomitant reduction of the volume of the cell.

With regard to a possible connection between nucleolar substance and sex chromosome no evidence was found indicating that during leptonema, zigonema and pachynema the chromosome may already have intermixed with the nu-

cleolus. I
because c
material
and does

BRUCH, C
Museo

COLEMAN
X chr

CROSBY I
phology

GEYER-DU
Chron

GRIFFEN,
1955,

GRIFFEN,
identi

HERNDER
meiosi

JOHN, B.
Schist

LIMA DE
chrom

MAKINO,
includ
305-38

MOHR, O.
Locust

OHNO, S.;
pycnos

SAEZ, F. A
tropho

SAEZ, F. A
Riv. I

SAEZ, F. A
los cro

11 de

SAEZ, F. A
sistem

SHAW, G.
and P

cleolus. Both elements can be separately recognized at the mentioned stages because of their selective staining behaviour. Clearly the nucleolus or the material formed by ARN is an entity independent from the sex chromosome and does not mix in any stage of the meiotic prophase.

BIBLIOGRAFIA

- BRUCH, C.— Algunas observaciones biológicas sobre *Schistocerca gregaria*. Revista del Museo de La Plata (Nueva serie), 1939, 1: 209-216.
- COLEMAN, L. C.— Chromosome structure in the acrididae with special reference to the X chromosome. *Genetics*, 1943, 28 (1): 2-8.
- CROSBY LONGWELL, A.— Immersion interferometry in studies of the functional morphology and cytogenetics of mouse ascites tumors. *Hereditas*, 1961, 47 (3-4): 641-673.
- GEYER-DUSZINSKA, I.— On the structure of the XY bivalent in *Mus musculus* L. *Chromosoma*, 1963, 13: 521-525.
- GRIFFEN, A. B.— A late pachytene chromosome map of the male mouse. *Jour. Morph.*, 1955, 96: 123-136.
- GRIFFEN, A. B.— Mammalian pachytene chromosome mapping and somatic chromosome identification. *J. cell. comp. Physiol.*, 56: 113-121.
- HERNDESON, S. A.— Differential ribonucleic acid synthesis of X and autosomes during meiosis. *Nature*, 1963, 200: 1235.
- JOHN, B. and NAYLOR, B.— Anomalous chromosome behaviour in the germ line of *Schistocerca gregaria*. *Heredity*, 1961, 16: 187-198.
- LIMA DE FARIA, A.— Initiation of DNA synthesis at specific segments in the meiotic chromosome of *Melanoplus*. *Hereditas*, 1961, 47: 674-694.
- MAKINO, S.— Studies on the murine chromosomes. I. Cytological investigations of mice included in the genus *Mus*. *J. Fac. Sci. Kokkaido Imp.*, 1941, Serv. VI Zool. 7, 305-380.
- MOHR, O. L.— Studien über die Chromatinreifung der männlichen Geschlechtszellen bei *Locusta viridissima*. *Arch. Biol. Paris*, 1916, 29: 579-752.
- OHNO, S.; KAPLAN, W. D. and KINOSITA, R.— Concentration of RNA on the heteropycnosis XY bivalent of the rat. *Exp. Cell Research*, 1956, 11: 520-526.
- SAEZ, F. A.— Differentiation of meiotic heterochromatin and euchromatin by microspectrophotometric techniques. *Anat. Record.*, 1952: 113: 65.
- SAEZ, F. A.— Estudio microespectrofotométrico de la heterocromatina y eucromatina. *Riv. Istoch. norm. pat.*, 1955, 1: 485-502.
- SAEZ, F. A.— El empleo de la hematoxilina acética o propiónica para el estudio de los cromosomas con la técnica de aplastamiento. *Comun. Soc. Biol. Montevideo*, 11 de mayo de 1960.
- SAEZ, F. A.— Gradient of the heterochromatinization in the evolution of the sexual system neo-X neo-Y. *Portugaliae acta biologica*, 1963, 7: 111-138.
- SHAW, G. W.— The nature of differential reactivity in the heterochromatin of *Trillium* and *Paris* spp. *Cytologia*, 1959, 24: 50-61.

- SLIZYNSKI, B. M.—A preliminary pachytene chromosome map of the house mouse. *J. Genet.*, 1949, 49: 242-245. The sex bivalent of *Mus musculus*. *L. J. Genet.*, 1955a, 53: 591-596. Chiasmata in the male mouse. *J. Genet.*, 1955b, 597-605. Sexual dimorphism in mouse gametogenesis. *Genet. Res.*, 1960, 1: 477-486.
- SOTELO, J. R. and TRUJILLO-CENOZ, O.—Electron microscope study on chromosome structure during meiosis. *Pathologie-Biologie*, 1961, 9: 762-768.
- SOTELO, J. R. and WETTSTEIN, R.—Electron microscope study on meiosis. The sex chromosome in spermatocytes, spermatids and oocytes of *Grillus argentinus*. *Chromosoma*, 1964, 15: 389.
- SZE, L. C.—The structure of the X chromosome in the meiosis of *Phlaeoba infumata*. *Journal of Morphology*, 1946, 79: 113-124.
- WHITE, M. J. D.—The heteropycnosis of sex chromosome and its interpretation in terms of spiral structure. *Journal Genet.*, 1940, 40: 67-82.
- WHITE, M. J. D.—The chromosomes, 1961, 5th edition. Methuen, London.
- WINIWARTER, H.—Evolution de l'heterochromosome chez *Tettigonia (Decticus) albifrons* (Fab.). *Arch. Biol. Paris*, 1931, 42: 201-228.

I)
rritori
cientif
E
princi
zi (5)
D
rius
estudi
S
géner
dera,
señal
Furn
I
meric
lado
nes e
de la
perim

Investigaciones
sobre *Furnarius rufus rufus* = "hornero"¹

RODOLFO V. TALICE y SUSANA LAFFITTE DE MOSERA

1) INTRODUCCION.—La gran mayoría de las aves autóctonas del territorio uruguayo han sido objeto, hasta el presente, de pocas comunicaciones científicas en relación con la biología.

En cambio sus problemas taxonómicos fueron repetidamente abordados: principalmente por: Alvarez (1, 2), Arredondo (3), Tremoleras (4), Devicenzi (5), y en el reciente y completo trabajo de Cuello y Gerzenstein (6).

Dentro de nuestros pájaros el más común es, quizá, el "hornero", *Furnarius rufus rufus*, y no escapa a esas generalidades en lo que respecta a su estudio y conocimiento.

Su sistemática ha sufrido sucesivas modificaciones, desde la inclusión en el género *Merops*, en el siglo pasado, hasta el momento actual, en que se considera, sin lugar a dudas, en la familia *Furnariidae* (7). Cuello y Gerzenstein (6) señalan en ella 19 géneros y 23 especies, una de las cuales es precisamente, *Furnarius rufus rufus*:

"Familia *Furnariidae* (6).

Furnarius rufus rufus (Gmelin) Hornero.

Merops rufus Gmelin, 1788, Syst. Nat., 1, p. 465 (basada en Buffon y Daubenton, pl. 739); Buenos Aires, Rep. Argentina.

Furnarius rufus Tremoleras, 1920, p. 19.

Furnarius rufus rufus Hellmayr, 1925, 7, p. 15; Wetmore, 1926, pp. 245-248; Peters, 1951, 7, p. 70."

La distribución geográfica de la especie es bastante amplia, abarca: Brasil meridional, Argentina (desde Misiones y Corrientes) y el Uruguay. Se ha señalado también para Paraguay y Bolivia.

En nuestro país tal distribución parece uniforme, existiendo sólo variaciones en la cantidad de nidos por zonas, vinculada estrechamente con la densidad de las poblaciones humanas.

1. Facultad de Humanidades y Ciencias, Departamento de Biología General y Experimental. Montevideo, Uruguay.

En lo que respecta al nombre común, en el Uruguay sólo se designa a esta especie como "hornero", pero en las restantes regiones encontramos otros, algunos curiosos. En Argentina: "hornero", "casero", "hornillero", "albañil", "Catalina", "alonsito", "Alonso-garcía", etc. En Bolivia, también "hornero". En Paraguay: "Alonso-garcía", "oga-rayty", "ibirog", "aloncito". En Brasil: "João de Barro", "barreiro", "John Clay".

Aunque la especie es exclusiva de América del Sur, existen nombres comunes equivalentes en francés ("fournier", "fournier roux"); en inglés ("red oven bird", "John of the mird-puddles"); en alemán ("lehmhans"). No podemos, en fin, olvidar los 21 nombres, mencionados para esta especie por D'Orbigny (8), en 21 lenguas indígenas, los cuales son imitaciones de los sonidos emitidos por el pájaro.

Es también interesante recordar las relaciones, consideradas en uno de nuestros trabajos anteriores (9), entre el "hornero" y el folklore rioplatense.

En el análisis de 55 fichas literarias, pudimos comprobar las variadas interpretaciones, correctas e incorrectas, que dan los escritores acerca de *Furnarius rufus rufus*. Ellas se refieren, sea a sus modalidades de vida, sea sobre todo, al nido; desde la absurda y tan aceptada tradición de "pájaro católico" ("porque no trabaja los días domingos"), hasta la mención acerca de qué integrante de la pareja construye el nido, olvidando que es imposible dilucidar —por la simple observación— cuál es el macho o la hembra, dada la ausencia de un claro dimorfismo sexual externo.

En cambio, otras alusiones literarias conciernen a hechos exactos del vivir del hornero, por ejemplo, aquellos conocidos versos de Supparo (10) que recuerdan a la situación de solidez de su típico nido, ubicado, generalmente, sobre postes o troncos de árboles.

II) MATERIAL Y METODOS.—Un estudio completo de *Furnarius rufus rufus* resulta naturalmente muy extenso. Abarca problemas de fisiología y comportamiento en todas sus manifestaciones.

En la presente comunicación nos referiremos principalmente al nido del pájaro y a sus aspectos conexos.

El material utilizado fue el coleccionado en el curso de reiteradas excursiones al campo. La casi totalidad de las observaciones fueron efectuadas en la naturaleza; sólo en lo referente a estructura del nido, se trabajó en el laboratorio con el material recogido. Nuestras observaciones y experiencias abarcan los dos últimos años.

Los animales, mantenidos en cautividad en una pajarera de aproximadamente 2 mt. \times 2 \times 2, fueron alimentados con alpiste, carne picada, y algunos insectos vivos.

1) CARACTERES DEL NIDO.—a) *Emplazamiento*: La encuesta que analizamos anteriormente, nos muestra la señalada diversidad de localizaciones que podríamos llamar normales: postes telegráficos y telefónicos, cumbres, árboles, palos de alambrados, techos, etc., así como otras sumamente extrañas, tales como los nidos sobre el suelo, en barrancas, sobre objetos en constante movimiento, alambres de energía eléctrica, hormigueros, recipientes, etc.

No podemos dejar de mencionar el fenómeno —no raro de observar al borde de nuestros caminos— de la superposición de dos nidos. En algunos casos (tres), llegando a los señalados en la sede de la Embajada Argentina (11) en Montevideo, con 6 nidos sobrepuestos, a los ordenadamente simétricos de la Comisaría del Pueblo Soca (Mosquitos), colocados de a dos o tres, a ambos lados de su puerta de entrada (12).

b) *Estructura*: Es —como se sabe— una construcción cuidadosamente planeada y realizada, que obliga al ave a un trabajo minucioso y prolongado para lograr ese nido de barro, que ha inducido, a muchos escritores nativistas, a sugerir —sin mayor fundamento— que ha sido el ejemplo para el paisano que construye, con materiales semejantes, su típico rancho.

Tiene la forma del horno campesino de cocer el pan. Su peso promedial es de 5kg.250, con un máximo de 6kg.150 y un mínimo de 2 kg. Comunica con el exterior por una abertura de forma elíptica, de 11 cm. \times 4cm.75.

La altura exterior es de 20cm.27; la profundidad, desde la zona anterior a la posterior (medidas externas), es de 20cm.72. El ancho es, en su frente, de 25cm.50. Las paredes son gruesas, de espesor variable según las zonas. En la mediana es de 3cm.27; en el techo y cerca de la base, de 2cm.35. El piso tiene poco espesor. La pared del tabique es la más delgada, alcanzando apenas a 1 cm.

La estructura interna muestra una disposición espiralada, con una amplia antecámara y un vestíbulo o entrada. Ambas zonas se comunican por una abertura alta y pequeña, situada en el fondo de la espira.

Se ha discutido mucho el número de cámaras del nido, pero se puede afirmar, sin lugar a dudas, que tiene sólo una cámara (o nido propiamente dicho) y una entrada (o vestíbulo).

La cámara interna presenta un eje mayor de 15cm.35 y uno menor de 12cm.50. Las paredes internas son mucho más lisas y mejor terminadas que las exteriores; tapizadas, se puede decir, por una mezcla tenue de pelos, crines y plumas.

De este mismo material suele estar llena la cámara y, en algunos casos, incluso el vestíbulo.

En lo referente a la abertura o entrada existen dos problemas; su relación con el nido en sí, y con respecto a los puntos cardinales.

Esa entrada, con respecto a la cara frontal, se sitúa indistintamente a la izquierda o la derecha, llegando a estar, en algunos casos, en el mismo centro. En los nidos pequeños, con gran abertura, ocupa casi todo el frente. Algunos autores, con un pequeño número de observaciones, pretenden situar la entrada hacia uno de los lados. Burmeister, por ejemplo [visto en Doello Jurado (13)], la señala a la izquierda.

Daguerre (14) supone que la situación hacia uno u otro lado es indistinta; sólo influiría el lugar cercano que presenta tierra más fresca para la construcción en el momento de iniciarse el tabique que separa la cámara del vestíbulo. La espira tomaría, en ese momento, una situación definida (sic.).

c) *Orientación de la abertura*: Uno de los aspectos más a menudo aludidos, en el lenguaje común, con respecto al peculiar nido de *Furnarius rufus*, es el que se refiere a la orientación de la abertura. Las opiniones son

contradictorias, desde la tan frecuente de considerarla orientada al norte ("para la protección contra el pampero frío"), hasta la que pretende que mira hacia el lado del camino o de la cercana vivienda humana (15).

Efectuamos un recuento de 286 nidos, midiendo la orientación de su abertura, mediante una brújula, en la zona sur-este del país (16). Los valores se detallan en el cuadro siguiente. Analizamos también algunos datos de trabajos argentinos, para establecer la orientación en relación con los cuatro puntos cardinales y comprobar si es debida al azar.

	Serie (17)		Sin autor (18)		Ambos (17, 18)		Nosotros	
	Nº de nidos	%	Nº de nidos	%	Nº de nidos	%	Nº de nidos	%
Norte	4	14,29	16	18,39	20	17,39	63	22,02
Sur	7	25	27	31,04	34	29,56	48	16,79
Este	8	28,57	29	33,33	37	32,18	90	31,47
Oeste	9	32,14	15	17,24	24	20,87	85	29,72
Total de nidos	28		87		115		286	

X² CON RESPECTO A LA ORIENTACION DE LA ABERTURA
HACIA LOS CUATRO PUNTOS CARDINALES
SEGUN DATOS DE DIFERENTES AUTORES

Serie (17)	Sin autor (18)	Ambos (17, 18)	Nosotros
X ² = 1.998	X ² = 7.297	X ² = 6.772	X ² = 16.067
P = 0.70 y 0.50	P = 0.10 y 0.05	P = 0.10 y 0.05	P < 0.01

El valor de P, obtenido en los cuatro cálculos, es diferente. En el primer caso, siendo P = 0.70 y 0.50, debe interpretarse que las variaciones son debidas al azar.

En los siguientes, al aumentar considerablemente el número de observaciones, la posibilidad de que esa distribución sea debida al azar disminuye notablemente, pues el valor de P es = 0.10 y 0.05.

Finalmente, merecería la pena estudiar la existencia de debidas incidencias en otros sectores. Se observó en Rivera, (

Montevideo

Montevideo

Durazno -

Tacuarembó

Por la distribución de la atención en aumento, agregan con los alrededores como otros. La causa posterior media, rentes, 20 días, se constata el lapso má

Finalmente, en el análisis de los valores hallados por nosotros, con un número mayor de observaciones, se obtiene un valor para $P < 0.01$. Luego, si bien existen orientaciones hacia los cuatro puntos cardinales, las diferencias no son debidas al azar. Existen, pues, otros factores (microclima, vientos, etc.) que inciden en ella.

Otro dato interesante es la modificación de la orientación con respecto a los sectores meridianos, a medida que nos alejamos de la región sur del país. Se observaron 549 nidos durante un recorrido en ferrocarril de Montevideo a Rivera, obteniéndose los siguientes resultados:

	Sectores del sur	Sectores del norte	
Montevideo - Rivera	174 = 31,88%	374 = 68,12%	$X^2 = 72.132$ $P < 0.01$
Montevideo - Durazno	116 = 37,42%	194 = 62,58%	$X^2 = 19.6$ $P < 0.01$
Durazno - Tacuarembó	25 = 31,65%	54 = 68,35%	$X^2 = 10.64$ $P < 0.01$
Tacuarembó - Rivera	34 = 21,25%	126 = 78,75%	$X^2 = 52.90$ $P < 0.01$

Por consiguiente, en los cuatro casos $P < 0.01$. Inciden pues, en la distribución de la abertura de los nidos, factores que no son debidos al azar. Llama la atención que, a medida que nos alejamos de la costa meridional del país, va en aumento el número de nidos cuya abertura mira hacia los sectores del norte.

d) *Materiales empleados*: El fundamental es la tierra húmeda, a la que agregan arena, ramitas, cortezas, pastitos, plumas, pelos, crines, etc., materiales con los cuales forman una masa de gran solidez. Los transportan desde zonas circundantes, pero se trata siempre de tierra y vegetales, nunca de objetos, como otros pájaros.

La construcción se inicia por la base; luego elevan las paredes laterales hasta cerrar la bóveda; posteriormente construyen el tabique divisorio. Es la causa por la cual se ha señalado el nido formado por un sólo compartimiento; exteriormente parece finalizado, pero puede restar por construir el tabique interior mediano.

e) *Época y tiempo de construcción*: Se señalan épocas y periodos muy diferentes. Arredondo (3) dice que lo inicia en setiembre y que el hornero demora 20 días, mediante trabajo conjunto del macho y la hembra. Para Hudson (15) se construye en otoño e invierno, finalizándose en primavera; sería pues, un lapso más largo.

Alvarez (1, 2) establece setiembre y 15 días de duración; Azara [visto en Menégaux (19)] da un tiempo de dos días (sic.); en el mismo trabajo se dice que, según Burmeister, se construye en 5 ó 6 días. Daguerre (14) indica que la construcción se inicia en el mes de abril.

Hemos visto trabajar al hornero durante todos los meses del año, en comprobaciones efectuadas mes a mes. Cuesta creer en un término menor a los 17 días para la total construcción del nido.

Nuestras observaciones, bien comprobadas, nos permiten señalar, como plazo para su finalización, entre 17 y 40 días. Es decir: en ciertas épocas el nido es totalmente construido en 17 días. En otras, el hornero tarda hasta 40 días.

La construcción queda a cargo de ambos componentes de la pareja; la realizan con el pico y con él recogen, llevan y colocan el material necesario; algunos autores agregan las patas como elemento de transporte, hecho que no hemos podido observar.

f) *Cálculo del trabajo del pájaro:* Hemos calculado que, en el pico del hornero, forzado en su abertura, caben 400 mlg. de tierra húmeda, lo que representa, en estado seco 300 mlg. (en algunos casos se ven ramitas que sobresalen del pico del pájaro).

Si reducimos el peso del nido a miligramos, tenemos un valor promedial de 5.250.000 mlg. Ello nos obligaría a admitir —para una construcción en 17 días— un total de 17.500 viajes de ida y vuelta para la pareja. Es decir, que cada animal debería efectuar 8.750 viajes. Ello significaría 541 viajes por día, 21 viajes por hora durante todas las horas del nictemerio. Cada viaje insu- miría, así, menos de 3 minutos (exactamente 2 minutos 51 segundos). ¿Cuándo, entonces se realizaría la propia labor de construcción? ¿Cuándo comería y dormiría el hornero? ¿Cuándo descansaría? Es un dato admitido que este pájaro sólo trabaja durante las horas del día con luz solar, aunque su actividad comienza muy temprano en la mañana. Es de señalar que en dicho último cálculo, sólo consideramos el pico como elemento de transporte de materiales.

De acuerdo con ese cálculo, parece, pues, bastante difícil aceptar tal lapso de 17 días para el acabado total del nido. Sin embargo así lo pudimos comprobar durante el último mes de setiembre en Carrasco, de modo fehaciente, con nuestro consiguiente asombro.

g) *Reconstrucción del nido en la naturaleza:* En la naturaleza pudimos observar en forma experimental el fenómeno de la reconstrucción del nido y de la selección específica de su emplazamiento.

En el Aeropuerto de Carrasco, en la zona donde se ha ubicado el radiotelescopio de la Facultad de Humanidades y Ciencias (Departamento de Astronomía), encontramos —en efecto— un predio en inmejorables condiciones para tal estudio.

A lo largo de un kilómetro, en dirección oeste-este, están colocadas, a igual altura, 16 antenas del radiotelescopio. Cada antena está sostenida sobre postes de madera que sitúan a todas a igual altura, y a una distancia de 60 metros entre una y otra. Entre antena y antena existen 5 postes interantenas. Todos ellos llegan también a igual altura y sirven de soporte a los hilos conductores tendidos.

Un
comen
los pos
dientes
los téc
compr
encarg
lizar e
en 8 ó
anulab
Pr
postes,
suporte
de igu
de los
yeron
Se
de los
28-30
perfect
los ho
en los
una ve
De
de los
razone
cercan
mos—
2)
50% d
un per
en 15
normal
rufus).
Es
de 4 a
El
suele s
al nido
Record
colocad
Pu
de tam
luchas
La
nes, pc

Un tiempo después de terminada tal instalación —sumamente delicada— comenzaron los horneros —abundantes en la zona— a emplazar sus nidos sobre los postes antenales y a englobar, con sus construcciones, los hilos correspondientes, todos ellos separados a distancias muy precisas. En un primer momento los técnicos retiraron los nidos sin prestar mayor atención al hecho, pero, al comprobar la reiteración del pájaro, el Sr. S. Codina, Ayudante de Investigación encargado de dicho radiotelescopio, nos lo comunicó. Planeamos entonces, analizar el problema, ya que cada nido, construido sobre postes con antenas (hasta en 8 de ellas), alteraba bastante su normal utilización, es decir, disminuía o anulaba en su totalidad, el registro del radiotelescopio.

Primera experiencia: Para tratar de evitar la construcción del nido en dichos postes, se pensó, primeramente, en ofrecer al pájaro, en la misma zona, otros soportes para sus nidos. Con tal fin se colocaron postes paralelos (sin hilos), de igual altura que los antenales, paralelamente a una distancia de 20 metros de los postes del radiotelescopio. Nunca —sin embargo— los horneros construyeron en esa fila de postes adicionales.

Segunda experiencia: Se individualizaron los nidos construidos en cada uno de los postes con antenas, y en los interantenales, durante varios meses. Cada 28-30 días se destruyeron los nidos construidos o semiconstruidos y se rasparon perfectamente los postes para evitar dejar rastros. En buen número de casos los horneros volvieron a construir, sobre todo en el mismo poste con antena o en los interantenales. Este aspecto será objeto de una comunicación posterior, una vez completada.

De lo antedicho se desprende claramente que existe una marcada selección de los postes para el emplazamiento del nido. El hornero elige al parecer por razones visuales, especialmente los que soportan las antenas, a veces los más cercanos a ellas, pero nunca los paralelos (sin hilos) colocados —como dijimos— con el fin de evitar la construcción sobre los postes antenales.

2) VIDA EN CAUTIVIDAD.— La adaptación a la cautividad es relativa: un 50% de los ejemplares mueren al cabo del segundo o tercer día; luego existe un período de mayor adaptación con algunas muertes sucesivas, que oscilaron en 15 días, y posteriormente una sobrevida prolongada (que no podemos decir normal, pues desconocemos los valores normales de vida de *Furnarius rufus*).

Esta sobrevida llegó en casos extremos, a casi un año, siendo generalmente de 4 a 5 meses.

El aspecto de los horneros en cautividad es normal. Sin embargo su muerte suele ser brusca, sin causa aparente. Pudimos comprobar a menudo el retorno al nido para morir, especialmente en pájaros con pocos días de cautividad. Recordamos que no se trata del nido propio, sino uno de la misma especie colocado en la pajarera.

Pueden vivir hasta 5 horneros juntos normalmente en la misma pajarera de tamaño mediano. No hemos comprobado, pues, en cautividad, problemas de luchas por el territorio.

La adaptación paulatina al cautiverio se aprecia, entre otras manifestaciones, por las acústicas. En efecto, a medida que aquél se prolonga, disminuyen

notablemente los sonidos emitidos por el pájaro en presencia del hombre. Al cabo de dos meses podíamos entrar en la pajarera y permanecer junto a ellos, sin que gritaran, aunque siempre escapando rápidamente como espantados.

Puestos en libertad, dentro del recinto donde está colocada la pajarera, se desplazan ampliamente, mientras se encuentran solos. En presencia del hombre, buscan refugio en la propia pajarera. Dejados en libertad después de muchos meses de cautividad, en condiciones de salir al exterior, huyen rápidamente y no regresan.

En lo que se refiere al comportamiento alimentario: como se sabe, en la naturaleza el hornero se alimenta exclusivamente fuera del nido. Si introducimos algún alimento, lo consume rápidamente: nunca —en efecto— observamos almacenamiento o acopio de alimentos u objetos, dentro del nido, ni en libertad ni en cautividad, fenómeno frecuente en muchas aves. Come granos e insectos diversos.

En cautividad se alimenta de alpiste, carne picada, agua, observándose su gran habilidad para cazar y comer presas vivas como cucarachas (*Periplaneta americana* y *Blatta orientalis*) y lombrices de tierra (*Lumbricus* sp.).

En lo que se refiere al acto de comer, lo hacen a pequeños bocados consecutivos. En pocas oportunidades se ha visto a dos horneros tironear de un mismo alimento; en ningún caso ello significó una lucha.

a) *Construcción en cautividad*: En esta condición no hemos logrado desencadenar el comportamiento constructivo, tan acentuado en esta especie durante su vida libre.

En efecto, puestos los pájaros en cautividad, en presencia de tierra húmeda, no construyen el nido. Adoptan si los ya construidos de su propia especie, entrando y saliendo del nido con toda facilidad, llegando a morir dentro del mismo.

También comprobamos que, colocando paja en la jaula, los horneros la ordenan y apisonan, pero sin iniciar una verdadera construcción.

3) *RELACIONES DEL NIDO CON LA VIVIENDA HUMANA*.— En la observación y análisis de los señalados 549 nidos de *Furnarius rufus rufus*, en la dirección meridiana sur-norte del país, siguiendo la línea férrea de Montevideo a Rivera, encontramos otro interesante fenómeno referente a su frecuencia con respecto a las poblaciones humanas.

A medida que nos alejamos de la zona sur del país, donde la frecuencia de nidos es pareja, al acercarnos al centro, cuando las poblaciones son cada vez más espaciadas, el número de nidos por kilómetro disminuye en forma notable, no existiendo a veces uno solo en el trayecto de muchos kilómetros, a pesar de que las líneas telefónicas siguen ofreciendo postes apropiados para la ubicación del nido.

III) *RESUMEN Y CONCLUSIONES*.— Esta comunicación resume dos años de investigaciones sobre el comportamiento del hornero de nuestro país, sobre la base de observaciones y experiencias en la naturaleza y en el laboratorio. He aquí los principales resultados:

1) *Una sola especie: Furnarius rufus rufus*, cuyo único nombre común vernáculo es: "hornero", parece existir en todo el país con una distribución bastante desigual.

2) En el *folklore literario rioplatense* se hacen frecuentes alusiones al hornero y a su nido, algunas exactas, la mayoría de carácter antropomórfico.

3) *Con respecto al nido:* a) *Emplazamiento* muy variable y a veces aberrante, con predominio del muy conocido sobre postes, árboles, etc.

b) *Estructura* uniforme en espiral y típica, externa e interna (dos cavidades, una entrada o vestíbulo y una cámara, ambas unidas por una abertura alta y estrecha). Vuelta de espira del recinto dextrorsa y sinistrorsa, según la colocación de la abertura con respecto a la cara frontal del nido. Caracteres del nido bastante uniformes, dimensiones y pesos bastante variables.

c) *Materiales empleados* para la construcción: únicamente tierra, agua y algunos vegetales (pastos).

d) *Orientación* de la abertura hacia los cuatro puntos cardinales.

e) *Epoca de construcción:* todos los meses del año. *Tiempo de construcción total:* mínimo 17 días.

f) *Cálculo aproximado del trabajo del pájaro* sobre la base de 17 días, 541 viajes por día para cada uno de los componentes de la pareja.

g) *Construcción en cautividad:* imposible de obtener.

h) *Reconstrucción en la naturaleza:* notable, rápida, casi siempre en los mismos lugares, al parecer por estímulos visuales significativos para el hornero.

4) *Vida en cautividad:* Posible hasta un año, pero con una adaptación variable según los ejemplares. Posibilidad de convivencia de varios horneros en la misma pajarera. Anulación progresiva del instinto de territorio. Alimentación normal. Instinto de libertad conservado después de varios meses, sin retorno. Utilización del nido ajeno, muerte habitual dentro del nido.

SUMMARY.—Summary of 2 years of investigations on the behavior of *Furnarius rufus rufus*, based on observations and experiences in the nature and laboratory.

1) *Only one species: Furnarius rufus rufus*, country name, "Hornero". Distribution in all the country.

2) a) *Location of the nest*, variable with predominance in posts, trees, etc.

b) *Uniform build in spiral and typical* (2 cavities, vestibule and chamber). Turn of spire of the recinct dextrorse and sinistrorse with respect to the frontal face of the nest.

c) *Materials used:* humid soil, grass, feathers, etc.

d) *Orientation of the opening* to the four cardinal points.

e) *Epoch and time of construction:* all the year, minimum 17 days.

f) *Reconstruction in the nature after the destruction of the nest:* notable, rapid, almost always in the same places, apparently by visual stimulus significant for the "Hornero".

3) *Captivity Life:* with variable adaptation up to one year. Possible living together of several birds. Progressive abrogation of the territorial instinct. Normal alimentation. Preserve liberty instinct. Usual death, inside the nest.

IV) BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ, T.—Exterior y biología de las aves uruguayas. Ed. Florensa, Montevideo, 1934, 66 pp.
2. ALVAREZ, T.—An. Mus. Hist. Nat. Mont., 2ª serie, 1955, IV: N° 1, 50 pp.
3. ARREDONDO, H.—Ornitología del Uruguay. Ed. Lugo, Montevideo, 1953, 387 pp.
4. TREMOLERAS, J.—Hornero, 1920-22, 2: 10-25.
5. DEVINCENZI, G.—An. Mus. Hist. Nat. Mont., 1926-28, 2: 67-111.
6. CUELLO, J. y GERZENSTEIN, E.—Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Mont., 1962, 6 (93): 1-191.
7. HELLMAYR, Ch. y CORY, Ch.—Field Museum Nat. Hist. Chicago, Publ. 234, Zool. Serie XIII, Part IV, 1929, 390 pp., Pl. 4.
8. D'ORBIGNY, A.—Voyage dans l'Amérique Méridionale. VI, 3ème. partie, Ed. Bertrand, Paris, 1835-44, 395 pp.
9. TALICE, R. V. y LAFFITTE DE MOSERA, S.—Fac. Hum. Cien., 1963, 21: 75-92.
10. SUPPARO, A.—El Hornero, p. 729. Exp. Poesía Uruguaya desde su origen hasta 1940, por J. Casal. Ed. Claridad, Montevideo, 1940, 767 pp.
11. Sin autor.—Hornero, 1944, 8: 578.
12. Sin autor.—(H. S. G.). Hornero, 1938-40, 7: 40-41.
13. DOELLO-JURADO, M.—Hornero, 1917-19, 1: 273-284.
14. DAGUERRE, J.—Hornero, 1920-22, 2: 228-230.
15. HUDSON, W.—Birds of La Plata. Vol. I. Ed. Dent, Nueva York, 1920, 244 pp.
16. TALICE, R. V. y LAFFITTE DE MOSERA, S.—Fac. Hum. Cien., 1963, 21: 119-131
17. SERIE, P.—Hornero, 1917-19, 1: 290-291.
18. Sin autor.—Hornero, 1920-22, 2: 227.
19. MENEGAUX, A.—Mus. Hist. Nat. Paris, 1909, 6-12.

de
y

IN/
rana cu
laridad
calcio y
de rana
en inve
nuestro,
sin asce
Los
19)
sio y co
poco co
estudiad
29)
iones ci
39)

Bufo, er
la pobl
mostrar
puestas
docentes
(o Ring

MA
venían t
nes). F
vadas a
360 gr.

1. 5
de Medie
sesión de

Estudio en las diferentes estaciones
de algunos iones plasmáticos del *Bufo Arenarum* Hensel
y primeros ensayos con una solución salina, Ringer-Bufo¹

S. S. FABIUS, H. MAZZELLA, S. BIDEGAIN y C. ROMERO

INTRODUCCION.—De Boer (1) observó que perfundiendo el corazón de rana europea con líquido de Ringer, en el verano, se producía el paro o irregularidades del funcionamiento cardíaco, los cuales desaparecían al aumentar el calcio y disminuir el potasio del medio perfusor. Waard (2) halló en el suero de ranas de verano, una concentración de calcio casi doble de la de las ranas en hibernación. R. Gerschman (3) comprobó que la calcemia en el sapo hembra nuestro, era más alta que en el macho, y se elevaba de julio a diciembre, pero sin ascender a más de 20 ó 30% del nivel invernal.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1º) La determinación de los niveles plasmáticos de los iones sodio, potasio y calcio en poblaciones de *Bufo Arenarum* H. recién capturados, dado el poco conocimiento que hay sobre algunos valores humorales de una especie muy estudiada en nuestro medio.

2º) Valoración de la repercusión del cautiverio del mismo *Bufo* sobre los iones citados.

3º) Preparación de un nuevo líquido de Ringer, que llamaremos Ringer-Bufo, en base a la natremia, potasemia y calcemia, promedialmente hallada en la población de sapos estudiados. Este Ringer nos parece justificarle, como mostraremos, dadas las irregularidades del funcionamiento cardíaco y las respuestas poco satisfactorias (y hasta contradictorias) observadas por algunos docentes, al estudiar el corazón del sapo perfundido con el Ringer "clásico" (o Ringer-Rana).

MATERIAL Y METODOS.—Utilizamos *Bufo Arenarum* H. hembras. Provenían todas del mismo lugar, localidad de La Paz (Departamento de Canelones). Fueron estudiadas en un plazo no mayor de tres días luego de ser llevadas a la Facultad de Medicina. El peso de cada ejemplar osciló entre 65 y 360 gr. Se estudiaron lotes de 20 sapos por mes; el trabajo comenzó en junio

1. Trabajo realizado en los Departamentos de Fisiología y de Biofísica, Facultad de Medicina y Laboratorio Central del Hospital Pereira Rossell, M. S. P. Presentado en sesión de homenaje al Prof. F. A. Sáez, el 31 de agosto de 1964.

de 1963 y se terminó en mayo de 1964. Fueron examinados en total 220 sapos recién capturados y 40 en cautiverio, distribuidos estos últimos en dos lotes: uno en noviembre de 1963 y el otro en mayo de 1964.

Después de inmovilización del animal por destrucción de los centros nerviosos, se procedía así:

Disección y exteriorización del corazón e individualización de las dos aortas. Previa inyección intracardiaca de 0,15 c.c. de heparina disuelta al 0,2% en NaCl al 9‰ y lapso de espera de 4 a 5 minutos (para que la sangre quedara incoagulable), se recogía ésta mediante un catéter introducido en una de las dos aortas; la extracción era favorecida por el latido cardiaco y el vis a tergo.

La cantidad de sangre extraída varió entre 4 y 11 c.c.; se obtuvo el plasma por centrifugación inmediata y rápida a 3.000 rev./minuto durante 15 minutos y se realizaron las determinaciones bioquímicas siguientes: dosificación de sodio y potasio por fotometría de llama; de calcio por el método complexométrico. Los valores obtenidos fueron tabulados y estudiados estadísticamente. Se determinó además, el pH de la sangre de un lote de 15 sapos hembra, en condiciones anaerobias, por el micrométodo de Beckman, operación realizada por el Dr. I. Korc.

Con los valores promediales de los iones sodio, potasio y calcio del plasma de animales de junio se preparó un nuevo Ringer, y se estudió la actividad cardiaca perfundiendo el corazón de *Bufo* con esta solución y con aquélla, la "clásica", de Ringer; esto se hizo en el verano de 1963 y en el otoño e invierno de 1964. Para este estudio se siguieron dos métodos:

1) Corazón aislado y perfundido con las dos soluciones Ringer oxigenadas, empleadas sucesivamente en el órgano perfundido según Straub. Se hacía registro de la sístole ventricular mediante palanca isotónica en papel ahumado. La presión-carga de perfusión del ventrículo fue de 6 a 7 cm.

2) Corazón perfundido "in situ", según método de Kronecker. Se sustituía el retorno venoso al corazón por los diferentes líquidos de Ringer, de acuerdo al proceder siguiente: los pedículos venosos (cavas superior e inferior) y pulmonares, así como la aorta derecha, eran ligados. Se introducía por la aorta izquierda una cánula de vidrio conectada con un tubo en T. Un extremo de la rama horizontal de dicho tubo, se unía con el catéter de un electromanómetro y éste al Polígrafo Sanborn. La rama vertical del tubo en T era continuada por un tubo de goma en el que podía modificarse el diámetro a voluntad, y por lo tanto, el gasto circulatorio, mediante llave de paso que representaba así la "resistencia periférica". La solución de Ringer ensayada era llevada a las aurículas por una cánula introducida en la cava inferior. De este modo, el corazón era perfundido, sucesivamente, con los Ringer de distinta composición, contenidos en frascos de Mariotte, y su aflujo a la aurícula era constante. La solución salina salía del ventrículo a través de la única aorta permeable, de allí al primer segmento de la rama horizontal del tubo en T, pasando luego a la rama vertical y finalmente al exterior.

Con este método el corazón era "lavado" en forma continua y, para cada caso, se mantenía constante el aflujo auricular y la "resistencia periférica" aórtica. Se registraban la presión arterial, al inicio de la aorta, y la frecuencia

cardiaca.
ziones per
y 26° C.
de perfus
Se di
man y ta

RESI
meses de
valores d
y agosto, L
para el p
En e
Por ese

Junio ...
Julio ...
Agosto ...
Setiembre ...
Octubre ...
Noviembre ...
Diciembre ...
Enero ...
Febrero ...
Marzo ...
Abril ...
Mayo ...
Población

Pi
me
En
Se

total 220 sapos
s en dos lotes:

os centros ner-

e las dos aortas.
l 0,2% en NaCl
uedara incoagu-
e las dos aortas;
ergo.

btuvo el plasma
nte 15 minutos
ificación de so-
lo complexomé-
stadísticamente.
pos hembra, en
ación realizada

lcio del plasma
lió la actividad
con aquélla, la
tóno e invierno

Ringer oxigena-
raub. Se hacía
papel ahumado.

cker. Se susti-
de Ringer, de
rior e inferior)
roducía por la
T. Un extremo
n electromanó-
T era continua-
tro a voluntad.
e representaba
ra llevada a las
este modo, el
ta composición,
era constante.
orta permeable,
pasando luego

na y, para cada
periférica" aór-
y la frecuencia

cardíaca. Se estudiaron los efectos de las soluciones Ringer ensayadas en cora-
zones perfundidos durante dos horas. La temperatura ambiental osciló entre 24°
y 26° C. en verano y de 14° a 16° C. en invierno. La temperatura del líquido
de perfusión varió entre 26° y 27° C. en verano y de 13° a 14° C. en invierno.

Se determinó el pH de las soluciones Ringer por el micrométodo de Beck-
man y también la viscosidad de dichas soluciones por el viscosímetro de Ostwald.

RESULTADOS.—Valores obtenidos de los distintos iones en los distintos
meses del año, expresados en mEq/lit. de plasma (fig. 1). Se destacan: los
valores de concentración de potasio y calcio durante los meses de junio, julio
y agosto, no difieren significativamente de los meses de diciembre, enero y fe-
brero. Los valores de verano eran 6,5% y 6,1% más altos que los de invierno,
para el potasio y el calcio, respectivamente.

En el caso del sodio, la tendencia fue ascendente a lo largo de todo el año.
Por ese motivo no se compararon los valores de invierno con los de verano.

	Potasio		Sodio		Calcio		Relación Potasio/ Calcio
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	
Junio	3,2 ± 0,35		126,6 ± 7,16		5,6 ± 0,66		0,57
Julio	3,2 ± 0,56		127,5 ± 8,31		5,5 ± 0,56		0,58
Agosto	3,4 ± 0,41		130,1 ± 6,39		5,9 ± 0,50		0,58
Setiembre	—	—	—	—	—	—	—
Octubre	3,4 ± 0,44		131,9 ± 6,55		5,8 ± 0,41		0,59
Noviembre	3,3 ± 0,30		130,1 ± 5,57		5,8 ± 0,71		0,57
Diciembre	3,2 ± 0,24		134,6 ± 4,59		5,9 ± 0,62		0,54
Enero	3,7 ± 0,40		130,9 ± 3,05		6,0 ± 0,57		0,62
Febrero	3,6 ± 0,39		133,1 ± 4,78		6,2 ± 0,54		0,59
Marzo	3,3 ± 0,37		133,2 ± 4,94		5,8 ± 0,69		0,57
Abril	3,4 ± 0,47		131,8 ± 4,38		5,7 ± 0,44		0,60
Mayo	3,5 ± 0,30		135,7 ± 4,54		5,7 ± 0,28		0,61
Población general	3,4 ± 0,40		131,3 ± 6,14		5,8 ± 0,56		0,59

Fig. 1.—Concentración de los distintos cationes, en m.Eq/lit., del plasma, en los
meses del año: \bar{x} expresa el valor promedial mensual y s su desvío standard.
En población general, se expresa el valor promedial anual y su desvío standard.
Se expone la relación de las concentraciones de los iones potasio y calcio.

Valor promedial general anual y su desvío standard (véase fig. 1). No hay diferencias significativas entre las concentraciones de sodio, potasio y calcio de los dos lotes de animales dejados en cautiverio durante el mes de noviembre y mayo:

—entre octubre y noviembre (1963) con respecto a las concentraciones de sapos recién capturados en octubre y noviembre;

—entre mayo y junio (1964) con respecto a las concentraciones de los recién capturados entonces.

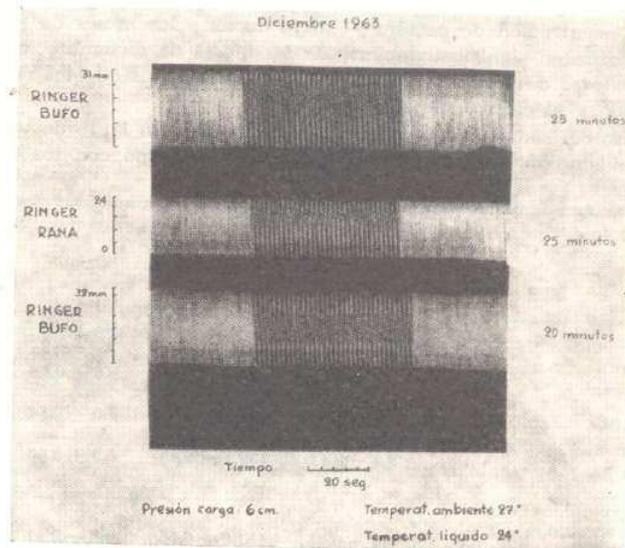


Fig. 2.—Registro de la sístole ventricular del corazón de sapo perfundido según técnica de Straub. Ritmo sinusal espontáneo. —Arriba: corazón perfundido con Ringer-Bufo a los 25 minutos de perfusión. —En segundo lugar: el mismo corazón perfundido con Ringer-Rana en el mismo lapso. —Abajo: el mismo preparado perfundido con Ringer-Bufo, a los 20 minutos de registro. Obsérvese la mayor amplitud de la sístole ventricular con este Ringer.

Nuestras dosificaciones pusieron además en evidencia que el Ringer (clásico) usado estaba compuesto (expresando dichas concentraciones en mEq/lt.), de Na: 111; K: 1.87; Ca: 3.17. Por otra parte el Ringer-Bufo experimentado por nosotros, tenía la composición siguiente: Na, 126; K, 3.2; Ca, 5.6.

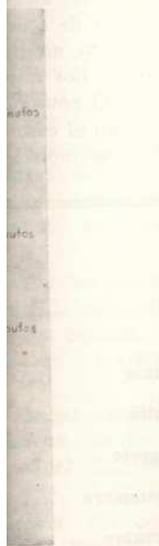
Los valores anuales promedialmente hallados de Ringer-Bufo, fueron: Na, 131.3; K, 3.4; Ca, 5.8.

El valor del pH del plasma, determinado, según técnica indicada, osciló entre 7.18 y 7.42. Los de las soluciones de Ringer usadas ("clásico" y Bufo), luego de la adición de bicarbonato de sodio (200 mgr./lt.) estaban entre 7.87 y 7.88.

fig. 1). No hay
stasio y calcio
es de noviem-

centraciones de

ones de los re-



perfundido
corazón per-
fundo lugar:
o. —Abajo:
os de regis-
este Ringer.

el Ringer (clási-
es en mEq/lit.),
o experimentado
a, 5.6.

ufo, fueron: Na,

indicada, osciló
clásico" y Bufo),
taban entre 7.87

Los valores de viscosidad relativa de las soluciones ensayadas, fueron de 1, es decir, no difieren de los valores de viscosidad del agua (viscosidad absoluta a 20° C., prácticamente igual a 1 centipoise).

En el estudio comparativo de la actividad ventricular de Bufo, frente a los dos líquidos de Ringer, "clásico" y Bufo, se observó:

A) Corazón aislado (cánula de Straub): Mayor amplitud de sístole con el Ringer-Bufo, aun cuando la frecuencia cardíaca permanecía constante. Al cambiarse el Ringer "clásico" por nuestro Ringer-Bufo, se repetía el aumento del inotropismo (véase fig. 2).

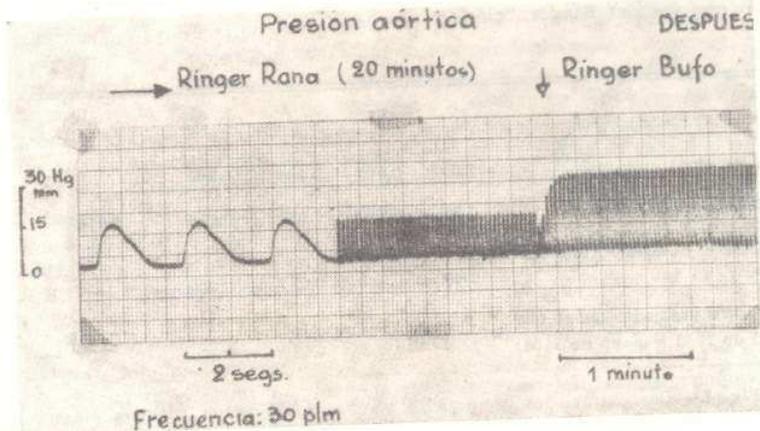


Fig. 3.— Registro de presión aórtica del Bufo Arenarum, según técnica modificada de aquella de Kronecker. Ritmo sinusal espontáneo. Después de perfundir con Ringer-Rana (20 minutos), la presión arterial aumenta al perfundirse con Ringer-Bufo.

B) Corazón perfundido "in situ": Usando el Ringer-Bufo, la presión aórtica era más alta que con la clásica, sobre todo a expensas de la presión sistólica. La frecuencia cardíaca no se modificó con los distintos líquidos ensayados (véase fig. 3).

En resumen: En un total de 36 corazones de Bufo perfundidos —"in situ" e "in vitro"— con las dos soluciones salinas citadas durante dos horas de experimentación, 32 mostraron un aumento del inotropismo ventricular con el Ringer-Bufo, 3 mostraron arritmias desde el comienzo con ambas soluciones y en 1 caso no se observó diferencia del inotropismo.

DISCUSION.— En primer lugar, llama la atención que la relación potasio-calcio para el Ringer "clásico", Ringer-Bufo y el Ringer anual sea prácticamente igual (0.59, 0.57, 0.59 respectivamente). Esta relación variaba en forma insignificante en los distintos meses del año.

Los estudios estadísticos mostraron que:

1) No hubo diferencias significativas entre los promedios de junio (usado en la preparación del Ringer-Bufo de junio) con respecto a los de la población global.

2) Considerando los valores obtenidos, el del sodio del Ringer "clásico" estaba alejado más de 3 desvíos standard con respecto a la media; el del potasio, 3.8 desvíos; el del calcio, 4.7 desvíos. La relación potasio-calcio era similar a la observada en la población de sapos estudiados.

3) Comparando las distintas concentraciones de la primera solución salina descrita por Ringer, solamente la de ClNa es similar a la nuestra (7.50 gr. %/lt.), no así la del potasio y del calcio (0.075 y 0.100 gr. %/lt.), mucho más bajas incluso que las del Ringer "clásico" (véase fig. 4).

	ClNa	ClK	Cl ₂ Ca	CO ₃ HNa	PO ₄ H ₂ Na	pH
Ringer original	7.50	0.075	0.100	0.100	—	—
Ringer-Rana según Houssay ...	6.50	0.140	0.120	0.200	0.010	7.87
Ringer-Bufo ensayado (junio de 1963)	7.40	0.238	0.211	0.200	—	7.87
Ringer-Bufo promedio anual (junio de 1963 a mayo de 1964)	7.68	0.253	0.219	0.200	—	7.88

Fig. 4.— Concentraciones comparadas en grs./lt. de varios cationes plasmáticos, bajo forma de cloruro, así como del bicarbonato de sodio, fosfato monobásico de sodio y del pH de los distintos tipos de Ringer. El llamado Ringer "original" es la solución salina preparada por vez primera por S. Ringer (1895); no es, pues, el Ringer-Rana o "clásico".

El pH de las soluciones Ringer con las que trabajamos (Ringer "clásico" y Ringer-Bufo), era más elevado que las que hallamos en el plasma.

De acuerdo a nuestro estudio, los dos Ringer ("clásico" y Bufo) resultan adecuados para los experimentos de perfusión, tanto "in situ" como "in vitro"; de hecho nuestras experiencias han mostrado sólo diferencias con respecto al motropismo cardíaco, que fue mayor con el Ringer-Bufo. Aparte de esto, creemos conveniente la utilización de este Ringer, dado que su preparación resultó de la determinación de las distintas concentraciones de los cationes plasmáticos señaladas y, por ende, esto representa una mejor adecuación del líquido de perfusión al medio biológico. Es posible también emplear dicha solución en experiencias de perfusión de corazones de sapos en cautiverio, breve o no muy prolongado (hasta un mes), dado que el mismo no alteró los niveles catiónicos plasmáticos.

De acuerdo a las investigaciones originales de Ringer (4) y de Loeb (5), es sabido que no importan mucho las concentraciones absolutas de Na, K, Ca

de junio (usado
de la pobla-

ringer "clásico"
dia; el del po-
calcio era simi-

solución salina
7.50 gr. % /lt.),
cho más bajas

H_2Na	pH
—	—
0.010	7.87
—	7.87
—	7.88

s plasmá-
i, fosfato
llamado
r S. Rin-

nger "clásico"
ma.

bufo) resultan
no "in vitro";
n respecto al
de esto, cree-
ración resultó
es plasmáticos
guido de per-
ción en expe-
no muy pro-
les catiónicos

de Loeb (5),
e Na, K, Ca

del medio perfusor cardiaco, sino fundamentalmente la relación K/Ca. Ya hemos visto que dichas relaciones en el Ringer "clásico" y Ringer-Bufo son prácticamente iguales, lo cual justificaría la utilidad de ambos líquidos en la perfusión mencionada. Sin embargo, no creemos que la igualdad de esa relación explique las diferencias de inotropismo arriba señaladas. Parecería, en cambio, que el mayor inotropismo podría deberse a la mayor concentración absoluta de calcio en el Ringer-Bufo ensayado.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.— Se realizaron determinaciones de las concentraciones de los iones sodio, potasio y calcio del plasma de 220 sapos hembras durante el curso de un año (junio 1963 a mayo 1964). No hubo diferencias significativas para el potasio y el calcio en invierno con respecto al verano. Con respecto al sodio, su concentración fue ascendente a lo largo del año, lo cual imposibilita, por ahora, su estudio estadístico.

Se analizó la repercusión de un mes de cautiverio sobre aquellos niveles catiónicos plasmáticos, comprobándose la ausencia de modificaciones de éstos.

En base a las concentraciones halladas en los principales cationes del plasma de *Bufo* se preparó un nuevo Ringer, que llamamos Ringer-Bufo. Con él, se efectuaron experiencias de perfusión del corazón de *Bufo* en las distintas estaciones del año, "in vitro" por el método de Straub, y de perfusión "in situ" mediante lavado continuo. Por estas técnicas se comprobó mayor inotropismo ventricular del corazón perfundido con Ringer-Bufo que con el "clásico" (o Ringer-Rana).

Se piensa que la mayor energía sistólica ventricular obtenida por perfusión con Ringer-Bufo, probablemente se deba a la mayor concentración de calcio, ya que se mantuvo igual la relación potasio-calcio en las soluciones Ringer ensayadas.

SUMMARY.— The sodium, potassium and calcium ionic concentration in the plasma of 220 female toad during a year (June 1963 - May 1964) were determined. There were no significant differences for the potassium and sodium in winter in relation to summer. In the case of the sodium, its concentration was increasing all through the year, which made it impossible, up to this moment, to study it statistically.

The influence of a month captivity over the plasmatic cationic levels was studied, proving its lack of modifications.

Based on the concentrations found in the principal cations of the plasma of the *Bufo*, a new Ringer was prepared, which we call Ringer-Bufo. With this Ringer experiments of heart perfusion —during different seasons of the year— "in vitro" by Straub's method and "in situ" by means of continuous washing, were done. By these techniques it was proved an increased ventricular inotropism with the Ringer-Bufo than with the "classical" (or Ringer-Frog).

Perhaps the bigger ventricular systolic energy obtained by perfusion with Ringer-Bufo is due to its higher concentration of calcium, because the relationship potassium-calcium of the Ringer solutions tried was the same.

Agradecimiento: Al Dr. I. Kore por la determinación del pH, realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, así como también a la Dra. I. Núñez por su asesoramiento en la parte estadística de este trabajo; al Br. R. Medina y al auxiliar técnico Sr. D. García, por la colaboración prestada en el desarrollo del mismo.

BIBLIOGRAFIA

1. BOER, S. de.—Arch. neerl. Physiol., 1918, 2: 352.
2. WAARD. (Citado en 3.)
3. GERSCHMAN, R.—Rev. Soc. Arg. de Biología, 1943, 19: 170.
4. RINGER, S.—J. Physiol., 1895, 4: 29
5. LOEB. (Citado en 6.)
6. ROGER, H. G. et BINET, L.—Traité de Physiologie normale et pathologique. Tome VI: Circulation. Masson et Cie., 1932.
7. HOUSSAY, A. B. y colab.—Fisiología Humana, Librería El Ateneo, Buenos Aires, 1954.

el Depar-
L. Núñez
lina y al
el mismo.

Tome VI:

nos Aires,

Estroncio-90 en leches uruguayas¹

C. BENECH y C. M. FRANCHI

INTRODUCCION.— El monitoreo de contaminantes radiactivos en alimentos está siendo realizado corrientemente por muchos laboratorios en todo el mundo. Se presta especial atención a los nucleidos producidos por reacciones de fisión en las pruebas de armas atómicas en la atmósfera.

La dispersión de restos radiactivos a causa del "fall-out" mundial ha hecho que el problema de la contaminación radiactiva de las cadenas alimenticias del hombre y de los animales, sea hoy una preocupación importante de las autoridades sanitarias de todas las naciones.

Entre los contaminantes de importancia biológica, el grupo de los llamados "buscadores del hueso" se considera el más peligroso, desde que estos nucleidos siguen caminos metabólicos comparables a los del calcio y se incorporan en la matriz ósea, donde actúan como fuentes de irradiación, difícilmente removibles, sobre el sistema hematopoyético y el tejido óseo. La importancia del daño radiobiológico depende de varios factores, que incluyen el tipo y alcance de la radiación, la cantidad de nucleido depositado y su media-vida efectiva.

El estroncio-90 (Sr^{90}), que se considera un típico "buscador del hueso" y tal vez el más peligroso de los radionucleidos artificialmente producidos, ha sido extensivamente estudiado bajo este aspecto. Se produce con un rendimiento bastante alto (5,3%) en las reacciones de fisión (11) y decae por emisión de una partícula beta negativa de 0,61 Mev, con una media-vida de 28 años, a Itrio-90 (Y^{90}) (17).

Su media-vida biológica en el hueso ha sido estimada en 200 días (16). Se ha postulado que el radioestroncio depositado en el hueso actúa como agente leucemogénico y se han presentado pruebas sustanciales de su papel activo en la inducción de tumores malignos óseos (7). Aparte de su similitud general (12), se han señalado e investigado diferencias en los comportamientos metabólicos del Sr y del Ca. Los sistemas biológicos discriminan entre ambos elementos, favoreciendo la utilización de Ca. Entre los mecanismos responsables por ello, Harrison y otros (10) han demostrado en el intestino humano la absorción selectiva de Ca sobre el Sr por un factor de 2 a 1. Los mismos autores hallaron que la depuración renal de Sr en el hombre es por lo menos tres veces mayor que la de Ca.

1. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Biofísica. Montevideo, Uruguay.

Comar y Wasserman (2) estudiaron la discriminación Sr/Ca en ratas y vacunos y otros estudios similares en el hombre fueron realizados por Comar y otros (4). Comar y colaboradores (3) propusieron una expresión para el factor global de discriminación —de dieta a hueso— que denominaron "tasa observada"

$$\text{(Observed Ratio; O. R.), de acuerdo a la ecuación: O. R.} = \frac{\text{Sr}^{90}/\text{Ca hueso}}{\text{Sr}^{90}/\text{Ca dieta}}$$

Para el hombre, el O. R. se ha estimado (8) en aproximadamente 0,25. Este valor está en razonable acuerdo con las cifras de O. R. de 0,27 a 0,33 determinadas por Harrison y otros (9) para la rata. Más recientemente, Loutit y otros (13), tomando en cuenta el hecho de que la leche de vaca es la principal fuente de calcio en la dieta de los niños, usaron a los mismos efectos la relación $\frac{\text{Sr}^{90}/\text{Ca hueso}}{\text{Sr}^{90}/\text{Ca leche}}$, que denominaron "factor hueso-leche".

Estos autores hallaron valores del "factor hueso-leche" comprendidos entre 0,22 y 0,32. Estas cifras están de acuerdo con los valores aceptados del O. R. y justifican la adopción de un valor promedio de 0,25-0,30 como base para una predicción aproximada del contenido de Sr⁹⁰ del hueso a partir de los datos suministrados por los exámenes de leche. Esto es especialmente aplicable en las áreas donde la principal fuente de calcio para la población es la leche, como es el caso de este país, donde un 82% del Ca de la dieta proviene de la leche y productos lácteos (8).

Muchas naciones mantienen programas de frecuente monitoreo de Sr⁹⁰ en la leche. En Sud América, Penna-Franca y otros (16), Penna-Franca (15) en Brasil y Beninson y otros (1) en Argentina, han publicado datos sobre contaminación radiactiva en leche.

En general, la información obtenible sobre contaminación por Sr⁹⁰ de productos alimenticios en Latino América es escasa, y no existía para el Uruguay cuando nuestras primeras determinaciones fueron realizadas. A fin de aportar algunos datos numéricos más para futuros estudios radioecológicos en este país, se ha efectuado una corta serie de determinaciones cuyos resultados se presentan. Algunas de las primeras determinaciones fueron comunicadas al Octavo Congreso Latino Americano de Química.

MATERIAL Y METODOS.— En todos los análisis se utilizó leche entera en polvo, tal como se libera al consumo público. Algunas muestras fueron cedidas por el fabricante y otras obtenidas en el comercio. La leche en polvo es producida mediante proceso "spray" a partir de la leche pasteurizada del día que se distribuye para consumo. Como leches provenientes de muchos productores y áreas lecheras se mezclan previamente al proceso de pasteurización, las muestras pueden considerarse representativas del producto suministrado a la población de Montevideo.

En cada análisis se emplearon de 125 a 470 gramos de leche en polvo. La separación radioquímica del Sr⁹⁰ se efectuó de acuerdo al procedimiento standard del Health and Safety Laboratory, U. S. A. E. C. (19) con modificaciones menores. Las determinaciones del contenido de Ca fueron hechas por mé-

en ratas y vapor Comar y para el factor "observada" Ca hueso

Ca dieta

ente 0,25. Este a 0,33 detergente, Loutit y es la principal los la relación

rendidos entre ados del O. R. base para una r de los datos aplicable en las a leche, como ne de la leche

o de Sr-90 en ranca (15) en s sobre conta-

Sr-90 de proa el Uruguay fin de aportar s en este país, dos se presen- das al Octavo

5 Lche entera ras fueron ce- ne en polvo es rizada del día muchos produc- pasteurización, ministrado a la

che en polvo. procedimiento en modificacio- echas por mé-

todo complexométrico con etilendiaminotetraacetato disódico (Titriplex III, Merck). Se efectuaron varias determinaciones de calcio para cada muestra, obteniéndose en todos los casos desvíos standard menores del 6% para cada serie.

El nucleido hija Y-90 se contó con un tubo G. M. de bajo conteo de fondo (tipo EHM2 de G. E. Co., Inglaterra). Se obtuvieron conteos del fondo y de la muestra durante períodos alternados de 24 horas, acumulando más de 10.000 cuentas cada vez, hasta que la actividad del Y-90 se reducía al nivel del fondo. El fondo fue contado sobre portamuestras cargados con portador de Itrio preparado en la misma forma que las muestras activas. La instalación de conteo fue calibrada mediante un standard de carbonato de Sr-90 suministrado por el Health and Safety Laboratory, Analytical Division, U. S. A. E. C.

Las actividades de Sr-90 fueron corregidas compensando la disminución de actividad desde la fecha de ordeño. El rendimiento de las separaciones radioquímicas fue determinado por métodos gravimétricos.

RESULTADOS.— Los resultados están expuestos en la tabla I. Los niveles de Sr-90 están expresados como "Unidades Sunshine" (Sunshine Units, S. U.) en relación al contenido de Ca, de acuerdo a la ecuación: $S. U. = \frac{\text{picocuries Sr-90}}{\text{gramos Ca}}$.

Los desvíos standard que se indican incluyen la estadística de las muestras problema y las de calibración.

Tabla I

DETERMINACION DE Sr-90 EN LECHE EN POLVO

Fecha	Peso de la muestra en gramos	Ca, gramos por 100 grs. de polvo	Unidades Sunshine (S. U.)	Desvío Standard S. U.	Desvío Standard %
Setiembre 1960	200	1.083	2.57	0.28	11
Setiembre 1960	125	1.341	2.40	0.33	14
Octubre 1960	150	1.245	2.38	0.38	16
Marzo 1962	469	0.773	1.68	0.16	10
Julio 1962	250	0.901	1.68	0.18	11
Setiembre 1962	216	0.942	1.86	0.44	24
Noviembre 1962	206	0.928	1.76	0.22	12.7

DISCUSION.— Los niveles de Sr-⁹⁰ hallados corresponden razonablemente con los valores comparables determinados por Beninson y otros (1) en leche de Buenos Aires. Es de esperar una cierta correspondencia entre los valores de Montevideo y los de Buenos Aires, debido a la proximidad geográfica de ambas ciudades y la similitud de factores climáticos que prevalecen en ambas localidades.

Las cifras obtenidas son definitivamente más bajas que las publicadas para el Hemisferio Norte. En el Reino Unido se ha hallado una media de 5,97 S. U. para 1960, mientras que la media uruguaya para el mismo año es de 2,38 S. U. En los Estados Unidos, se han encontrado valores hasta de 20 S. U. para el mismo período, aunque los valores para diferentes localidades muestran amplias variaciones. En Italia, De Bortoli y otros (6) publicaron valores promedio de 36 S. U. para 1960-1961 y 24 S. U. para 1962. Las fluctuaciones en la tasa de deposición de restos radiactivos debidas al fall-out regional y al latitudinal deben ser tomadas en cuenta al comparar valores de ambos hemisferios y son obviamente responsables de los valores anormalmente altos encontrados en algunas localidades.

Las cifras encontradas demuestran que la leche uruguaya tiene un contenido relativamente bajo en Sr-⁹⁰. Es al presente muy difícil predecir el contenido de Sr-⁹⁰ del hueso en la población sobre la base de los escasos datos disponibles.

Algunos factores importantes que no pueden ser evaluados en este momento son: a) diferencias en la composición de la dieta para grupos grandes de la población; b) variaciones muy amplias en el contenido de Ca del suelo. El suelo uruguayo es generalmente pobre en calcio —son corrientes valores del índice de Spurway de alrededor de 100 para el Ca soluble y de 1.100 para el Ca reserva en las áreas productoras de leche, de acuerdo a análisis practicados por la División de Suelos y Fertilizantes del M. G. A.— y es posible que comunidades que dependen de la producción de áreas restringidas tengan ofertas de Ca muy diferentes de la media nacional; c) inclusión en la dieta de cantidades sustanciales de alimentos importados, con una diferente relación Sr-⁹⁰/Ca. El Uruguay importa ocasionalmente considerables cantidades de trigo en bruto, que es elaborado y consumido principalmente como pan. Una ingestión importante de productos alimenticios extranjeros en la dieta fue experimentada en ocasión de las inundaciones de 1958, cuando grandes embarques de trigo y leche en polvo fueron suministradas para consumo público por instituciones extranjeras de beneficencia públicas y privadas. Algunas muestras de leche en polvo de esa procedencia, presumiblemente manufacturada alrededor de abril de 1958, fueron analizadas en este Laboratorio, encontrándose niveles de Sr-⁹⁰ de $3,36 \pm 0,30$ S. U. y $3,85 \pm 0,36$ S. U.

Teniendo en cuenta estos factores, el contenido en Sr-⁹⁰ (1962) de los huesos de niños uruguayos, que podría ser calculado provisoriamente en la vecindad de 0,5 S. U., debe ser considerado sólo como una aproximación sujeta a confirmación o corrección mediante investigaciones futuras.

Los niveles de Sr-⁹⁰ en leche hallados hasta el momento caen muy por debajo del límite de 40 S. U. considerado por Tilley (18) como requiriendo

"consideración inmediata", y dentro de los valores inferiores del Rango I de los Standards de Protección Contra la Radiación establecidos por el Federal Radiation Council, U. S. A. (5). De acuerdo a las directivas adoptadas por este organismo, los niveles aquí expuestos no son potencialmente peligrosos, y mientras se mantengan estables, se considera que el muestreo infrecuente es la sola medida necesaria para mantener la situación radiobiológica bajo adecuado control.

RESUMEN.— Se determinaron los niveles de Estroncio-90 en leche en polvo de consumo público en Montevideo. Fue usado el procedimiento de separación radioquímica standard del U. S. A. E. C. Health and Safety Laboratory, y las muestras (Y-90) se contaron con tubo G. M. calibrado con muestra standard de la U. S. A. E. C. Se hallaron niveles desde $2,38 \pm 0,38$ a $2,57 \pm 0,28$ para 1960 y desde $1,68 \pm 0,18$ a $1,86 \pm 0,44$ picocuries de Sr-⁹⁰ por gramo de calcio para 1962. Se comparan estas cifras con las de Buenos Aires y las del Hemisferio Norte y se discute su valor en la predicción de los niveles locales de Sr-⁹⁰ en huesos humanos.

SUMMARY.— Strontium-90 levels in powdered milk for public consumption in Montevideo were determined. The radiochemical separation standard procedure of the U. S. A. E. C. Health and Safety Laboratory was used. The Y-90 daughter was counted with a low-background G. M. tube calibrated against an U. S. A. E. C. standard sample. Levels from 2.38 ± 0.38 to 2.57 ± 0.28 picocuries of Sr-⁹⁰ gram of Ca for 1960 and from 1.68 ± 0.18 to 1.86 ± 0.44 picocuries of Sr-⁹⁰/gram Ca for 1962 were found. The figures are compared with Buenos Aires and Northern Hemisphere values, and their value for prediction of local human bone burden of Sr-⁹⁰ is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. BENINSON, D.; MIGLIORI, A.; MUGLIAROLI, H. and van der ELST, E.— Transferecia de contaminantes radioactivos en las cadenas alimenticias. In: 4th-Inter American Symposium on the Peaceful Applications of Nuclear Energy, vol. II, Pan-American Union, Washington, 1962, pp. 85-92.
2. COMAR, C. L. and WASSERMAN, R. H.— Radioisotopes in the study of mineral metabolism. In: Progress in Nuclear Energy. Series VI, Biological Sciences. Ed. by Bugher, J. C. et al. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1966, pp. 153-196.
3. COMAR, C. L.; WASSERMAN, R. H. and NOLD, M. M.— Strontium-calcium discrimination factors in the rat. Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., 1956, 92: 859-863.
4. COMAR, C. L.; WASSERMAN, R. A.; ULLBERG, S. and ANDREWS, G. A.— Strontium metabolism and Strontium-Calcium discrimination in man. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 95: 386-391.

5. CHADWICK, D. R. and STRAUB, C. P.—Some considerations in the establishment of radiation protection standards for radioactivity in the environment. In: 4th Inter American Symposium on the Peaceful Applications of Nuclear Energy, vol. II, Pan-American Union, Washington, 1962, pp. 65-72.
6. DE BORTOLI, M.; GAGLIONE, P.; MALVICINI, A. and van der STRICHT, E.—Strontium-90 and Caesium-137 in milk at Ispra, Italy, during 1960-62. *Nature*, 1964, 201: 1175-1177.
7. DUNHAM, CH. L.—Fallout from nuclear weapons tests. In: *Advances in Biological and Medical Physics*, vol. VI, Ed. by Tobias, C. A. and Lawrence, J. H., Academic Press, Inc., New York, 1958, pp. 175-199.
8. ECKELMAN, W. R.; KULP, J. L. and SCHULERT, A. R.—Strontium-90 in man. *Science*, 1958, 127: 266-274.
9. HARRISON, G. E.; KOSTIAL-SIMONOVIC, Krista and HOWELLS, G. R.—The turnover of calcium and strontium in the skeletons of growing rats on high-strontium diets. *Int. J. Rad. Biol.*, 1962, 4: 623-636.
10. HARRISON, G. E.; RAYMOND, W. H. A. and TRETHERWAY, Helen C.—Metabolism of Strontium in Man. *Clin. Sci.*, 1955, 14: 681-695.
11. LAPP, R. E. and ANDREWS, H. L.—*Nuclear radiation physics*. 2nd. edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 1959, 532 pp.
12. LOUITT, J. F.—Strontium in man and beast. In: *Second Australasian Conference on Radiation Biology*. Ed. by Martin, J. H.; Butterworths Scientific Publications, London, 1959, pp. 209-220.
13. LOUITT, J. F.; SCOTT RUSELL, R.; BRUCE, R. S. and BARTLETT, B. O.—Ratios of Strontium-90 to Calcium in milk and in the bones of infants. *Nature*, 1964, 201: 770-772.
14. MERCER, E. R.; BURTON, J. D. and BARTLETT, B. O.—Relationships between the deposition of Strontium-90 and the contamination of milk in the United Kingdom. *Nature*, 1963, 198: 662-665.
15. PENNA-FRANCA, E.—Determinación de contaminantes radioactivos en materiales biológicos. En: 2º Simposio interamericano sobre la aplicación de la energía nuclear para fines pacíficos. C. I. E. N., O. E. A., Washington, 1960, pp. 63-73.
16. PENNA-FRANCA, E.; PINTO COELHO, A. e CHAGAS, C.: Determinação do Estrôncio-90 em materiais biológicos. *Anais da Acad. Bras. Cien.*, 1957, 29: 553-556.
17. STROMINGER, D.; HOLLANDER, J. M. and SEABORG, G. T.—Table of isotopes. *Rev. Modern Phys.*, 1958, 30: 585-904.
18. TILLEY, J. M. A.—Strontium-90 in human diet. *Nature*, 1959, 184: 1111.
19. WHITNEY, IRA, B., editor.—*Manual of Standard Procedures*. Analytical Branch, Health and Safety Laboratory, U. S. Atomic Energy Commission, New York, 1957.

Incorporación de 14-C lisina en fibras nerviosas motoras y sensitivas de rata¹

GUSTAVO S. L. APPELTAUER

INTRODUCCION.— A pesar de que numerosos estudios sobre el metabolismo de las proteínas en el sistema nervioso han sido realizados hasta el momento, muchos problemas no están aún resueltos. Mientras que las investigaciones en el sistema nervioso central se han visto complicadas por la presencia de la barrera hematoencefálica, las principales dificultades encontradas en el nervio periférico son consecuencia de sus conexiones con el sistema nervioso central y del estado dinámico de sus componentes.

Mucho tiempo atrás, Santiago Ramón y Cajal (14) observó la intensa tumefacción que aparece en los nervios en el sitio proximal a una zona de constricción crónica. Este fenómeno fue posteriormente estudiado exhaustivamente por Weiss (19, 20, 21, 22), quien lo interpretó como consecuencia de un desplazamiento en el sentido próximo-distal de líquido endoneural y axoplasma. Otras evidencias sobre movimientos de fluidos en el nervio fueron aportadas por la microcinematografía (23) y por el estudio del movimiento de partículas cargadas mediante el efecto Hall (1).

Desde 1945 los flujos endoneural y axónico han sido estudiados con distintos tipos de trazadores. Weiss et al. (24) emplearon colorantes como tinta china, azul de metileno y cristales de ferrocianuro de potasio, y compuestos radioactivos como (24-Na)Cl, (64-Cu)Cl₂ y (64-Cu)S. Sus estudios mostraron que, cuando estas sustancias son introducidas en el tronco nervioso, se concentran principalmente en la parte distal a la zona de la inyección. Posteriormente se usaron 32-P fosfato (11, 12, 13, 15) y aminoácidos marcados, como 14-C lisina (18), 14-C glicina y 35-S metionina (5, 17), 14-C treonina y 14-C valina (10) y 3-H leucina (2, 3).

Empleando 14-C lisina, Waelsch (18) observó que la incorporación de este aminoácido en el ciático de la rana es progresivamente menor desde las raíces lumbosacras hasta la parte distal del nervio. Resultados similares han sido obtenidos en nervios de mamíferos con 32-P fosfato (11, 13), 14-C glicina y 35-S metionina (5). Las variaciones de este gradiente próximo-distal decreciente con el tiempo después de la inyección, no están aún bien aclaradas.

Por el contrario, la administración de 14-C treonina y 14-C valina a conejos con sección unilateral del hipogloso, no ha revelado actividad alguna en los nervios contralateral empleados como testigos (10).

1. Laboratorio de Biofísica, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Montevideo, Uruguay.

Se han aportado pruebas de que la incorporación de estas sustancias no es un simple proceso de difusión, sino un fenómeno fisiológico que depende de la integridad de la neurona (12, 13) y del nervio (11) y es alterado por la hipoxia y los cambios de temperatura (13).

El propósito del presente experimento es hacer un estudio de la incorporación de un aminoácido en nervio de mamífero. Como el nervio es una entidad compleja, los resultados de los experimentos pueden ser consecuencia de numerosos fenómenos simultáneos y, por lo tanto, difíciles de interpretar. A fin de eliminar factores responsables de irregularidades en los resultados, se han diseccionado las fibras motoras y sensitivas del nervio tibial. De esta manera es posible obtener una serie de fibras de origen, trayectoria, longitud y función iguales.

MATERIAL Y METODOS.—Ocho ratas albinas macho, de 6 a 7 meses de edad y 300 a 320 gramos de peso, fueron empleadas. Se les mantuvo en jaulas individuales a 20-23° C. de temperatura y se les permitió comer y beber a voluntad.

Los animales, ligeramente anestesiados con éter, fueron inyectados intratecalmente por punción lumbar entre la última vértebra lumbar y primera sacra. Todos ellos se recuperaron completamente cinco minutos después de la inyección. Por medio de la inyección de colorantes, se comprobó que la sustancia así administrada difunde por el espacio subaracnoideo hasta el bulbo.

A intervalos especificados, comprendidos entre 4 horas y 22 días después de la inyección, los animales fueron anestesiados con éter y, previa extracción de sangre por punción cardíaca, sangrados completamente. La muestra de sangre fue enfriada a 2° C. y, una vez coagulada, centrifugada. 0,1 ml. del suero así obtenido fue procesado.

Inmediatamente después de la muerte del animal, se le diseccionó la columna vertebral y las membranas meníngeas fueron expuestas desde la quinta vértebra lumbar hasta el sacro. Previo secado con algodón, las meninges fueron abiertas y un trozo pesado de esponja de gluten sumergido en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Entre 2,5 y 5 mg. de LCR fueron obtenidos por medio de este procedimiento.

Luego se les extrajo un trozo del lóbulo izquierdo del hígado y ambos nervios ciáticos, conjuntamente con el quinto nervio lumbar y sus raíces dorsal y ventral. A fin de obtener fibras nerviosas de la misma longitud, se empleó el siguiente procedimiento. Los nervios fueron sumergidos en una solución de Ringer sin calcio, débilmente ácida (pH 6,5), a 2° C. de temperatura. Bajo lupa se les despojó del epineuro y se aislaron las fibras del nervio tibial provenientes de la quinta raíz lumbar. Estas, a su vez, se separaron en dos componentes: uno proveniente de la raíz ventral y otro de la dorsal. Las muestras tomadas están especificadas en la figura 1.

Terminado el proceso, ninguna actividad pudo ser medida en la solución isotónica. Las muestras fueron guardadas en frascos herméticos a -10° C. hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras y determinación de la radioactividad.—Previo adición de 2 mg. de lisina no radioactiva, cada muestra fue desintegrada en un homogeneizador de pistón de teflón para tejidos duros, suspendida en alcohol 80 y centrifugada. El precipitado fue dos veces más rehomogeneizado y

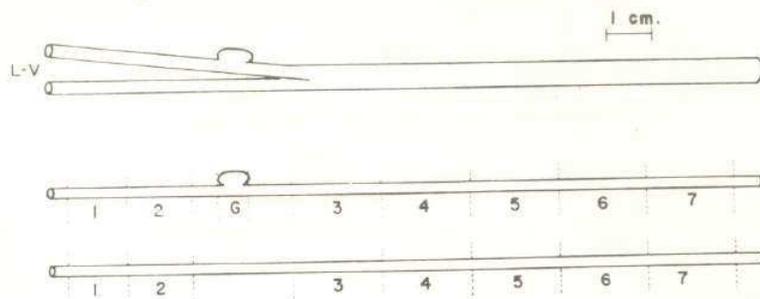


Fig. 1.—Esquema de la disección del nervio ciático. a) El nervio tibial liberado de las colaterales. b) Las raíces dorsal y ventral separadas, mostrando la localización de las muestras tomadas.

lavado con alcohol 80. Los sobrenadantes fueron transferidos a la plancheta A y el precipitado final a la B, donde fueron secados bajo luz infrarroja y corriente de aire. Para los propósitos de este estudio, la fracción A puede ser considerada como compuesta de aminoácidos libres y la B de proteínas. Pruebas llevadas a cabo en este laboratorio, mostraron que más del 95% de la lisina libre es recogida en la fracción A.

La radioactividad fue determinada en un contador G.M. de ventana delgada. Corregida la autoabsorción, los resultados se expresaron en conteos por minuto por miligramo de peso fresco del tejido (CPM/mg.).

RESULTADOS.—Los resultados están presentados en las tablas I, II y III. Es evidente (tabla III) que poco tiempo después de la inyección, una gran parte de la radioactividad está incorporada a la fracción proteica (B) (más del 40% en cuatro horas y más del 88% en un día). Simultáneamente, la actividad de la fracción A (aminoácidos libres) disminuye rápidamente en todas las muestras. Como esta disminución no está compensada por un aumento similar en la actividad de las proteínas, es de suponer que una gran parte de los aminoácidos es eliminada en su forma libre.

Después de esta rápida incorporación, la actividad de las proteínas se mantiene (hígado, nervio) o disminuye (ganglio, LCR, suero), con lo cual la actividad total del tejido disminuye.

El rápido intercambio de lisina entre la sangre y el cerebro, ya ha sido estudiado en experimentos de corta duración (6, 7, 8, 9). En nuestro experimento la radioactividad aparece rápidamente en la sangre e hígado, mientras que disminuye en el LCR en las primeras 24 horas. Sin embargo, el equilibrio entre la sangre y LCR recién se observa a los 2 días para los aminoácidos libres y a los 12 para las proteínas.

Grandes diferencias de actividad entre las partes intra y extrarraquídea, pueden observarse en las primeras horas después de la inyección. Hasta el séptimo día la actividad es máxima en el ganglio y mayor en las raíces raquídeas que en el nervio tibial. No se observa equilibrio entre estas últimas ni aún 22 días después de la inyección.

Tabla I
 INCORPORACION DE 14-C LISINA
 EN FIBRAS MOTORAS DEL NERVIO TIBIAL

		CPM						
		Resultados en <u>mg. peso fresco</u>						
Tiempo después de inyección	Fracción	Segmentos						
		1	2	3	4	5	6	7
4 horas	A	31.38	43.78	4.55	0.49	0.47	0.62	0.67
	B	33.15	38.35	7.41	1.11	0.47	0.66	0.00
	Total	64.53	82.13	11.96	1.60	0.94	1.28	0.67
8 horas	A	5.54	9.84	0.67	0.47	0.54	0.00	0.21
	B	35.72	59.73	5.62	1.73	2.16	0.84	1.20
	Total	41.26	69.57	6.29	2.20	2.70	0.84	1.41
1 día	A	5.23	5.66	2.58	1.19	0.61	0.02	0.83
	B	19.74	38.76	15.30	2.20	3.51	1.93	0.12
	Total	24.97	44.12	17.96	3.39	4.12	1.95	0.95
2 días	A	6.80	3.86	0.51	0.33	0.81	0.90	0.90
	B	40.46	17.49	6.63	2.68	1.79	1.80	2.29
	Total	47.26	21.35	7.14	3.01	2.60	2.70	3.19
7 días	A	3.96	10.72	0.84	0.00	0.46	1.47	1.05
	B	26.65	24.15	8.02	3.34	4.17	2.80	2.58
	Total	29.61	34.87	8.86	3.34	4.63	4.27	3.63
12 días	A	2.66	2.42	0.24	0.39	0.00	0.63	0.00
	B	29.96	16.02	1.94	1.43	1.31	1.47	0.64
	Total	32.62	18.44	2.18	1.82	1.31	2.10	0.64
13 días	A	1.74	0.86	0.00	0.73	1.20	0.00	0.00
	B	6.30	7.19	1.24	1.40	1.30	0.00	0.54
	Total	8.04	8.05	1.24	2.13	2.50	0.00	0.54
22 días	A	0.00	0.29	0.00	0.00	0.74	0.00	0.22
	B	3.03	5.98	1.49	0.19	0.44	0.00	0.57
	Total	3.03	6.27	1.49	0.19	1.18	0.00	0.79

Tabla II
 INCORPORACION DE 14-C LISINA
 EN FIBRAS SENSITIVAS DEL NERVI0 TIBIAL

Resultados en $\frac{\text{CPM}}{\text{mg. peso fresco}}$

Tiempo después de inyección	Fracción	Segmentos								
		1	2	Ganglio	3	4	5	6	7	
4 horas	A	38.21	59.67	22.58	5.38	0.87	0.80	1.20	0.00	
	B	50.54	37.58	135.76	9.08	1.48	0.73	0.00	0.00	
	Total	88.75	97.25	158.34	14.46	2.35	1.53	1.20	0.00	
8 horas	A	6.62	5.56	35.96	2.01	0.24	0.39	0.00	0.00	
	B	35.84	42.79	172.87	25.75	1.41	1.46	0.80	1.39	
	Total	42.46	48.35	208.83	27.76	1.65	1.85	0.80	1.39	
1 día	A	2.84	4.98	8.64	1.74	0.00	0.11	0.00	1.24	
	B	31.97	56.97	96.09	20.52	2.17	1.36	1.13	1.44	
	Total	34.81	61.95	104.73	22.26	2.17	1.47	1.13	2.68	
2 días	A	6.57	7.44	5.19	1.60	0.41	0.19	0.92	0.42	
	B	31.43	49.31	98.51	15.66	3.73	2.46	2.21	1.82	
	Total	38.00	56.75	103.70	17.26	4.19	2.65	3.13	2.24	
7 días	A	3.95	7.61	10.98	3.87	0.70	0.48	0.11	0.17	
	B	25.89	44.20	53.20	30.78	7.35	4.71	4.65	3.58	
	Total	29.84	51.81	64.18	34.65	8.05	5.19	4.76	3.75	
12 días	A	1.67	2.95	3.02	0.16	0.11	0.13	0.24	0.08	
	B	11.68	14.10	4.85	1.54	0.98	0.69	0.97	0.92	
	Total	13.35	17.05	7.87	1.70	1.09	0.82	1.21	1.00	
13 días	A	0.27	1.72	0.72	0.20	0.28	0.47	0.00	0.00	
	B	2.88	6.49	6.49	2.58	1.29	0.86	1.63	0.82	
	Total	3.15	8.21	7.21	2.78	1.57	1.33	1.63	0.82	
22 días	A	0.22	0.70	1.18	0.17	0.24	0.08	0.11	0.02	
	B	1.58	5.75	5.04	2.33	1.19	1.14	0.74	1.22	
	Total	1.80	6.45	6.22	2.50	1.43	1.22	0.85	1.24	

Tabla III
 INCORPORACION DE 14-C LISINA
 EN DIFERENTES TEJIDOS

CPM
 Resultados en —————
 mg. peso fresco

Tiempo después de inyección	Fracción	Nervio (promedio)	Ganglio raquídeo	Líquido cefalo- raquídeo	Suero	Hígado
4 horas	A	13.43	22.58		0.68	8.98
	B	12.89	135.76		8.98	10.14
	Total	23.30	158.34		9.66	19.12
8 horas	A	2.29	35.96	34.56	0.39	4.78
	B	15.46	172.87	68.21	20.72	7.28
	Total	17.75	208.83	102.77	21.11	12.06
1 día	A	1.92	8.64	3.63	0.24	1.54
	B	14.08	96.09	33.28	9.88	10.98
	Total	16.01	104.73	36.91	10.12	12.51
2 días	A	2.28	5.19	3.23	0.26	1.71
	B	12.85	98.51	25.81	11.50	8.06
	Total	15.10	103.70	29.04	11.76	9.77
7 días	A	2.53	10.98	0.89+	1.02	0.90
	B	13.71	53.20	34.46	6.05	9.08
	Total	16.23	34.65	35.35	7.07	9.98
12 días	A	0.88	3.02	1.42+	0.19	0.63
	B	5.98	4.85	11.21	2.14	3.96
	Total	6.86	7.87	12.63	2.33	4.59
13 días	A	0.53+	0.72		0.03	
	B	2.47	6.49		3.54	
	Total	3.00	7.21		3.57	
22 días	A	0.20+	1.18	0.06+++	0.08	0.35
	B	1.83	5.04	2.73	2.22	3.80
	Total	2.03	6.22	2.79	2.30	4.15

Tabla IV
 ACTIVIDADES PROMEDIO
 DE RAICES RAQUIDEAS Y NERVIOS TIBIAL

Tiempo después de inyección	Fracción	Raíz dorsal	Nervio tibial (raíces sensitivas)	Raíz ventral	Nervio tibial (raíces motoras)
4 horas	A	48.94	1.65	37.58	1.36
	B	44.06	2.26	35.75	1.93
	Total	93.00	3.91	73.33	3.29
8 horas	A	6.09	0.58+	7.69	0.38++
	B	37.32	6.16	47.73	2.31
	Total	43.41	6.74	55.42	2.69
1 día	A	3.91	0.62+	5.45	1.05+
	B	44.47	5.32	29.25	4.63
	Total	48.38	5.94	34.70	5.68
2 días	A	7.05	0.71+	5.33	0.69+
	B	40.37	5.19	28.98	3.04
	Total	47.42	5.90	34.31	3.73
7 días	A	5.78	1.07+	7.34	0.76+
	B	35.05	10.21	24.90	4.18
	Total	40.83	11.28	32.24	4.94
12 días	A	2.31	0.14++	2.54	0.25++
	B	12.89	1.02+	22.99	1.36
	Total	15.20	1.16+	25.53	1.61
13 días	A	1.00+	0.19++	1.30	0.39++
	B	4.69	1.44	6.75	0.90+
	Total	5.69	1.63	8.05	1.29+
22 días	A	0.46+	0.12++	0.15++	0.19++
	B	3.67	1.32	4.51	0.54+
	Total	4.13	1.44	4.66	0.73+

DISCUSION.—Las diferencias de actividad entre el LCR y suero, y entre las partes intra y extrarraquídea del nervio son, indudablemente, consecuencia de la técnica de la inyección. El hecho que esta diferencia se mantenga por mucho tiempo (12 y 22 días), refleja la lentitud del intercambio entre la sangre y el LCR y la inercia metabólica de algunas proteínas del sistema nervioso (18).

Las diferencias de actividad entre los distintos segmentos del nervio, son más difíciles de interpretar. El nivel de actividad de las raíces raquídeas está muy por encima del de los segmentos del nervio tibial. Esto puede ser explicado como consecuencia del acceso directo de lisina marcada del LCR en los segmentos situados intratecalmente. Sin embargo, el hecho que las actividades de ambas raíces no son iguales y las relaciones entre los segmentos proximales y distales varían de un animal a otro, es difícil de explicar. Más aún, la relación entre aminoácidos libres y proteínas para cada segmento es diferente, siendo unas veces mayor en el segmento proximal, otras en el distal, lo que no puede ser explicado simplemente como consecuencia de un mejor acceso del precursor.

Estos hechos pueden también discutirse en relación a la teoría del flujo axónico. Varios autores que observaron una mayor incorporación de aminoácidos o fosfatos marcados en los segmentos proximales, interpretaron sus resultados como consecuencia de la migración, a lo largo del axón, de proteínas o fosfolípidos sintetizados en el cuerpo celular. Sin embargo, si bien hay evidencias de que algunas proteínas pasan del cuerpo celular al axón (17) y de que este fenómeno depende de la integridad del perikarion (12, 13) y del nervio (11), es necesario tener en cuenta que en el nervio existen otros mecanismos de transporte de sustancias (19, 24) y que tanto las células de Schwann como los axones (14), tienen todos los elementos necesarios para sintetizar proteínas. De acuerdo a nuestro experimento, el pasaje somatoaxonal no puede ser considerado como el mecanismo responsable de la actividad de las proteínas del nervio. El pasaje somatoaxonal resultaría en actividades similares para ambos prolongamientos (raíz dorsal y fibras sensitivas del nervio tibial) de las células de los ganglios raquídeos. Sin embargo, el primero tiene de 19 (4 horas) a 2,7 (22 días) la actividad específica del segundo. Diferencias similares pueden observarse entre la raíz ventral y las fibras motoras.

Finalmente, los descensos de actividad del ganglio espinal y de la raíz ventral, no son seguidos de un incremento similar en las fibras sensitivas y motoras del nervio periférico. Los hechos arriba mencionados, no descartan la existencia de un pasaje somatoaxonal y de un flujo axónico, pues la actividad del axón puede estar oculta por la de las células de Schwann y del tejido conjuntivo. Sin embargo, muestran que una gran parte de las proteínas del nervio son sintetizadas y metabolizadas localmente.

RESUMEN.—La distribución de C-14 L-lisina, inyectada intratecalmente, en el LCR, suero, ganglio raquídeo, nervio ciático e hígado de ratas fue estudiado en períodos que comprenden de 4 horas a 22 días después de la inyección. Las fracciones soluble (aminoácidos libres) y precipitable (proteínas) por alcohol 80%, se midieron en forma separada. La lisina marcada rápidamente aparece en la sangre, hígado, ganglio espinal y nervio ciático. Los niveles de actividad de los aminoácidos libres de la sangre y LCR, alcanzan el equilibrio a los dos días;

las proteínas a los 22. Las actividades específicas de los ganglios raquídeos son más altas que la de las raíces dorsal y ventral y éstas, a su vez, más altas que la de las fibras sensitivas y motoras del nervio tibial, sin que se observe tendencia al equilibrio ni aún a los 22 días. Los resultados llevan a la conclusión de que una gran parte de las proteínas del nervio son sintetizadas y metabolizadas localmente.

SUMMARY.—The distribution into blood serum, liver, cerebro-spinal fluid, spinal ganglion and sciatic nerve fibers of intrathecally injected C-14 L-lysine was studied in rats at periods ranging from 4 hours to 22 days after injection. Ethanol 80% soluble (free amino-acids) and precipitable (protein) fractions were separately measured. The activity appears rapidly in blood and liver and is rapidly incorporated into the protein fractions of blood serum, liver, spinal ganglion and sciatic nerve motor and sensory fibers. The levels of activity of cerebro-spinal fluid and serum's amino-acids approach equilibrium at the 2nd. day after injection. Protein fractions reach equilibrium at the 12th. day. In the nerve tissue studied, specific activity is highest in the spinal ganglion, and higher in the sub-arachnoidal nerve segments (spinal roots) than in the tibial nerve segments, without tendency to equilibrium even at the 22th. day. The findings support the conclusion that a great part of nerve proteins is synthesized and metabolized locally.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Grant AF-AFOSR-61-64 de la U. S. Air Force Office of Scientific Research, y por el Grant RF-61034 de la Fundación Rockefeller.

BIBLIOGRAFIA

1. BECKER, R. O.—Search for evidence of axial current flow in peripheral nerves of salamander. *Science*, 1961, 134: 101-102.
2. DROZ, B. and LEBLOND, C. P.—Migration of proteins along the axons of the sciatic nerve. *Science*, 1962, 137: 1047-1048.
3. DROZ, B. and LEBLOND, C. P.—Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radioautography. *J. Comp. Neurol.*, 1963, 121: 325-346.
4. EDSTROM, J. E.; EICHNER, D. and EDSTROM, A.—The ribonucleic acids of axons and myelin sheaths from Mauthner neurons. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 61: 178-184.
5. KOENIG, H.—The synthesis and peripheral flow of axoplasm. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 1958, 83: 162-164.
6. LAJTHA, A.—Amino acid and protein metabolism of the brain II. The uptake of L-lysine by brain and other organs of the mouse at different ages. *J. Neurochem.*, 1958, 2: 209-215.

7. LAJTHA, A.; FURST, S.; GERSTEIN, A. and WAELSCH, H.—Amino acid and protein metabolism of the brain I. Turnover of free and protein bound lysine in brain and other organs. *J. Neurochem.*, 1957, 1: 289-300.
8. LAJTHA, A. and MELA, P.—The exchange of free amino acids between plasma and brain. *J. Neurochem.*, 1961, 7: 210-217.
9. LAJTHA, A. and TOTH, J.—The brain barrier system III. The efflux of intracerebrally administered amino acids from the brain. *J. Neurochem.*, 1962, 9: 199-212.
10. MIANI, N.—Proximo-distal movement along the axon of protein synthesized in the perikarion of regenerating neurons. *Nature*, 1960, 185: 541.
11. MIANI, N.—Evidence of a proximo-distal movement along the axon of phospholipid synthesized in the nerve cell body. *Nature*, 1960, 193: 887-888.
12. OCHS, S. and BURGER, E.—Movements of substance proximo-distally in the nerve axons as studied with spinal cord injections of radioactive phosphorus. *Am. J. Physiol.*, 1958, 194: 499-506.
13. OCHS, S.; DALRYMPLE, D. and RICHARDS, G.—Axoplasmic flow in ventral root nerve fibers of the cat. *Exp. Neurol.*, 1962, 5: 349-363.
14. RAMON Y CAJAL, S.—Degeneration and regeneration in the nervous system. Hafner-Publ. Co. New York, 1959.
15. SAMUELS, A. J.; BOYARSKY, L. L.; GERARD, R. W.; LIBBET, B. and BRUST, M.—Distribution, exchange and migration of phosphate compounds in the nervous system. *Am. J. Physiol.*, 1958, 164: 1-15.
16. TAKAHASHI, Y.; NOMURA, M. and FURUSAWA, S.—In vitro incorporation of ¹⁴C amino acids into proteins of peripheral nerve during Wallerian degeneration. *J. Neurochem.*, 1961, 7: 97-102.
17. VERNE, J. and DROZ, B.—Déplacement de la radioactivité dans le ganglion cervical supérieur après injection de ³⁵S méthionine. *Experientia*, 1960, 16: 77-78.
18. WAELSCH, H. and LAJTHA, A.—Protein metabolism of the nervous system. De "The neurochemistry of nucleotids and amino-acids". Ed. Brady R. O. & Tower D. S., New York, 1959.
19. WEISS, P.—Endoneurial edema in constricted nerve. *Anat. Rec.*, 1943, 86: 491-522.
20. WEISS, P.—Damping of axoplasm in constricted nerves, a sign of perpetual growth in nerve fibers. *Anat. Rec.*, 1944, 88: 464.
21. WEISS, P.—Evidence of perpetual proximo-distal growth of nerve fibers. *Biol. Bull.*, 1944, 87: 160.
22. WEISS, P. and HISCOE, H.—Experiments on the mechanism of nerve growth. *J. Exp. Zool.*, 1948, 107: 315-395.
23. WEISS, P.; TAYLOR, A. C. and PILLAI, P. A.: The nerve fiber as a system in continuous flow: microcinematographie and electronmicroscope demonstrations.
24. WEISS, P.; WANG, H.; TAYLOR, A. C. and EDDS, M. V. Jr.—Proximo-distal fluid convection in the endoneurial spaces of peripheral nerves demonstrated by colored and radioactive (isotope) tracers. *Am. J. Physiol.*, 1945, 143: 521-540.

Incorporación de 14-C lisina
en fibras del nervio ciático normal de rata ¹

GUSTAVO S. L. APPELTAUER, CLAUDIO BENECH,
ABRAHAM LEVITAS y CARLOS M. FRANCHI

INTRODUCCION.—Desde que los experimentos de Weiss proporcionaron datos indirectos sobre la existencia de un flujo axónico centrifugo, se han hecho numerosos trabajos tanto para aportar pruebas sobre dicho fenómeno como para determinar sus características.

El progreso de estos experimentos comprende dos etapas. La primera consiste en estudios morfológicos sobre la tumefacción que aparece en los nervios en el sitio proximal a una zona de constricción crónica (8, 12, 13, 14, 15, 16). La segunda comprende investigaciones sobre el movimiento de trazadores en el interior del tronco nervioso. Para tal fin se administró a vertebrados 32-P fosfato (5, 6, 7, 9), 14-C/lisina (11), 14-C glicina y 35-S metionina (4) y se comprobó que la incorporación de dichas sustancias es mayor en la parte proximal del nervio que en la distal. La dinámica del flujo axónico ha sido además estudiada por medio de la microcinematografía (16) y la incorporación de aminoácidos en el axón demostrada en autorradiografías (3, 10).

Con el fin de obtener un mayor número de datos sobre la incorporación de aminoácidos en nervios de mamíferos, se realizó el presente trabajo, eligiéndose además como vía de administración de la sustancia, la intratecal, a fin de provocar un gran desnivel de actividad entre las raíces y ganglio raquídeo y el nervio periférico (1), y obtener así datos sobre sus conexiones metabólicas.

MATERIAL Y METODOS.—En todos los experimentos fueron usadas ratas albinas del sexo masculino. Se emplearon dos grupos de animales: el grupo I compuesto por ratas de 6-8 meses de edad y 300 gramos de peso, y el grupo II cuya edad oscila entre 3 y 4 meses y cuyo peso promedio es de 180 gramos.

Las condiciones en que los animales fueron mantenidos y la técnica de inyección, ya han sido descritas previamente (1).

Las ratas fueron sacrificadas con éter a intervalos especificados luego de la inyección y disecadas inmediatamente. Los nervios plantares lateral y medio fueron seccionados a nivel del calcáneo y sus fibras separadas de las demás

1. Laboratorio de Biofísica, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay.

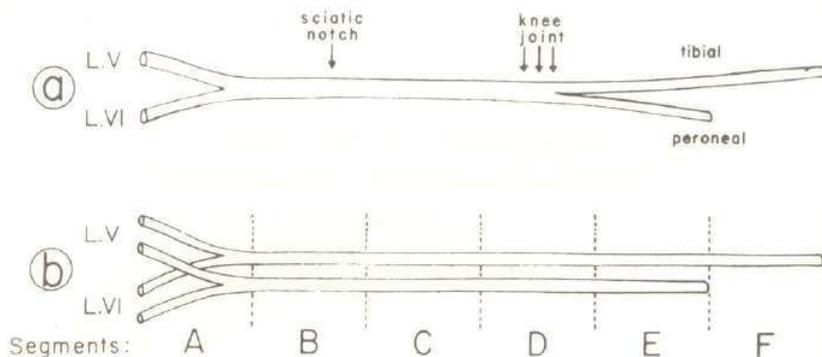


Fig. 1.—Diagrama de la disección del nervio ciático. a) El nervio ciático liberado de las colaterales. b) Los nervios tibial y peroneo separados mostrando la localización de las muestras tomadas. Sciatic notch: escotadura ciática; knee joint: rodilla.

hasta un centímetro fuera de su emergencia de los agujeros de conjugación. Denominaremos a este haz "nervio tibial". El nervio peroneo común (poplíteo externo) fue a su vez seccionado en el punto en que sus fibras penetran el gastrocnemio y extraído en forma similar. Designaremos a este haz como "nervio peroneo".

La longitud de las fibras del nervio tibial era de 9 cm. y las del peroneo de 7,5. Sus variaciones no llegaban a un 10%. El primero fue cortado en 6 segmentos y el segundo en 5 (fig. 1). Las piezas fueron guardadas en frascos herméticos a -10°C . de temperatura hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras y determinación de la radioactividad.—Cada muestra fue desintegrada en un homogeneizador de pistón de teflón y transferida a una plancheta, donde se le secó con corriente de aire bajo luz infrarroja. La radioactividad se determinó en un contador G. M. de flujo gaseoso, dejándose acumular conteos hasta obtener un "desvío standard" de 5% o menos. La autoabsorción se corrigió de acuerdo a una curva obtenida experimentalmente con homogeneizados de nervio preparados en las condiciones descritas. Los resultados se expresaron como conteos por minuto por miligramo de peso fresco del tejido.

RESULTADOS.—Se emplearon 8 animales del grupo I y 4 del grupo II. Los experimentos comprenden periodos de 1 a 13 días para el grupo I y de 5 a 11 para el II. Los resultados están resumidos en las tablas I, II, III y IV.

Para una mejor observación de los datos, las actividades específicas fueron expresadas como porcentajes de la actividad promedio del nervio (figs. 2 y 3).

A fin de determinar si alguna clase de "onda de actividad" puede ser visualizada, se hizo el siguiente análisis. Un fenómeno periódico, como por ejemplo

Tabla I

INCORPORACION DE 14-C LISINA
EN EL NERVI0 TIBIAL (7-8 MESES)

Las actividades específicas están expresadas en CPM/peso fresco
y como porcentaje de la actividad específica promedio.

Días		Segmentos						Total	Promedio
		A	B	C	D	E	F		
1	CPM	88,11	66,71	34,51	24,13	16,85	12,47	242,78	4,60
	peso fresco	13,30	10,90	8,75	8,10	5,90	5,85	52,80	
	actividad	6,62	6,12	3,94	2,97	2,85	2,13		
	específica	144 %	133 %	86 %	65 %	62 %	46 %		
3	CPM	130,89	81,65	50,59	27,04	20,08	15,14	325,39	8,56
	peso fresco	11,30	7,75	5,95	4,45	4,00	4,55	38,00	
	actividad	11,58	10,53	8,50	6,07	5,02	3,32		
	específica	135 %	123 %	99 %	71 %	58 %	39 %		
5	CPM	31,43	28,03	19,69	9,75	9,19	11,52	109,61	2,71
	peso fresco	10,20	8,85	6,70	4,95	4,50	5,30	40,50	
	actividad	3,08	3,17	2,94	1,97	2,04	2,17		
	específica	114 %	117 %	108 %	73 %	75 %	80 %		
7	CPM	54,12	46,20	27,41	18,74	18,09	18,36	182,92	4,57
	peso fresco	9,50	8,95	6,70	5,40	4,30	5,20	40,05	
	actividad	5,69	5,16	4,09	3,28	3,27	3,53		
	específica	124 %	113 %	89 %	72 %	71 %	77 %		
10	CPM	60,10	36,28	27,28	8,14	13,45	13,81	159,06	3,87
	peso fresco	10,60	9,00	7,30	3,00	4,95	6,20	41,05	
	actividad	5,67	4,03	3,73	2,71	2,71	2,22		
	específica	146 %	104 %	96 %	70 %	70 %	57 %		
12	CPM	75,20	48,85	42,24	30,00	24,75	28,48	249,52	3,97
	peso fresco	11,70	8,05	6,40	4,40	3,90	6,20	40,65	
	actividad	6,42	6,06	6,60	6,81	6,33	4,59		
	específica	104 %	99 %	107 %	111 %	103 %	75 %		
13	CPM	47,13	49,31	31,15	21,21	17,78	19,95	190,53	3,97
	peso fresco	11,40	11,20	7,75	5,55	5,65	6,40	47,95	
	actividad	4,10	4,40	4,53	3,82	3,14	3,11		
	específica	103 %	111 %	114 %	96 %	79 %	78 %		

Tabla II

INCORPORACION DE 14-C LISINA
EN EL NERVI0 PERONEO (7-8 MESES)

Las actividades especificas están expresadas en CPM/peso fresco
y como porcentaje de la actividad especifica promedio.

Días		Segmentos					Total	Promedio
		A	B	C	D	E		
1	CPM		43,81	20,96	13,54	15,59	93,90	
	peso fresco		4,75	5,25	3,80	4,70	18,50	5,08
	actividad		9,22	3,99	3,56	3,31		
	especifica		181 %	78 %	70 %	65 %		
3	CPM	40,21	37,87	23,23	12,68	12,64	126,63	
	peso fresco	3,20	3,35	2,60	2,85	3,35	15,35	8,25
	actividad	12,56	11,30	8,53	4,45	3,77		
	especifica	152 %	137 %	103 %	54 %	46 %		
5	CPM	10,02	13,20	7,89	7,12	8,55	46,78	
	peso fresco	2,80	3,80	3,40	4,35	4,60	18,95	2,47
	actividad	3,51	3,47	2,31	1,63	1,87		
	especifica	142 %	140 %	93 %	66 %	76 %		
7	CPM	25,26	17,03	16,49	9,45	8,54	76,77	
	peso fresco	3,05	3,55	3,10	3,00	3,15	15,85	4,84
	actividad	8,28	5,31	4,80	3,15	2,75		
	especifica	171 %	110 %	99 %	65 %	57 %		
10	CPM	28,48	15,52	10,34	8,52	10,71	73,57	
	peso fresco	3,60	3,60	3,05	3,30	3,95	17,50	4,20
	actividad	7,91	4,31	3,39	2,58	2,71		
	especifica	188 %	103 %	81 %	61 %	64 %		
12	CPM	24,80	18,33	15,12	13,13	12,50	83,88	
	peso fresco	4,15	3,25	2,45	3,20	3,25	16,30	5,15
	actividad	5,97	5,64	5,77	4,15	3,84		
	especifica	116 %	109 %	112 %	80 %	74 %		
13	CPM	29,17	22,26	18,37	12,63	11,23	93,66	
	peso fresco	5,30	5,30	4,00	4,20	4,65	23,45	3,99
	actividad	5,50	4,20	4,50	3,01	2,41		
	especifica	138 %	105 %	113 %	75 %	60 %		

Tabla III

INCORPORACION DE 14-C LISINA
EN EL NERVI0 TIBIAL (3-4 MESES)

Las actividades específicas están expresadas en CPM/peso fresco
y como porcentaje de la actividad específica promedio.

resco	Promedio
3,90	
3,50	5,08
3,63	
3,35	3,25
3,78	
3,95	2,47
3,77	
3,85	4,84
3,57	
7,50	4,20
3,88	
3,30	5,15
3,66	
3,45	3,99

Días	Segmentos						Total	Promedio
	A	B	C	D	E	F		
CPM	606,98	275,92	132,48	99,06	86,03	82,94	1283,41	
peso fresco	16,00	12,55	8,20	7,20	6,45	7,75	58,15	22,07
actividad	37,93	21,98	16,15	13,75	13,35	10,70		
especifica	172 %	99 %	73 %	62 %	60 %	48 %		
CPM	249,64	190,46	112,35	63,75	64,73	69,64	750,57	
peso fresco	12,00	8,65	6,60	5,65	4,80	7,20	44,90	16,72
actividad	20,80	22,01	17,02	11,28	13,48	9,47		
especifica	124 %	132 %	102 %	67 %	81 %	58 %		
CPM	325,73	140,44	104,24	75,02	48,73	52,86	747,02	
peso fresco	14,00	10,45	8,65	6,45	5,10	8,10	52,75	14,16
actividad	23,26	13,43	12,05	11,63	9,74	6,52		
especifica	164 %	95 %	85 %	82 %	69 %	46 %		
CPM	686,71	296,38	193,36	140,18	106,39	85,15	1508,17	
peso fresco	11,75	14,35	10,65	9,50	7,30	8,70		24,23
actividad	58,44	20,65	18,15	14,75	14,57	9,78		
especifica	241 %	85 %	75 %	61 %	60 %	40 %		

Tabla IV

INCORPORACION DE 14-C LISINA
EN EL NERVI0 PERONEO (3-4 MESES)

Las actividades específicas están expresadas en CPM/peso fresco
y como porcentaje de la actividad específica promedio.

Días		Segmentos					Total	Promedio
		A	B	C	D	E		
	CPM	216,12	106,38	51,19	47,94	48,63	478,26	
5	peso fresco	6,70	5,20	4,50	4,85	5,70	26,95	17,75
	actividad	32,25	20,40	14,61	9,88	8,51		
	específica	181 %	115 %	82 %	56 %	48 %		
	CPM	138,72	81,02	53,16	37,20	37,22	347,32	
6	peso fresco	6,10	3,60	3,30	4,20	4,35	21,55	16,12
	actividad	22,74	22,50	16,11	8,85	8,65		
	específica	141 %	139 %	100 %	55 %	54 %		
	CPM	117,20	71,89	45,91	32,38	31,12	298,50	
8	peso fresco	4,90	4,70	3,80	4,20	4,80	22,40	13,33
	actividad	23,91	15,29	12,08	7,70	6,80		
	específica	179 %	115 %	91 %	58 %	49 %		
	CPM	238,15	177,60	80,17	55,13	54,65	605,70	
11	peso fresco	5,25	6,00	4,60	4,50	5,30	25,65	23,61
	actividad	45,36	29,60	17,42	12,25	10,31		
	específica	192 %	125 %	74 %	52 %	44 %		

Promedio

17,75

16,12

13,33

23,61

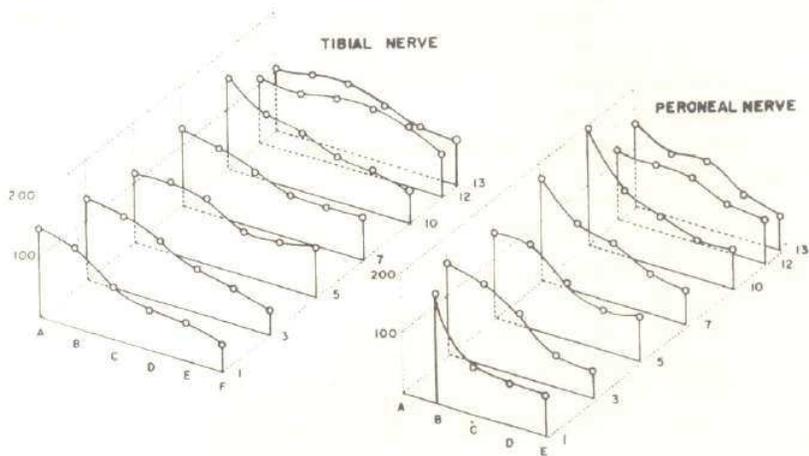


Fig. 2.— Actividad específica de los nervios tibial y peroneo de los animales del grupo I. X: segmentos del nervio (ver fig. 1). Y: actividades específicas expresadas como porcentajes de la actividad específica promedio. Z: días después de la inyección.

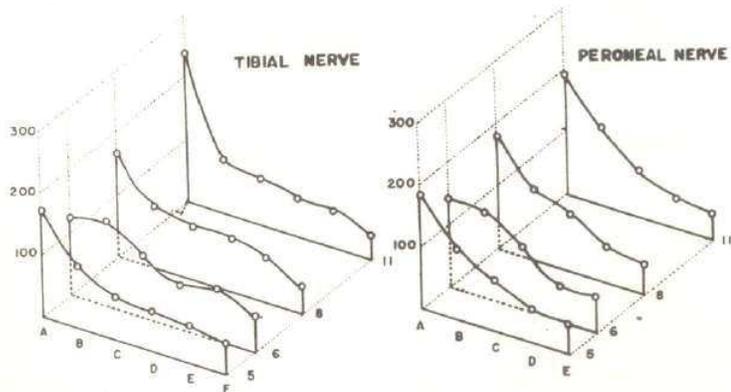


Fig. 3.— Actividad específica de los nervios tibial y peroneo de los animales del grupo II. X: segmentos del nervio (ver fig. 1). Y: actividades específicas expresadas como porcentajes de la actividad específica promedio. Z: días después de la inyección.

una onda superpuesta a una curva de tipo exponencial, puede ser puesto en evidencia sacando la primera y segunda derivadas. Este procedimiento se llevó a cabo con los resultados obtenidos en el nervio tibial, calculando los valores de $\frac{\Delta^2 \text{ porcentaje de actividad}}{(\text{longitud del nervio})^2}$ y $\frac{\Delta^2 \text{ porcentaje de actividad}}{(\text{tiempo})^2}$.

Estos serían los análogos de los términos dependientes del espacio y del tiempo respectivamente, de la ecuación unidimensional de una onda (2) (figs. 4 y 5).

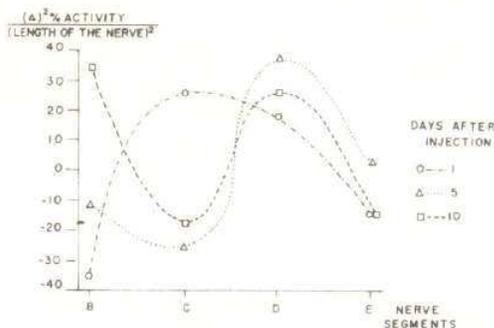


Fig. 4.— La función $\frac{(\Delta)^2 \text{ \% actividad}}{(\text{longitud del nervio})^2}$ (eje de las y) tomada de los datos de la tabla I. Eje de las x: segmentos del nervio (ver fig. 1).

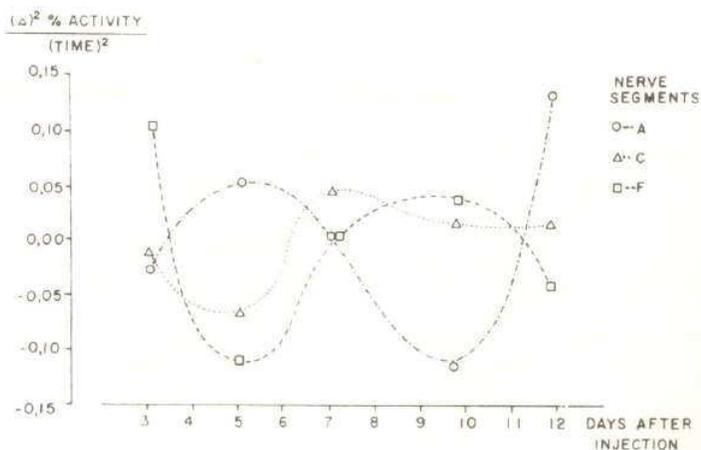


Fig. 5.— La función $\frac{(\Delta)^2 \text{ \% actividad}}{(\text{tiempo})^2}$ (eje de las y) tomada de los datos de la tabla I. Eje de las x: segmentos del nervio (ver fig. 1).

ser puesto en
miento se llevó
ndo los valores

pacio y del tiem-
2) (figs. 4 y 5).

ada de los
er fig. 1).

NERVE
SEGMENTS
O--A
A--C
O--F

DAYS AFTER
INJECTION
de los datos
fig. 1).

DISCUSION.— Los resultados muestran que las fibras aisladas pueden ser empleadas con éxito en experimentos de distribución de actividad a lo largo del nervio.

En las tablas I, II, III y IV puede observarse que la toma de lisina por los nervios de las ratas del grupo I es de 3 a 4 veces mayor que en las del II. A pesar de estas diferencias, el esquema de incorporación es similar para ambos grupos. Sus principales características son:

a) Una relativa constancia de la actividad específica promedio en los 13 días posteriores a la inyección. En el grupo II la actividad específica promedio es mayor a los 11 días, pero las diferencias individuales no pueden descartarse como responsables de esta variación. Esta constancia sugiere que la actividad está incorporada a una fracción lentamente metabolizada del nervio.

b) Una actividad próximo-distal decreciente a lo largo del nervio, que aparece antes del primer día y se mantiene hasta el 13°. La temprana aparición y su poca variación con el tiempo, sugieren que esta actividad está incorporada localmente a lo largo del nervio. La sola existencia de mecanismos de flujo endoneural y axónico no podría explicar este hecho, pues se produciría una disminución y aun una inversión de la pendiente con el tiempo, lo cual no se observa en este experimento.

Es importante tener en cuenta que la aparición de un gradiente próximo-distal decreciente, su aplanamiento e inversión con el tiempo pueden ser fácilmente explicados como consecuencia de un más lento metabolismo en los segmentos distales, hecho que obliga a ser muy cuidadosos en la interpretación de los resultados.

c) La aparición de picos de actividad entre los días 1-3 y 7-10, hecho evidente en las fibras tibiales y peroneas de ambos grupos. Esto podría ser consecuencia de la penetración en el nervio de dos "ondas" de material marcado por flujo endoneural o axónico, o simplemente una evidencia de la presencia de material metabólicamente más activo en el primer segmento.

Cualquiera que sea el mecanismo responsable de estas "ondas", pueden ser más claramente observadas en las figuras 4 y 5. La figura 4 muestra los picos de actividad visibles en la 2; en la 5 es posible observar además un retardo de fase entre los segmentos A, C y E. El cálculo de velocidad de propagación de la onda carece de interés debido al escaso número de datos.

RESUMEN.— La toma de actividad por los nervios tibial y peroneo de la rata luego de la inyección intratecal de 14-C L-lisina ha sido estudiado en experimentos de 1 a 13 días de duración. El esquema de incorporación es similar en los nervios tibial y peroneo de los animales de 3 a 4 meses y de 7 a 8 meses de edad. Las ratas más jóvenes incorporan de 3 a 4 veces más actividad que las más viejas. La actividad específica promedio de todo el nervio se mantiene aproximadamente constante durante la duración del experimento. Un gradiente próximo-distal de actividad aparece a las 24 horas y se mantiene el día 13°. En el segmento más proximal aparecen picos de actividad a los días 1-3 y 7-10. Las características de los picos de actividad son estudiadas en gráficas de la segunda derivada en relación a la longitud del nervio y al tiempo. Los resultados son brevemente discutidos en relación a los mecanismos de flujo endoneural y axónico.

SUMMARY.—The uptake of activity along tibial and peroneal fibers of the sciatic nerve of normal rats has been studied at periods ranging from 1 to 13 days after a single injection of 14-C L-lysine. The pattern of uptake was similar in tibial and peroneal fibers of 3-4 months and 7-8 months old animals. Younger animals incorporated 3-4 times more activity than older ones. The average specific activity of the whole nerve kept approximately constant during the duration of the experiment. A proximo-distally decreasing gradient of specific activity was found as early as 24 hours and persisted at the 13th day. Peaks of activity appeared in the most proximal segment at days 1-3 and 7-10. The characteristics of the peaks of activity are studied in plottings of the second derivative of the activity versus nerve length and versus time. The results are briefly discussed in relation to endoneurial and axonic transport mechanisms.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el contrato AF 49 (638) 585 y Grant AF-AFOSR-61-64 de la U. S. Air Force Office of Scientific Research, y por el Grant RF 58122 de la Fundación Rockefeller.

BIBLIOGRAFIA

1. APPELTAUER, G.—Incorporación de 14-C lisina en fibras nerviosas motoras y sensitivas. Arch. Soc. Biol. Montevideo. (En prensa.)
2. DEFARES, J. G. and SNEDDON, I. N.—An introduction to the mathematics of medicine and biology. North-Holland Publ. Co., 1960, 495-496.
3. DROZ, B. and LEBLOND, C. P.—Migration of proteins along the axons of the sciatic nerve. Science, 1962, 137: 1047-1048.
4. KOENIG, H.—The synthesis and peripheral flow of axoplasm. Trans. Am. Neurol. Assoc., 1958, 83: 162-164.
5. MIANI, N.—Evidence of a proximo-distal movement along the axon of phospholipid synthesized in the nerve cell body. Nature, 1960, 193: 887-888.
6. OCHS, S. and BURGER, E.—Movement of substance proximo-distally in nerve axons as studied with spinal cord injections of radioactive phosphorus. Am. J. Physiol., 1958, 194: 499-506.
7. OCHS, S.; DALRYMPLE, D. and RICHARDS, G.—Axoplasmic flow in ventral root nerve fibers of the cat. Exp. Neurol., 1962, 5: 349-363.
8. RAMON Y CAJAL, S.—Degeneration and regeneration of the nervous system. Hafner Publ. Co., New York, 1959, 212-214.
9. SAMUELS, A. J.; BOYARSKY, L. L.; GERARD, R. W.; LIBBET, B. and BRUST, M.—Distribution, exchange and migration of phosphate compounds in the nervous system. Am. J. Physiol., 1951, 164: 1-15.
10. VERNE, J. et DROZ, B.—Déplacement de la radioactivité dans le ganglion cervical supérieur après injection de 35-S méthionine. Experientia, 1960, 16: 77-78.
11. WAELSCH, H. and LAJTHA, A.—Protein metabolism of the nervous system. De "The neurochemistry of nucleotids and amino-acids". R. O. Brady & D. B. Tower Ed., New York, 1959.

neal fibers of the
ng from 1 to 13
ptake was similar
animals. Younger
es. The average
stant during the
adient of specific
13th day. Peaks
3 and 7-10. The
gs of the second
. The results are
port mechanisms.

AF 49 (638) 585 y
arch, y por el Grant

fosas motoras y sen-

the mathematics of
496.

g the axons of the

Trans. Am. Neurol.

the axon of phospho-
887-888.

stally in nerve axons
rus. Am. J. Physiol.,

flow in ventral root

rvious system. Jafner

BET, B. and BRUST,
e compounds in the

le ganglion cervical
1960, 16: 77-78.

the nervous system.

R. O. Brady & D. B.

12. WEISS, P.—Endoneurial edema in constricted nerve. *Anat. Rec.*, 1943, 86: 491-522.
13. WEISS, P.—Damming of axoplasm in constricted nerves, a sign of perpetual growth in nerve fibers. *Anat. Rec.*, 1944, 88: 464.
14. WEISS, P.—Evidence of perpetual proximo-distal growth of nerve fibers. *Biol. Bull.*, 1944, 87: 160.
15. WEISS, P. and HISCOE, H.—Experiments on the mechanism of nerve growth. *J. Exp. Zool.*, 1948, 107: 315-395.
16. WEISS, P.; TAYLOR, C. and PILLAI, P. A.—The nerve fiber as a system in continuous flow: microcinematographic and electron microscope demonstrations. *Science*, 1962, 136: 330.
17. WEISS, P.; WANG, H.; TAYLOR, A. C. and EDDS, M. V. Jr.—Proximo-distal fluid convection in the endoneurial spaces of peripheral nerves as demonstrated by colored and radioactive (isotope) tracers. *Am. J. Physiol.*, 1945, 143: 521-540.

Incorporación de 14-C lisina en distintas fracciones de nervio periférico¹

GUSTAVO S. L. APPELTAUER y EDUARDO SAA (colaborador técnico)

INTRODUCCION.— Desde que el estudio directo de la dinámica de los componentes del organismo fue posible, gracias al empleo de compuestos marcados con radioisótopos, tanto el comportamiento de los aminoácidos frente a la barrera hemato-encefálica como su incorporación en las proteínas del sistema nervioso central han sido objeto de numerosas investigaciones. En contraste, sólo un escaso número de estudios sobre estos aspectos del nervio periférico ha sido realizado hasta el momento.

Una serie de investigaciones en relación a este tema consiste en estudios comparativos sobre la incorporación de 35-S metionina (8) y 14-C glicina (3) en cerebro y nervio periférico de mamíferos, que demostraron la presencia en ambos tejidos de proteínas rápida y lentamente metabolizadas. Se observó, además, que el metabolismo de fracciones proteicas equivalentes es más lento en el nervio que en el cerebro.

Un segundo grupo de investigaciones fue dirigido al estudio del movimiento de proteínas a lo largo del axón. La gran concentración de ácidos nucleicos a nivel del cuerpo celular y la existencia de un movimiento próximo-distal de axoplasma (9, 14, 15, 16, 17), hicieron suponer a varios autores que una parte de las proteínas de la neurona se sintetiza a nivel del cuerpo celular y luego se desplaza a lo largo del axón. A fin de demostrar esta teoría se administró a vertebrados 32-P fosfato (10), 14-C lisina (12), 14-C glicina y 35-S metionina (5), comprobándose que la incorporación de estos compuestos es mayor en las proteínas de la parte proximal del nervio que en las de la distal. La disminución progresiva de actividad en la parte proximal y aumento en la distal no fue siempre observada, y tampoco pudo ser comprobada en experimentos llevados a cabo en este laboratorio (2). Posteriormente, la incorporación de aminoácidos en las proteínas del axón fue estudiada en autorradiografías (4, 11).

El propósito del presente trabajo es hacer un estudio de corto plazo sobre la incorporación de 14-C lisina en nervio periférico de rata. El aminoácido se administró por vía intratecal a fin de provocar un gran desnivel de actividad entre las raíces y ganglios raquídeos y el nervio periférico (1), y obtener así datos sobre sus conexiones metabólicas.

1. Laboratorio de Biofísica, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Montevideo, Uruguay.

MATERIAL Y METODOS.— Como animales de experimentación se emplearon ratas albinas macho de 3 ½ a 4 meses de edad y 190-210 gramos de peso. Todas ellas fueron mantenidas en jaulas individuales a 20° C. de temperatura y alimentadas a voluntad.

Los animales fueron inyectados intratecalmente por punción lumbar con 6 μ C de U-14-C L-lisina disuelta en 0,3 ml. de solución de Ringer Locke y sacrificados en intervalos comprendidos entre 1 y 5 horas después de la inyección. Extraídos ambos nervios ciáticos, fueron sumergidos en vaselina líquida a 2° C. y sus fibras disecadas, como está especificado en la figura 1. Se tomaron además muestras de suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) e hígado. Más detalles sobre la técnica empleada, pueden consultarse en los trabajos anteriores (1).

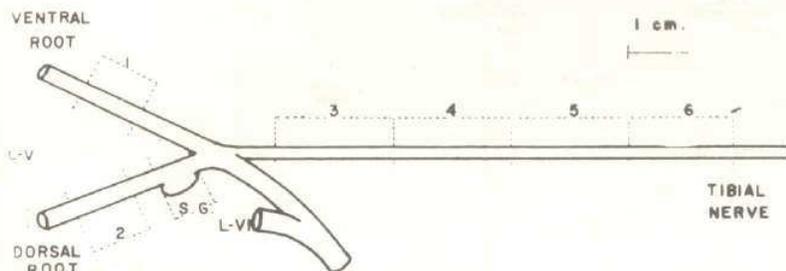


Fig. 1.— Esquema de la disecación del nervio ciático mostrando la localización de las muestras tomadas. Ventral root: raíz ventral; dorsal root: raíz dorsal; tibial nerve: nervio tibial; S. G.: ganglio raquídeo.

Procesamiento de las muestras.— Previa adición de 2 mg. de lisina no radioactiva, las muestras fueron desintegradas en un homogeneizador de pistón de teflón y lavadas una vez con cloroformo-metanol (2 : 1) y tres veces con agua-alcohol-éter (1 : 5 : 4). Este proceso se llevó a cabo a 2° C. de temperatura. El precipitado fue finalmente transferido a la plancheta B.

Los sobrenadantes, tomados en conjunto, fueron secados con corriente de aire a temperatura ambiente (12-20° C.), suspendidos en 1 ml. de cloroformo y lavados tres veces con 9 ml. de agua. Las fases acuosas fueron transferidas a la plancheta A y la clorofórmica a la C.

Tests llevados a cabo con homogeneizados de distintos tejidos mezclados con 14-C lisina y tratados en las condiciones arriba descritas, mostraron que más del 98% de la actividad se recoge en la fracción A. Las tres fracciones son Folin positivas; B y C son biuret positivas, A es biuret negativa. La fracción A será llamada "fracción de aminoácidos libres", B "fracción de proteínas" y C "fracción lipídica".

Determinación de la radioactividad.— Las tres fracciones fueron transferidas a planchetas de aluminio y secadas con corriente de aire bajo luz infra-

roja. La actividad se determinó en un contador G. M. de ventana delgada. Corregida la autoabsorción, los resultados se expresaron en conteos por minuto por miligramo de peso fresco del tejido (CPM/mg.).

RESULTADOS.—En los resultados obtenidos se observa, en primer lugar, una alta actividad específica en los tejidos situados en el espacio subaracnoideo, que quedan en contacto directo con la sustancia inyectada. Hay, sin embargo, un rápido pasaje de lisina a la sangre, hígado (14) y nervio periférico, detectable una hora después de la inyección.

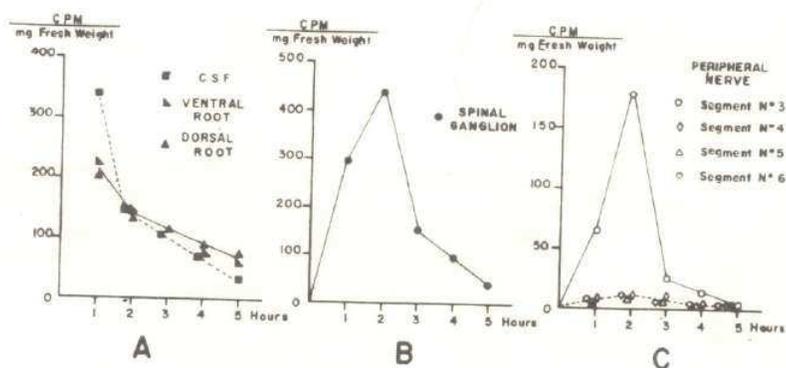


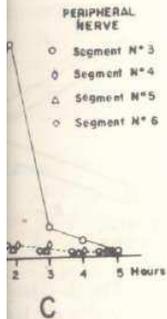
Fig. 2.—Actividades específicas (CPM/mg. peso fresco) (eje de las y) de la fracción A (ver texto) de los tejidos. Eje de las x: tiempo después de la inyección. A) Líquido cefalorraquídeo (CSF), raíz ventral (ventral root) y raíz dorsal (dorsal root). B) Ganglio raquídeo (spinal ganglion). C) Nervio periférico (peripheral nerve), segmentos Nos. 3, 4, 5 y 6 (ver figura 1).

La incorporación de lisina a la fracción de aminoácidos libres sigue dos esquemas distintos: en el líquido cefalorraquídeo y raíces raquídeas la actividad es máxima una hora después de la inyección, mientras que en el ganglio raquídeo y nervio tibial lo es a la segunda (fig. 2-B y 2-C).

Por otra parte, llama la atención el contraste entre la alta actividad específica del segmento más proximal del nervio tibial y el bajo nivel de los demás (tabla I y fig. 2-C). Esta diferencia disminuye con el tiempo y a las 5 horas se alcanza el equilibrio. En cambio, la actividad del ganglio es a las 5 horas menor que la de las raíces, pero unas 15 veces superior a la del nervio. Es de hacer notar que, colorantes como el azul de metileno y azul tripán, inyectados en las mismas condiciones, no penetran más allá del ganglio ni aún en 48 horas.

ventana delgada.
teos por minuto

en primer lugar,
o subaracnoideo,
lay, sin embargo,
periférico, detec-



eje de las y)
tiempo des-
raíz ventral
quídeo (spinal
tos N°s. 3, 4,

los libres sigue dos
quídeos la actividad
en el ganglio raquí-

alta actividad espe-
l bajo nivel de los
n el tiempo y a las
ad del ganglio es a
es superior a la del
de metileno y azul
más allá del ganglio

La eliminación de lisina libre, medida por el tiempo de renovación del 50%, es de aproximadamente 45 y 36 minutos para el ganglio y nervio tibial (segmento proximal). Es mucho más lenta en el LCR y raíces raquídeas (70 y 100 minutos aproximadamente).

Tabla I

ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\frac{CPM \pm \sigma}{mg. \text{ peso fresco}}$) DEL GANGLIO RAQUIDEO
Y DE LOS SEGMENTOS N°s. 3, 4, 5 y 6 del nervio tibial
(Ver figura 1)

Tiempo después de la inyección	Fracción	Ganglio raquídeo	Nervio tibial				Total
			3	4	5	6	
1 hora	A	299.28 ± 1.37	64.45 ± 0.56	9.80 ± 0.37	4.88 ± 0.33	6.71 ± 0.44	21.46 ± 0.22
	B	230.65 ± 1.14	4.30 ± 0.21	1.13 ± 0.25	0.97 ± 0.30	0.56 ± 0.34	1.74 ± 0.14
	C	8.79 ± 0.35	1.96 ± 0.22	0.26 ± 0.27	0.34 ± 0.32	0.00 ± 0.35	0.64 ± 0.15
	Total	538.72 ± 1.81	70.71 ± 0.64	11.19 ± 0.52	6.19 ± 0.55	7.27 ± 0.66	23.84 ± 0.30
	2 horas	A	439.13 ± 1.54	178.21 ± 0.72	10.55 ± 0.29	8.72 ± 0.26	10.86 ± 0.43
B	690.21 ± 1.80	29.77 ± 0.30	4.24 ± 0.22	2.23 ± 0.39	1.63 ± 0.30	9.47 ± 0.14	
C	52.42 ± 0.57	4.84 ± 0.18	0.30 ± 0.20	0.00 ± 0.18	0.28 ± 0.32	1.36 ± 0.12	
Total	1181.76 ± 2.44	212.82 ± 0.80	15.09 ± 0.42	10.95 ± 0.37	12.77 ± 0.61	62.92 ± 0.29	
3 horas	A	153.29 ± 0.91	26.46 ± 0.26	11.31 ± 0.24	6.19 ± 0.25	5.63 ± 0.29	12.40 ± 0.10
	B	489.72 ± 1.48	16.14 ± 0.20	7.36 ± 0.20	3.74 ± 0.21	2.03 ± 0.23	7.32 ± 0.08
	C	30.27 ± 0.43	1.29 ± 0.12	0.69 ± 0.16	0.54 ± 0.18	0.42 ± 0.22	0.74 ± 0.07
	Total	673.28 ± 1.79	43.89 ± 0.35	19.36 ± 0.35	10.47 ± 0.37	8.08 ± 0.42	20.46 ± 0.17

(Continuación de Tabla I)

Tiempo después de la inyección	Fracción	Ganglio raquídeo	Nervio tibial				Total
			3	4	5	6	
4 horas	A	97.17	13.99	4.80	3.53	4.77	6.77
		± 0.83	± 0.30	± 0.34	± 0.37	± 0.48	± 0.14
	B	297.97	5.29	4.00	5.24	1.93	4.12
		± 1.32	± 0.22	± 0.30	± 0.35	± 0.51	± 0.14
	C	10.36	0.54	0.30	0.80	0.80	0.61
± 0.36	± 0.19	± 0.30	± 0.24	± 0.74	± 0.17		
Total	405.50	19.82	9.10	9.57	7.50	11.50	
	± 1.62	± 0.42	± 0.54	± 0.59	± 1.02	± 0.27	
5 horas	A	39.43	2.84	2.99	1.62	2.58	2.51
		± 0.54	± 0.16	± 0.19	± 0.21	± 0.26	± 0.08
	B	212.85	2.39	1.89	1.17	1.63	1.77
		± 1.05	± 0.17	± 0.19	± 0.16	± 0.19	± 0.07
	C	8.79	0.03	0.46	0.39	0.42	0.33
± 0.32	± 0.14	± 0.17	± 0.20	± 0.25	± 0.08		
Total	261.07	5.26	5.34	3.18	4.63	4.61	
	± 1.22	± 0.25	± 0.32	± 0.32	± 0.41	± 0.13	

Tabla II

ACTIVIDAD ESPECÍFICA ($\frac{\text{GPM} \pm \sigma}{\text{mg. peso fresco}}$) DE LAS RAÍCES RAQUÍDEAS,
LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO, SUERO E HÍGADO

Tiempo después de la inyección	Fracción	Raíces raquídeas		Líquido cefalorraquídeo	Suero	Hígado
		Ventral	Dorsal			
1 hora	A	227.76	205.97	339.48	3.95	9.00
		± 1.09	± 0.88	± 1.59	± 0.03	± 0.11
	B	42.49	36.93	113.24	8.87	24.02
		± 0.47	± 0.39	± 0.92	± 0.04	± 0.21
	C	5.37	9.55	3.05	0.01	0.50
± 0.28	± 0.25	± 0.30	± 0.01	± 0.06		
Total	275.62	252.45	455.77	12.83	33.52	
	± 1.22	± 0.99	± 1.86	± 0.05	± 0.24	

(Continuación de Tabla II)

Total	Tiempo después de la inyección	Fracción	Raíces raquídeas		Líquido cefalorraquídeo	Suero	Hígado
			Ventral	Dorsal			
77 6.77	2 horas	A	152.51	137.75	148.82	2.45	8.87
48 ± 0.14			± 0.82	± 0.70	± 1.11	± 0.03	± 0.15
93 4.12		B	48.24	63.81	113.30	28.39	38.92
51 ± 0.14			± 0.46	± 0.47	± 1.00	± 0.08	± 0.28
80 0.61		C	8.13	8.08	1.60	0.10	1.21
74 ± 0.17	± 0.28		± 0.23	± 0.33	± 0.01	± 0.10	
50 11.50	Total	208.88	209.64	263.72	30.94	49.00	
02 ± 0.27		± 0.98	± 0.87	± 1.53	± 0.09	± 0.28	
58 2.51	3 horas	A		117.96	116.48	0.79	3.43
26 ± 0.08				± 0.59	± 0.82	± 0.02	± 0.10
63 1.77		B	67.94	73.40	104.90	19.49	17.45
19 ± 0.07			± 0.51	± 0.44	± 0.78	± 0.06	± 0.18
42 0.33		C		7.56	2.24	0.10	0.96
25 ± 0.08			± 0.20	± 0.25	± 0.01	± 0.08	
63 4.61	Total		198.92	223.62	20.38	21.84	
41 ± 0.13			± 0.76	± 1.16	± 0.06	± 0.22	
	4 horas	A	76.12	80.48	71.35	0.73	3.96
			± 0.66	± 0.60	± 0.68	± 0.01	± 0.09
IDEAS,		B	32.04	41.36	176.89	30.07	37.71
			± 0.42	± 0.42	± 1.12	± 0.08	± 0.22
		C	6.81	6.35	3.09	0.19	1.58
	± 0.28		± 0.24	± 0.27	± 0.01	± 0.07	
	Total	114.97	128.19	251.33	30.99	43.25	
		± 0.84	± 0.77	± 1.33	± 0.08	± 0.24	
Hígado	5 horas	A	61.39	69.58	28.92	0.67	1.18
9.00			± 0.42	± 0.33	± 0.51	± 0.01	± 0.07
± 0.11		B	40.09	53.56	116.68	19.22	23.33
24.02			± 0.36	± 0.49	± 1.02	± 0.06	± 0.16
± 0.21		C	5.31	2.55	1.05	0.01	0.29
0.50	± 0.38		± 0.30	± 0.15	± 0.00	± 0.07	
± 0.06	Total	106.79	125.69	146.65	19.90	24.80	
33.52		± 0.67	± 0.66	± 1.15	± 0.06	± 0.20	
± 0.24							

Tabla III

PORCENTAJE DE ACTIVIDAD TOTAL
INCORPORADA A LA FRACCIÓN B

$$\text{Resultados en } 100 \frac{\text{CPM} \pm \sigma}{\text{CPM total} \pm \sigma}$$

— A —

Tiempo después de la inyección	Ganglio raquídeo	Nervio tibial				Total
		3	4	5	6	
1 hora	42.81	6.08 ± 0.30	10.10 ± 2.32	15.67 ± 5.20	7.70 ± 4.70	7.30 ± 0.58
2 horas	58.41	13.99 ± 0.15	28.10 ± 1.66	20.37 ± 1.85	12.76 ± 2.86	15.05 ± 0.15
3 horas	72.74	36.77 ± 0.53	38.02 ± 1.25	35.72 ± 2.30	25.12 ± 3.11	35.78 ± 0.36
4 horas	73.48	26.69 ± 1.23	43.96 ± 2.02	54.75 ± 4.98	25.73 ± 7.90	35.83 ± 0.36
5 horas	81.53	45.44 ± 3.86	35.39 ± 4.14	36.79 ± 6.25	35.21 ± 5.28	38.39 ± 1.92

La incorporación de lisina a la fracción proteica (B) es muy rápida (tablas I y II). La actividad del ganglio es máxima a la segunda hora y más alta que la de las raíces espinales y LCR (fig. 3-A). En el nervio tibial (fig. 3-B) se observa ya la tendencia a la actividad próximo-distal decreciente que se hará evidente a las 24 horas (2). Las actividades máximas del primero, segundo y tercer segmento se alcanzan a la segunda, tercera y cuarta hora respectivamente.

Los más altos porcentajes de lisina incorporada a las proteínas se encontraron en el hígado y suero (90-100% a las 5 horas) (tabla III). Los valores del ganglio y LCR son intermedios (80% en 5 horas) y los de las raíces raquídeas y nervio periférico bajos (menores del 60% en 5 horas).

La incorporación de lisina a la fracción lipídica (C) es muy baja y sigue un esquema similar al de las proteínas (tablas I y II).

Tiempo después de la inyección	Raíces raquídeas		Líquido cefalorraquídeo	Suero	Higado
	1 Ventral	2 Dorsal			
1 hora	15.42 ± 0.15	14.63 ± 0.15	24.85 ± 2.44	69.13	71.66
2 horas	23.09 ± 0.23	30.44 ± 0.30	42.86	91.76	79.43
3 horas	—	36.90 ± 0.37	46.91	95.63	79.90
4 horas	27.87 ± 0.28	32.26 ± 0.32	70.38	97.03	87.19
5 horas	37.54 ± 0.38	42.61 ± 0.42	79.56	96.58	94.07

Total	
6	
7.70	7.30
4.70	± 0.58
12.76	15.05
2.86	± 0.15
25.12	35.78
3.11	± 0.36
25.73	35.83
7.90	± 0.36
35.21	38.39
5.28	± 1.92

uy rápida (ta-
ora y más alta
bial (fig. 3-B)
te que se hará
ero, segundo y
espectivamente.
fínas se encon-
). Los valores
as raíces raquí-
y baja y sigue

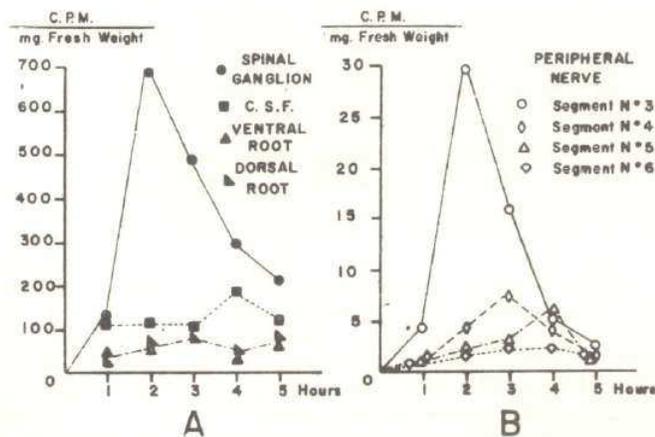


Fig. 3.—Actividades específicas (CPM/mg. peso fresco) (eje de las y) de la fracción B (ver texto) de los tejidos. Eje de las x: tiempo después de la inyección. A) Ganglio raquídeo (spinal ganglion), líquido cefalorraquídeo (CSF), raíz ventral (ventral root) y raíz dorsal (dorsal root). B) Nervio periférico (peripheral nerve), segmentos Nos. 3, 4, 5 y 6 (ver figura 1).

DISCUSION.—Cualquier sustancia administrada a un vertebrado tiene acceso al nervio por uno de los siguientes mecanismos: a) intercambio con el LCR (raíces raquídeas) o con el líquido endoneural (nervio tibial) (13, 18), b) intercambio con la sangre y linfa, y c) pasaje del cuerpo celular al axón (flujo axónico) (14, 15, 16, 17).

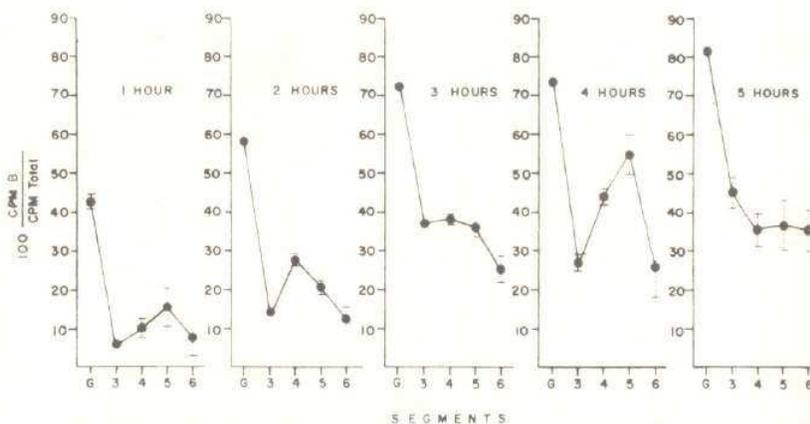
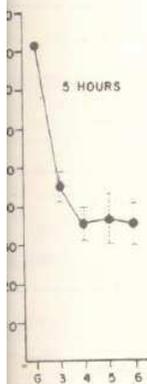


Fig. 4.—Porcentajes de actividad incorporada a la fracción B (eje de las y) del ganglio raquídeo (G) y de los segmentos Nos. 3, 4, 5 y 6 del nervio periférico (ver figura 1) (eje de las x). La línea punteada representa el desvío "standard".

La importancia del primer mecanismo queda demostrada en nuestros experimentos. La lisina radioactiva introducida en el LCR rápidamente penetra en las raíces y ganglios raquídeos, así como en el nervio tibial. Es dudoso que esta incorporación sea por intermedio de la sangre o linfa, ya que la actividad del suero es considerablemente menor. Por otra parte, luego de la inyección intraperitoneal de ^{14}C lisina, la actividad de las raíces y ganglio espinales y de los cuatro segmentos del nervio tibial es varias veces menor.

La posibilidad de incorporación a través del pasaje somato-axonal y flujo axónico puede también descartarse, ya que la corta duración de los experimentos impide la detección de un fenómeno que progresa a una velocidad de 1-1,5 mm. por día (16). Experimentos llevados a cabo en este laboratorio (1, 2) mostraron además, que las diferencias de actividad a lo largo del nervio se mantienen incambiadas aún 22 días después de la inyección, cuando ya la mayor parte de la actividad ha sido eliminada. Es de suponer, por lo tanto, que las proteínas marcadas que encontramos a lo largo del nervio se sintetizaron localmente o llegaron allí a través de otro mecanismo, por ejemplo, flujo endoneural (13, 18).

brado tiene ac-
rcambio con el
tibial) (13, 18),
celular al axón



(eje de
5 y 6 del
nteadada

nuestros expe-
ente penetra en
dudoso que esta
la actividad del
inyección intra-
pinales y de los

-axonal y flujo
de los experi-
na velocidad de
laboratorio (1, 2)
del nervio se
ando ya la ma-
or lo tanto, que
se sintetizaron
emplo, flujo en-

Llama la atención la gran velocidad de eliminación, tanto de aminoácidos libres como de proteínas, a nivel de la parte proximal del nervio periférico, lo cual impediría la llegada de gran parte de la lisina inyectada a las partes más distales. Los resultados presentados sugieren que no existe ninguna restricción para el intercambio con la sangre ni a nivel del ganglio ni del nervio tibial. La lenta pérdida de actividad por las raíces raquídeas puede interpretarse como una consecuencia del contacto con el LCR, fuertemente marcado.

Las actividades máximas de la fracción proteica (B) de los tres primeros segmentos del nervio tibial son alcanzadas a la segunda, tercera y cuarta horas respectivamente, lo cual sugeriría la presencia de un pasaje de proteínas de un segmento a otro. Estos resultados no aparecen en la fracción de aminoácidos libres (A).

El porcentaje de actividad total incorporada a las proteínas, es distinto a lo largo del nervio (tabla III y fig. 4). A pesar de la irregularidad de los resultados obtenidos, puede observarse una tendencia a ser menor en los primeros y últimos segmentos. Esto puede ser consecuencia, tanto de una distinta velocidad de eliminación de aminoácidos libres y proteínas a lo largo del nervio, como de una distinta velocidad de síntesis de proteínas.

RESUMEN.— La incorporación de ^{14}C L-lisina administrada por vía intratecal en tres fracciones (aminoácidos libres, proteínas y proteolípidos) de raíces raquídeas, ganglios raquídeos, nervio tibial, líquido cefalorraquídeo, suero e hígado de ratas fue estudiado en experimentos de 1 a 5 horas de duración.

Se encontraron altas actividades específicas en los tejidos situados en el espacio subaracnoideo (LCR, raíces raquídeas), ganglios raquídeos y segmento más proximal del nervio tibial. Las actividades de los segmentos más distales son mucho más bajas. La velocidad de eliminación es mínima en las raíces raquídeas y aumenta en el orden: LCR, ganglio espinal, nervio tibial (segmento proximal).

Fraciones rápida y lentamente metabolizadas fueron encontradas en proteínas y proteolípidos. La actividad de los últimos es mucho menor.

Las actividades específicas de la fracción proteica de los tres segmentos más proximales del nervio tibial fueron alcanzadas a la segunda, tercera y cuarta hora respectivamente. El porcentaje de actividad total incorporada a las proteínas fue máxima en el suero e hígado, intermedia en el ganglio espinal y LCR y mínima en las raíces raquídeas y nervio tibial.

SUMMARY.— The incorporation of intra-theccally administered ^{14}C L-lysine into three fractions (free amino-acids, proteins and proteo-lipids) of spinal roots, spinal ganglia, tibial nerve, cerebro-spinal fluid, serum and liver of rats was studied.

High specific activities were found in the free amino-acid fraction of sub-arachnoidally situated tissues (cerebro-spinal fluid, spinal roots), spinal ganglia and proximal part of tibial nerve. The activities found in the distal segments of tibial nerve were distinctly lower. The rate of elimination is minimal for the spinal roots and increases in the order: cerebro-spinal fluid, spinal ganglia and is highest in the tibial nerve (proximal segment).

Rapidly metabolized fractions were found in both proteins and proteo-lipids, the activities of the latter being much lower. Maximal specific activities of the protein fraction of the three most proximal segments of peripheral nerve are reached at 2, 3 and 4 hours respectively after the injection. The percentage of total activity incorporated into the protein fraction is highest for the serum and liver, intermediate for spinal ganglia and cerebro-spinal fluid and lowest for spinal roots and peripheral nerve.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Grant AF-AFOSR 61-64 de la U. S. Air Force Office of Scientific Research y por el Grant RF-61034 de la Fundación Rockefeller.

BIBLIOGRAFIA

1. APPELTAUER, G.—Incorporación de ^{14}C lisina en fibras nerviosas motoras y sensitivas de rata. Arch. Soc. Biol. (En prensa.)
2. APPELTAUER, G.; BENECH, C.; LEVITAS, A. and FRANCHI, C. M.—Incorporación de ^{14}C lisina en el nervio ciático normal de rata. Arch. Soc. Biol. (En prensa.)
3. DAVIDSON, A. N.—Metabolically inert proteins of the central and peripheral nervous system, muscle and tendon. Biochem. J., 1961, 78: 272-282.
4. DROZ, B. and LEBLOND, C. P.—Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by autoradiography. J. Comp. Neurol., 1963, 121: 325-346.
5. KOENIG, H.—The synthesis and peripheral flow of axoplasm. Trans. Am. Neurol. Assoc., 1958, 83: 162-164.
6. LAJTHA, A. and TOTH, J.—The brain barrier system III. The efflux of intracerebrally administered amino-acids from the brain. J. Neurochem., 1962, 9: 199-212.
7. MIANI, N.—Proximo-distal movement along the axon of protein synthesized in the perikarion of regenerating neurons. Nature, 1961, 185: 541.
8. PALLADIN, A. V.—The use of radioisotopes in the study of protein, nucleic acids and glycogen metabolism in the brain and peripheral nerves. Radioisotopes in scientific research. R. C. Extermann Ed., Pergamon Press, London, 1958, 403-414.
9. RAMON Y CAJAL, S.—Degeneration and regeneration of the nervous system. Hafner Publ. Co., New York, 1959, 212-214.
10. SAMUELS, A. J.; BOYARSKY, L. L.; GERARD, R. W.; LIBBET, B. and BRUST, M.—Distribution, exchange and migration of phosphate compounds in the nervous system. Am. J. Physiol., 1951, 164: 1-15.
11. VERNE, J. et DROZ, B.—Déplacement de la radioactivité dans le ganglion cervical supérieur après injection de ^{35}S méthionine. Experientia, 1960, 16: 77-78.
12. WAELSCH, H. and LAJTHA, A.—Protein turnover of the nervous system. De "The neurochemistry of nucleotids and amino-acids". R. O. Brady & D. B. Tower Ed., New York, 1959.

nd proteo-lipids,
activities of the
heral nerve are
he percentage of
for the serum
fluid and lowest

61-64 de la U. S.
de la Fundación

sas motoras y sen-

, C. M.—Incorpo-
ch. Sec. Biol. (En

al and peripheral
2-282.

the central nervous
J. Comp. Neurol.,

Trans. Am. Neurol.

efflux of intrace-
n., 1962, 9: 199-212.
synthesized in the

otein, nucleic acids
s. Radioisotopes in
ndon, 1958, 403-414.
ous system. Hafner

YT, B. and BRUST,
compounds in the

ganglion cervical
960, 16: 77-78.

us system. De "The
& D. B. Tower Ed.,

13. WEISS, P.—Endoneurial edema in constricted nerve. *Anat. Rec.*, 1943, 86: 491-522.
14. WEISS, P.—Damping of axoplasm in constricted nerves, a sign of perpetual growth in nerve fibers. *Anat. Rec.*, 1944, 88: 464.
15. WEISS, P.—Evidence of perpetual proximo-distal growth of nerve fibers. *Biol. Bull.*, 1944, 87: 160.
16. WEISS, P. and HISCOE, H.—Experiments in the mechanism of nerve growth. *J. Exp. Zool.*, 1948, 107: 315-395.
17. WEISS, P.; TAYLOR, C. and PILLAI, P. A.—The nerve fiber as a system in continuous flow: microcinematographic and electronmicroscope demonstrations. *Science*, 1962, 136: 330.
18. WEISS, P.; WANG, H.; TAYLOR, A. C. and EDDS, M. V. Jr.—Proximo-distal fluid convection in the endoneurial spaces of peripheral nerves as demonstrated by colored and radioactive (isotope) tracers. *Am. J. Physiol.*, 1945, 143: 521-540.

β -galactosidasa del intestino de la rata ¹

ANIBAL ALVAREZ

INTRODUCCION.— En un trabajo anterior se ha descrito el crecimiento de la actividad específica de la β -galactosidasa en el intestino de la rata (1, 2) durante la histodiferenciación, alcanzando un máximo que dura hasta el fin de la lactación. Luego la actividad desciende al nivel que se encuentra en el adulto. Esta enzima actúa como una galactotransferasa (3, 4) sobre los β -galactósidos.



donde Gal-O representa a la agrupación β -galactósido, A la aglicona (glucídica, alquilica o arílica) y ROH un aceptor, agua en el caso de la hidrólisis.

La distribución de β -galactosidasas en la naturaleza es muy extensa, donde su función fisiológica no es siempre bien comprendida. En el intestino de los mamíferos en lactación, el aumento señala su importancia en la asimilación de la lactosa (β -galactosil-glucosa) de la leche (5).

El objeto de este trabajo es el estudio de la β -galactosidasa extraída del intestino de ratas en lactación.

MATERIALES Y METODOS.— Se trabajó con intestinos delgados de ratas blancas, machos, de 10 a 18 días de edad, provenientes del criadero de Laboratorios Dispert S. A., cuya colonia, comenzada hace unos veinticinco años, puede considerarse como una línea aislada.

La actividad enzimática se midió por dos métodos: a) Usando el o-Nitrofenil β -galactósido (ONPG) como sustrato: se mide por la extinción a 420 m μ , en medio alcalino, el o-Nitrofenol liberado (1, 2). b) Usando la lactosa como sustrato: se determina enzimáticamente la glucosa liberada, con glucosa oxidasa, peroxidasa y o-tolidina como sustrato coloreable de esta última enzima (6).

En ambos casos se usan cantidades de enzima y de sustrato que aseguran una reacción de orden cero. La unidad de actividad es la cantidad de enzima que hidroliza 1 m μ M de sustrato en una hora en las condiciones establecidas; se expresa como u(ONPG) o u(lactosa) según el sustrato empleado.

¹. Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Montevideo, República Oriental del Uruguay.

do
0,9
fra
tur
did
por
vid
1%

Fig. 1.
fiada
lactosa
pleto.
0,05 M
0,05 M

C
que se
fieren
lar, la
por mg

RESULTADOS.— Purificación de la enzima.— La enzima se purificó alrededor de 50 veces a partir de homogeneizados de intestino en cloruro de sodio al 0,9%, mediante precipitaciones con acetona al 40%, tratamiento ácido a pH 3.1, fraccionamiento con acetona (40-64%) y con sulfato de amonio (40-60% de saturación). Se recupera alrededor del 25% de la actividad original.

La enzima es muy estable, pudiéndose guardar varios meses a -15° sin pérdidas apreciables. La actividad específica que se alcanzó es de 83.000 u(ONPG) por mg. de proteína, la cual es aproximadamente un 50% de la máxima actividad obtenida en la β -galactosidasa extraída de intestino de ternero (7) y sólo 1% de la proveniente de *Escherichia coli* (4).

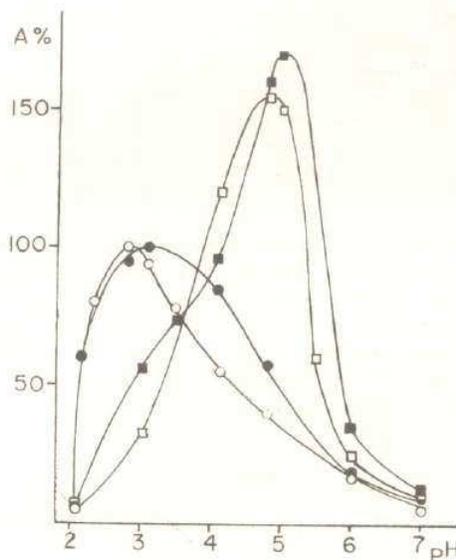


Fig. 1.— Efecto del pH sobre la actividad. ○ Hidrólisis del ONPG por la enzima purificada. ● Hidrólisis del ONPG por el homogeneizado completo. □ Hidrólisis de la lactosa por la enzima purificada. ■ Hidrólisis de la lactosa por el homogeneizado completo. Sustratos: 4 μ M/ml. de ONPG ó 40 μ M/ml. de lactosa. Buffers: ácido aspártico 0.05 M-HCl, pH 2.1 a 3.5; ácido fólico-citrato de sodio 0.05 M, pH 3.2-5.3; histidina 0.05 M-HCl, pH 5.0-8.0. Enzima purificada: 49.000 u(ONPG)/mg. proteína; homogeneizado completo: 800 u(ONPG)/mg. proteína.

Contenido de carbohidratos.— Se analizó el contenido de carbohidratos porque se conocen muchas glicosidasas asociadas a carbohidratos, las cuales confieren estabilidad a la proteína o son esenciales para su actividad. En particular, la β -galactosidasa de ternero más pura, conserva 10,8 mg. de carbohidrato por mg. de proteína (7). Sólo trazas de glúcidos se podrían asociar a la enzima

del intestino de la rata: menos de 0,025 mg. de carbohidratos por reacción a la antrona (8) y menos de 0,01 de aminoazúcares por el método de Elson y Morgan (9). Desde este punto de vista la enzima se asemeja a la de *E. coli*, que es una proteína pura (4).

Actividad en función del pH.— En la figura 1 se estudia la relación entre la actividad y el pH, observándose que los pH óptimos son diferentes para cada sustrato: alrededor de 3 para el ONPG y de 5 para la lactosa. Alrededor de pH 4 se observa una inflexión en la hidrólisis de la lactosa por el homogeneizado total.

La relación de actividades a los pH óptimos entre la lactosa y el ONPG es 1,7 para el homogeneizado completo y 1,55 para la enzima purificada. Debajo del pH 2.5 hay desnaturalización.

Estos resultados no pueden considerarse evidencia de la existencia de dos diferentes β -gactosidasas. Los referentes a la enzima purificada son muy similares a los de enzimas extraídas del epidídimo de la rata (10) y de varios órganos del ratón (11). Difieren de los encontrados en β -galactosidasas de otras fuentes, particularmente de la purificada del intestino de ternero (7) y de la señalada en fracciones citológicas de intestinos de ratas y conejos lactantes (12).

Efecto de varios cationes.— La actividad de la β -galactosidasa de *E. coli* se multiplica por 5 en presencia de los iones de metales alcalinos (8). Tal efecto no existe en la enzima estudiada según se observa en la tabla I, donde sólo se nota una sensibilización de la enzima a los pH ácidos por efecto de los cationes agregados, que se desnaturaliza. Es de notar que el verseno a concentración 0,075 M inhibe un 80% de la hidrólisis del ONPG, lo que sugiere que algún catión interviene en la actividad.

Tabla I

ACCION DE VARIOS CATIONES SOBRE LA ACTIVIDAD

Sustrato	pH	---	Na	K	NH ₄	Mg	Ca	Mn	Zn
			.05M	.05M	.05M	.05M	.05M	.075M	.075M
ONPG	2.5	90	55	48	64	32	25		
ONPG	3.2	100	101	102	98	100	102	104	102
ONPG	4.9	42	44	42	42	44	43		
Lactosa	4.8	100	101	98	98	98	87		

500 u(ONPG) de la enzima se incubó a 38° con 1 ml. de buffer, 8 μ M de ONPG o 40 μ M de lactosa y el catión, como cloruro, a la concentración indicada. Buffers: pH 2.5 y 3.2, glicilglicina 0.05M-HCl; pH 4.8 y 4.9, histidina 0.05M-HCl. Los valores se expresan como porcentaje de la actividad de la enzima sin cationes, en su pH óptimo.

F1
M
de
M
res

por reacción a la de Elson y Mor- de *E. coli*, que

la relación entre rentes para cada a. Alrededor de por el homoge-

tosa y el ONPG purificada. De-

existencia de dos la son muy simi- y de varios ór- osidasas de otras nero (7) y de la jos lactantes (12).

laxa de *E. coli* se s (8). Tal efecto I, donde sólo se to de los cationes a concentración sugiere que algún

VIDAD

	Mn	Zn
a	.075M	.075M
5		
2	104	102
3		
7		

8 μ M de ONPG o la. Buffers: pH 2.5 valores se expresan I óptimo.

Estabilidad térmica.— La enzima es relativamente estable a la temperatura si se la compara con las de otras fuentes, dependiendo lógicamente del pH a que se realiza la incubación, según la tabla II.

Tabla II

ACTIVIDAD RESIDUAL
DESPUES DE INACTIVACION TERMICA A DIFERENTES pH

pH	23	38	50
3.18	100	92	78
5.12	100	98	96
7.5	100	100	80
8.3	100	100	43

2.000 u(ONPG) se incuban en 0.5 ml. de buffer durante 20 minutos. La actividad residual se mide usando ONPG como sustrato y se expresa en forma porcentual. Buffers: ácido cítrico-citrato de sodio 0.05M, pH 7.5; Tris-HCl 0.05M, pH 8.3. Enzima: 83.000 u(ONPG)/mg. de proteína.

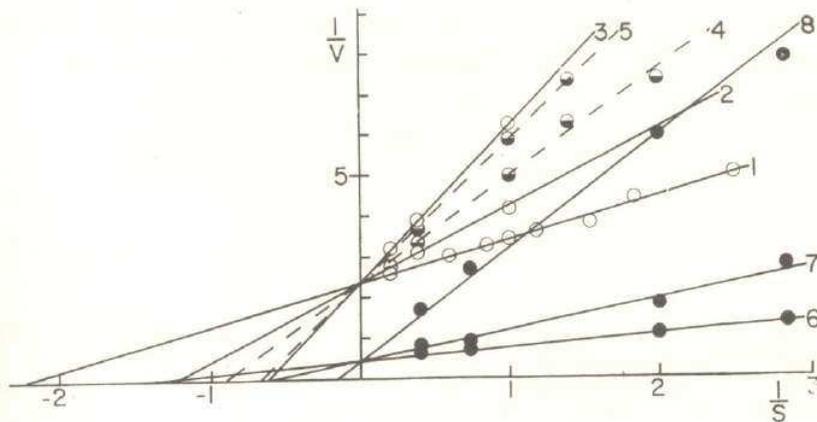


Fig. 2.—Relación de Lineaweaver y Burk para la determinación de las constantes de Michaelis y de inhibición. 1, 2 y 3: hidrólisis de ONPG con $0, 2,5 \times 10^{-3}$ y 50×10^{-3} M de lactosa, pH 3.8. 4, 5: hidrólisis de ONPG con $0, 2,5 \times 10^{-3}$ y 10×10^{-3} M de galactosa, pH 3.0. 6, 7 y 8: hidrólisis de la lactosa con $0, 2,5 \times 10^{-3}$ y 10×10^{-3} M de galactosa, pH 4.8. Buffers: ácido cítrico-citrato de sodio 0.05 M. V: velocidad de reacción de unidades arbitrarias. S: concentración del sustrato, $M \times 10^2$ para la lactosa, $M \times 10^3$ para el ONPG. Enzima: 83.000 u(ONPG)/mg. proteína.

Actividad como β -glucosidasa.—Esta actividad es muy pequeña en la preparación en estudio de la enzima. Se determinó usando salicina a diversos pH, entre 3 y 8, como sustrato, midiendo la hidrólisis por análisis químico de la glucosa liberada (13). La actividad es inferior al 0,4% de la observada con ONPG como sustrato. En enzimas de otros orígenes estas actividades están asociadas: por ejemplo, en la emulsina, un mismo locus es responsable de ambas (14).

Constantes cinéticas.—El estudio cinético se realizó por el método de Lineweaver y Burk, así como el de la inhibición competitiva causada por la lactosa y la galactosa, según la figura 2. Las constantes de Michaelis y de inhibición aparecen en la tabla III.

Tabla III
CONSTANTES CINÉTICAS Y DE INHIBICIÓN

Sustrato	Inhibidor	pH	Constantes
ONPG	—	3.0	$K_m = 4.5 \times 10^{-4}M$
ONPG	—	3.0	$V_m = 83 \mu M/hr./mg. prot.$
Lactosa	—	4.8	$K_m = 7.3 \times 10^{-3}M$
Lactosa	—	4.8	$V_m = 130 \mu M/hr./mg. prot.$
ONPG	Galactosa	3.8	$K_i = 3.6 \times 10^{-3}M$
ONPG	Lactosa	3.8	$K_i = 2.0 \times 10^{-2}M$
Lactosa	Galactosa	4.8	$K_i = 1.8 \times 10^{-3}M$

Las constantes fueron estimadas según el método de Lineweaver y Burk en los gráficos de la figura 2.

La glucosa no tiene efecto inhibitor a concentraciones fisiológicas; el efecto del ONPG sobre la hidrólisis de la lactosa no es posible estudiarlo por los métodos usados, debido a que el fenol liberado interfiere en la determinación enzimática de la glucosa.

Energía de activación.—La constante de reacción k y la temperatura de hidrólisis, para el ONPG y la lactosa, están relacionadas en el gráfico de la figura 3. La energía de activación ha sido calculada para cada reacción por la ecuación de Arrhenius: 12.1 kcal/mol para el ONP y 8.6 kcal./mol para la lactosa, entre 20 y 50°.

Activ
u(ONPG)
tores, 200
en un vol
pués de i
zaron las
de 50 μ l.,
piridina-ag
48 horas a
las manchi
provisoria
expresa en
se usa con
la lactotric
punto defi

DISCU
como una
tiene una r
el óptimo
con el sust
de la enzim

ña en la pre-
a diversos pH,
mico de la glu-
rada con ONPG
están asociadas:
ambas (14).

método de Li-
sada por la lac-
tilis y de inhibi-

onstantes

$\times 10^{-4}M$

$\mu M/hr./mg. prot.$

$\times 10^{-3}M$

$\mu M/hr./mg. prot.$

$\times 10^{-3}M$

$\times 10^{-2}M$

$\times 10^{-3}M$

rk en los gráficos

ológicas; el efec-
studiario por los
la determinación

temperatura de
el gráfico de la
da reacción por
cal./mol para la

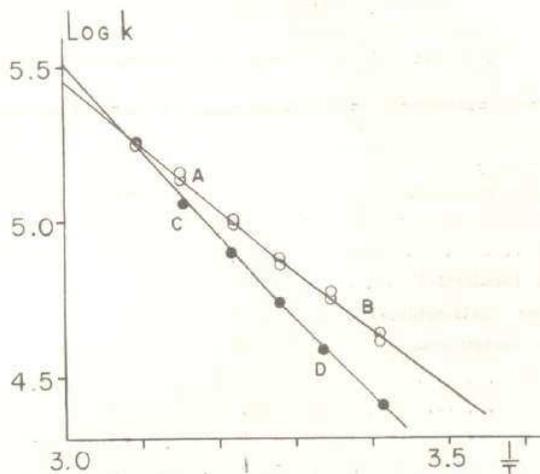


Fig. 3.—Relación del logaritmo de la constante de reacción ($\log k$) contra $1/T$. AB: hidrólisis de la lactosa. CD: hidrólisis del ONPG. K: constante de reacción en unidades arbitrarias. T: temperatura absoluta en $^{\circ}K \times 10^{-3}$.

Actividad transgalactosidante.—Esta propiedad se estudió incubando 5.000 u(ONPG) de la enzima con 200 μM de lactosa y agregando o no, como aceptores, 200 μM de galactosa o de glucosa, en buffer de citrato 0.05 M, pH 3 ó 5, en un volumen final de 1 ml., con una gota de xilol como conservador. Después de inactivar la enzima por calentamiento de 3 minutos a 100°, se analizaron las muestras por cromatografía. Se usó el método descendente, manchas de 50 $\mu l.$, papel Whatman número 1, y como solventes una mezcla de butanol-piridina-agua en relación 6 : 4 : 3. Los cromatogramas se desarrollaron durante 48 horas a 25° y se revelaron con biftalato de anilina. Los desplazamientos de las manchas, referidos al de la lactosa como R_L , se usaron para la identificación provisoria de los azúcares originados por transgalactosidación (15), según se expresa en la tabla IV. La galactobiosa sólo es sintetizada a pH 3 ó cuando se usa como aceptor galactosa. El producto de síntesis preferencial parece ser la lactotriosa, pero un análisis cuantitativo se requeriría para asegurar este punto definitivamente.

DISCUSION.—La β -galactosidasa estudiada en este trabajo se presenta como una enzima que difiere considerablemente de la extraída de *E. coli* (4); tiene una relación de actividad versus pH muy característica, especialmente por el óptimo en zona muy ácida, y por la dependencia que guarda esa relación con el sustrato. Los cationes de metales alcalinos, importantes en la actividad de la enzima bacteriana, no tienen aquí importancia. La relación entre la acti-

Tabla IV

PRODUCTOS DE LA ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA

Producto (identificación provisoria)	R _L	Aceptor		
		Laetosa	Glucosa	Galactosa
3-galactosil-glucosa	1.33	+++	+++	
6-galactosil-glucosa (allolactosa)	0.78	++	++	+
6-galactosil-galactosa (galactobiosa) ...	0.58	+		++
galactosil-lactosa (lactotriosa)	0.46	++++	++++	++++
Glucosa	2.2			
Galactosa	2.0			

Los métodos se describen en el texto. R_L (R_r referido a la lactosa) es el promedio de 5 cromatogramas.

vidad con ONPG como sustrato, sobre la actividad con lactosa, a sus pH óptimos, es de 14.9 para la enzima de *E. coli* y de 0.64 para la del intestino de rata.

Si bien se asemeja en este sentido a la enzima del ternero (7) cuya relación es de 0.31, se distingue por contener poco o ningún carbohidrato, por la relación entre actividad y pH para cada sustrato, y por la actividad transgalactosidante, entre otras propiedades.

Doell y Kretchmer (12) han descrito algunas características de la actividad de β -galactosidasa en el intestino de ratas lactantes que difieren de las presentadas en este trabajo, particularmente la distribución en diferentes fracciones celulares. Pese a que las técnicas empleadas son muy similares, no nos ha sido posible reproducir sus resultados.

Por otra parte, las observaciones descritas en este trabajo son similares a las señaladas por Mao y Rickenberg (11) para enzimas extraídas de diferentes órganos y células L del ratón, y por Conchie y Hay (10), del epidídimo de la rata.

La cinética de la enzima es de estudio sencillo, permitiendo el cálculo simple de las constantes cinéticas.

La existencia de dos enzimas presentes en el intestino con actividad de β -galactosidasa no surge de este trabajo, pese al diferente comportamiento para cada sustrato, dado que la relación entre las actividades ONPG/lactosa se mantiene relativamente constante. Si sólo una enzima es la responsable de la hidrólisis de la unión β -galactosídica, la parte aglicona de la molécula del sustrato es muy importante en la actividad de la enzima, dado que varía según ésta el pH de la configuración óptima del grupo activo.

RESUMEN.—Se ha descrito un método de purificación de la β -galactosidasa extraída del intestino de ratas en lactación y varias de sus propiedades. Las propiedades se han comparado con las de otras enzimas conocidas, en particular con la de *E. coli* y de intestino de ternero.

SUMMARY.—A 50 fold preparation of β -galactosidase extracted from intestines of baby rats was studied. It was devoid of carbohydrate, had an optimal pH of 3 for ONPG substrate and of 5 for lactose; several cations had no action on the enzymatic hydrolysis; β -glucosidase activity was very low. A kinetical study was done for the K_m determination and for the competitive inhibitory action of lactose and galactose; glucose was not inhibitory. The transgalactosidation was studied by chromatographic methods. A comparison with β -galactosidase from other sources is given.

Agradecimiento.—Se desea expresar nuestro reconocimiento al Dr. De Vries por la o-tolidina empleada, a Laboratorios Dispert S. A. por el aporte de ratas lactantes y a la Sra. G. M. de Drest por la discusión del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ, A. and SAS, J.—*Nature*, 1961, 190: 826.
2. ALVAREZ, A. y SAS, J.—*An. Fac. Med. (Montevideo)*, 1961, 46: 92.
3. WALLENFELS, K.—*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42: 1715.
4. WALLENFELS, K. and PRAKASH, O. M.—En "The enzymes", Boyer et al. (Ed.), 1960.
5. MILLER, T. and CRANE, R. K.—*Bioch. Bioph. Acta*, 1961, 52: 281.
6. SALOMON, L. L. and JOHNSON, I. E.—*Anal. Chem.*, 1959, 31: 453.
7. WALLENFELS, K. and FISCHER, J.—*Hope Seyler's Z.*, 1960, 321: 223.
8. DISCHE, Z.—*Meth. Biochem. Anal.*, 1955, 2: 313.
9. WINZLER, R. J.—*Meth. Biochem. Anal.*, 1955, 2: 279.
10. CONCHIE, J. and HAY, A. J.—*Biochem. J.*, 1959, 73: 327.
11. MAIO, J. J. and RICKENBERG, H. V.—*Bioch. Bioph. Acta*, 1960, 37: 101.
12. DOELL, R. G. and KRETCHMER, N.—*Bioch. Bioph. Acta*, 1962, 62: 353.
13. NELSON, N.—*J. Biol. Chem.*, 1944, 153: 375.
14. HEYWORTH, R. and WALKER, P. G.—*Biochem. J.*, 1962, 83: 331.
15. WOHNLIICH, J.—*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, 45: 1171.

Metabolismo de hexosas-fosfato y pentosas-fosfato en *Lactobacilo brevis*¹

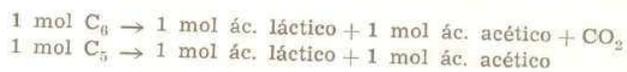
GLORIA MARTINEZ DE DRETS

INTRODUCCION.—Fred, Peterson y Anderson (1921) clasificaron las especies de *Lactobacilos* en dos grupos, caracterizados por su capacidad para fermentar lactosa y otros azúcares y producir manitol en la fermentación de fructosa. Las especies homofermentativas, incluyendo el *Lactobacilo plantarum*, fermentan la fructosa dando ácido láctico y sólo trazas de otros productos. Las especies heterofermentativas producen, además de ácido láctico, ácido acético, CO₂ y, en algunas especies, tales como el *Lactobacilo brevis*, *Lactobacilo pentoacético*, grandes cantidades de manitol. Dentro de este último grupo hay un número limitado de especies que fermentan la fructosa según la siguiente ecuación:



Anteriormente se determinó (Wolff y col., 1949) que el *Lactobacilo brevis* era incapaz de fermentar la glucosa a menos que se adicione l-arabinosa u otra pentosa. Este requerimiento auxotrópico de pentosas hizo pensar que existe un disturbio de la síntesis de las pentosas. Al realizar un estudio más exhaustivo, se aclaró que el *Lactobacilo brevis* podía crecer cuando estaban presentes como única fuente de carbono xilosa, ribulosa, ribosa, lixosa, fructosa y ácido glucurónico, pero que crecía sobre glucosa si también se le adicionaba dihidroxiacetona, gliceraldehído, ácido pirúvico u O₂. Estos últimos requerimientos indican la existencia de una anomalía más general en el metabolismo de los hidratos de carbono en el *Lactobacilo brevis*.

Se estableció: I) la no existencia de la enzima aldolasa en estas especies de *Lactobacilos* (Buyze, van den Hamer y de Haan, 1957), lo que señala que la glucosa no puede ser metabolizada por la vía glucolítica; II) que las sustancias mencionadas, xilosa, ribulosa, ribosa, lixosa, fructosa y ácido glucurónico, pueden ser fermentadas sin O₂ o aceptor de H de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



¹. Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Montevideo, República Oriental del Uruguay.

De acuerdo con el primer punto, al no poder fermentar las hexosas por la vía glucolítica, la única vía posible sería a través del ciclo de la hexosa monofosfato (Buyze, 1955), pudiendo realizarse los primeros pasos de este ciclo solamente en presencia de O_2 o de aceptores de H. Como el *Lactobacilo brevis* no puede sintetizar estos aceptores, sólo metabolizaría metabolitos del ciclo de la hexosa monofosfato, después de los pasos oxidativos (por ejemplo, ribosa, ribulosa o sustancias tales que puedan ser transformadas en dichos metabolitos después de adaptarse enzimáticamente).

En el caso del *Lactobacilo brevis* se presentan dos problemas a resolver: 1º) qué vía metabólica siguen las hexosas y las pentosas en su degradación; y 2º) explicar cómo estos *Lactobacilos* fermentan la fructosa y no la glucosa.

El problema es determinar si existe alguna otra vía metabólica o aceptor orgánico de hidrógeno en la fermentación de la fructosa, que no esté presente en la fermentación de la glucosa. Estos dos puntos son los que se han tratado de aclarar en el presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS.— En este trabajo se ha empleado la cepa de *Lactobacilo brevis* ATCC 367, obtenida de la American Type Collection en forma liofilizada. Estos microorganismos fueron crecidos de acuerdo a lo descrito en nuestro trabajo anterior (Martínez, Barker y Horecker, 1963).

El extracto bacteriano se obtuvo provocando la ruptura bacteriana con polvo de vidrio de grado de finura 200 mesh, en cantidad doble al peso de las células húmedas durante 10 m a $0^\circ C$. en mortero de porcelana; con adición de 0.05 ml. de solución de cisteína 0.1 M, y se extrajo con un Buffer de 0.005 M de fosfato de sodio pH 6.5 conteniendo glutatión 2×10^{-4} M.

El extracto se centrifugó a 5.000 r. p. m. en una centrifuga International refrigerada y se separó el sobrenadante en donde se ensayaron las actividades enzimáticas. La precipitación con sulfato de amonio se realizó con una solución saturada de sulfato de amonio pH 7.0 y la fracción precipitada entre 50 y 70% de saturación fue disuelta en Buffer 0.05 M de Tris pH 7.5 adicionado de 2×10^{-4} M glutatión.

Todas las manipulaciones con los extractos bacterianos se realizaron a una temperatura entre 0 y $4^\circ C$.

En el presente trabajo se han empleado los siguientes métodos analíticos:

La fructosa fue determinada por el método de Roe (1934); el manitol por el método de Dixon y Lipkin (1954) y enzimáticamente (Martínez, Barker y Horecker, 1963).

La ribosa-5-P y sedoheptulosa-7-P fueron determinados por el método de Mejbaum (1939).

La ribulosa-5-P y xilulosa-5-P fueron determinados por el método de Dische y Borenfreund (1951).

El Acetil-P fue determinado por el método de Lipman y Tuttle (1945).

El Pi fue determinado por el método de Fiske y Subbarow (1925).

El piruvato se midió por el método colorimétrico de Elgar y Nelson (1941) y enzimáticamente con láctico deshidrogenasa.

El ácido Láctico se midió por el método de Barker y Summerson (1941).

La glucosa-6-P, triosa-P y 6-P-glucónico fueron determinadas enzimáticamente con glucosa-6-P deshidrogenasa; glicerofosfato deshidrogenasa junto con triosa fosfato isomerasa y 6-P-glucónico deshidrogenasa respectivamente.

El acetato fue determinado enzimáticamente con acetoquinasa, seguido por el método colorimétrico de Lipman y Tuttle (1945).

La aldolasa fue determinada de acuerdo con el método de Warburg y Christian (1943).

La hexoquinasa, fructoquinasa, hexosamonofosfato isomerasa, láctico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa fueron determinadas de acuerdo a los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, Vol. 1 (1955).

La Na glucosa-6-P; Na fructosa-6-P; ADP; gliceraldehído-3-P; NAD⁺; láctico deshidrogenasa y hexoquinasa fueron obtenidos del Laboratorio Sigma.

NADP⁺ y gliceraldehído-3-P fueron obtenidos del Nutritional Biochemical Corp.

Ba Ribosa-5-P y Na Piruvato fueron comprados al Laboratorio Schwartz.

La fructosa fue obtenida del Laboratorio Merck.

El Ba 6-P-glucónico fue comprado al Laboratorio Calbiochem y transformado en sal de sodio.

La 6-P-glucónico deshidrogenasa fue preparada a partir de *Candida utilis* de acuerdo al método seguido por Pontremoli, de Flora, Grazi, Mangiarotti, Bonsignore y Horecker (1961).

La P-pentosa isomerasa fue preparada de acuerdo a la técnica de Hurwitz, Weissbach, Horecker y Smyrniotis (1956) y la P-pentosa epimerasa de acuerdo a Hurwitz y Horecker (1956).

La α -glicero-P-deshidrogenasa y la aldolasa se obtuvo a partir de músculo de conejo según la técnica de Racker (1947).

La acetoquinasa fue preparada según la técnica de Rose, Grunberg-Manago, Korey y Ochoa (1954).

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS.— Al determinar cuál era la vía metabólica seguida por la molécula de glucosa-6-P se ha establecido:

I) No se ha encontrado el ciclo de la hexosa monofosfato de Warburg, Horecker y Dickens, puesto que no se ha comprobado la actividad de las enzimas transcetolasa y transaldolasa.

II) No se ha hallado la vía de Entner-Doudoroff.

III) Se pensó que pudiera existir la enzima P-pentocetolasa que había sido estudiada en el *Lactobacilo pentosus* por Heath, Hurwitz y Horecker (1957) y que es capaz de escindir la molécula de Xilulosa-5-P en moléculas con 2 y 3 átomos de carbono.

Para ello se incubó extracto de *Lactobacilo brevis* con Ribosa-5-P y se midió la formación de acetyl-P y triosa-P. Se encontró que la cantidad de estos

dos productos formados es equimolecular con la Ribosa-5-P desaparecida. Posteriormente se purificó este extracto aislándose la fracción que precipita a una saturación de 50 a 70% de sulfato de amonio. Esta fracción tiene actividad enzimática de fosfopentocetolasa, fosforibosa isomerasa y fosfocetopentosa epimerasa.

Tabla I

ESTEQUIOMETRIA DE LA ESCISION PENTOSA-FOSFATO

La mezcla de incubación contuvo por ml. 20 μM de Ribosa-5-P; 23 μM de fosfato; 3,3 μM de Mg^{++} ; 0,68 μM de Tiamina pirofosfato; 2 μM de glutatión; 67 μM de buffer de succinato de sodio pH 6.0; 2,0 mg. de una fracción precipitada con sulfato de amonio obtenida de *Lactobacilo brevis*.

Las muestras fueron tomadas a 30 m. y 60 m. de incubación a 25° C.

Experimento	Ribosa-5-P consumida en μM		Triosa-P formada en μM		Acetil-P formado en μM	
	30'	60'	30'	60'	30'	60'
1	8.60	12.18	8.20	11.80	8.12	11.60
2	7.40	11.70	7.20	12.20	—	—
3	7.25	10.53	6.92	10.70	6.83	10.90
4	7.02	10.30	6.70	9.95	7.20	10.20
5	8.85	12.50	8.50	11.80	8.35	12.05
6	7.20	11.80	7.35	12.00	7.12	11.90
7	7.54	12.30	8.05	12.40	—	12.53
8	8.45	12.70	9.02	11.90	8.70	12.40
Valor promedio	7.79	11.75	7.70	11.59	7.72	11.65

La existencia de esta enzima, la P-pentocetolasa, fue confirmada además por la medida de la desaparición de fosfato (equimolecular con la concentración de Ribosa-5-P desaparecida) (tabla II).

Tabla II

DETERMINACION DE FOSFATO DESAPARECIDO

La mezcla de incubación contuvo por ml. 20 μM de Ribosa-5-P; 23 μM de fosfato; 3,3 μM de Mg^{++} ; 0,68 μM de Tiamina pirofosfato; 2 μM de glutatión; 67 μM de buffer de succinato de sodio pH 6.0; 6 μM de ADP; 67 μM de glucosa; 100 μg de hexoquinasa; 2 mg. de una fracción precipitada con sulfato de amonio obtenida de *Lactobacilo brevis*.

Las muestras fueron tomadas a 30 m. y 60 m. de incubación a 25° C.

Experimento	Ribosa-5-P consumida en μM		μM de fosfato desaparecido				Fracción calentada (1)	
	Sistema completo		Sistema completo		Sin Ribosa 5-P			
	30'	60'	30'	60'	30'	60'	30'	60'
1	8.70	11.80	9.02	12.25	0.15	0.25	0.00	0.01
2	9.30	12.10	9.45	12.90	0.24	0.40	0.05	0.02
3	9.50	12.70	9.30	11.80	0.08	0.23	0.15	0.22
4	8.84	12.05	9.05	12.57	0.15	0.04	0.03	0.09
5	8.53	11.50	8.95	11.95	0.09	0.32	0.02	0.18
Valor promedio	8.97	12.03	9.15	12.32	0.14	0.25	0.05	0.10

(1) El extracto enzimático fue desnaturalizado por calentamiento a 60° C. durante 3 minutos.

La desaparición de fosfato se determinó también incubando el extracto de *Lactobacilo brevis* con P^{32} en presencia de Ribosa-5-P como sustrato, demostrándose la formación de ATP^{32} , que fue adsorbida con charcoal (Heath, Hurwitz, Horecker y Ginsburg, 1958) y luego eluida con ácido clorhídrico a ebullición (tabla III).

Tabla III

DETERMINACION DE ATP^{32} FORMADO

(Conteo por minuto)

La mezcla de incubación contuvo por ml.: 20 μM de Ribosa-5-P; 3,3 μM de Mg^{++} ; 0,68 μM de Tiamina pirofosfato; 2 μM de glutation; 67 μM de buffer de succinato de sodio pH 6.0; 5 μM de ADP, fosfato 32 aproximadamente 7.000 c. p. m. y 2 mg. de una fracción precipitada con sulfato de amonio obtenida de *Lactobacilo brevis*.

La reacción se inició mediante la adición de sustrato y después de 30 m. de incubación a 25° C. se detuvo por dilución con 5 ml. de ácido perclórico al 2,5 por ciento. Los adenina nucleótidos fueron adsorbidos con charcoal (0,5 ml. de una suspensión al 10 por ciento) y eluidos con 2 ml. de ácido clorhídrico 1 N, recogidos en una plancheta y contados.

Experimento	Sistema completo	Sin Ribosa-5-P	Fracción enzimática calentada
1	5.800	1.300	380
2	4.900	730	120
3	5.250	515	52
4	4.830	640	105
5	4.740	430	87

Una vez establecida la existencia de esta enzima, se continuó determinando la actividad en el extracto de *Lactobacilo brevis* de todas las otras enzimas que intervienen en este ciclo que intentamos demostrar en el presente trabajo (cuadro 1).

Quadro 1

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DEMOSTRADAS
EN EL EXTRACTO DE LACTOBACILO BREVIS

Enzimas	Actividad
Glucosa-6-P deshidrogenasa	+
6-Fosfogluconico deshidrogenasa	+
Fructoquinasa	+
P-Pentocetolasa	+
P-Pentosa isomerasa	+
P-Ceto pentosa epimerasa	+
Láctico deshidrogenasa	+
Acetoquinasa	+
Alcohol deshidrogenasa	+
Manitol deshidrogenasa	+
Glucoquinasa	-
Aldolasa	-
Transcetolasa	-
Transaldolasa	-
Fosofructoquinasa	-

determinando
estas enzimas
este trabajo

Las actividades enzimáticas se determinaron de acuerdo a *Methods in Enzymology* (vol. 1).

Se determinó, además, la actividad de las enzimas deshidrogenasas en el extracto de *Lactobacilo brevis* con las coenzimas NAD⁺ y NADP⁺ (tabla IV).

Tabla IV

ACTIVIDADES ENZIMATICAS
EN EL EXTRACTO DE LACTOBACILO BREVIS

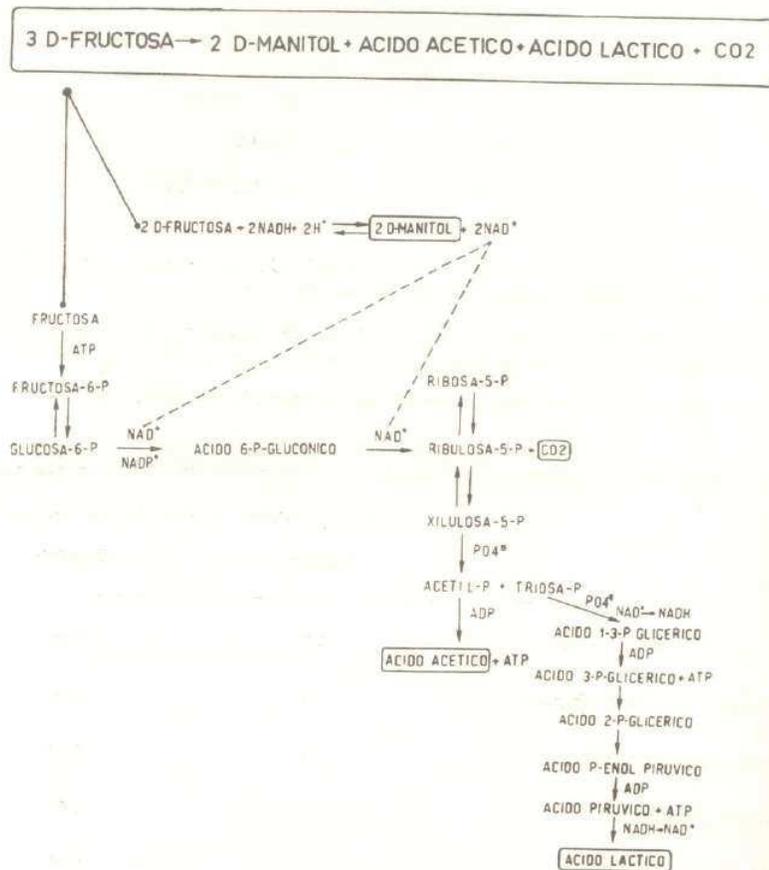
La actividad enzimática fue medida siguiendo la reducción de NAD⁺ o NADP⁺ con un espectrofotómetro Beckman Modelo D. U.

Las unidades de enzimas se definen como la cantidad requerida para producir un cambio inicial en la densidad óptica de 1.0 por minuto a 340 m μ .

Las proteínas fueron determinadas por el método de Büchner (1947).

Enzimas	Actividad específica en unidades/mg. de proteína	
	NAD ⁺	NADP ⁺
Glucosa-6-P deshidrogenasa	6,7	12,50
6-Fosfogluconico deshidrogenasa ..	0,3	0,00
Manitol deshidrogenasa	4,7	0,00
Hexosa-P isomerasa		3,54
Fructoquinasa		1,40
Láctico deshidrogenasa	21,0	0,00
Alcohol deshidrogenasa	3,1	2,90

DISCUSION.— En la presente investigación creemos haber aclarado la vía metabólica seguida por las pentosas-P y hexosas-P en el *Lactobacilo brevis* estableciéndose los pasos que llevan a la formación de manitol, ácido acético y ácido láctico, postulándose el siguiente ciclo:



Se ha determinado, además, que todas las enzimas deshidrogenasas del *Lactobacilo brevis* actúan a NAD⁺ y sólo en algunos a NADP⁺. De todas estas enzimas, la que más llama la atención es la glucosa-6-P deshidrogenasa de alta actividad a NAD⁺, ya que esta enzima siempre actúa a NADP⁺, con la sola excepción en toda la literatura del *Leuconostoc mesenteroide* (De Moss, Bard y Gunsalus, 1951), pero con una actividad a NAD⁺ muy inferior a la enzima encontrada por nosotros.

aclarado la vía
lactobacilo brevis
ácido acético y

LACTICO + CO₂

RESUMEN.—1) Se ha establecido la vía metabólica seguida por las pentosas y las hexosas fosfato en el *Lactobacilo brevis*, determinándose la existencia de la enzima fosfo-pentocetolasa que divide la molécula de xilulosa-5-P en dos moléculas de 2 y 3 átomos de carbono.

2) Se han identificado las enzimas que transforman la fructosa en ácido láctico y acético y se ha aclarado cual es la vía metabólica seguida en la fermentación de la fructosa por los *Lactobacilos heterofermentativos*.

3) Se ha aclarado que los primeros pasos oxidativos del ciclo hexosamofosfato se realizan con la intervención de NAD⁺ formado en la transformación de fructosa a manitol.

4) Se destaca el hecho de que todas las deshidrogenasas encontradas tienen como coenzima NAD⁺ y sólo algunas de esas deshidrogenasas tienen también NADP⁺ como coenzima.

SUMMARY.—1) In the present paper the metabolic pathway followed by the hexoses and pentoses phosphate in *Lactobacillus brevis* has been pointed out. The presence of the enzyme phosphoketolase which cleaves one mol. of xylulose-5-P into one ₂C mol. and one ₃C mol. has been determined.

2) The enzymes which transform the fructose into lactic acid and acetic acid have been identified. The metabolic pathway followed in the fermentation of the fructose by the heterofermentative *Lactobacillus* is described.

3) It has been concluded that the first oxidative steps of hexose monophosphate cycle are carried out in the presence of NAD⁺ which is formed in the transformation of fructose into mannitol.

4) The fact that all the dehydrogenases are NAD⁺ linked and that only in some cases NADP⁺ can replace it, is emphasized.

BIBLIOGRAFIA

- BARKER, S. B. and SUMMERSON, W. H.—*J. Biol. Chem.*, 1941, 138: 535.
BUYZE, G.—Thesis Utrecht, 1955.
BUYZE, G.; van den HAMER, C. J. A. and de HAAN, P. G.—*Antonie van Leeuwenhoek*, 1957, 23: 345.
BÜCHER, T.—*Biochim. et Biophys. Acta*, 1947, 1: 292.
DE MOSS, R. D.; BARD, R. C. and GUNSALUS, I. C.—*J. Bacteriol.*, 1951, 62: 499.
DISCHE, Z. and BORENFREUND, E.—*J. Biol. Chem.*, 1951, 192: 583.
DIXON, J. S. and LIPKIN, D.—*Anal. Chem.*, 1954, 26: 1092.
ELGART, F. and NELSON, A.—*J. Biol. Chem.*, 1941, 138: 443.
ELTZ, R. W. and van de MARK, P. J.—*Bacteriol. Proc.*, 1957, 122.
FISKE, C. H. and SUBBAROW, Y.—*J. Biol. Chem.*, 1925, 66: 375.
FRED, E. B.; PETERSON, W. H. and ANDERSON, J. A.—*J. Biol. Chem.*, 1921, 48: 385.
HEATH, E. C.; HURWITZ, J. and HORECKER, B. L.—*J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 78: 5449.

NAD⁺ - NADH
P GLICERICO
ADP
GLICERICO + ATP
P GLICERICO
NOL PIRUVICO
ADP
UVICO + ATP
NADH - NAD⁺
LACTICO

rogenasas del Lac-
+. De todas estas
idrogenasa de alta
ADP+, con la sola
e (De Moss, Bard
ferior a la enzima

- HEATH, E. C.; HURWITZ, J.; HORECKER, B. L. and GINSBUNG, A.—*J. Biol. Chem.*, 1958, 231: 1009.
- HURWITZ, J. and HORECKER, B. L.—*J. Biol. Chem.*, 1956, 218: 753.
- HURWITZ, J.; WEISSBACH, A.; HORECKER, B. L. and SMYRNIOTIS, P. Z.—*J. Biol. Chem.*, 1956, 218: 769.
- LIPMANN, F. and TUTTLE, L. C.—*J. Biol. Chem.*, 1945, 159: 21.
- MARTINEZ, G.; BARKER, H. A. and HORECKER, B. L.—*J. Biol. Chem.*, 1963, 238: 1598.
- MEJBAUM, W. Z.—*Z. physiol. Chem.*, 1939, 258: 117.
- Methods in Enzymology. Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, 1955, Vol. I.
- PONTREMOLI, S. A.; DE FLORA, A.; GRAZI, E.; MANGIAROTTI, G.; BONSIGNORE, A. and HORECKER, B. L.—*J. Biol. Chem.*, 1961, 236: 2975.
- RACKER, E.—*J. Biol. Chem.*, 1947, 167: 843.
- ROSE, I. A.; GRUNBERG-MANAGO, M.; KOREY, S. R. and OCHOA, S.—*J. Biol. Chem.*, 1954, 211: 737.
- ROE, J. H.—*J. Biol. Chem.*, 1934, 107: 15.
- WARBURG, O. and CHRISTIAN, W.—*Biochem. Z.*, 1943, 314: 149.
- WOLFF, R. and KARLIN, R.—*En: Cl. Lancetot; Comp. Rend. Soc. Biol.*, 1949, 143: 1100.

Agradecimiento.— Se agradece al Dr. B. L. Horecker por las sugerencias y consejos dados en la realización de este trabajo.

plan
geri
únic
fine
dife
con
prim
5 mi
dose
Sobr
y S.
gre
10%
latin
suerc
dos p
de la
regid
Se fe
apro:
mato
con
Mont

Acción proteolítica del látex del *Ficus Carica*¹

MERCEDES ROVIRA DE CUTINELLA,
AUREA GUEVARA y MARTA RUIZ

Desde tiempo atrás se conoce la acción proteolítica del látex de distintas plantas. Entre ellos el obtenido del *Ficus Carica* (higuera común).

Se ha establecido la acción proteolítica y anticoagulante (1) y se ha sugerido que esta enzima es del tipo sulfhidrílico (2).

Por su acción proteolítica se le ha usado como antihelmíntico y es ésta la única aplicación clínica que ha tenido hasta ahora.

A. Walti (3) obtuvo la ficina cristalina. En el comercio se encuentra para fines de investigación una suspensión de ficina en cisteína que reveló en los diferentes métodos usados una actividad proteolítica mucho menor a la obtenida con el látex que nosotros experimentamos.

19) OBTENCION.—El látex es extraído del fruto verde; obteniéndose exprimiéndolo, un escaso rendimiento. De 100 higos se obtiene aproximadamente 5 ml. de látex. Se centrifuga al frío y se descarta la parte gomosa, conservándose el líquido amarillento congelado.

20) PRUEBAS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA.—a) "*In vitro*": Sobre la leche se estudió la acción coagulante usando el método de A. K. Balls y S. R. Hoover (4). Sobre la sangre se probó la acción anticoagulante, en sangre venosa y arterial de distintos animales (ratas, cobayos, conejos y humana).

No se observó hemólisis en las condiciones estudiadas (0ml.05 de látex al 10% en suero fisiológico + 2 ml. de sangre).

Se demostró, además, la acción proteolítica sobre diferentes sustratos, gelatina, caseína y fibrina.

b) "*In vivo*": Se inyectó a un lote de ratas, una sol. de látex al 1/10 en suero fisiológico por vía subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. Por las dos primeras vías se vieron acciones locales sobre la zona inyectada. Con 0,1 ml. de la solución indicada aparece a los pocos segundos enorme hematoma de la región. Con 0,2 ml., el hematoma es seguido de ulceración entre las 6 y 8 horas. Se forma posteriormente una escara seca que no se infecta y que cura en 15 días aproximadamente. Por vía intraperitoneal la inyección de 0,2 ml. provocó hematomas múltiples, exudado hemorrágico intraperitoneal y vísceras congestivas con piqueteado hemorrágico.

¹ Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica, Montevideo, Uruguay.

Estos hechos fueron comprobados en animales muertos a las 24 horas de la inyección y en los autopsiados 48 horas después.

En el perro por inyección intravenosa produjo acción fibrinolítica que medimos por el test de lisis de las euglobulinas de von Kaulla (5).

Se usaron 5 animales. Se toma el tiempo de lisis de las euglobulinas, previo a la inyección del látex por vía intravenosa y en tiempo sucesivos (½ hora, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 6 horas) (ver tabla I).

Tabla I

	Cantidad de látex dil. 1/10 en suero fisiológico	Tiempo de lisis normal	Tiempo de lisis a ½ h.	Tiempo de lisis a 1 h.	Tiempo de lisis a 2 h.	Tiempo de lisis a 3 h.	Tiempo de lisis a 6 h.
		antes de la inyección					
Perro 1	0 ml. 2	33m	0m	0m	0m		
Perro 2	0 ml. 1	70m	53m	48m		100m	72m
Perro 3	0 ml. 1	40m	15m	23m	50m		
Perro 4	0 ml. 1	54m	8m	52m	60m		
Perro 5	0 ml. 1	51m	11m	33m	54m		

En el perro N° 1 de 10 Kg. que recibió 0ml.2 de látex diluido al 1/10 cuyo tiempo normal de lisis era de 33m, en las medidas realizadas posteriormente a la inyección del látex, el coágulo de euglobulina se lisaba inmediatamente o sea en tiempo 0. El animal sangraba abundantemente desde todos los puntos de punción (sangre líquida que no coagulaba) y muere a las 6 horas. Considerando que la cantidad inyectada es muy elevada, en los otros animales se inyecta 0ml.1 de la diluida al 1/10 en suero fisiológico. Se puede observar que a la ½ hora el tiempo de lisis ha descendido francamente manteniéndose esos valores alrededor de 1 hora para luego ascender entre las 2 y 3 horas, llegando en todos los casos a cifras superiores a las normales (fenómeno de rebote).

39) MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA.— Usamos la técnica de Wallerstein (6) empleando 1/10 de las cantidades descritas.

En tubo de ensayo se colocan:

2,5 ml. de sustrato (sol. de caseína al 1%).

1 ml. de enzima (en buffer de cisteína versenato).

Se incuba 15m a 38° C.

las 24 horas de la

prinolítica que me
(5).

uglobulinas, previo
ucesivos (½ hora).

po	Tiempo	Tiempo
sis	de lisis	de lisis
h.	a 3 h.	a 6 h.

100 ^m	72 ^m
------------------	-----------------

ex diluido al 1/10
realizadas posterior-
se lisaba inmedia-
mente desde todos
a las 6 horas.

los otros animales
Se puede observar
ente manteniéndose
as 2 y 3 horas, lle-
nómeno de rebote).

Usamos la técnica
tas.

2 ml. de ácido tricloroacético.

Se agita, se deja 30^m en el baño. Se filtra y se lee al Beckman a 280 mμ.

Se compara con un blanco en las mismas condiciones, excepto el T. C. A. que se agrega en tiempo cero.

Adaptamos esta técnica sustituyendo el sustrato caseína por fibrina y gelatina. Una unidad de actividad proteolítica es la cantidad de enzima que en las condiciones descritas produce una extinción de 1 en un minuto. Con caseína como sustrato da una actividad por ml. de látex de 500 U. Con fibrina la actividad es de 300 U. por ml. y con gelatina 150 U. por ml.

4º) ELECTROFORESIS (en papel).— Se usa el aparato de Beckman Spinco con bandas de papel Whatman N° 1. Se realizaron 50 electroforesis cambiando las condiciones: cantidad de la muestra, tiempo de conservación de la misma, duración de la electroforesis, pH, e intensidad de corriente.

Se trabaja a intensidad constante. Se usó buffer de fosfato a pH 6 y buffer de veronal a pH 8.6. Se varió la duración del corrimiento entre 2 ½ horas y 23 horas. La intensidad se probó entre 5 MA y 10 MA.

a) Las condiciones elegidas como óptimas son: buffer veronal pH 8.6 con glutation 10⁻⁴ M como protector, intensidad constante 5 M. A., voltage 210 V. al iniciar la experiencia que baja a aproximadamente 150 V. al finalizarla. Tiempo, 16 horas.

Se colocan 10 λ del líquido claro de la centrifugación puro o diluido al ½ en la parte media de las bandas de papel, corriéndose ocho bandas al mismo tiempo.

b) Revelado (fig. 1): Una banda se colorea con azul de bromofenol siguiendo la técnica usual. Da un corrimiento catódico de 5 ó 6 cm., observándose hasta 5 zonas con coloración más intensa. Hacia el ánodo hay un corrimiento de unos 2 cm., notándose 2 zonas coloreadas muy débilmente.

c) Localización de las zonas proteolíticas sobre placa de gelatina: Inmediatamente de finalizada la electroforesis se coloca otra banda de papel húmeda, sobre gelatina extendida en capa fina sobre una cápsula rectangular de 0,30 × 0,10 m. según esta fórmula: 35 ml. de agua destilada hirviendo, 10 gr. de gelatina en polvo y 5 ml. de mertiolate al 1%. Para poder observar la acción sobre la gelatina es necesario que ésta tenga determinada consistencia y conserve cierto grado de humedad, lo que se consigue preparándola 24 horas antes de ser usada.

Se deja el papel en contacto con la placa de gelatina durante 2 horas y se retira. En ese momento se nota una zona de pérdida de brillo sobre la superficie de la gelatina entre 1 ½ cm. a 2 de la línea de partida hacia el cátodo a la que llamamos *banda 1*.

A las 24 horas aparece otra banda de proteólisis a 1 cm. ó 1 ½ cm. hacia el ánodo, de características distintas a la anterior. La gelatina permanece brillante, pero con puntos de digestión notables, la llamamos *banda 2*.

En las primeras experiencias nos pasó desapercibida una tercera zona de proteólisis a unos 5 cm. hacia el cátodo por ser sumamente débil. A ésta la llamamos *banda 3*.

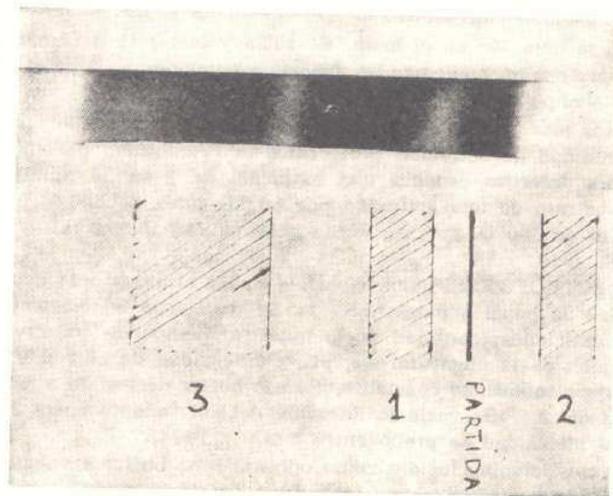


Fig. 1.—Acción proteolítica del látex del *Ficus Carica*.

d) *Localización de las zonas proteolíticas sobre placa de fibrina:* Se prepara la placa de fibrina al 1% con fibrinógeno de bovino al 1% más 80 U. por 100 ml. de trombina. Se extiende sobre una cubeta de $0,30 \times 0,10$ m. dejándose en reposo para que coagule, lo que sucede rápidamente.

Se coloca sobre esta placa de fibrina formada, otra banda húmeda inmediatamente después de terminada la electroforesis. Se retira a las 3 horas. En ese tiempo no se nota ninguna acción. A las 8 horas después de retirada, aparece una zona de lisis completa con licuado de la fibrina a la altura de la banda 3, permaneciendo el resto sin modificar.

Tabla II

	Caseína	Fibrina	Gelatina
Banda 1	4.2 U.	3 U.	0.176 U.
Banda 2	1.3 U.	2.7 U.	4.4 U.
Banda 3	2 U.	4.4 U.	0.186 U.

e) E
rridas junt
actividad
otro para
f) R
acción de
tiene may
da 3 sobre

CONC
lítica inten
musculares
2) Ti
3) L
ferentes pe
4) D
te a la ban

SUMM
activity, w
fibrin and
subcutaneo
A fibr
dog, the ly
the intrave
By pap
their activi
or gelatin).

Agrade
dei Prof. Cle
con los mien
Alvarez.

1. ECHAVE
Ficu
2. HAMMO
B. J.
3. WALTJ,
4. BALLS,
Chen
5. KURT vo
fibrin
6. "Prolase

e) *Elución*: Las bandas 1, 2 y 3 correspondiente a 7 tiras de papel corridas juntas, se eluyen en 2 ml. de buffer de cisteína versenato y se mide la actividad con la técnica de Wallerstein. Se emplea 1 ml. para la reacción y otro para el blanco.

f) *Resultados*: En la tabla II observamos una notable diferencia en la acción de cada una de las bandas sobre los tres sustratos probados. La banda 1 tiene mayor acción sobre la caseína; la banda 2 sobre la gelatina y la banda 3 sobre la fibrina.

CONCLUSIONES.— 1) El látex del *Ficus Carica* tiene una acción proteolítica intensa que se muestra "in vivo" en las inyecciones subcutáneas e intramusculares e "in vitro" sobre distintos sustratos.

2) Tiene una acción fibrinolítica muy marcada.

3) La separación por electroforesis muestra la presencia de 3 enzimas diferentes por su comportamiento frente a los sustratos usados.

4) Destacamos la potente actividad fibrinolítica de la zona correspondiente a la banda 3.

SUMMARY.— The latex obtained from *Ficus carica* has a high proteolytic activity, which was studied: *in vitro* by the hydrolysis of the protein (casein, fibrin and gelatin) and *in vivo*, by the anatomical and physiological effect of subcutaneous and intramuscular injection in rats and guinea pigs.

A fibrinolytic action was detected and tested *in vitro* and *in vivo*. In the dog, the lysis times of the serum euglobulins falls notably 30 minutes after the intravenous infection of only 1% of latex per Kg. of weight.

By paper electrophoresis three bands of proteolytic enzymes were revealed, their activity being different according to the tested substrates (casein, fibrin or gelatin).

Agradecimientos: Dejamos constancia que el trabajo fue iniciado por sugerencia del Prof. Clemente Estable, agradeciendo además las interesantes discusiones mantenidas con los miembros del Departamento, Q. F. Sra. Gloria Martínez de Drets y Q. I. Aníbal Alvarez.

BIBLIOGRAFIA

1. ECHAVE, Dionisio.—Acción anticoagulante in vitro, sobre la sangre del látex del *Ficus doméstica*. Sem. Med., 1954, 104: 351.
2. HAMMOND B. R. and GUTFREUND, H.—The mechanism of ficin catalysed reactions. B. J., 1959, 12: 349.
3. WALTI, A.—Crystalline Ficin. J. Am. Chem. Soc., 1938, 60: 493.
4. BALLS, A. K. and HOOVER, S. R.—The milk-clotting action of papain. J. Biol. Chem., 1937, 121: 737.
5. KURT von KAULLA and SCHÜULZ, R. L.—Methods for the evaluation of human fibrinolysis. Amer. J. Clin. Path., 1958, 29: 104.
6. "Prolase 300". Technical Bulletin 703. Wallerstein Company.

Transformación de un centro de la vida órgano-vegetativa en centro de la vida de relación¹

I. Transformación del centro frénico en centro de un músculo esquelético

C. ESTABLE, J. SAS y E. SILVA GAUDIN

INTRODUCCION.— En los ARCHIVOS DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA publicamos —C. Estable y J. Sas— un trabajo relativo a la transposición del frénico en el miocardio. Se comprende que los resultados sean distintos si la trasplatación del frénico se hace en un músculo esquelético o en el músculo cardíaco, pues en el primer caso carece de automatismo y en el segundo, existe automatismo miógeno. En el músculo naturalmente privado de automatismo, ¿se puede crear un automatismo neurógeno?; y en el corazón, con automatismo miógeno, ¿qué ocurre si interfiere el automatismo neurógeno?

Además, los resultados varían: a) con hiperinervación o sustitución de nervios; b) con que el sitio de inserción del frénico sea el nódulo de Keith-Flack, el nódulo de Aschoff-Tawara, el sistema específico extranodular o el sistema inespecífico.

Al XXI Congreso Internacional de Ciencias Fisiológicas (1959) se presentó por Sas, Estable y Silva, otro estudio sobre implantación del frénico en el miocardio. Y en 1962 publicamos (Estable, Sas y Sotelo) en *Perspectives in Biology*, un ensayo de transformación del centro motor ocular común en centro secretorio (hipofisario).

La actual comunicación está comprendida en un amplio programa de transformación de los centros nerviosos de la vida órgano-vegetativa en centros de la vida de relación e inversamente, cuyos fines son dilucidar: 1º) si el modelamiento de la *pars axónica* de la sinapsis está intrínsecamente determinado por la naturaleza de la neurona, del efector, del receptor o de los tres, en cuyo caso el problema es precisar el grado de participación de cada uno de los factores en juego; 2º) si los cambios experimentalmente introducidos en las constantes sinápticas perduran y no involucionan la nueva función creada por artificio técnico; 3º) si los mediadores químicos liberados por las terminaciones axóni-

1. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Montevideo (Uruguay). Esta investigación fue parcialmente financiada por U. S. A. F. Scientific Research (Contract AF-AFOSR 313-64).

cas actúan de igual o de distinta manera en las sinapsis de inervación heteróloga que en las sinapsis congénitas; 4º) si las sustancias farmacodinámicas obran de idéntico modo o no en las sinapsis que conservan sus constantes y en las sinapsis cuyas constantes están perturbadas; 5º) si el automatismo neurógeno persiste cuando la neurona inerva otro efector que el propio; 6º) si persistiendo el automatismo neurógeno, conserva su ritmo originario; 7º) si un efector que carece de automatismo puede adquirir un automatismo neurógeno; 8º) si es posible la coexistencia de dos géneros de automatismo, el miógeno y el neurógeno por ejemplo, sea intercalándose, sea interfiriendo, sea en alternancia; 9º) si la excitabilidad del efector cambia con la transmutación de un efector sin automatismo o con automatismo miógeno a efector con automatismo neurógeno; 10º) si los centros nerviosos se transforman estructuralmente a consecuencia del cambio de sus efectores o receptores cuyas neuronas están en directa sinapsis con ellos.

MATERIAL Y TÉCNICAS.— Los experimentos han recaído sobre ocho gatos adultos. La técnica operatoria es sencilla. Anestesiado el animal con nembutal y descubierto el plexo braquial, a la vez que la porción anterior de frénico, se hace la exéresis de éste, sin separarlo de sus raíces espinales de origen. Luego de la desinervación total del músculo bíceps braquial, se introduce el cabo central del frénico en el punto motor del músculo bíceps braquial. La exéresis del frénico se hace enrollándolo, con cuidado de no desprenderlo de sus raíces cervicales, en torno de un liso tubo de plástico en cuyo interior se pone la pinza con la cual se le sujeta. Si la extremidad libre se desgarrara demasiado, se secciona el frénico próximo a ella antes de implantarlo en el punto motor del bíceps braquial.

Ningún animal perece por la operación, que no repercute en su estado general. La hemiplejía diafragmática y la parálisis del bíceps braquial no perturbaban su vida normal.

Además de la observación directa, que globalmente revela por sí sola lo más importante del efecto de la sustitución del nervio musculocutáneo del plexo braquial por el frénico, se recurrió a los registros mecánicos (miogramas) y oscilográficos (electromiogramas, fig. A).

En lo concerniente a las técnicas microscópicas, hemos aplicado de preferencia las de impregnación argéntica de Cajal y de Bielschowsky, así como diversas variantes.

Nuevas aportaciones haremos a favor de una técnica biomicroscópica, que no describimos aquí y que permite el análisis simultáneo de estructura y función neuromusculares. Es una aplicación de la técnica de biomicroscopía cardíaca de uno de nosotros (Estable).

RESULTADOS.— Los procesos promovidos por nuestros experimentos son paralelamente funcionales y estructurales, incluyendo, claro está, los bioquímicos y los biofísicos.

Al comienzo, todo es degenerativo, luego, degenerativo-regenerativo en compleja interferencia, para prevalecer, al fin, lo regenerativo tanto de las fibras nerviosas y musculares como de las sinapsis, en especial neuroefectoras.

El nervio frénico insertado en el punto motor del bíceps braquial, previa exéresis del nervio propio de este músculo, regenera perfectamente bien y sus conos axógenos abordan las miofibras y modelan nuevas placas motoras que sustituyen a las degeneradas. No ocurre lo mismo con la neoformación de las sinapsis neuroreceptoras (husos de Kühne, etc.), acaso por la mayor dificultad mecánica de acceso, más que por intrínseca diferencia de potenciales regenerativos.

En ninguno de los ocho gatos en los cuales se sustituyó la inervación propia del músculo del bíceps braquial por el frénico, fue posible obtener reflejos por estiramiento, por tracción (ausencia absoluta del *stretch reflex*). Esto se explica por la no regeneración de los propioceptores.

Lo primero que se impone a la observación inmediata, sin registros ni gráficas, es precisamente lo más importante: la contracción del bíceps braquial a cada inspiración, con ligero retardo inicial. Y esta transformación de un músculo esquelético sin automatismo en un músculo con automatismo neurógeno, prueba que las neuronas tienen cierta especificidad independiente del efector y que éste puede cambiar su régimen de actividad inducido por el régimen de actividad propio de aquéllas.

La contracción del bíceps braquial reinervado por el frénico, sigue el ritmo del hemidiafragma cuya inervación queda intacta, pues ambos están regulados por los mismos centros respiratorios.

Ni el sueño normal, ni los anestésicos, ni los narcóticos suprimen el automatismo neurógeno experimental: el músculo esquelético se ha transformado, por el comando de un nuevo centro nervioso, en un músculo de la vida vegetativo-respiratoria, aunque sin la significación fisiológica de ésta.

La hiperactividad del bíceps braquial reinervado por el frénico, conduce a su hipertrofia. De suerte que de la profunda degeneración atrófica en la etapa de la perturbación sináptica, se evoluciona a una sinaptogénesis ultrarreparadora.

DISCUSION.—Si bien la neurona es influenciada en su especificidad funcional por la naturaleza de los receptores y efectores entre los cuales se encuentra interpolada, es indudable que existe cierta especificidad funcional intrínseca. Prueba de ello, entre otras, es que una neurona de la vida órgano-vegetativa, al cambiársele su efector como en nuestros experimentos, imprime su característica al efector que sustituye al propio, aunque la reacción esté condicionada, en primer término, por la naturaleza de éste.

En el modelamiento neosináptico, el cono axógeno del frénico se comporta de manera distinta en el miocardio y en el bíceps braquial. En éste, como en el diafragma, se modelan placas motoras, y así ocurre con la propia inervación, mientras que en el miocardio no se generan placas. Se imponen, pues, factores intrínsecos de las neuronas, factores intrínsecos del tejido inervado, sus correlaciones y el juego de otros factores.

En la sinaptogénesis de la inervación heteróloga del músculo, hay en su primera etapa, exuberancia de conos de crecimiento; a la proliferación subsigue la orientación, el ordenamiento y al fin, se modela la sinapsis de restauración. Surgen muchos problemas que discutiremos en otras comunicaciones, como el

cial, previa
bien y sus
otoras que
ción de las
r dificultad
les regene-

ción propia
reflejos por
o se explica

ros ni gráfi-
quial a cada
un músculo
eno, prueba
ector y que
en de acti-

que el ritmo
n regulados

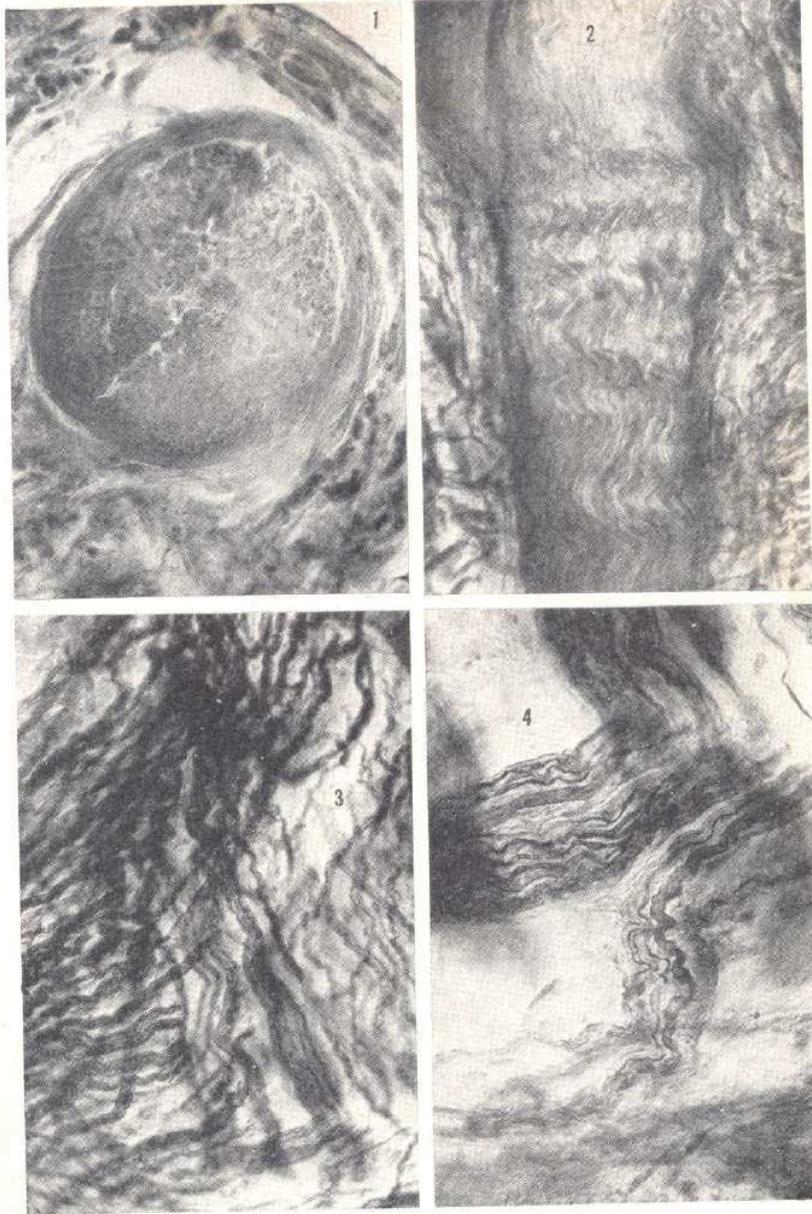
nen el auto-
ansformado,
vida vege-

onduce a su
la etapa de
rreparadora.

ad funcional
se encuentra
l intrínseca.
o-vegetativa,
su caracte-
ondicionada,

se comporta
ste, como en
a inervación,
ues, factores
o, sus corre-

, hay en su
ción subsigue
restauración.
nes, como el



de las causas físico-químicas determinantes de la marcha de los conos de crecimiento, de su tendencia a dirigirse hacia los focos de las miofibras donde hay núcleos y abundan las mitocondrias, o donde permanecen restos de sinapsis en degeneración.

Los procesos regenerativos por reinervación de un músculo es una contra-prueba de la función trófica de la sinapsis (Estable, 1956) función básica, la más importante de la misma. Cuando el músculo se restaura por reinervación a partir de una atrofia extrema, como ocurre con el bíceps braquial, ¿sobre qué elemento de la miofibra se aplica el cono axógeno y cómo resurgen las numerosas fibras del músculo? Debe tenerse en cuenta, entre otros factores, la proliferación nuclear como reacción de la miofibra y el remodelamiento sináptico en zonas nucleadas y ricas en mitocondrias.

Reiniciadas ya las relaciones neuromusculares, a la función trófica de la sinapsis se agrega la del ejercicio muscular.

¿Porqué un músculo esquelético como el bíceps braquial se hipertrofia al ser reinervado y regido por el frénico? Seguramente, debido a la hiperactividad impuesta por su nuevo centro: el respiratorio. Pero, ¿porqué no se hipertrofian los músculos del tórax o el diafragma sometidos a igual actividad?

Ha de existir una regulación distinta en el metabolismo de los músculos estriados sin automatismo y en los músculos estriados con automatismo, sea neurógeno, como el del diafragma, sea miógeno, como el miocardio.

CONCLUSIONES.— 1º) Un centro nervioso de la vida órgano-vegetativa puede imprimir su automatismo a un músculo de la vida de relación. Así, transplantado el nervio frénico en el músculo bíceps braquial, previa desinervación de éste, dicho músculo esquelético adquiere el automatismo neurógeno propio del diafragma: se contrae automáticamente en cada inspiración.

2º) Los anestésicos y narcóticos que desvanecen los reflejos de la vida de relación, no inhiben el automatismo neurógeno del músculo esquelético reinervado por el frénico.

3º) En el sueño normal, como en la vigilia, el músculo esquelético de automatismo neurógeno por reinervación frénica, se contrae rítmicamente sincronizando con los músculos inspiratorios del tórax (existe un ligero retardo inicial).

4º) El automatismo neurógeno del bíceps braquial del gato adulto, a consecuencia de su reinervación mediante el nervio frénico, se patentiza globalmente en torno de los tres meses y medio de la operación.

5º) Los procesos histológicos degenerativos y regenerativos de la reinervación del bíceps braquial por el frénico, son, como en todos los casos, complejos. En ciertos momentos de las reacciones neuromusculares, se entremezclan los procesos regenerativos y los degenerativos, con predominio ya de la degeneración, bien de la regeneración, hasta culminar ésta completamente.

Sorprende que al año de la intervención quirúrgica aún se encuentren fibras nerviosas, placas y fibras musculares en estadio degenerativo y no sólo como simples residuos sin fagocitar, pues los hay en todos los grados, incluso iniciales. Es que además de la degeneración de las fibras remanentes del nervio extirpado (el músculo cutáneo del plexo braquial), existen fibras y termi-

os de cre-
donde hay
sinapsis en

na contra-
básica, la
inervación
al, ¿sobre
surgen las
actores, la
nto sináp-

fica de la

ertrofia al
iperactivi-
se hiper-
idad?

músculos
tismo, sea

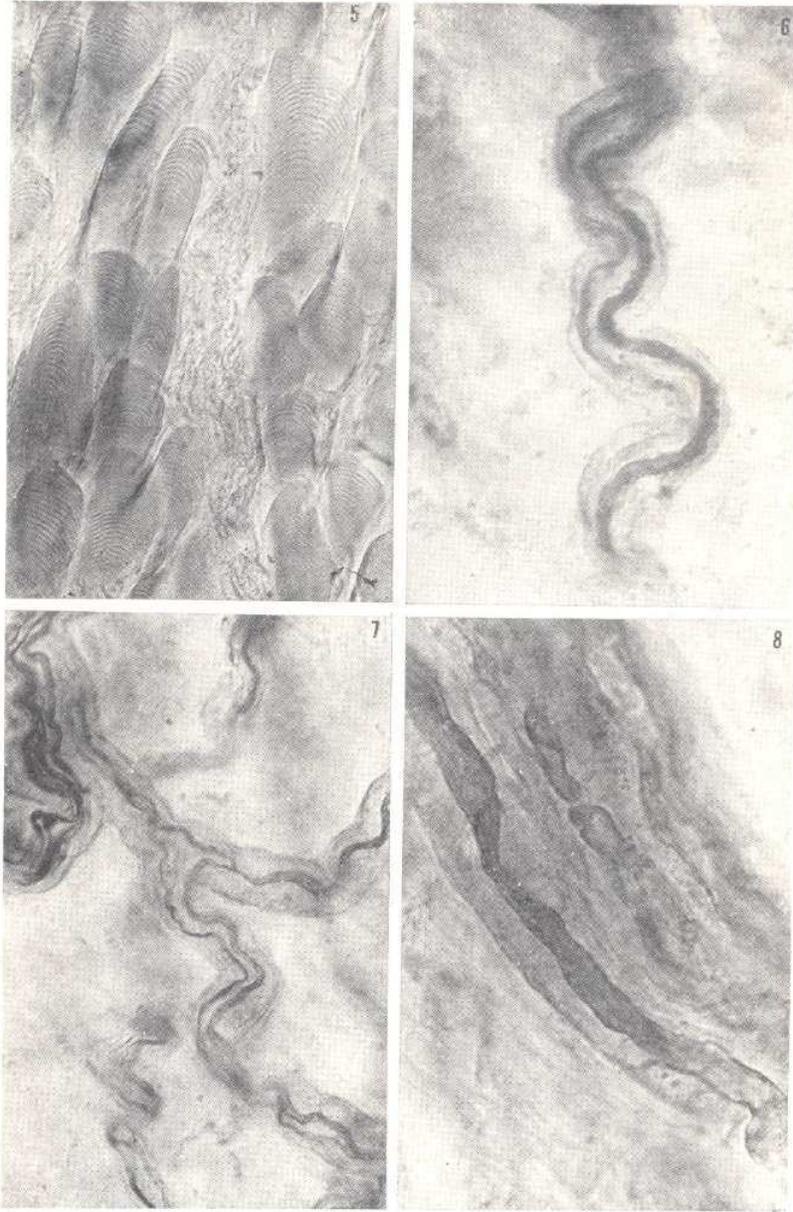
vegetativa
Así, trans-
nervación
no propio

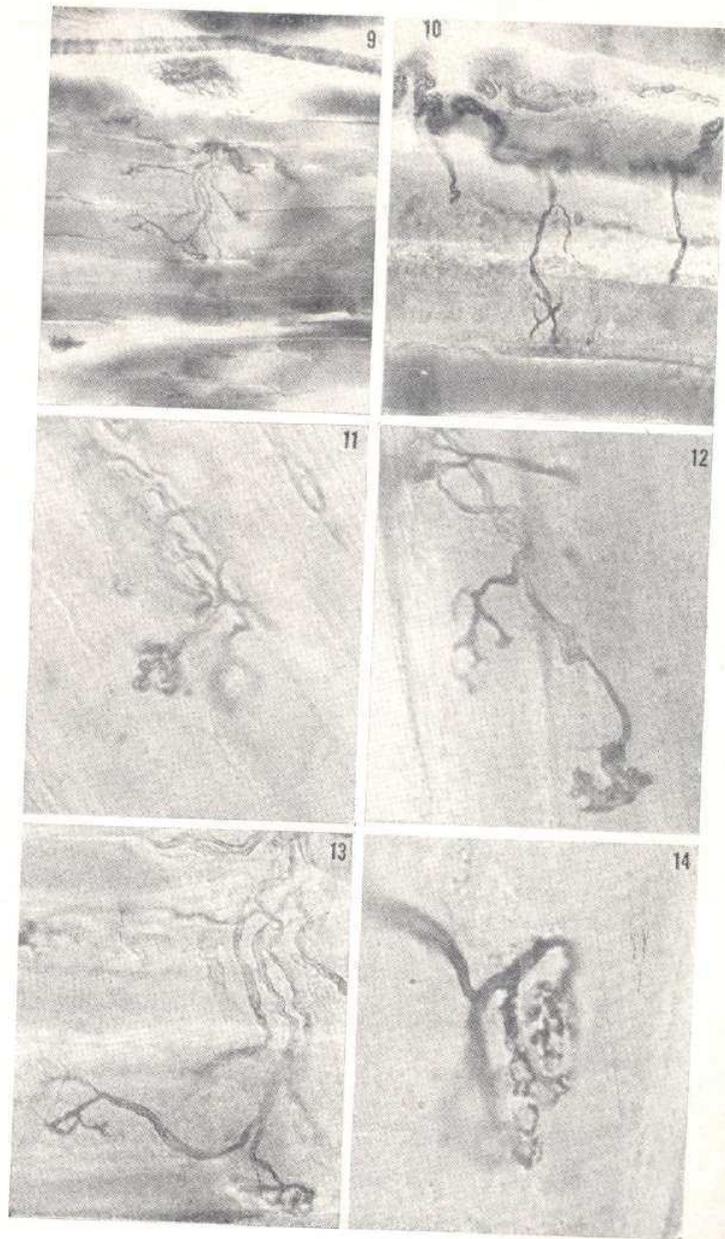
a vida de
co reiner-

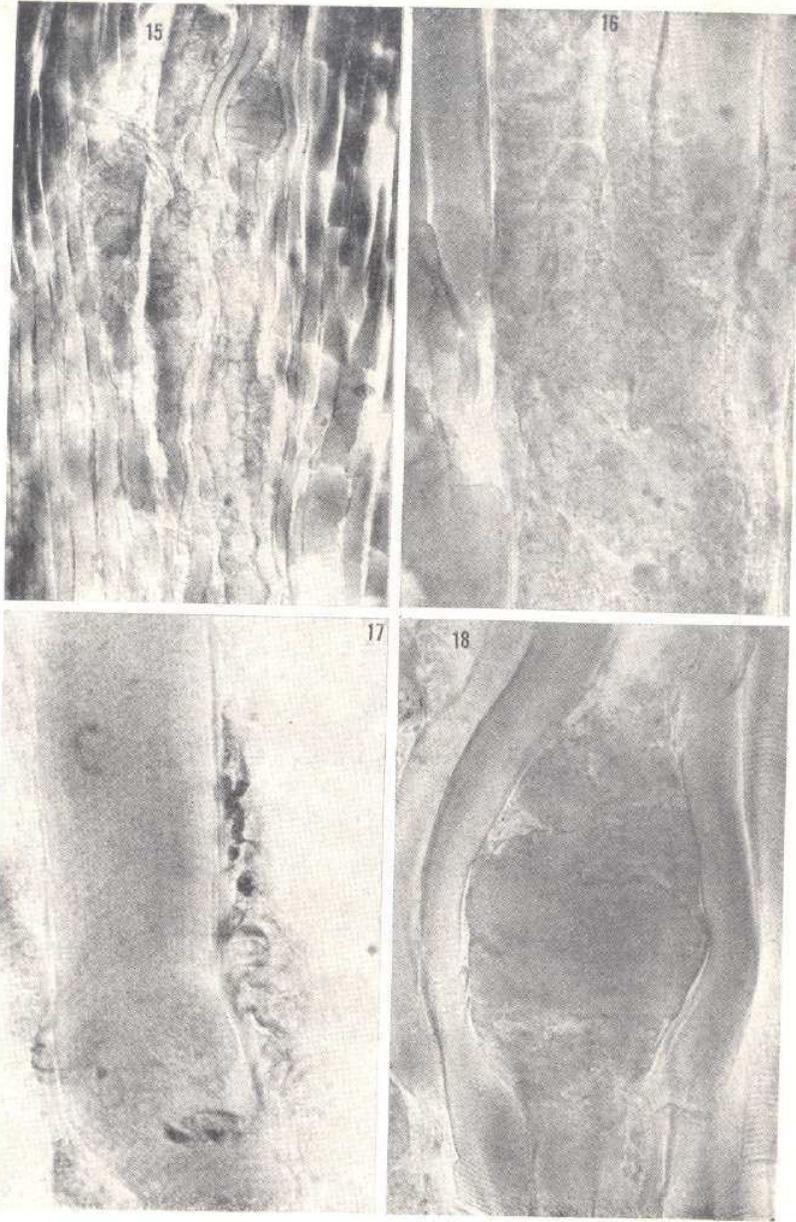
o de auto-
sincroni-
o inicial).
to, a con-
lobalmen-

reinerva-
complejos.
mezclan los
degenera-

ncuentren
no sólo
s, incluso
del ner-
y termi-







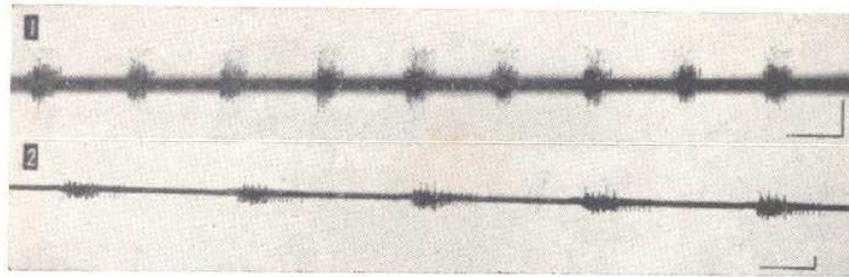


Fig. A.—Nº 1: Gato, implantación del frénico en el músculo bíceps braquial, 3½ meses de operado, 1 seg. 200 μ V. Nº 2: Gato, implantación del frénico en el músculo bíceps braquial, 5½ meses de operado, 1 seg. 200 μ V.

naciones neoformadas del nervio implantado (el frénico), que al modelar más sinapsis que las necesarias, en puntos extraños a la topografía de las sinapsis naturales, involucionan.

6º) El músculo esquelético con automatismo neurógeno experimental, luego de la atrofia consecutiva a la extirpación de su propio nervio, no sólo regenera al ser reinervado por el frénico, sino que se hipertrofia a causa de la hiperactividad impuesta por su nuevo centro, el respiratorio.

Se plantea este problema: ¿porqué el diafragma y otros músculos de la mecánica respiratoria, no se hipertrofian con el mismo automatismo neurógeno que conduce a la hipertrofia de un músculo esquelético, como el bíceps braquial?

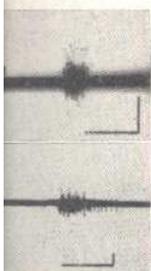
7º) El análisis paralelo de la progresiva restauración fisiológica de un músculo reinervado y de los procesos regenerativos neuromusculares microscópicos, es aún poco satisfactorio, tanto en lo experimental como en lo patológico. Se requiere simultáneo examen biomicroscópico y oscilográfico.

8º) El bíceps braquial reinervado por el frénico, carece del reflejo de tracción (stretch-reflex) y se explica por la falta de regeneración de los propioceptores.

9º) La desinervación sensitiva de un músculo esquelético como el bíceps braquial, no apareja atrofia cuando existe automatismo neurógeno experimental, salvo la de las pocas fibras de sinapsis neurorreceptoras.

10º) Se comprende que toda excitación o inhibición que incida sobre el centro frénico, repercuta en la actividad del bíceps braquial regulado por dicho centro.

Las fotomicrografías 1 a 18 pertenecen a un gato luego de 361 días de operado. Figura 1, sección transversal del nervio frénico implantado en el músculo bíceps braquial. Figura 2, sección longitudinal del mismo. Figura 3, plexo por dispersión de fibras regeneradas. Figura 4, entre fibras normales neoformadas, algunas pseudohipertróficas. Figura 5, fascículos de fibras nerviosas en plena



bíceps bra-
quial del
g. 200 μ V.

degeneración y miofibras neoformadas. Figura 6, axón pseudohipertrófico en vaina de mielina sin fragmentación. Figura 7, fibra mielínica cuyo axón se bifurca dentro de la vaina de mielina. Figura 8, fibras nerviosas pseudohipertróficas con estrangulación y fragmentación. Figura 9, placas motoras neoformadas (sinapsis frénicomuscular). Figura 10, placa motora neoformada sobre una miofibra con estriaciones desvanecidas, pero rica en núcleos, ¿proceso regenerativo inducido por la sinapsis? Repárese también en la colateral que emana de una estrangulación de Ranvier y remata en botón sobre la fibra muscular, próximamente a la placa (pseudoinervación simpática). Figuras 11, 12, 13 y 14: placas en distinto grado de involución. Figuras 15, 16, 17 y 18: distintas etapas degenerativas de miofibras.

Figura A: electromiograma del bíceps braquial reinervado por el frénico (gato, 361 días de la operación). Las descargas corresponden a la inspiración.

SUMMARY.—Primary nervous centers are characterized by their respective afferent and efferent pathways. Their spontaneous responses may change, changing the afferent pathway and their effector. The connection of a respiratory center with a body muscle determines the action of the center upon this muscle which therefore acquires the automatism of the respiratory center. The muscle will have neurogenic automatism.

In the present paper the activity of brachial biceps after being connected with the phrenic center is studied. The phrenic nerve is implanted in the muscle thus substituting the muscle innervation for the phrenic fibers. Reinnervation takes place without difficulty. Three months after implantation the brachial biceps contracts at inspiration with the same rhythm that the diaphragm but a little later than this muscle.

Neither normal sleep nor anesthetics and drugs suppress the rhythm activity of the reinnervated muscle which becomes hypertrophic.

It is discussed why the automatic muscles (neurogenic or myogenic automatism) do not undergo hypertrophy.

Every factor influencing the activity of the phrenic nerve influences too the brachial biceps reinnervated by the phrenic nerve.

BIBLIOGRAFIA

1. ESTABLE, C.—Biomicroscopía del corazón. Publ. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, 1951, 11-104.
2. ESTABLE, C.—Tipos sinápticos. Parasinapsis. Función trófica de la sinapsis. Arch. Soc. Biol. Montevideo, 1956, Vol. XXII: 7-12.
3. ESTABLE, C. y SAS, J.—Modelamiento de la pars axónica de la sinapsis neuromuscular en la hiperinervación del miocardio por implantación del frénico. Arch. Soc. Biol. Montevideo, 1958, Vol. XXIV: 49-65.

4. ESTABLE, C.—Considerations on the histological bases of Neurophysiology. *Brain Mechanism and Learning*. Symposium. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1961, 309-332.
5. ESTABLE, C.; SAS, J. y SOTELO, J. R.—Essay of transformation of motor nervous centers into secretory centers. *Perspective in Biology*, 1962, 395-408.
6. ESTABLE, C.—Función trófica de la sinapsis. V. Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas. Resúmenes. Caracas, Venezuela, 1963, 39-40.
7. ESTABLE, C.—A critical study of the laws of dynamic polarization and of isolated conduction. XXI International Congress of Physiological Sciences. Buenos Aires, Abstracts of Communications., 1959, 84-85.
8. SAS, J.; ESTABLE, C. y SILVA, E.—Effects on the heart activity of the phrenic nerve implantation in the myocardium. XXI International Congress of Physiological Sciences. Buenos Aires, Abstracts of Communications, 1959, 243-244.

SUMARIO DEL VOLUMEN XXVI

“Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo”

	Pág.
Vázquez Nin, G. H.; Roberto Sotelo, J.— Estudio con el microscopio electrónico de los ovocitos normales de la rata prepúber	3
Vázquez Nin, G. H.; Roberto Sotelo, J.— Estudio de la atresia ovular con el microscopio electrónico	10
Bennati, D.; Ghiggino, C. W.; García-Rizzo, M.— Heparinemía endógena y sensibilidad a la heparina en pacientes arterioescleróticos	16
Bennati, D.; Ghiggino, C. W.; García-Rizzo, M.— Estudio de la fibrinólisis inducida en el perro por el shock peptónico y su inhibición por el Iniprol (C. Y. 66 Choay)	21
Mazzella, H.; Gñemberena de Casacuberta, L.; Fabius, S.— Alternancia y pseudoalternancia causadas por corte de los nervios vagos y/o denervación de los senos carotídeos	26
Pradines Brazil, N.; Laborde, H. F.; Legnani, C. L.— Una reacción de aglutinación en el diagnóstico de tuberculosis y otras enfermedades	29
Paulete-Vanrell, J.; Scaglia de Paulete, S.— Histología e histoquímica de la glándula colear de <i>Ampullaria canaliculata</i> (Lam.)	37
Vaz-Ferreira, R.; Sierra de Soriano, B.; Scaglia de Paulete, S.— Eco-etología de la reproducción en los peces del género <i>Cynolebias</i> Steindachner, 1876	44
Sáez, F. A.; Pérez-Mosquera, G.— Evolución del cromosoma sexual en <i>Schistocerca infumata</i>	50
Talice, E. V.; Laffitte de Mosera, S.— Investigaciones sobre <i>Furnarius rufus rufus</i> = “hornero”	63
Fabius, S. S.; Mazzella, H.; Bidegain, S.; Romero, C.— Estudio en las diferentes estaciones de algunos iones plasmáticos del <i>Bufo Arenarum</i> Hensel y primeros ensayos con una solución salina, Ringer-Bufo	73

	Pág.
Benech, C.; Franchi, C. M.—Estroncio-90 en leches uruguayas	81
Appeltauer, G. S. L.—Incorporación de 14-C lisina en fibras nerviosas motoras y sensitivas de rata	87
Appeltauer, G. S. L.; Benech, C.; Levitás, A.; Franchi, C. M.—Incorporación de 14-C lisina en fibras del nervio ciático normal de rata	97
Appeltauer, G. S. L.; Sáa, E.—Incorporación de 14-C lisina en distintas fracciones de nervio periférico	108
Alvarez, A.— β -galactosidasa del intestino de la rata	120
Martínez de Drets, G.—Metabolismo de hexosas-fosfato y pentosas-fosfato en <i>Lactobacillus brevis</i>	128
Rovira de Cutinella, M.; Guevara, A.; Ruiz, M.—Acción proteolítica del látex del <i>Ficus Carica</i>	139
Estable, C.; Sas, J.; Silva Gaudín, A.—Transformación de un centro de la vida órgano-vegetativa en centro de la vida de relación. I. Transformación del centro frénico en centro de un músculo esquelético	144

nales
Cons

marg
exced
grafías
(una

cisam
donde
o sola
que se
terpre
otros
en ing
autor.
índice.
2) titu
ción, d
página
pleto,

La
bibliogr
La
papel bl
bigos y
Los
rarse se
que está
Los
recibirán
con la p
deseen, l

2)
de una e
ilustraci
La p
dado los