

EFFECTOS DE LA IRRADIACION SOBRE LAS SEROPROTEINAS DE BUFO ARENARUM REVELADOS POR TESTS DE PRECIPITINAS

POR CEI, J. M., COHEN, R. y M. P. CASTRO

SUMMARY

Effects of irradiation on the seroproteins of *Bufo arenarum* as showed by precipitine tests. — Female Toads from Mendoza (*Bufo arenarum*) were given whole-body single exposures to X-rays. The experimented animals showed the same corporal weight as the controls, under the same environmental conditions. Irradiations were done in the Comision Nacional Energía Atomica, Buenos Aires, Department of Radiobiology, in the same periods (May-August). A range of exposures was distributed as follows: 12 toads 1000 r; 12 toads 2000 r; 8 toads 3000 r; 10 toads 4000 r; 10 toads 6000 r; 10 toads 8000 r. Turbidimetric precipitin test by the Libby's procedure were employed, at the 5 days after irradiation. Results of the tests were plotted in graphs and their statistical significance was analyzed by the current methods. Exposures of 1000 r. caused no significant alterations in the serological properties of the plasma of Toads. Doses of 2000 r and 3000-4000 r caused significant changes aboveall in globulins. Exposures of 6000-8000 r induce quantitative alterations of the plasmatic serological properties of the whole globulins and albumins. Comparison with analogous researches in other Vertebrates (Birds) was carried out.

INTRODUCCIÓN

Desde 1944 Lea y col. han señalado efectos de radiaciones sobre proteínas (miosina, enzimas), indicándose luego (Lea, 1947) que una ionización producida al azar en una molécula de enzima provoca inactivación. Sería aquí imposible revisar la bibliografía relativa, enviando para mayores detalles a revistas sintéticas como la de Pollard y col. (1953-55) o a obras recientes como la de Bacq y Alexander (1964). En especial, desde 1952, Hutchinsen y col. han insistido sobre la disminución esponencial de la actividad serológica de las proteínas con dosis crecientes de irradiación (partículas α , electrones de baja energía, etc.). Aun utili-

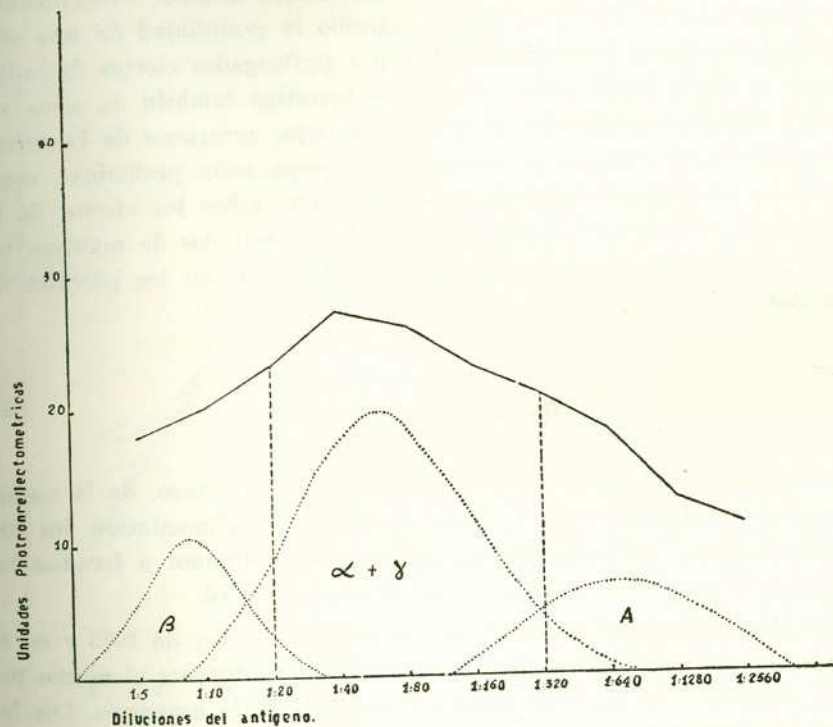
zando rayos γ (y análogamente rayos X) el mecanismo de desnaturalización proteínica queda algo oscuro. Habría en efecto una emisión primaria de electrones por la proteína excitada y una ionización secundaria.

Desde 1955, principalmente por mérito de Leone, se han investigado ovalbúminas y gamma-globulinas, observándose las modificaciones de sus propiedades antigénicas, luego de irradiaciones con dosis diferentes, sirviéndose de campos uniformes de rayos γ , cuidadosamente medidos: por ejemplo con el dosímetro de Fricke al Sulfato de hierro (Leone, 1956, 1960). Otras observaciones in vitro, realizadas por tests de precipitinas — y además por polarimetría— demostraron, de acuerdo con los datos de Hutchinson, la alteración de las moléculas proteínicas y de sus características antigénicas, con desplazamiento evidente de las curvas precipitínicas hacia las zonas de más elevada concentración antigénica, en la serie de las diluciones progresivas de la solución de albúmina, o globulinas, empleada como antígeno en los tests.

Se consideraron también proteínas fraccionadas y las fracciones, por ejemplo las coagulables y las termolables, en el caso de las ovalbúminas. presentaron comportamiento diferente frente a la desnaturalización por irradiación progresiva: evidentemente en relación con su estructura y peso molecular. Cambios en las uniones H de las estructuras o pliegues estructurales (folding) secundarias y terciarias de dichas proteínas, pueden ser postulados. Resultando relativa a la intensidad de la dosis la pérdida de actividad, se ha calculado, para la ovalbúmina, que con 100 ev/m se mantenga inalterada un 37-39 % de la actividad serológica inicial. En realidad se forman nuevas combinaciones moleculares que presentan comportamiento serológico algo distinto del originario, según la irradiación a la cual hayan estado sometidas, variando desde un exceso de reacción heteróloga hasta una correspondencia serológica no más medible.

En los tests serológicos de proteínas séricas por precipitinas, realizados a un cierto nivel de aproximación (cf. Boyden, 1956), por ejemplo en nuestro caso al nivel que Boyden llama bidimensional, con una sola componente variable en la reacción —la antigénica— se han podido establecer en la curva global de la mezcla albúminas-globulinas, áreas parciales correspondientes a proporciones óptimas y zonas de equivalencia características de cada grupo de proteínas (cf. Leone, 1957). Se ha intentado dar de aquéllas, esquemas gráficos indicativos, refrendados en algunos casos por resultados de observaciones electroforéticas (Leone y col., 1959). Se reconoce así una área referible a las globulinas de tipo β , otra parcialmente superpuesta referible a las globulinas α y γ , otra enfín perteneciente a las albúminas (fig. 1). Estas áreas, comprendidas en el

área total de la curva integrada, presentan como aquélla, variación individual muy limitada, en conjuntos poblacionales experimentados en condiciones idénticas, en las mismas condiciones físicas del test, y fundamentalmente frente al mismo dador de anticuerpos (reacción individual del conejo utilizado para inmunización).



En un test "poblacional" de curvas testigos, la oscilación, global y parcial, de aquéllas y de sus fracciones albúmino-globulínicas, resulta pues escasa, alrededor de un término medio de valores de reacción precipitínica, por ejemplo en unidades photronreflectométricas (UP) si la técnica empleada es la de Libby. Es evidente que cada desviación significativa —en un sentido estadístico— desde los valores poblacionales de la muestra testigo y sus términos medios, puede considerarse síntoma de alteraciones estructurales de las moléculas proteínicas séricas, cuyas propiedades antigénicas se encuentran cambiadas por una causa determinada. La alteración estructural de las moléculas hace variar, en consecuencia, los puntos de combinación y las proporciones de los precipitados, que se han

cen mayores —como se dijo— en las regiones de más alta concentración del antígeno diluído.

El presente trabajo tuvo como objeto, la comparación de las curvas precipitínicas de las seroproteínas normales e irradiadas, in vivo, de una especie de anfibio de la región árida de Mendoza (*Bufo arenarum*), realizando tests, en condiciones rigurosamente standardizadas, mediante la técnica de Libby y con un photronreflectómetro AMINCO. Observaciones accidentales anteriores, nos habían sugerido la posibilidad de una sensibilidad de estos vertebrados estenoicos a prolongados efectos de radiaciones naturales (Cei, 1965), la que se investiga también en otras regiones (Tanner, 1965; Tinekle, 1965). Trabajos anteriores de Leone en Aves (1957) nos dieron un elemento de comparación preliminar, como asimismo varias observaciones de Blair (1960) sobre los efectos de la irradiación en anuros (*Bufo valliceps*). Los resultados de nuestras investigaciones serán expuestas ahora a continuación, en los párrafos siguientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

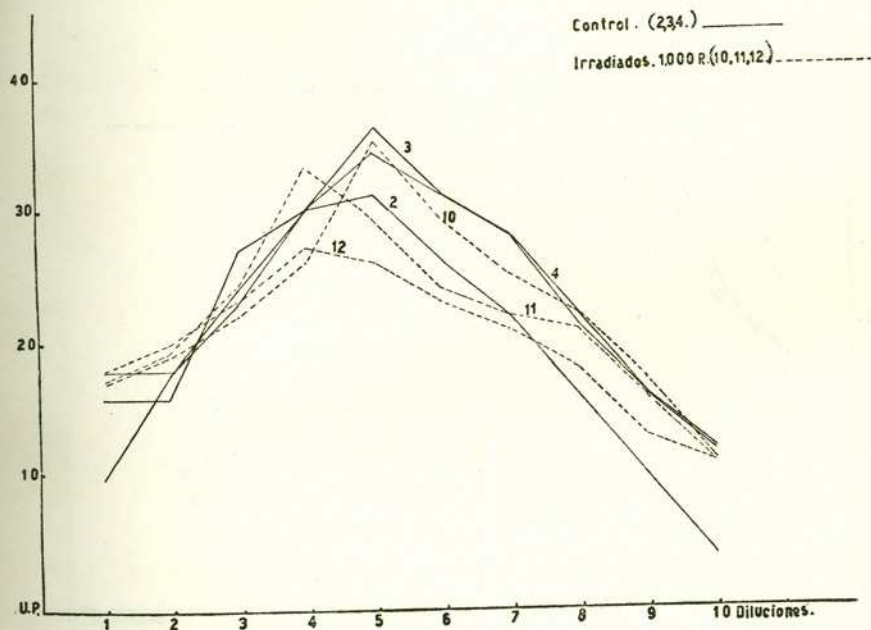
Se usaron ejemplares hembras adultos, del mismo peso, de la misma procedencia (Mendoza), en análogas condiciones de alimentación, los que fueron regularmente divididos en lotes, unos destinados a irradiación, con dosis progresivas (Rayos X), y los otros a control.

Las observaciones se desarrollaron en el mes de mayo de 1965 y en el mes de agosto de 1966, es decir aproximadamente durante el mismo período funcional del ciclo de actividad anual de *Bufo arenarum*. Los lotes experimentados y su dosis progresiva de irradiación fueron:

- Lote 1) 24/5/65: kilovoltaje 200; miliamperaje 10; filtro 0,5 mm Cu y 1 mm Al; distancia Blanco animal 36 cm; dosis 100 rad/m, durante 10': irradiación total, 1.000 R.
- 2) 24/5/65: idénticas características de irradiación; 100 rad/m, durante 20': irradiación total, 2.000 R.
- 3) 3/8/66: Kv. 200-15 mA; filtro idéntico; distancia igual: 133 rad/m, durante 22' 55": irradiación total, 3.000 R.
- 4) 3/8/66: idénticas características de irradiación; 133 rad/m, durante 30' 7": irradiación total, 4.000 R.

- 5) 25/8/66: idénticas características de irradiación; 135 rad/m, durante 44' 44": irradiación total, 6.000 R.
- 6) 25/8/66: idénticas características de irradiación; 135 rad/m, durante 60': irradiación total, 8.000 R.

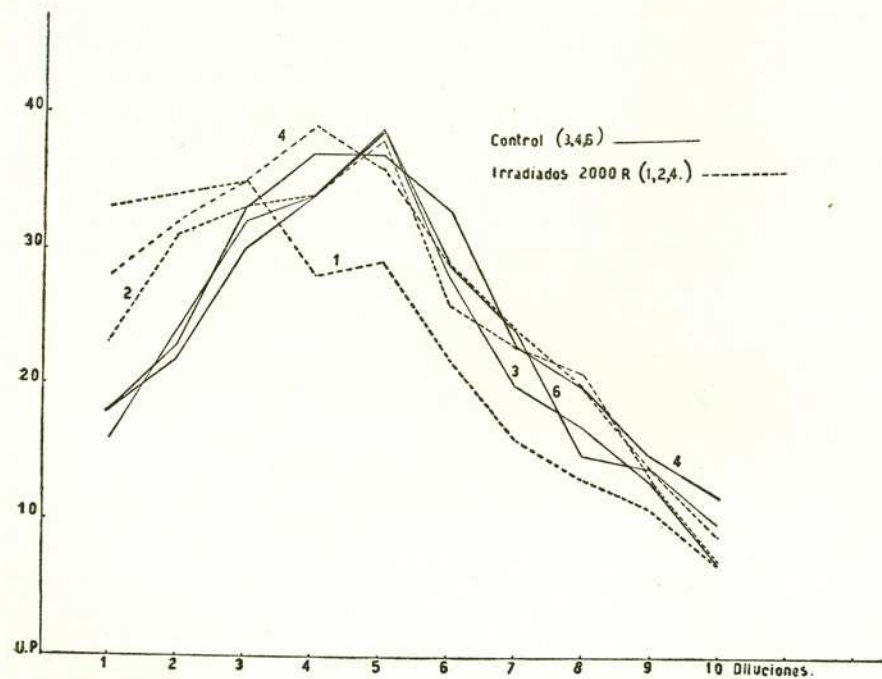
Todas las irradiaciones se efectuaron en la Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, División Efectos Somáticos.



Deseamos expresar nuestro más vivo agradecimiento por su fundamental colaboración y sus consejos, al Dr. José Mayo, del Departamento de Radiobiología de dicha Comisión Nacional, sin cuya cortés ayuda hubiera sido imposible el presente trabajo.

Todos los animales irradiados se sacrificaron a los cinco días del tratamiento, extrayéndoles la sangre por punción cardíaca y utilizándose los sueros, obtenidos por coagulación, en los tests photronreflectométricos según la técnica clásica de Libby, referida en numerosos trabajos (cfr. Cei y Cohen, 1965). Los animales de control se sacrificaron contemporáneamente y sus sueros se emplearon para las curvas testigos. Los sueros anti-*arenarum* se prepararon en conejos, en la misma época. Es

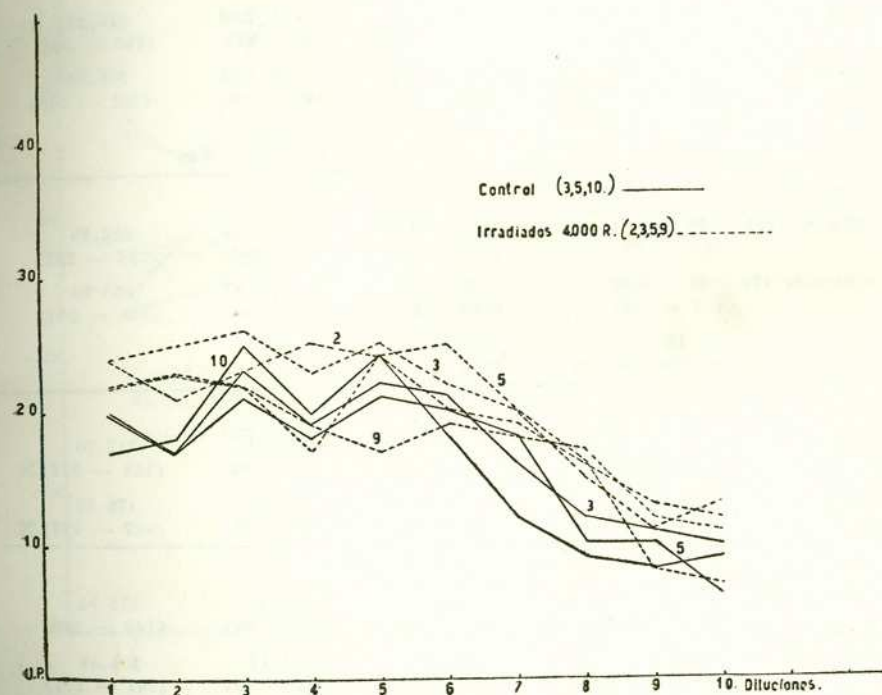
evidente que cada familia de curvas individuales de los animales irradiados de cada lote y sus correspondientes familias de curvas testigos, fue obtenida "con el mismo suero anti-*arenarum* procedente del mismo conejo dador". La cantidad del suero anti-*arenarum* proporcionada por cada conejo dador al momento de su sangría, determinó en efecto el número total de las curvas de irradiados y testigos correspondientes a cada lote.



RESULTADOS

Todos los animales resistieron las dosis progresivas aplicadas: solamente en el caso de las dosis de 6.000-8.000 R se observaron en algunos casos lesiones cutáneas, edemas, etc. No hemos establecido directamente para *Bufo arenarum* la DL 50, pero ésta debe ser elevada y en función de la temperatura del medio ambiente que tiende, disminuyendo, a retardar los procesos metabólicos. No se hicieron todavía estudios histológicos de los órganos fijados de los animales autopsiados, en particular el hígado, de especial importancia para la irradiación, como lugar de activa síntesis proteínica.

Los resultados se tabulan en el presente cuadro (tabla I), donde se indican los valores turbidimétricos, por área total de cada curva, y los valores de sus curvas parciales correspondientes a las albúminas y a las globulinas. Cada valor aparece indicado como media acompañada por su Error Standard (E. S.) y por los límites de variación, o "range", de la muestra. El análisis estadístico por el T de Student y el valor de probabilidad (P según Fisher) proporciona el criterio del significado estadístico de las diferencias encontradas, respectivamente, entre muestras de animales irradiados y no irradiados.



Como se ve por la Tabla no hay diferencia entre controles y animales irradiados con 1.000 R y esto se puede también observar gráficamente por la fig. 2, donde aparecen características de ambas muestras. Con 2.000 R se evidencian diferencias significativas en la zona de las globulinas β , pero no en las otras (fig. 3). Con 3.000 R y 4.000 R las diferencias se acentúan (fig. 4) siempre en correspondencia de las globulinas β y aún de las α . Pero en 6.000 R y más drásticamente con 8.000 R las diferencias son totales y la alteración de las propiedades antigénicas de

TABLA I

COMPARACIONES DE VALORES TURBIDIMETRICOS (U. P.) CORRESPONDIENTES A AREAS PARCIALES (β : $\alpha + \gamma$: A) DE LAS CURVAS DE PRECIPITINAS DE *BUFO ARENARUM* (MENDOZA) IRRADIADOS CON DOSIS DIFERENTES (RAYOS X), Y SUS RESPECTIVOS CONTROLES. CADA GRUPO DE IRRADIACION Y SUS CONTROLES RESPECTIVOS CORRESPONDEN A TESTS CON SUERO ANTI-*ARENARUM* NORMAL (MENDOZA) DEL MISMO CONEJO DADOR

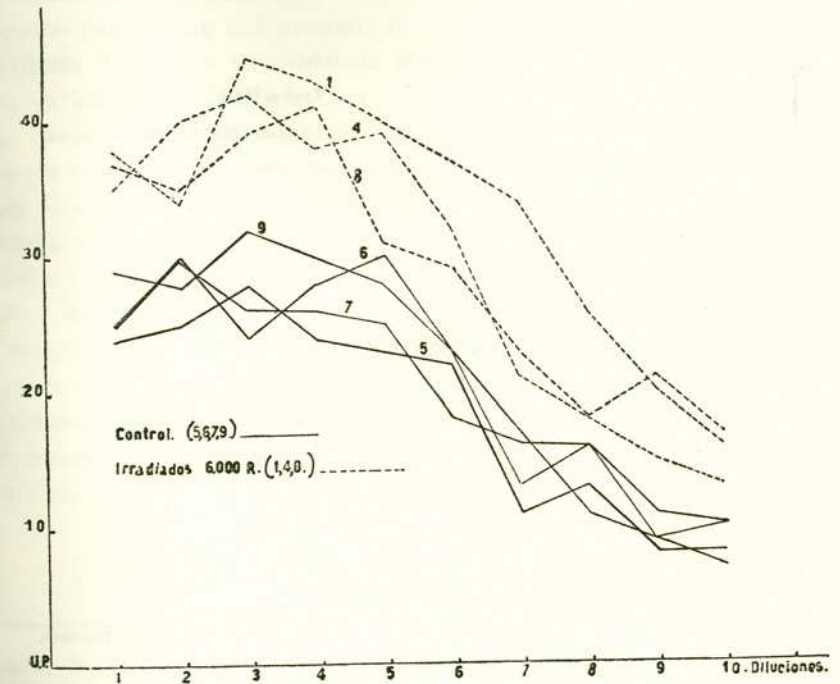
(Entre paréntesis el número de individuos, irradiados y de control).

	β	$\alpha + \gamma$	A	Area total
Lote 1)				
1.000 R (12)	34 \pm 0.70 (E.S.) (30 — 38)	109 \pm 2.23 (99 — 122)	73 \pm 2.00 (56 — 83)	216.20 (182 — 235)
controles (4)	33 \pm 1.73 (28 — 36)	116 \pm 3.00 (111 — 124)	70 \pm 6.08 (52 — 78)	218.50 (191 — 233)
	t: 0.52 P: 0.70 — 0.60	t: 1.87 P: 0.50 — 0.40	t: 0.46 P: 0.70 — 0.60	
Lote 2)				
2.000 R (12)	58 \pm 1.41 (48 — 67)	128 \pm 3.16 (109 — 145)	66 \pm 3.87 (47 — 80)	250.60 (223 — 282)
controles (3)	40 \pm 0.40 (40 — 41)	135 \pm 2.44 (132 — 140)	63 \pm 3.87 (57 — 70)	238.66 (230 — 251)
	t: 12 P: 0.01 — 0.001	t: 1.75 P: 0.20 — 0.10	t: 0.54 P: 0.70 — 0.60	
Lote 3)				
3.000 R (8)	52.25 (47 — 63) X	104.75 (92 — 118) X	56.75 (47 — 69)	213.70 (188 — 227) X
controles (3)	45.00 (44 — 46) X	87.00 (83 — 92) X	43.66 (36 — 51)	175.66 (167 — 187) X
Lote 4)				
4.000 R (10)	43.50 (38 — 49) X	79.50 (67 — 96)	49.90 (35 — 60)	172.90 (146 — 197)
controles (7)	34.85 (32 — 37) X	77.57 (70 — 87)	41.14 (38 — 49)	153.57 (141 — 171)
Lote 5)				
6.000 R (10)	68.80 (61 — 75) X	136.50 (124 — 165) X	76.60 (63 — 96) X	291.90 (254 — 333) X
controles (7)	53.85 (49 — 57) X	109.71 (95 — 123) X	49.14 (40 — 57) X	212.71 (186 — 235) X
Lote 6)				
8.000 R (10)	38.80 (35 — 47) X	86.60 (73 — 98) X	68.30 (54 — 88) X	193.70 (164 — 222) X
controles (7)	25.85 (24 — 29) X	53.85 (49 — 57) X	30.71 (22 — 35) X	110.42 (103 — 119) X

X Diferencias estadísticamente significativas obvias entre irradiados y controles.

las proteínas irradiadas aparece general y constante, en todas las curvas de ambas familias poblacionales comparadas, irradiadas y de control (fig. 5-6).

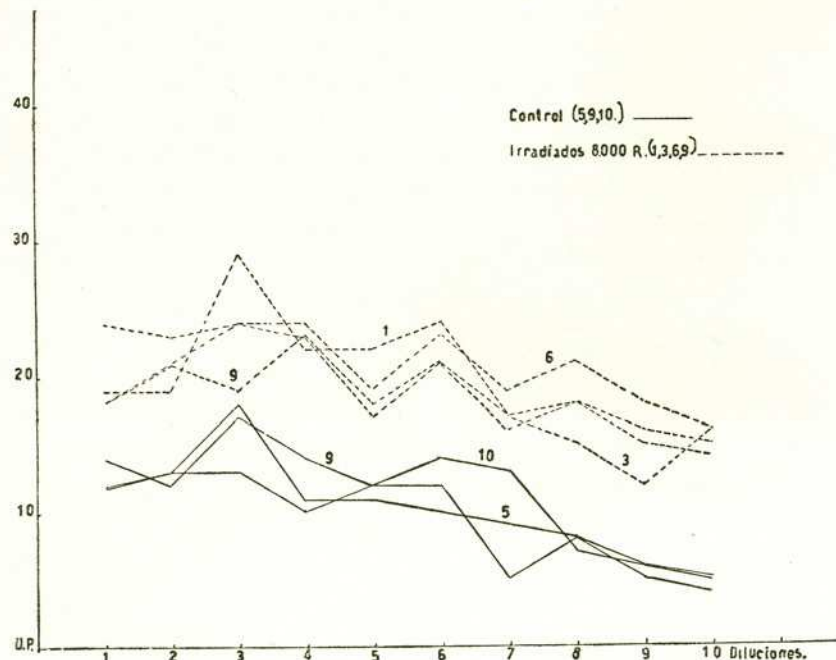
Es oportuno aclarar que los números que caracterizan las curvas consignadas en los gráficos de las figs. 2-6, se refieren a los números de orden de los ejemplares de cada muestra; no se pudo representar gráficamente todas las curvas, para cada lote, por evidentes razones de claridad.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados tabulados indican que una irradiación progresiva, provoca efectos significativos para las características antigénicas de las globulinas y albúminas de *Bufo arenarum* y que tales efectos se revelan más precozmente para las globulinas β , luego para las α y γ , y finalmente para las albúminas. Una dosis de 1.000 R no determina aparentemente alteraciones a los 5 días de la aplicación, pero 2.000 R afecta inicialmente a las globulinas β . Con 6.000 y 8.000 R hemos visto una alteración total, pero ya con 3.000 R las diferencias son significativas para las

globulinas β y $\alpha + \gamma$, menos claras para las albúminas, y con 4.000 R esto ocurre, para las globulinas β pero no para las $\alpha + \gamma$ o la albúmina. Esto parece significar que existen diferentes niveles de tolerancia molecular a la misma dosis, y el aumento del valor total turbidimétrico, podría estar en relación con efectos de polimerización, analizados por ejemplo por Leone y Sweet (1962).



Nuestros datos merecen ser comparados, a pesar de las evidentes diferencias biológicas de las especies empleadas, con los datos de Leone (1957), quien irradiando pollos con rayos X, no comprobó variaciones significativas frente a los controles después de una dosis de 330 R, pero alteraciones plasmáticas ya evidentes en 24 horas, con 660 R. En tres días había "recuperación" turbidimétrica de las reacciones precipitínicas y a los 7-10 días, aumento total del valor turbidimétrico global de las curvas. Con 990 R las alteraciones plasmáticas aparecían más profundas, persistiendo hasta 30 o 60 días después. Dosis de 1.320 R mataban en 12 horas a todos los animales experimentados. Según Leone las modificaciones de las proteínas séricas serían de dos tipos. Cuantitativas, reve-

ladas por los aumentos turbidimétricos en las curvas de los irradiados frente a las de los controles; cualitativas, correspondientes a depresiones de las mismas. Así, los cambios inducidos en las aves por una dosis de 660 R, serían fundamentalmente de naturaleza cuantitativa; de naturaleza cualitativa serían al contrario los debidos a 990 R, al límite de la dosis letal (estimándose en 1.000 R la DL 50). Por otro lado, el autor hace especialmente hincapié sobre la gran sensibilidad a las radiaciones demostrada por las globulinas β del plasma.

Considerando los resultados de Leone y los nuestros, puede subrayarse cierto paralelismo del proceso, en particular cambios precoces en las globulinas β , puestos en evidencia por sus efectos cuantitativos, a los 5 días, en los sapos irradiados con 2.000-3.000-4.000 R. Las analogías serían claras entonces con las aves que recibieron 660 R. Cambios cuantitativos notables se registraron luego con exposiciones de 6.000 y 8.000 R en el caso de *Bufo arenarum*, a los 5 días, pero en las aves Leone constata con 990 R, ya a partir de los 3 días y por más de un mes, cambios cualitativos evidentes, con depresión general de las curvas en el área de las β globulinas. Una comparación general de ambas series de resultados experimentales es sin embargo posible, pero la norma de reacción fisiológica de los anuros es con dosis superiores de irradiación sensiblemente diferente de las aves, y parece indicar su probable mayor resistencia a eventuales factores de ionización naturales y experimentales.

BIBLIOGRAFIA

- BACQ, Z. M. y ALEXANDER, P., 1964. Fundamentos de Radiobiología. Ed. Esp. Acribia. Zaragoza.
- BLAIR, W. F., 1960. Radiation induced genetic damage in the Mexican Toad (*Bufo valliceps*).— Tex. J. Sci. 12, 3-4: 216-222.
- BOYDEN, A., 1956. On measuring Serological Correspondence among Antigens.— Bull. Ser. Mus. 16 : 3-8.
- CEI, J. M., 1965. Radioactividad natural y estado funcional del aparato cutáneo en *Bufo spinulosus* Wiegmann.— Comun. III Ses. Cient. Biol., Soc. Arg. Biol. Rosario, 12-14 abril 1965: 92-93. (En prensa: Arch. Bioq. Farm. U. N. T.).
- CEI, J. M. y COHEN, R., 1965. Serological relationships in the Leptodaetylus (pachypus) species group.— Copeia. 2.
- HUTCHINSON, F., 1952. Arch. Biochem. 41 : 317.
- HUTCHINSON, F., 1954. Radiation Research., 1 : 43.
- LEA, D. E., 1947. Actions of radiations on living cells. MacMillan, N. Y.: 402 pp.
- LEA, D. E., SMITH, K. M., HOLMES, B. y MARKHAM R., 1944. Direct and indirect action of radiation on viruses and enzymes.— Parasitology, 36 : 110.

- LEONE, C. A., 1956. Effect of gamma-rays on the serological properties of ovalbumin. — *Radiation Research*, 5, 4: 34.
- LEONE, C. A., 1957. Alteration of antigenicity of ovalbumin by X-rays. — *Fed. Proc.* 16, 1: 1809.
- LEONE, C. A., 1957. Effects of X-irradiation on Chickens as revealed by Serological Analysis. I — Whole Plasma comparisons. — *Trans. Kans. Acad. Sci.* 60, 3: 301-315.
- LEONE, C. A., 1959. Serological studies on gamma-irradiated ovalbumin. — *Fed. Proc.* 18, 1: 2276.
- LEONE, C. A., 1960. Serological studies of ovalbumin denaturated by gamma-rays. — *Fed. Proc.* 19, 1: 1.
- LEONE, C. A., 1960. Effects of gamma-rays on the serological properties of ovalbumins. I—Irradiated lyophilized Protein. — *J. Immunology*, 85, 2: 107-11.
- LEONE, C. A. 1960. Effects of gamma-rays on the serological properties of ovalbumins. II—Fractions from irradiated lyophilized protein. — *J. Immunology*, 85, 2: 112-119.
- LEONE, C. A., 1961. Some biophysical changes in gamma-irradiated protein. — *Radiation Research*. 14, 4: 91.
- LEONE, C. A. and SWEET, G. H., 1962. Serological studies on gamma-irradiated human gamma-globulin. — *Fed. Proc.* 21, 2.
- POLLARD, E., 1953, *Advanc. biol. med. Phys.*, 3 : 153.
- POLLARD, E. C., GUILD W. R., HUTCHINSON, F. y SETLOW, R. B., 1955. *Progr. Biophys.*, 5 : 72.
- TANNER, W. W., 1965. A comparative population study of small vertebrates in the Uranium Areas of the Upper Colorado River Basin of Utah. *Brigham Young Sc. — Bull. Biol. Ser.* 1 : 1-31.
- TINCKLE, D. W., 1965. Effects of radiation on the natality, density and breeding structure of a natural population of Lizards. *Utah Stansburiana. — Hlth. Phys.* 11 : 1595-1599.