

## Tesis de Posgrado

# Alteraciones vasculares producidas por la irradiación

Schwint, Amanda Elena

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Schwint, Amanda Elena. (1986). Alteraciones vasculares producidas por la irradiación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1994\\_Schwint.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1994_Schwint.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Schwint, Amanda Elena. "Alteraciones vasculares producidas por la irradiación". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1994\\_Schwint.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1994_Schwint.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

15 1994

Ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ALTERACIONES VASCULARES PRODUCIDAS POR LA IRRADIACION

Autor

Amanda Elena Schwint

Director de Tesis

Dra. Maria Elina Itoiz

Lugar de trabajo:

Departamento de Radiobiología

Comisión Nacional de Energía Atómica

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1986

Tesis 1994  
Ej. 2

Director de Tesis: María Elina Itoiz de Cabrini

Lugar de trabajo: División Patología del Departamento de  
Radiobiología de la Comisión Nacional de  
Energía Atómica

*A mis padres*

*A mi esposo, Marcos*

*A mis hijos, Jonathan y Jennifer*

## Agradecimientos

- A mi padrino de Tesis, Dra. Maria Elina Itoiz de Cabrini, mi mayor reconocimiento y gratitud por haberme brindado su guía y experiencia científica y su constante apoyo a nivel humano.
- Al Prof. Dr. Rómulo Luis Cabrini, por su asesoramiento científico de incalculable valor y su comprensión y calidez humana.
- A las Dras. A. M. Ubios y B. M. de Rey por su desinteresada colaboración y asesoramiento constante.
- A la Sra. Sara Orrea por su desinteresado apoyo técnico.
- A las Sras. Diana Prahic y Alicia Petragalli por la dedicación y eficacia con que realizaron las técnicas de irradiación.
- A todo el personal científico y técnico del Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica que hizo posible la realización de este trabajo.
- Al Dr. J. M. Rey, pediatra, por su certero criterio en el diagnóstico y desinteresada guía en el tratamiento de la enfermedad de mi hijo, sin lo cual hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

-A las Dras. Elena Graciela Espinal y María Beatriz Guglielmotti por todo el apoyo que me brindaron durante la confección de este trabajo.

## INDICE

Introducción -----	1
Reseña Bibliográfica -----	8
Materiales y Métodos-----	25
Resultados-----	45
Discusión-----	77
Resumen y Conclusiones-----	87
Referencias Bibliográficas-----	89

## INTRODUCCION

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes se deben a la absorción y distribución de la energía en los tejidos. Estas radiaciones, electromagnéticas o corpusculares, originan, directa o indirectamente el fenómeno de ionización al interactuar con la materia. Los distintos efectos causados por los distintos tipos de radiaciones ionizantes estarían íntimamente ligados a las características de deposición energética, que a su vez dependen de la masa, la carga y la energía de la radiación en estudio. La distribución espacial de las ionizaciones varía en función de la fuente primaria de ionización. En el caso de un emisor de partículas la energía se absorbe en un espesor determinado del sistema, mientras que las radiaciones electromagnéticas se atenúan progresivamente a lo largo de su trayectoria.

Las interacciones físicas iniciales que ocurren en un rango de tiempo que oscila entre  $10^{-24}$  y  $10^{-14}$  segundos generan a su vez una serie de reacciones en cadena que culminan en el daño biológico. La segunda etapa ( $10^{-12}$ - $10^{-8}$  segundos) es la físico-química en la cual la energía se deposita en la forma de ionizaciones estructurales primarias. Luego sobreviene el daño químico ( $10^{-7}$  segundos hasta horas post-irradiación) que comprende la generación de radicales libres que a su vez interactúan con moléculas blanco generando productos biológicos nocivos o disparando una serie de reacciones en cadena injuriantes. La cuarta etapa que ocurre minutos a horas después de la exposición



comprende el daño biomolecular debido al cual resultan afectadas moléculas de gran importancia biológica tales como enzimas y otras proteínas y los ácidos nucleicos. Prosiguen los efectos biológicos tempranos (de horas a semanas post-irradiación) y por último los efectos biológicos a largo plazo (de años a siglos después de la exposición) que comprenden las manifestaciones tardías del daño entre las cuales se cuentan la aparición de tumores malignos y la expresión de alteraciones genéticas.

El daño radiobiológico en mamíferos es de distinto tipo según el nivel de organización biológica que se considere. A nivel molecular se verifica el daño a macromoléculas tales como enzimas, RNA y DNA y la alteración de los caminos metabólicos. A nivel subcelular ocurre el daño a membranas celulares, núcleo, cromosomas, mitocondrias y lisosomas. La injuria celular comprende la inhibición de la división celular, la aparición de atipias (transformación maligna) y la muerte celular. A nivel de tejidos y órganos ocurren asimismo, modificaciones morfológicas y funcionales de diversa magnitud y la aparición de tumores. La lesión de sistemas tales como el nervioso, la médula ósea y el tracto intestinal pueden ocasionar la muerte del individuo. La irradiación total del individuo puede inducir su muerte o envejecimiento prematuro. A nivel de poblaciones animales ocurren cambios en las características genéticas debido a mutaciones génicas y cromosómicas en individuos de la especie afectada.

Los efectos radiobiológicos radioinducidos no son específicos de la radiación. Los procesos degenerativos y hemorrágicos

junto con las alteraciones atróficas, atípicas o necróticas son lesiones radioinducidas, asimismo por otras condiciones. No obstante, algunas manifestaciones patológicas tales como la radiodermatitis con sus cambios vasculares asociados, descrita por Wolbach en 1909 (1) se reconocen como distintivas.

Las alteraciones fisiopatológicas producidas por exposición a radiación ionizante han sido estudiadas extensamente en la mayoría de los mamíferos, incluyendo al hombre. A pesar que las manifestaciones de lesiones por radiación difieren de especie a especie, los efectos de la radiación son similares en el hombre y algunos otros mamíferos. Los resultados experimentales obtenidos en animales se extrapolan, generalmente, pero con suma reserva, al hombre. Las analogías y homologías constituyen los aspectos teóricos de la extrapolación.

La respuesta de los sistemas vivos frente a la radiación difiere en su naturaleza y grado según la magnitud de la dosis, el tipo y energía de la radiación, la intensidad y forma de administración y la extensión del área irradiada. Asimismo, la lesión radioinducida está condicionada por variables inherentes al organismo tales como la especie, la edad, el estado metabólico y las condiciones ambientales tales como la tensión de gases y la temperatura.

Estas variables pueden ser estudiadas aisladamente en modelos experimentales.

La irradiación total produce una reacción compleja y generalizada: el llamado síndrome de radiación dentro del cual se pueden distinguir el síndrome de médula ósea, el gastrointestinal y el del sistema nervioso central. La irradiación total resul-

ta así adecuada para estudios de letalidad producidos por irradiación y el análisis de la patogenia y evolución de la llamada "enfermedad por radiación". Por el contrario, la irradiación local brinda un modelo circunscripto a partir del cual se puede obtener información sobre los efectos primarios y secundarios ejercidos por la radiación sobre determinados órganos y tejidos.

Entre los modelos experimentales que pueden seleccionarse para el estudio de los efectos locales, la piel constituye un campo de gran interés debido a que es el tejido más expuesto a radiaciones naturales y accidentales y es la puerta de entrada de la mayor parte de las radiaciones aplicadas terapéuticamente. Por otra parte, su posición superficial minimiza los problemas técnicos de la irradiación experimental, pudiéndose además seleccionar áreas en donde la irradiación no daña tejidos vitales, comprometiendo el estado general o la supervivencia del animal.

Los efectos de la irradiación local sobre la epidermis han sido extensamente analizados por diversos grupos de trabajo. Entre ellos el Laboratorio de Patología de la Comisión Nacional de Energía Atómica, donde se ha efectuado el presente trabajo, ha venido desarrollando en los últimos años una línea de investigación tendiente a analizar, con distintos enfoques y metodologías concurrentes, los daños agudos producidos por la irradiación en un modelo de piel de rata recién nacida. Se ha demostrado que, desde el punto de vista morfológico, la irradiación produce inicialmente un aumento de volumen de la epidermis. Los métodos estereológicos, a nivel óptico y electrónico, permitieron establecer que la magnitud del aumento depende de las do-

sis y tiempos post-irradiación transcurridos, y, si bien existe incremento del número de células y del espacio intercelular, se debe esencialmente al aumento de volumen de las células(2-5).

El análisis ultraestructural de los queratinocitos indicó que aparecen en las células signos degenerativos caracterizados por la aparición de acúmulos de grasas, pero fundamentalmente el aumento del volumen va acompañado de un incremento del tamaño nuclear y aumento de mitocondrias y tonofibrillas(6) indicando una intensificación de actividades metabólicas.

Esta intensificación concuerda con hallazgos histoquímicos en este mismo modelo experimental, los cuales revelaron que, contrariamente a lo observado en otros modelos "in vitro" en los cuales las enzimas se inactivan por acción ionizante, en la epidermis se produce una activación de óxidoreductasas. Las enzimas del ciclo de Krebs aumentan en relación con el aumento de tamaño de la epidermis y las correspondientes al shunt de las pentosas, aumentan no solo en relación al aumento morfológico sino también su densidad intracelular. Este aumento de las actividades metabólicas del shunt de las pentosas produce un aumento de los productos intermediarios utilizados en la síntesis de RNA que, a su vez, resulta en un incremento de las proteínas elaboradas durante la diferenciación de las células epidérmicas(7-10). Se han encontrado también aumentos de otras enzimas hidrolíticas relacionadas con la keratinización, tal como la fosfatasa ácida(11,12).

Estos incrementos de actividad se correlacionan con la dosis administrada y según sea su magnitud conducen a la recuperación del tejido o a la aparición de fenómenos regresivos

y la necrosis. Debido a ello cobran especial relevancia los análisis de efectos radiobiológicos en función de la dosis, como un medio de establecer la posibilidad de recuperación de los tejidos.

La dermis subyacente a la epidermis no ha sido objeto de análisis tan exhaustivos. Se han descripto cambios inflamatorios y reacciones aisladas, difícilmente correlacionables con secuencias de dosis o tiempos post-irradiación. Menos aún se conocen datos que puedan contribuir a explicar si las alteraciones epidérmicas antes mencionadas son producidas directamente por la irradiación o secundarios a daños en la dermis subyacente.

Con el objeto de encarar el análisis de uno de los aspectos del daño a la dermis en el mismo modelo experimental antes mencionado se ha proyectado el presente estudio cuantitativo de los efectos agudos de la irradiación sobre la microvasculatura de la piel de la rata recién nacida para correlacionar las conocidas alteraciones epidérmicas con posibles cambios nutricionales. Es bien conocido que los vasos son estructuras radiosensibles que evidencian lesiones que se inician con el aumento de la permeabilidad, continúan con cambios morfológicos de la pared y finalizan con cuadros de fibrosis y esclerosis que llegan a modificar consistentemente la actividad circulatoria.

Reinhold(13) sugirió que la lesión primaria por radiación sería la esterilización de la célula endotelial, el daño celular y la despolimerización de las membranas induciendo así vasodilatación(erythema), la liberación de mediadores inflamatorios y un aumento en la permeabilidad. A medida que progresan los estudios en éste campo surge la necesidad de cuantitar estos

cambios para comparar distintas condiciones de dosis y tiempo post-irradiación. El presente trabajo comprende un estudio cuantitativo de lesiones agudas radioinducidas en la microvasculatura de la piel de mejilla de la rata recién nacida en función de la dosis y el tiempo post-irradiación usando peroxidasa como trazador. El uso de Horseradish Peroxidase inyectada por vía intravenosa para el estudio a nivel ultraestructural del transporte endotelial fue introducido por Graham y Karnovsky en 1966. Esta técnica fue adaptada por nosotros para estudios cuantitativos a nivel de microscopía óptica de la morfología y función vascular normal y patológica y permite la visualización de todos los vasos funcionantes, incluyendo los capilares, en cortes gruesos. El estudio morfométrico permitió la evaluación cuantitativa de parámetros morfológicos que caracterizan el patrón vascular. Asimismo, parte de la peroxidasa inyectada permea el endotelio, pasa al tejido conectivo perivascular y es fagocitada por macrófagos. Así es posible obtener información sobre cambios radioinducidos en la permeabilidad capilar del conteo directo de células macrofágicas peroxidasa positivas y de la evaluación microfotométrica de la peroxidasa presente en el tejido conectivo revelada histoquímicamente.

## RESEÑA BIBLIOGRAFICA

Los estudios sobre el efecto de la irradiación sobre los vasos sanguíneos se han realizado mediante trabajos experimentales que han encarado dos diferentes aspectos: por una parte el daño evidenciado en alteraciones morfológicas de las estructuras vasculares, ha sido analizado a nivel macroscópico y a nivel de microscopía óptica y electrónica. Por otra parte numerosos estudios han enfocado los aspectos funcionales del daño por irradiación en la circulación tisular.

Dado el carácter morfológico del presente trabajo se ha puesto un mayor énfasis en el análisis exhaustivo de la literatura referente al primero de los aspectos mencionados aunque se han analizado también en forma complementaria los hallazgos de carácter fisiológico.

### 1. Alteraciones morfológicas producidas por la irradiación

Las alteraciones morfológicas asociadas a la irradiación de diversos tejidos han sido estudiadas ampliamente a nivel de microscopía óptica y electrónica pero no se dispone de una serie ordenada de datos en función de las dosis administradas. Estudios realizados en función del tiempo post-irradiación con una dosis fija han dado una mayor información sobre la evolución progresiva de la lesión.

Los daños tempranos post-irradiación (horas) se manifiestan por congestión y extravasación de polimorfonucleares (14,15). A nivel de microscopía electrónica se observa daño endotelial y de cé-

lulas mesenquimáticas circundantes. La destrucción de la barrera endotelial puede explicar la pérdida de grandes cantidades de plasma y proteínas plasmáticas al espacio extravascular. Las células circulantes se adhieren a la membrana de las células endoteliales generando sitios de formación de trombos(16). La membrana basal se edematiza y se ha comprobado la depolimerización de los mucopolisacáridos y la esterilización celular. Estos datos sugieren que el daño vascular directo es de gran importancia en el colapso circulatorio post-irradiación(16).

Algunos días después de la irradiación los núcleos de las células endoteliales aparecen agrandados y polimorfos, con cromatina marginada y condensada. El citoplasma contiene un retículo endoplásmico dilatado, vacuolas autofágicas y mitocondrias alteradas. La membrana plasmática también se encuentra lesionada con lo cual se favorecen las condiciones para la producción de abundante edema, el cual, a su vez, sería desencadenante de la fibrosis que sobreviene en estadios crónicos(17). Los agregados celulares que se encuentran a lo largo de las paredes vasculares representarían sitios de reparación(18). También se produciría una migración celular para cubrir espacios producidos por la atrofia y necrosis de algunos elementos endoteliales(19). La membrana basal continúa edematosa y aparecen engrosamientos y plegamientos(20).

Las observaciones realizadas algunos meses post-irradiación muestran que prosigue la degeneración nuclear y citoplasmática(21). Hay fenómenos de trombosis y proliferación de la íntima. El tejido elástico se fragmenta y se produce un engrosamiento hialino de la pared vascular en necrosis y fibrosis circundante(22). En el lu-



men capilar se han observado invasiones de colágeno e inclusiones lipídicas(17).Hay una disminución en el número de vasos sanguíneos y linfáticos y desaparición de algunas células endoteliales con exposición de la membrana basal(19),ya que el intento de proliferación de células endoteliales puede fracasar por la esterilización y necrosis radioinducida(23).Comienzan en esta etapa las telangiectasias típicas del daño crónico(24).Cuatro a seis meses después de la irradiación se observa la persistencia de infiltración celular de plasmocitos,leucocitos y macrófagos(17),la formación de trombos,hialinización del plasma exudado y fibrosis(15,25).Durante ésta fase es común ver lisosomas e inclusiones citoplasmáticas anómalas(21).

A tiempos más tardíos post-irradiación se acentúan los daños endoteliales(26) y fibróticos(17).Hay proliferación endotelial hasta la oclusión(27,23).La membrana basal se encuentra fraccionada y engrosada(26).Las células y fibras musculares sufren atrofia. Hay un aumento de vasos telangiectásicos y se observa la degeneración de fibras elásticas y el reemplazo de la membrana elástica por tejido fibroso (23).

En el caso particular de animales hipercolesterolémicos la irradiación aumenta la infiltración lipídica(28,29).El origen de la atheromatosis se encontraría en la despolimerización de la matriz de mucopolisacáridos y en el daño a nivel celular ya que ambos fenómenos facilitan el depósito de lípidos( 30).

#### -Efectos de la irradiación sobre la proliferación endotelial

Modelos experimentales en los que se induce una activa proliferación vascular tales como la cicatrización de heridas han permit

estudiar el efecto de la irradiación sobre la proliferación endotelial.

La irradiación reduce la proliferación vascular(31-33).Debido a que el recambio de las células endoteliales ocurre,dependiendo del tejido del cual se trate,cada 2 meses a 3 años,se asume que la muerte radioinducida,la cual ocurre generalmente cuando células esterilizadas intentan dividirse mitóticamente,ocurriría meses e incluso años después de la irradiación.La diferencia en los tiempos los cuales los distintos componentes de la red vascular exhiben daños podría ser explicada por el amplio rango de tiempos de recambio que se han medido en células endoteliales.Una disminución en el número de células endoteliales gatillarían su proliferación a tiempos tardíos post-irradiación,lo cual podría causar la oclusión vascular(23).En algunos casos la repoblación sería via la migración celular y no mediante la proliferación de células endoteliales(23,34).

La irradiación induce la desaparición del revestimiento de mucopolisacáridos de las células endoteliales,incluso a muy bajas dosis(200 rads)(35).

#### -Efectos de la irradiación sobre la matriz celular de la pared vascular

La irradiación induce la depolimerización de los mucopolisacáridos(30,36).Las consecuencias funcionales son,básicamente,un aumento de permeabilidad al agua y algunos solutos.

Se describen dos tipos de respuesta a la irradiación.Si la membrana basal no está dañada se produce una repoblación celular a lo largo de la antigua membrana basal.Si la continuidad de la

membrana basal se destruye, la regeneración es incompleta, lo cual produce una cicatriz y una abolición de la función. El segundo tipo de regeneración se produce mediante la formación de una nueva capa de membrana basal en aposición a la antigua por cada nueva generación de células. Capas múltiples pueden acumularse a partir de sucesivas generaciones celulares (36). La depolimerización inmediata de la matriz de mucopolisacáridos de la pared vascular indicaría que éste tipo de daño es el inicial y probablemente el desencadenante esencial de los daños posteriores. No obstante, hay opiniones que sostienen que el daño endotelial y la muerte celular son los daños principales que causan la posterior insudación de los componentes plasmáticos a la pared vascular. La organización de éste insudado sería la base para el desarrollo de las lesiones fibrosíticas posteriores (36).

## 2. Variaciones en el volúmen sanguíneo inducidas por la irradiación

Se verifica un notable aumento del volumen sanguíneo como efecto agudo de la irradiación local en la piel de la oreja de conejo con 8000 rads de Rayos X (37). El volúmen sanguíneo intravascular sufre un aumento significativo 2 días después de la irradiación con 500-6000 rads de Rayos X tanto en piel, como en músculo. El incremento de volumen vascular se mantiene a los 12 días post-irradiación, pero ya no es tan marcado (38). En la bolsa facial del hamster el aumento de volumen se detecta 2 semanas después de la irradiación con 500-3000 rads de Rayos X. Este aumento inicial podría deberse a la dilatación de arteriolas, venas y capilares en las primeras se-

manas post-irradiación. Además una dilatación produciría una disminución de la resistencia vascular causando un aumento de flujo sanguíneo verificado por la técnica de extracción de Rb 86( 39). Se comprobó una reducción significativa del volumen intravascular 8-12 ses después de la irradiación con 500-3000 rads de Rayos X. Esta respuesta más tardía de disminución del volumen intravascular podría explicarse en términos de la reducción en tamaño del lecho vascular, la pérdida de células endoteliales y la consecuente oclusión de arteriolas terminales por células endoteliales proliferantes(39).

Las técnicas empleadas para el estudio del volumen intravascular consisten, en líneas generales, en la inyección de proteínas marcadas y su detección autorradiográfica y la inyección de glóbulos rojos marcados con  $\text{Cr}^{51}$  y la posterior medición de la radioactividad presente en la muestra de sangre(19)

### 3. Efectos de la irradiación sobre el flujo sanguíneo y la vascularización.

La irradiación induce una reducción en el árbol vascular como efecto crónico. Se postula que la fibrosis inducida por la irradiación podría ser la causa de ésta reducción por la presión que ejerce sobre el árbol vascular. Esta condición, a su vez, induciría la proliferación de la íntima provocando así un incremento en la reducción del lumen vascular(22). Se obtuvo una destrucción del 70% del árbol vascular 2 meses después de 4000 rads de Rayos X en la pata de la rata, el 30% restante aún estaba presente 8 meses después de la irradiación con 10.000 rads de Rayos X(40).

El estudio del flujo sanguíneo y su alteración causada por la irradiación ha sido realizado por varios autores por métodos de extracción y clearance de sustancias marcadas. La interpretación de los datos aportados por éstos trabajos se ve dificultada por la gran cantidad de factores involucrados. El clearance de un trazador de la sangre o del tejido depende no solamente del flujo sanguíneo sino también del coeficiente de partición tejido-sangre, velocidad y distancia de difusión, permeabilidad vascular, interfase tejido-capilar, proporción de shunts arterio-venosos u otro flujo no funcional y el drenaje linfático. Todos éstos parámetros pueden ser alterados por la irradiación(23).

Como efecto agudo de una dosis local de irradiación en piel se verifica un aumento de flujo sanguíneo inmediatamente después de la exposición durante la reacción inflamatoria inicial y un aumento 3-6 horas post-irradiación. No obstante, contradiciendo parcialmente los resultados de Hopewell(39), cuando aparece la reacción aguda(7 días post-irradiación) no se han podido demostrar inequívocamente cambios en el flujo sanguíneo(41). La piel humana ha sido estudiada usando termografía con la cual se verificó un aumento del flujo durante el eritema agudo temprano(2-3 meses post-irradiación)(23).

A tiempos tardíos post-irradiación se observó que se mantenía aumentado el flujo sanguíneo(42,39), lo cual sería producido por el shunting arterio-venoso que a su vez es estimulado por la caída en el volumen vascular(39). No obstante otros autores detectaron una disminución en el flujo sanguíneo a tiempos tardíos post-irradiación(43) y una progresiva incapacidad de producir hiperemia compensatoria(44). En el tejido conectivo laxo subcutáneo de ratones el flujo sanguíneo disminuye 3-6 meses post-irradiación, pero au-

mento compensatorio(45).

Se describen cambios en el flujo sanguíneo inducidos por la irradiación local en hígado, riñón y pulmón.

Tomando en conjunto los estudios hechos en hígado a tiempos cortos post-irradiación se ve que el ritmo de desaparición de sangre o la captación por el hígado de partículas coloidales disminuye con dosis mayores que 1500 rads. A tiempos más tardíos post-irradiación hay coincidencia en cuanto a una disminución de los índices circulatorios y de funcionalidad(41).

Trabajos experimentales en pulmón y observaciones clínicas basadas sobre estudios de ventilación indican que las radiaciones ionizantes pueden deprimir la capacidad pulmonar (41,43).

La gran capacidad autorregulatoria del Sistema Nervioso Central dificulta su estudio y la interpretación de los resultados. Aún cuando solamente se irradia la cabeza se observan cambios en la presión arterial, la presión central y periférica y la resistencia vascular. La disminución en éstos parámetros circulatorios se reconoce generalmente como un efecto directo o indirecto de la irradiación sobre el mecanismo central de regulación del sistema circulatorio(43).

#### 4. Efectos de la irradiación sobre la permeabilidad vascular

Los cambios de permeabilidad, volumen sanguíneo y flujo sanguíneo efectivo dependen de la dosis, el tiempo post-irradiación y las diferencias entre especies. En particular, las variaciones en la permeabilidad que a su vez dependen de cambios en otros paráme-

metros circulatorios se traducen directamente en alteraciones nutricionales de los tejidos y en eso radica su mayor importancia.

Haciendo un análisis global se puede afirmar que para la inducción de cambios tempranos se requiere una dosis de 1000-4000 rads, para la inducción de cambios agudos de 2500-8000 rads y una dosis mayor que 1500 rads para llegar a la condición de daño crónico(41).

Las diferencias entre especies son más notables en cuanto a la dosis requerida para provocar el cambio de permeabilidad temprano: 1000 rads para el conejo y 4000 rads para el cobayo; la piel de ratón no es afectada por dosis menores de 4200 rads(41). En general se puede afirmar que existe un aumento de permeabilidad hasta 1 mes post-irradiación(37). El aumento de permeabilidad se desarrolla en ocasiones como un incremento bifásico. Aproximadamente a las 3 y 18 horas post-irradiación se dan los picos de permeabilidad en algunos modelos de piel estudiados(46, 41, 15, 47). Según Law(23), con dosis de 100-3000 rads de Rayos X se observan 3 picos de permeabilidad, el primero casi inmediatamente después de la irradiación, el segundo 1-3 días post-irradiación y el tercero llega a su máximo 9-17 días post-irradiación y va decayendo durante las 2 semanas subsiguientes.

El tiempo de latencia hasta que aparece el primer pico de permeabilidad es menor cuanto mayor es la dosis. El período de incremento de permeabilidad podría ser originado por fragmentos polipeptídicos activos liberados por proteasas o esterasas del pool de proteínas solubles de la sangre. Los cambios más tardíos podrían deberse a un retardo en la circulación por obstrucción vascular(48).

Se obtuvieron resultados similares para la irradiación de intestino(49,50).

En estudios hechos en explantos de pollo se observó, a los 30-45' post-irradiación, hemoconcentración y edema, lo cual indicaría que ocurre pérdida de plasma por un aumento de permeabilidad. La degeneración vascular prosiguió hasta el éstasis completo 4-6 horas post-irradiación. El efecto inicial de la irradiación sería sobre las estructuras extracelulares-membrana basal y sustancia intercelular-causando una temprana pero moderada pérdida de plasma. Si la dosis es suficiente ocurren cambios degenerativos en las células endoteliales. Las células circulantes tienden a adherirse a éstas zonas causando oclusión y finalmente éstasis(51,52).

Estudios hechos en riñón evidencian un aumento de permeabilidad tubular 1 día post-irradiación. A los 2 días se verificaron cambios en los glomérulos, especialmente a nivel de endotelio y engrosamientos locales de la membrana basal(52).

La irradiación de pulmón provoca un aumento de permeabilidad a tiempos cortos(24).

En el Sistema Nervios Central se ve aumentada la permeabilidad de la barrera entre el mismo y el Sistema Circulatorio a tiempos cortos post-irradiación. No obstante, algunos trabajos describen una disminución de la permeabilidad de 24-72 horas post-irradiación (43).

Como daño crónico hay una disminución en la capacidad de transporte, que se acentúa en condiciones de flujo máximo. Con dosis altas, por encima de los 2500 rads algunos autores han detectado, casi paradójicamente, un daño menor, lo cual podría explicarse como la reparación temprana de un daño más severo en los períodos agudos(42).



También en pulmón irradiado se detecta una disminución en el transporte de sustancias biológicas 7-18 meses post-irradiación(24).

### Técnicas para el estudio de la permeabilidad

Las técnicas empleadas en los estudios de permeabilidad son, básicamente, la inyección intravascular de colorantes vitales(41), proteínas marcadas(54), marcado de vasos con carbón coloidal(55) y el uso de trazadores para el estudio del sistema fisiológico de poros pequeño-citocromo c(PM:12.000)(56)-y para el estudio del sistema de poros grande-ferritina(PM:500.000)(57)-y para ambos sistemas de poros-la peroxidasa(PM:40.000)(58)-.

La técnica de inyección intravascular de peroxidasa elegida y adaptada para el presente trabajo fue introducido para identificar, a nivel de microscopía electrónica, los estadios en la absorción de peroxidasa en los túbulos proximales de riñón(59). La técnica está basada en la inyección intravascular de peroxidasa (HRP), enzima de peso molecular 40.000, diámetro de 40 Å y punto isoeléctrico de 7,2. A distintos tiempos post-inyección se fija el tejido y posteriormente se revela la peroxidasa con 3-3' Diaminobencidina como sustrato oxidable y  $H_2O_2$  lo que produce un producto insoluble visible con microscopía óptica y electrónica por ser marcadamente osmófilo. El método permite una localización exacta de la enzima y su alta sensibilidad se debe a la posibilidad de detectar pequeñas cantidades de proteína. Debido al diámetro de la molécula enzimática se puede postular como trazador para el sistema teórico de poros grandes y chicos propuestos para explicar la fisiología del transporte endotelial(57,54).

Con ésta metodología se ha estudiado el transporte endotelial a nivel ultraestructural en distintos modelos tales como plexo coroideo de rata(60), la membrana alvéolo-capilar en ratón(61), las uniones neuromusculares en ratón(62), el hígado de ratón(63) y la glándula salival submandibular de conejo(64). Asimismo, Lorenz y Plenck(65) estudiaron el transporte en hueso de ratón joven, Squier(66) estudió la permeabilidad a la peroxidasa del epitelio oral queratinizado y no queratinizado y Williams y Wissig(67) estudiaron el transporte endotelial de los capilares del diafragma. El método no ha sido utilizado hasta el presente para el estudio de otros parámetros vasculares. En los trabajos que emplean la inyección intravascular de peroxidasa para el estudio de transporte endotelial se han discutido las posibles variaciones introducidas por la inyección de peroxidasa como agente extraño y de la peroxidasa "per se". El pasaje de peroxidasa a través de las uniones endoteliales en el pulmón de ratones aumenta al ser inyectada en mayor volumen. Se supone que los gaps de  $\approx 0 \text{ \AA}$  de diámetro de las máculas occludens serían el equivalente estructural del poro pequeño. Así quedaría bastante restringido el pasaje de HRP cuyo diámetro hidrodinámico equivalente es de  $25\text{-}30 \text{ \AA}$ , y se propone que un aumento de presión intravascular favorecería éste pasaje(68). No obstante, trabajando con los capilares del diafragma de ratones se vio que aumentando el volumen de inyección hasta un 30% del volumen sanguíneo total no varía la cantidad de peroxidasa que sale del lumen(67).

En cuanto a los efectos de la peroxidasa "per se" no hay evidencias de efecto citotóxico(69). Se ha detectado en cambio que la inyección intravenosa de HRP en conejos y cobayos produce una rápida disminución en las plaquetas circulantes, las cuales que-

dan agregadas y atrapadas en los capilares, y una caída en la 5HT sanguínea, la cual sería liberada por las plaquetas y catabolizada enzimáticamente(70).

Estudios del efecto de la peroxidasa sobre la permeabilidad capilar realizados en músculo cardíaco y esquelético de ratones indicaron que no existirían variaciones(58). En cambio, cuando la peroxidasa(5-20 mg/100 gr de peso) fue inyectada por vía intradérmica se verificó un aumento de la permeabilidad en vénulas y vasos pequeños aunque no en capilares(71). También se vio que diferencias en la concentración de la solución inyectada pueden producir distintas condiciones de permeabilidad. Vegge y Haye(72) detectaron que la inyección de peroxidasa 1 mM aumentó la permeabilidad pero no encontraron variaciones con peroxidasa 0,1 mM. Según Clementi(73) y Schneeberger y Karnovsky(68) la peroxidasa afectaría la permeabilidad del sistema de poros pequeño pero no del sistema de poros grandes. HRP no alteró la ultraestructura de las máculas ocludens de capilares pulmonares en ratones(61).

##### 5. Efectos de la irradiación sobre las vías linfáticas

La interrelación que existe entre el sistema circulatorio y el linfático se ve representado por mecanismos compensatorios tendientes a reducir los daños circulatorios provocados por la irradiación. La reacción compensatoria del sistema linfático ocurre por medio de dos mecanismos: un aumento en el drenaje directo por parte de los vasos linfáticos a través del conducto torácico y la apertura de comunicaciones venoso-linfáticas. El revestimiento en-

dotelial linfático es más resistente a la radiación que el de los capilares sanguíneos del mismo tejido. Asimismo, las alteraciones del flujo linfático aparecen a dosis mayores que las necesarias para causar daños en el flujo capilar sanguíneo. La aparición de tortuosidades y dilataciones a nivel de linfáticos se verifica con dosis por encima de los 5000-8000 rads. La formación de nuevos vasos linfáticos se impide con dosis superiores a los 2000 rads(36).

#### 6. Mecanismos bioquímicos de las alteraciones circulatorias producidas por la irradiación.

Los daños circulatorios producidos por la irradiación se deben principalmente a su acción directa sobre los vasos sanguíneos y el tejido circundante. Por otra parte existe evidencia de que la liberación de agentes bioquímicos ya sea por inducción directa de la irradiación, como por efecto secundario del daño directo sobre los tejidos o ambos produce alteraciones no solo en los vasos irradiados sino también a distancia, incluso en zonas blindadas a la irradiación.

Datos experimentales parecerían indicar que la liberación de histamina podría iniciar el aumento temprano de permeabilidad que ocurre hasta 24 horas después de la irradiación de la piel pero probablemente no permanecería en el área durante un período suficiente para justificar el incremento sostenido de la permeabilidad (41,23,49,37,48,55). Los vasos del lado venoso de la circulación son, aparentemente los más dañados, especialmente las vénulas. Los capilares exhiben un daño menor(55).

Las lesiones mediadas por liberación de serotonina son muy similares a aquellas inducidas por la histamina(55).

La 5-OH triptamina estaría también involucrada en los aumentos de permeabilidad vascular observados durante las 24 horas post-irradiación(23,49,41).

El aumento de la permeabilidad debido a la liberación de histamina sería luego mantenido por un mecanismo que parecería involucrar una proteasa o una estearasa(49). Estas fases más tardías podrían resultar de la liberación de enzimas lisosomales de células que mueren debido al daño inicial por irradiación. Estas enzimas liberarían péptidos vasoactivos a partir de proteínas plasmáticas(23,48).

Se ha verificado que la inhibición de la primera etapa de permeabilización con anti-proteasas afecta notablemente el desarrollo de los incrementos de permeabilidad tardíos inducidos por la irradiación(41,48).

Las fases tempranas inflamatorias, en particular la permeabilización radioinducida, son de fundamental importancia en el desarrollo de la fibrosis post-irradiación que se produce más tardíamente. Dunjic(41) y Ullrich y Casarett(15) en piel describieron la eliminación del sistema de complemento antes de la irradiación, lo cual reduce la permeabilidad, los daños conectivos y vasculares y la fibrosis de la piel.

En la fase tardía de la inflamación se acumula material enzimático de tipo lisosómico. En consecuencia, cabe la posibilidad que se genere un mediador que debilite la membrana basal(74).

Se ha sugerido que los cambios tempranos post-irradiación representan una respuesta inflamatoria secundaria de la dermis

frente al daño epidérmico y a tiempos más tardíos post-irradiación, se expresaría el daño endotelial directo. La reducción del flujo a mayores tiempos post-irradiación se podría atribuir a la proliferación endotelial que obstruye el lumen. Otra posibilidad es que la deplección de células endoteliales lleve a la invasión de las paredes vasculares por proteínas plasmáticas, las cuales podrían ser reemplazadas por fibras colágenas engrosando así la pared vascular y reduciendo el lumen(23).

### Conclusiones

Las fases tempranas del daño vascular se caracterizan por aumento del volumen y flujo sanguíneo y por cambios en las células endoteliales, particularmente de capilares y aumentos de permeabilidad que se asocian a la producción de edema e infiltración celular del conectivo. Los vasos de mayor diámetro no exhiben daño hasta tiempos más largos post-irradiación, al cabo de los cuales se detecta en forma característica el engrosamiento de la pared vascular con reducción del lumen, lo cual provoca una disminución en el flujo sanguíneo y el volumen vascular.

Reinhold et al.(75) esquematizan las posibles interacciones que podrían jugar un rol en las manifestaciones de la influencia de la radiación sobre los vasos sanguíneos y circulación en el cuadro que a continuación reproducimos.



## MATERIALES Y METODOS

### Puesta a punto de la técnica a utilizar

#### 1. Elección de animales

Los estudios descriptos en la literatura reseñados en el capítulo anterior, fueron en su mayoría realizados en animales jóvenes o adultos. No se dispone de información sobre alteraciones vasculares producidas por la irradiación en la piel de animales recién nacidos. Existe, en cambio, una vasta información sobre alteraciones morfológicas y metabólicas de la epidermis irradiada en animales de pocos días de edad (2-9, 11, 12). Ello se debe a que éstos animales resultan un modelo muy útil para este tipo de análisis dada la radiosensibilidad de algunas funciones de la células epiteliales en la vida fetal y las primeras etapas de la vida extrauterina (5). Debido a ello se propuso el estudio de las alteraciones vasculares en modelos experimentales similares con la finalidad de correlacionar las alteraciones epidérmicas con posibles cambios en la nutrición.

En todas nuestras experiencias hemos utilizado ratas Wistar de 5-7 días de edad pertenecientes al bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

#### 2. Elección de la zona

Se intentó estudiar inicialmente las alteraciones producidas por la irradiación en la cola y pata de los animales ex-



perimentales debido a que éstas zonas han sido las más extensamente estudiadas debido a la facilidad de su irradiación con métodos sencillos de blindaje del resto del cuerpo. Para el análisis vascular éstas zonas tuvieron el inconveniente de tener una tendencia mayor a la isquemia que otros sectores de la epidermis por ser áreas terminales muy influenciadas por variaciones técnicas y mecánicas. Después de algunas pruebas preliminares se eligió la zona de la mejilla que presentó las ventajas de ser una zona cercana al sitio de la inyección (vena jugular externa izquierda), no sufrir variaciones circulatorias importantes durante el tiempo post-inyección y el material a procesar puede obtenerse fácilmente mediante una incisión intrabucal rápida y ser fijado antes de que se afecte el lleno vascular de los capilares subepiteliales.

### 3. Puesta a punto del método de anestesia previa a la inyección vascular

La anestesia empleada fue el embutal ya que proporciona un mayor tiempo de manipulación. Se adecuó la dosis considerando un mayor índice de mortalidad en neonatos que en adultos: 0,006 ml/gr de peso de una solución de 100 mg de pentobarbital sódico, 14 ml de agua destilada y 4 ml de alcohol 96%.

### 4. Puesta a punto del método de inyección

Se siguieron los lineamientos generales propuestos por Williams y Wissig (67) para ratones adultos.

Se probaron la peroxidasa I, II y VI adquiridas en la casa

Sigma. Los resultados de éstas experiencias piloto indicaron que la peroxidasa VI era la mejor tolerada y la que ofrecía mayor resolución a nivel de microscopía electrónica y fue entonces seleccionada.

El único método posible fue la inyección a cielo abierto (Fig.1) realizada con agujas Carpule(Bayer) de calibre 0,3 mm que se proveen comercialmente para anestésias dentales. Fue necesario adaptarlas a jeringas calibradas a la décima de ml ya que las agujas mencionadas se proveen para ser utilizadas con jeringas metálicas no calibradas. Hubo dificultades iniciales en la administración de la inyección de peroxidasa VI en la jugular externa izquierda debido a su reducido tamaño en neonatos, las cuales fueron subsanadas con entrenamiento reiterado. Para ello se realizaron experiencias piloto inyectando en la vena jugular externa izquierda una solución de azul de Evans que permitió seguir la trayectoria del material inyectado debido a su coloración. Después de realizar experiencias piloto con aproximadamente 50 animales se logró una correcta inyección intravascular con un índice de mortalidad de aproximadamente 10% dependiendo de la edad del animal y de la exactitud de las maniobras quirúrgicas.

Durante las experiencias piloto se comprobó también la producción accidental de zonas isquémicas que impedían la visualización del material inyectado en algunas zonas de la piel. Esto se evitó inyectando a los animales en un ambiente de aproximadamente 35°C.

Se verificó asimismo durante las experiencias piloto que

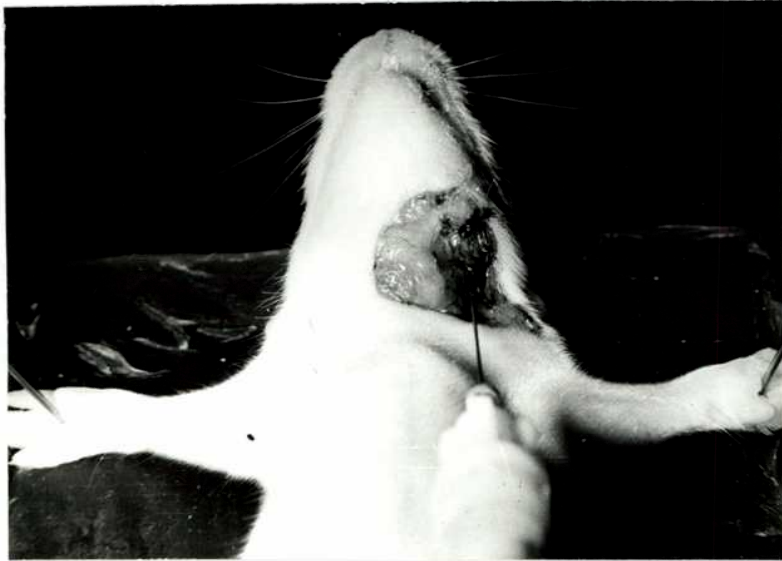


Fig.1: Inyección a cielo abierto de peroxidasa en la jugular externa izquierda de la rata neonata.

el llenado vascular podía ser posteriormente modificado por el método de obtención de las piezas. Tanto la obtención de las piezas por cauterización como por congelación rápida con nitrógeno líquido provocaron alteraciones en el llenado de los capilares más que por simple sección a bisturí en un plano profundo respecto a la capilarización en estudio.

### Técnica de irradiación

La irradiación se realizó en los laboratorios y con el equipo de la Comisión Nacional de Energía Atómica. La fuente de radiación fue el equipo radioterapéutico 250/25 Philips (Fig. 2) operado a una energía de 220 kV y 14 mA con una intensidad de dosis de 25 Gy/min. (1 Gy=100 rads). Se usó un filtro de 0,25 mm de Cobre + 1,0 mm Al. Estas condiciones fijan la energía efectiva de irradiación en 78 KeV. La distancia foco-objeto fue de 23,5 cm. Por medio de una ventana en un blindaje adecuado de plomo, se irradió una zona de 0,5 por 1 cm<sup>2</sup> de la mejilla izquierda de ratas Wistar de 5-7 días de edad con una dosis única de 8,15,60 ó 120 Gy de rayos X.

Se immobilizó cada animal con cinta adhesiva de celulosa y se fijó la cabeza a una cuña de lucite construida con una angulación que permite que la zona de la mejilla a irradiar quede ubicada en forma perpendicular al haz de rayos X (Fig. 3). El sistema de irradiación diseñado permitió exponer simultáneamente a 5 animales. El animal sujeto a la cuña se fijó debajo de una plancha de plomo de 3 mm de espesor (Fig. 4). La plancha de plomo tiene 6 ventanas dispuestas radialmente, 5 de las cuales per-

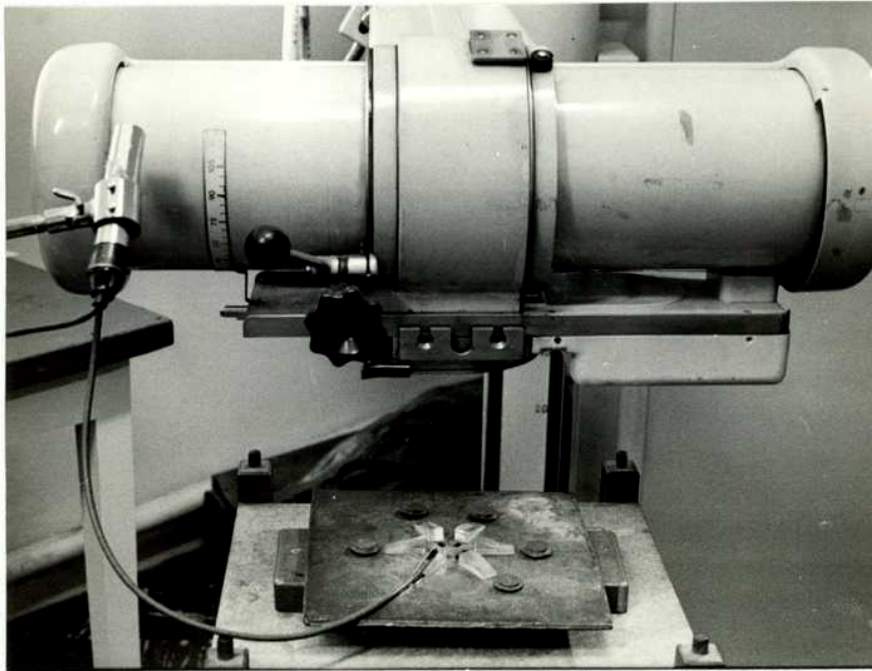


Fig.2:Fuente de radiación:equipo radioterapéutico 250/25  
Philips.



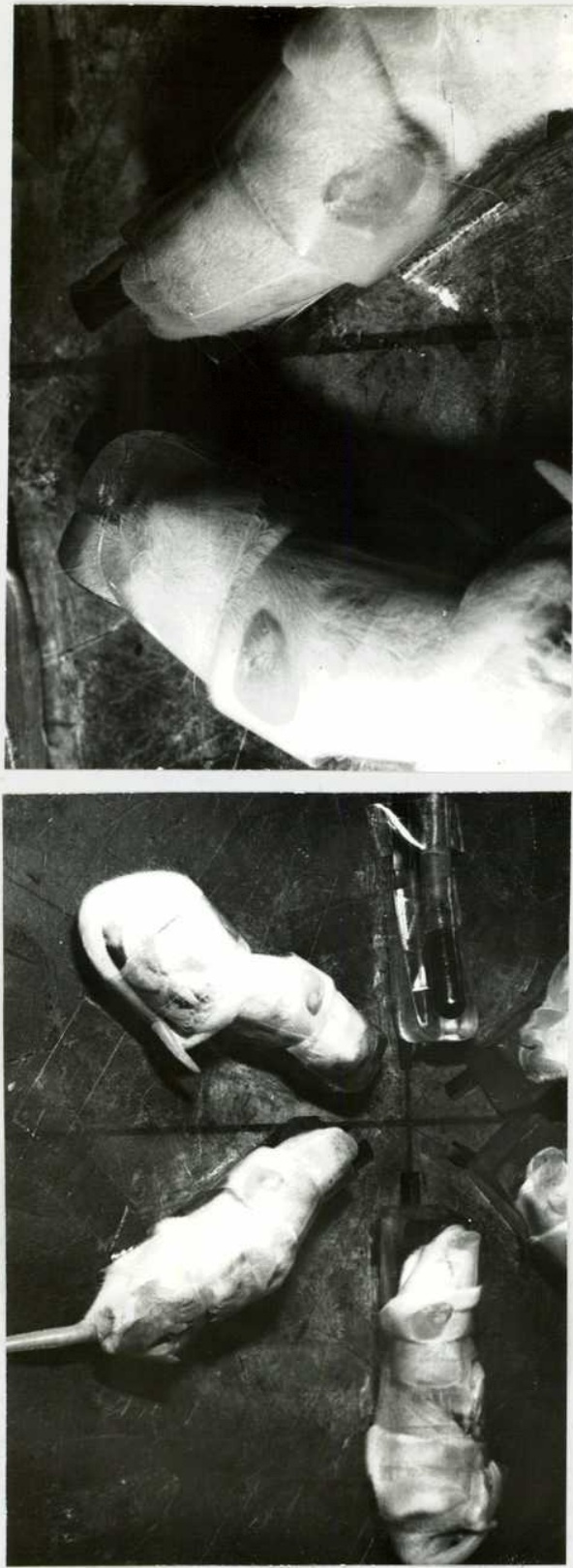


Fig. 4: Animales inmobilizados con cinta adhesiva de celulosa con la cabeza fijada a una cuña de lucite, colocados debajo de una plancha de plomo de 3mm de espesor que permite blindar la zona que no se desea irradiar.

miten exponer las mejillas manteniendo el resto del animal blindado (Fig. 5). La ventana restante aloja la Cámara de Ionización tipo Normal del dosímetro P.T.W.Simplex. La Cámara de Ionización integra la dosis entregada durante la exposición.

### Técnica de inyección intravascular

Con la finalidad de analizar las alteraciones vasculares producidas por las distintas dosis en función del tiempo post-irradiación, de cada grupo dosis se inyectaron animales a las 3 horas, 1 día, 3 días y 6 días después de la exposición. Se realizó la inyección intravascular de peroxidasa en la jugular externa izquierda. En cada experiencia igual número de animales no irradiados de la misma camada fueron igualmente inyectados como controles. Los animales se anestesiaron con 0,006ml/gr de peso de una solución de 14 ml de agua destilada, 4ml de alcohol 96% y 100 mg de pentobarbital sódico. Posteriormente se realizó la inyección intravascular de 0,0045 ml/gr de peso de una solución de 0,364 ml de agua destilada, 0,0018 gr de peroxidasa VI (Sigma) y 0,0033 gr de ClNa. Manteniendo la aguja en su lugar para evitar hemorragia o extravasación del material inyectado se permitió que éste circulara durante tiempos variables de 1', 3', 5', 10' y 20' en experiencias piloto. Posteriormente se seleccionó el tiempo de 5' para el trabajo experimental por ser éste un tiempo que permite visualizar los capilares llenos de peroxidasa y macrófagos que han fagocitado la peroxidasa permeabilizada en cantidades posibles de evaluar con exactitud.





Fig.5 a: Cinco animales sujetos a la plancha de plomo que tiene 6 ventanas dispuestas radialmente, 5 de las cuales permiten exponer las mejillas al haz de Rayos X manteniendo el resto del animal blindado. La ventana restante aloja la Cámara de Ionización que integra la dosis entregada durante la exposición.

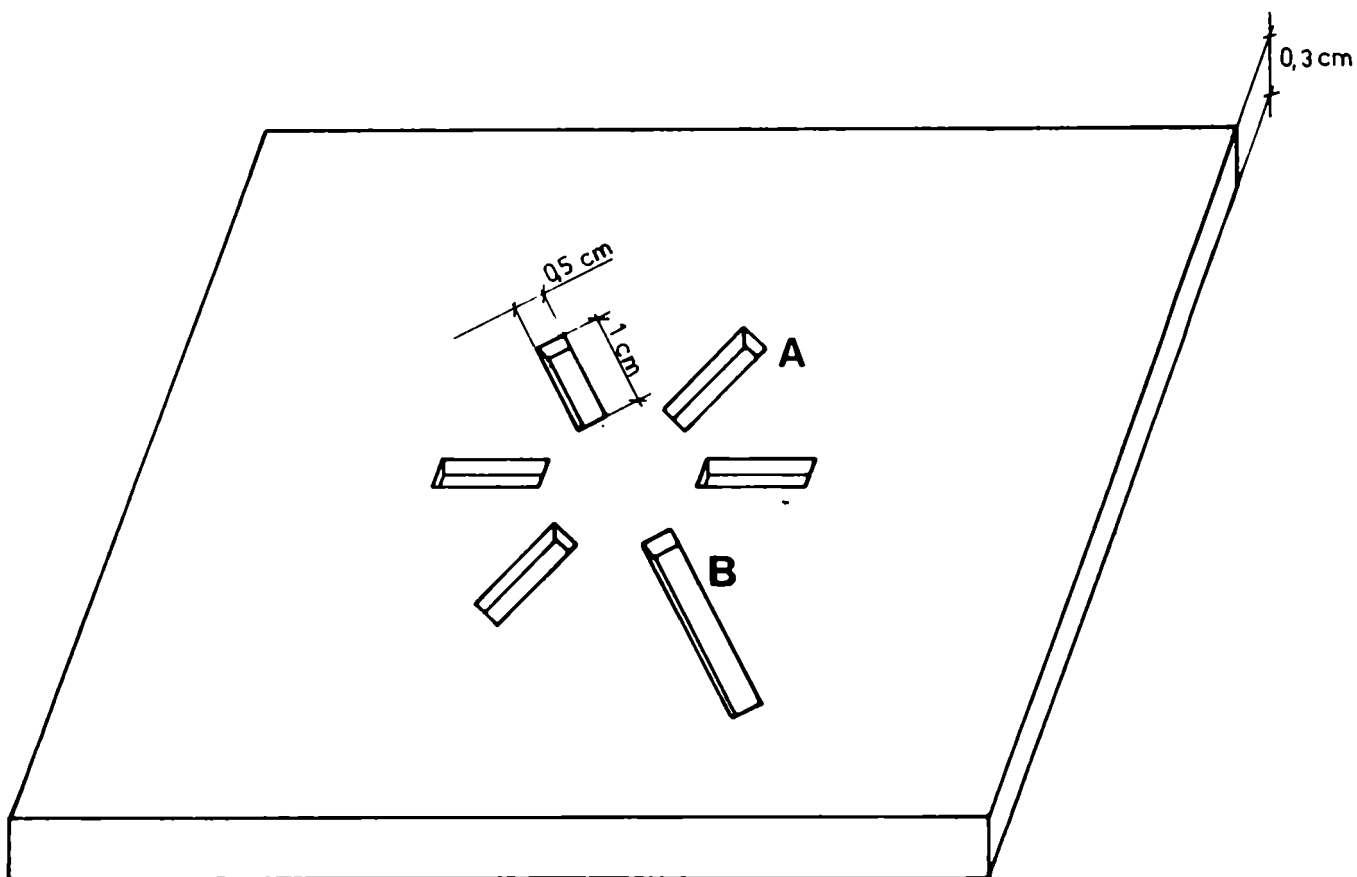


Fig.5 b:Esquematzación del blindaje de plomo utilizado para la irradiación simultánea de la mejilla izquierda de 5 ratas neonatas visto del lado que se expone al haz de Rayos X.A:ventana en el blindaje que permite la exposición de la mejilla al haz de Rayos X,B:ventana en el blindaje que aloja al dosímetro.

Después de un tiempo de circulación de 5' se procedió a la obtención de la pieza de la mejilla mediante una incisión intra-bucal rápida y a su inmediata fijación en 2% glutaraldehído, 1% paraformaldehído, 1% sucrosa, 0,02%  $Cl_2Ca$ , 0,067 M Buffer Cacodilato pH 7,6 durante 12 horas. A continuación se realizó un lavado de 1 hora en Buffer Cacodilato pH 7,6 y luego se procesó el material para su observación a nivel óptico. En algunas experiencias se apartó material para su procesamiento para microscopía electrónica. Animales irradiados no inyectados se procesaron simultáneamente para la detección de actividad peroxidasa positiva endógena.

### Microscopía óptica

Se efectuaron cortes por congelación de 70 micrones de espesores en una platina de congelación a termoelementos. La regularidad de éste espesor que posteriormente puede influenciar la obtención de parámetros cuantitativos, se comprobó mediante una inclusión en parafina de bloques que contenían 5-10 cortes de congelación superpuestos. Estos bloques de parafina fueron luego cortados en forma transversal de modo que las preparaciones histológicas mostraran el espesor de los cortes. Este espesor fue medido con un ocular micrométrico, registrándose variaciones no superiores a 2 micrones.

Los cortes de congelación se flotaron en Buffer Tris y luego se reveló la peroxidasa mediante incubación en 3-3' Diaminobencidina(0,01 gr DAB,20ml de Buffer Tris ClH pH 7,6 y 0,035ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 vol.) a temperatura ambiente durante 30' según la técnica de Graham y Karnovsky(59).

Posteriormente se procedió a la deshidratación en alcoholes, aclarado con xilol-acatato de butilo en partes iguales, montado con bálsamo y coloración con hematoxilina-eosina en algunos casos.

### Microscopía electrónica

El análisis ultraestructural se hizo para estudiar el pasaje de la peroxidasa a través de los endotelios irradiados y correlacionar los datos morfológicos y funcionales cuantitativos a nivel óptico con daños puntuales radioinducidos en las paredes vasculares.

Para ello se realizaron experiencias piloto para ajustar el método, las cuales consistieron en inyectar ratas recién nacidas en la forma antes descrita y fijar "in situ" el diafragma para luego retirarlo y procesarlo para su observación en el microscopio electrónico. Se eligió éste músculo por ser éste el material usado en los trabajos donde esta metodología fue descrita para estudios de transporte endotelial(58,67). Solo después de observar el llenado vascular con peroxidasa y su transporte en vesículas pinocitósicas en microfotografías de nitidez semejante al del trabajo mencionado se pasó al procesado de la piel de la mejilla. En éste último material se tuvieron

dificultades iniciales debidas a la distribución y menor número de vasos pequeños, las cuales se subsanaron con un adecuado tallado y orientación de los tacos.

El material, obtenido en forma similar a la descripta para microscopía óptica, fue inmediatamente mojado en fijador y recortado en trozos de 2mm por 2mm bajo lupa. Luego se colocó en 2% glutaraldehído, 1% paraformaldehído, 1% sucrosa, 0,02%  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  en 0,067M Buffer Cacodilato pH 7,6 durante 2 horas a 4°C. A continuación se lavó 2 veces en Buffer Fosfato 0,1M pH 7,4 durante 40' agitando periódicamente. Se incubó el material durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución de 0,01 gr 3-3' DAB, 20ml de Buffer TRis ClH pH 7,6 y 0,235ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  20vol. La post-fijación se realizó en 1% de osmio en Buffer Fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora. Se deshidrató en alcoholes de grado creciente. Luego se colocó el material en óxido de propileno durante 1,5 horas y posteriormente en óxido de propileno-Epón 1:1 2 horas. Se transfirió luego el material a Epón y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30' y a 4°C durante 12 horas. Se incluyó el material en Epón en tacos chatos para facilitar su posterior orientación y se dejó en estufa a 70°C durante 48 horas. Se realizaron cortes finos en un 11800 LKB Pyramitome en sentido paralelo a la superficie epitelial para seleccionar la zona del taco a tallar para ultramicrotomía. Los cortes ultrafinos de aproximadamente 500 Å de espesor se realizaron en el ultramicrotomo LKB 8800. En todos los casos se utilizaron navajas de vidrio. Los cortes fueron montados sobre grillas de cobre sin membrana. Se contrastó en la forma conven-

cional con acetato de uranilo-nitrato de plomo y se observaron y fotografiaron las grillas en un microscopio electrónico de transmisión Philips 300.

Métodos de evaluación cuantitativa en las preparaciones de microscopía óptica.

Los cortes se proyectaron en un procesador electrónico de imágenes Kontron Messgerate MOP/AM 03, Zeiss, perteneciente al Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica, a un aumento total de 400X para la evaluación estereológica, sobre las proyecciones, del volumen y longitud vascular. El sistema MOP opera por un principio magnético. La medición se efectúa sobre una platina sobre la cual se coloca la proyección del preparado a medir. Se recorren los contornos de la zona a medir con un cursor. Este cursor escribe cuando se le aplica una presión normal; al aplicarle una presión adicional comienza el proceso de medición que se interrumpe al cesar la presión. El área de medición activa de la platina contiene alambres de acero magnético dispuestos a intervalos regulares en dirección de los ejes x e y. La grilla metálica genera, de ésta forma, un campo magnético. Los alambres suministran pulsos en dirección de los ejes x e y que viajan a velocidad constante. Cuando los pulsos magnéticos son interceptados por el cursor se establece un conteo exacto de pulsos. Este conteo es transformado en una distancia o un punto sobre el eje de las coordenadas en pocos microsegundos por un microprocesador.

De esta manera es posible establecer perímetros, áreas y otras magnitudes geométricas rápidamente y con exactitud. El sistema está calibrado para que, al recorrer los perímetros de las zonas a medir con el cursor usando el programa correspondiente, aparezcan en el indicador digital correspondiente los valores absolutos en mm y  $\text{mm}^2$  de los perímetros y las áreas respectivamente (Fig. 6)

Debido a que la irradiación causa atrofia de la dermis las medidas se realizaron sobre todos los vasos sanguíneos visibles a una determinada profundidad de foco en un área de tejido que corresponde, en ancho, a 500  $\mu\text{m}$  de la sección de la superficie epidérmica y en altura al espesor total de la dermis claramente delimitado por la unión dermo-epidérmica y el primer plano muscular (Fig. 7). El diámetro de los vasos sanguíneos se estimó superponiendo las proyecciones de los cortes con una grilla de líneas paralelas y midiendo los calibres de aquellos vasos que intersectaban las líneas.

La cantidad de células macrofágicas que incorporaron peroxidasa se evaluó por medio de conteo directo del total de células (de 15-30  $\mu\text{m}$  de diámetro) peroxidasa positivas en un área de 0,25  $\text{mm}^2$  de cada corte, con ayuda de una grilla incorporada al ocular de un microscopio óptico.

La tinción intersticial se evaluó microfotométricamente. La microespectrofotometría sigue, en líneas generales, los mismos principios de la espectrofotometría. Un espectrofotómetro está compuesto por una fuente de luz, un monocromador, una cubeta para la solución a medir y un detector de intensidad luminosa. En un microespectrofotómetro, la cubeta es reempla-

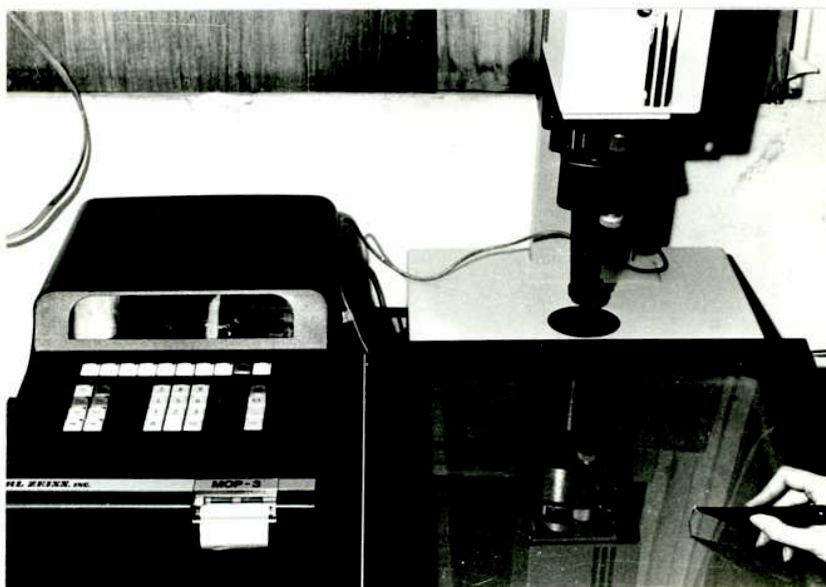
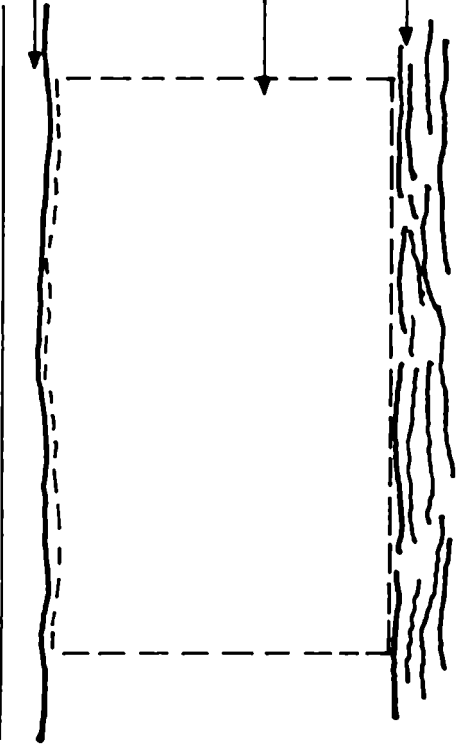


Fig.6:Procesador electrónico de imágenes Kontron Messgerate MOP/AM 03,Zeiss,empleado para la evaluación estereológica,sobre las proyecciones de los cortes de tejido, de volumen y longitud vascular.



Piel normal

500  $\mu\text{m}$



epidermis

dermis

plano  
muscular

Piel irradiada

500  $\mu\text{m}$

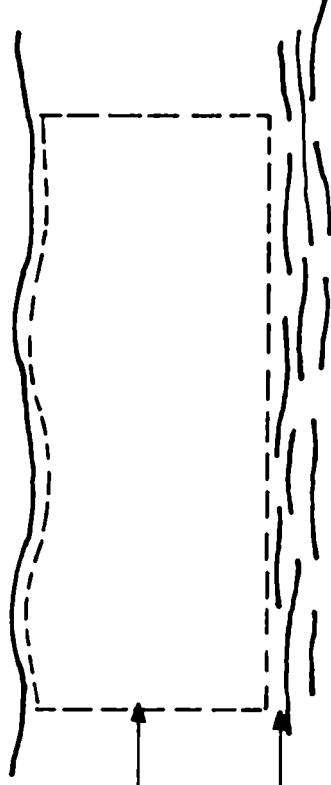


Fig. 7: Esquemmatización de la delimitación de las áreas en las que se realizó la evaluación de los parámetros vasculares.

zada por un microscopio y la fotometría es realizada sobre la imagen aumentada del preparado histológico. Las medidas del presente trabajo se realizaron en un Cytoscan marca Zeiss (Fig. 8) que permite la realización de barridos automáticos unidireccionales previamente programados de la reacción histoquímica en la dermis. El microfotómetro integra en forma gráfica las densidades ópticas a lo largo del área barrida. La actividad enzimática total (TEA), se obtiene como el valor integrado o el área total bajo la curva. La actividad enzimática media se obtiene dividiendo el TEA por la longitud del barrido. Este es el valor que presentamos y representa la densidad promedio de la reacción enzimática en cada punto del tejido. La validez de la microfotometría para medir la cantidad de producto final de 3-3' DAB oxidada ha sido previamente demostrada (76). Se tomaron 10 medidas a 480nm usando un haz luminoso de 23,4  $\mu\text{m}$  de diámetro en el tejido conectivo subepitelial, evitando estructuras vasculares, folículos pilosos y células macrofágicas peroxidasa positivas. Los resultados de la evaluación de células macrofágicas peroxidasa positivas y la tinción intersticial debida a la peroxidasa permeabilizada de los vasos sanguíneos fueron considerados como índices de permeabilidad capilar.

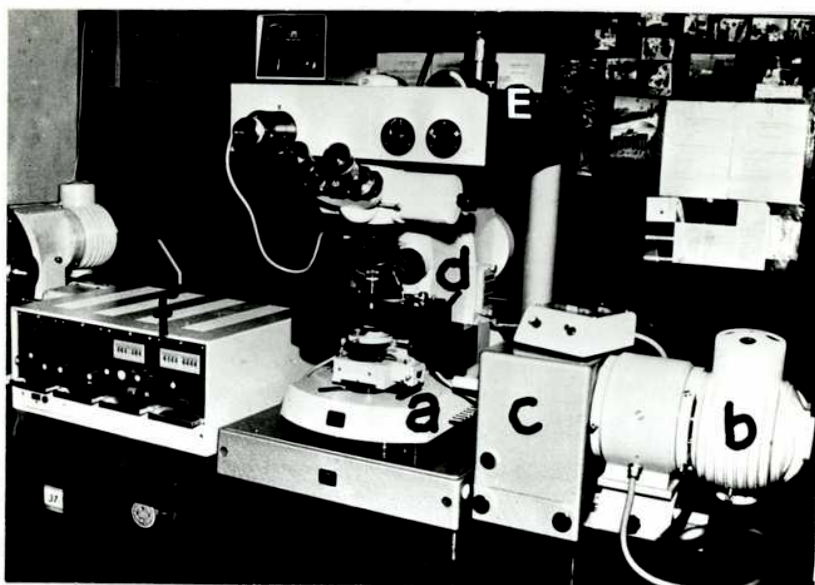


Fig.8:Cytoscan marca Zeiss con el cual se realizó la evaluación microfotométrica de la tinción intersticial peroxidasa-positiva, índice de permeabilidad capilar(a y d:base y estatativo del microscopio;c:monocromador;e:fotomultiplicador; f:unidad de control de alto voltaje,avance de la platina y lectura digital de los valores fotométricos).

## RESULTADOS

Desde el punto de vista macroscópico la lesión por radiación se hace evidente en los animales irradiados con dosis superiores a 15 Gy. En estos animales a partir de los 2 días post-irradiación comienza a verse una zona eritematosa en el área irradiada. A partir de los 3 ó 4 días de edad el crecimiento del pelo en la cabeza se hace ostensible por el cambio de coloración. En los animales irradiados comienza a notarse en ese momento la falta de crecimiento piloso en la zona de la lesión lo que la hace aún más evidente macroscópicamente (Fig. 9). Estos cambios no son visibles en los animales irradiados con dosis menores en los cuales la obtención de la pieza para su estudio histológico e histoquímico se hace en base a los reparos anatómicos elegidos previamente para determinar el área a irradiar.

La técnica de inyección de peroxidasa por vía intravenosa usada para estudios de función y morfología vascular resultó altamente sensible ya que permite detectar con precisión pequeñas cantidades de enzima.

La pequeña cantidad de peroxidasa inyectada por vía intravenosa se mezcla inmediatamente con el plasma circulante. Después de la detección de la actividad enzimática en cortes gruesos de tejido, los vasos sanguíneos se ven llenos de diaminobenzidina polimerizada en cantidades que aumentan con el tiempo de incubación. Esto permite la visualización de todos los vasos funcionantes, incluyendo los capilares. Más aún, como parte de la peroxidasa inyectada permea el endotelio en cantidades que

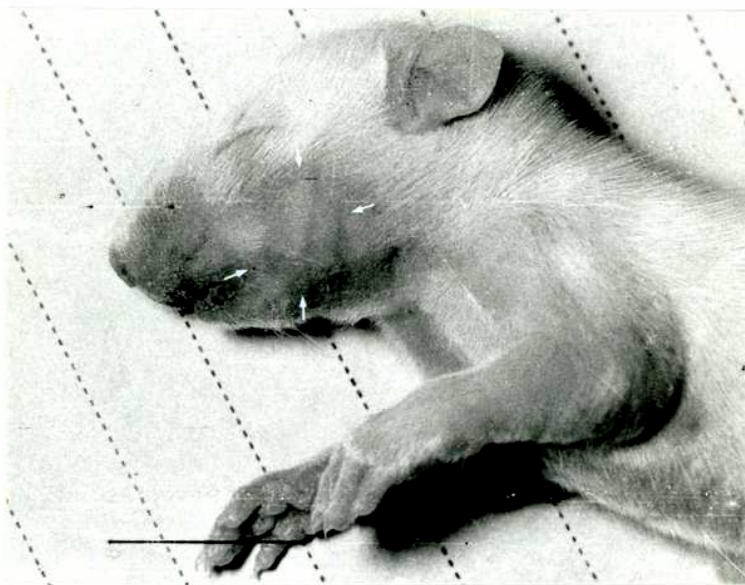


Fig.9:Lesión macroscópica radioinducida en la que se hace evidente la falta de crecimiento piloso en la zona de la mejilla que ha sido expuesta al haz de Rayos X. En este caso particular la dosis fue de 60 Gy y el tiempo post-irradiación de 3 días.

aumentan con el tiempo post-inyección, pasa al tejido conectivo perivascular y es fagocitada por macrófagos se puede obtener información referente a cambios en la permeabilidad capilar de los mismos cortes de tejido mediante el conteo de estas células fagocíticas.

La microvasculatura de la piel normal de la rata está compuesta por un conjunto de capilares dispuestos en sentido perpendicular a la superficie epidérmica (Fig.10). Este patrón vascular se ve marcadamente alterado por la irradiación, con desarrollo, en pocos días, de vasodilatación y telangiectasia (Fig.11). Los parámetros que caracterizan estas alteraciones morfológicas revelan que el daño radioinducido es función de la dosis y el tiempo post-exposición.

La distribución en frecuencia de los calibres vasculares se modificó con un aumento de la frecuencia de los calibres mayores a expensas de los menores (Fig.12).

El volumen vascular expresado como porcentaje de volumen de dermis considerado para la evaluación aumenta progresivamente después de la irradiación con 60 y 120 Gy. Dosis de 8 y 15 Gy causaron una leve disminución en el volumen vascular relativo (Fig.13). Debido a que la irradiación causa una reducción en el espesor de la dermis (Fig.14) resultó de interés considerar los valores absolutos de volumen vascular disponibles para nutrir la piel después de la atrofia radioinducida de la dermis. La Fig.15 muestra los valores absolutos de volumen vascular de todo el espesor de dermis subyacente a 500  $\mu\text{m}$  lineales de epidermis en el corte histológico. El volumen vascular así expresado aumentó rápidamente después de la irradiación con 60

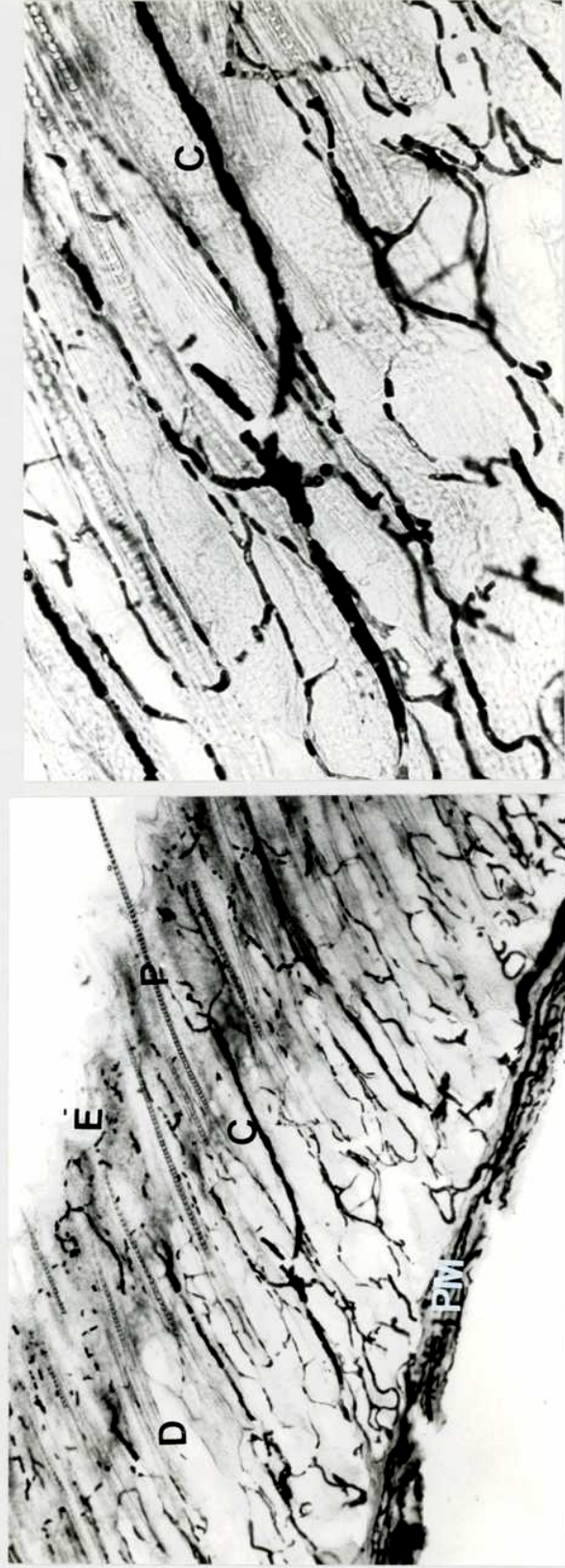


Fig.10:Piel normal de una rata neonata sacrificada 3' post-inyección intravascular de peroxidasa. Se observa la microvasculatura que está compuesta por un conjunto de capilares(C) dispuestos en sentido perpendicular a la superficie epidérmica(E). D:dermis, P:pelo, PM:primer plano muscular.(izquierda: x 70 , derecha: x 95 ).



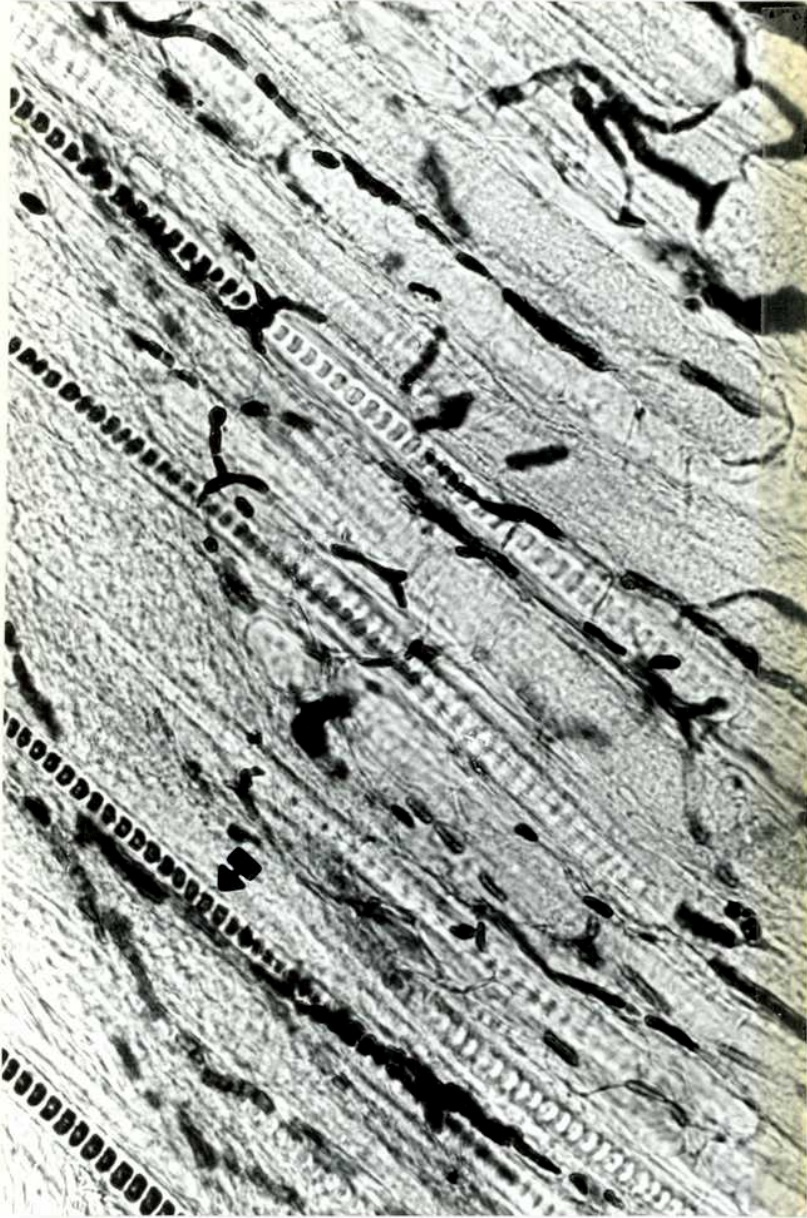


Fig.11:Vascularización de piel normal(arriba),3 días post-exposición a 60 Gy de Rayos X (centro) y 6 días post-exposición a 60 Gy de Rayos X(abajo).Se ve un desarrollo progresivo con el tiempo post-irradiación de vasodilatación,telangiectasia y tinción intersticial.La radiación provoca,asimismo,la pérdida de folículos pilosos, acantosis epitelial y atrofia de la dermis.Se ha marcado un pelo remanente como evidencia que las 3 fotografías fueron tomadas con el mismo aumento(x 180)



elidencis dne jae 3 totoglasia inelou romqqa con el wtsuo amwuto(x 180)



geamta .26 in amwuto  
'02' 92  
scion  
eo ca  
'3



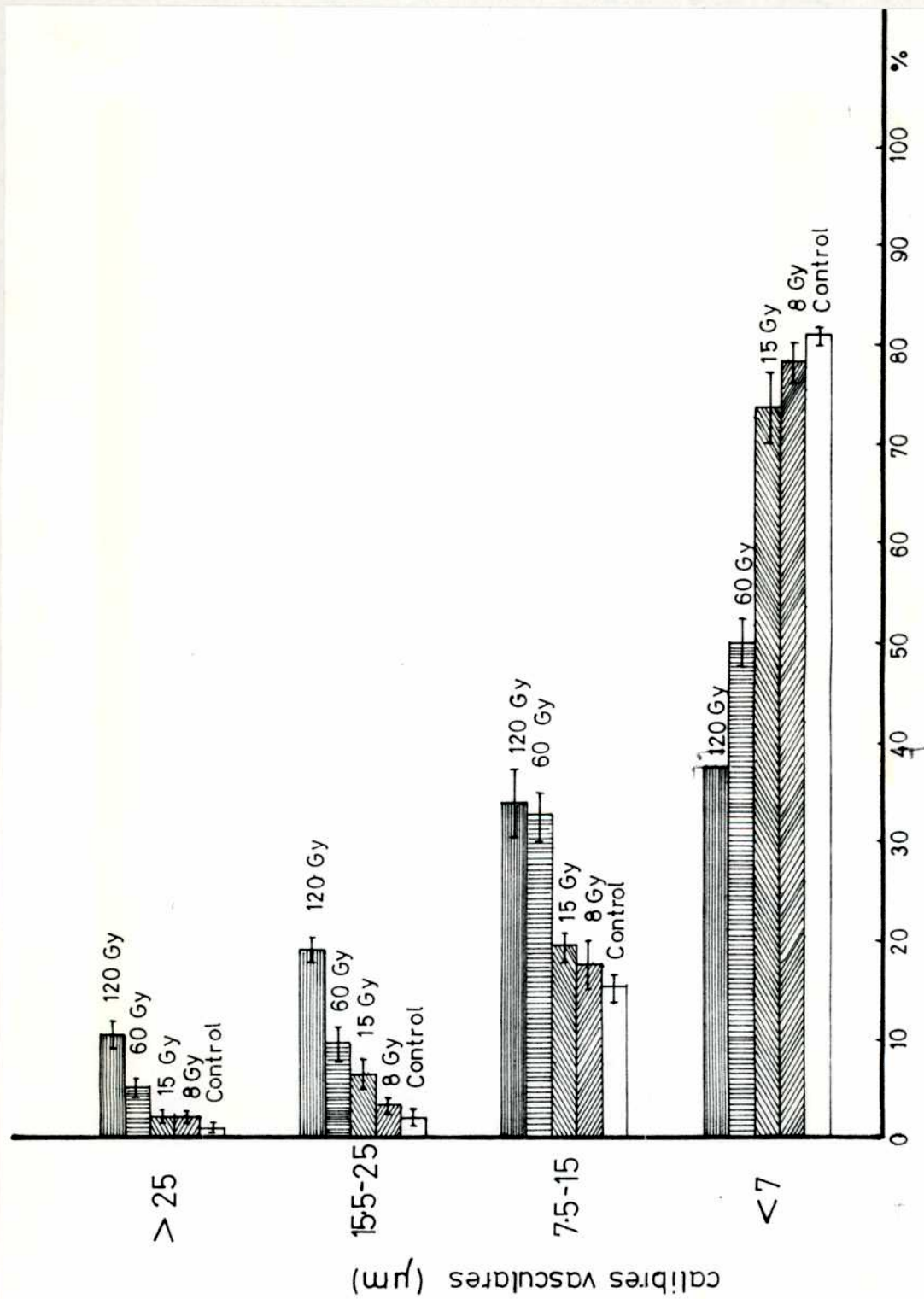


Fig.12:Histograma de frecuencias de calibres vasculares en piel normal

(control) e irradiada 6 días después de la exposición.

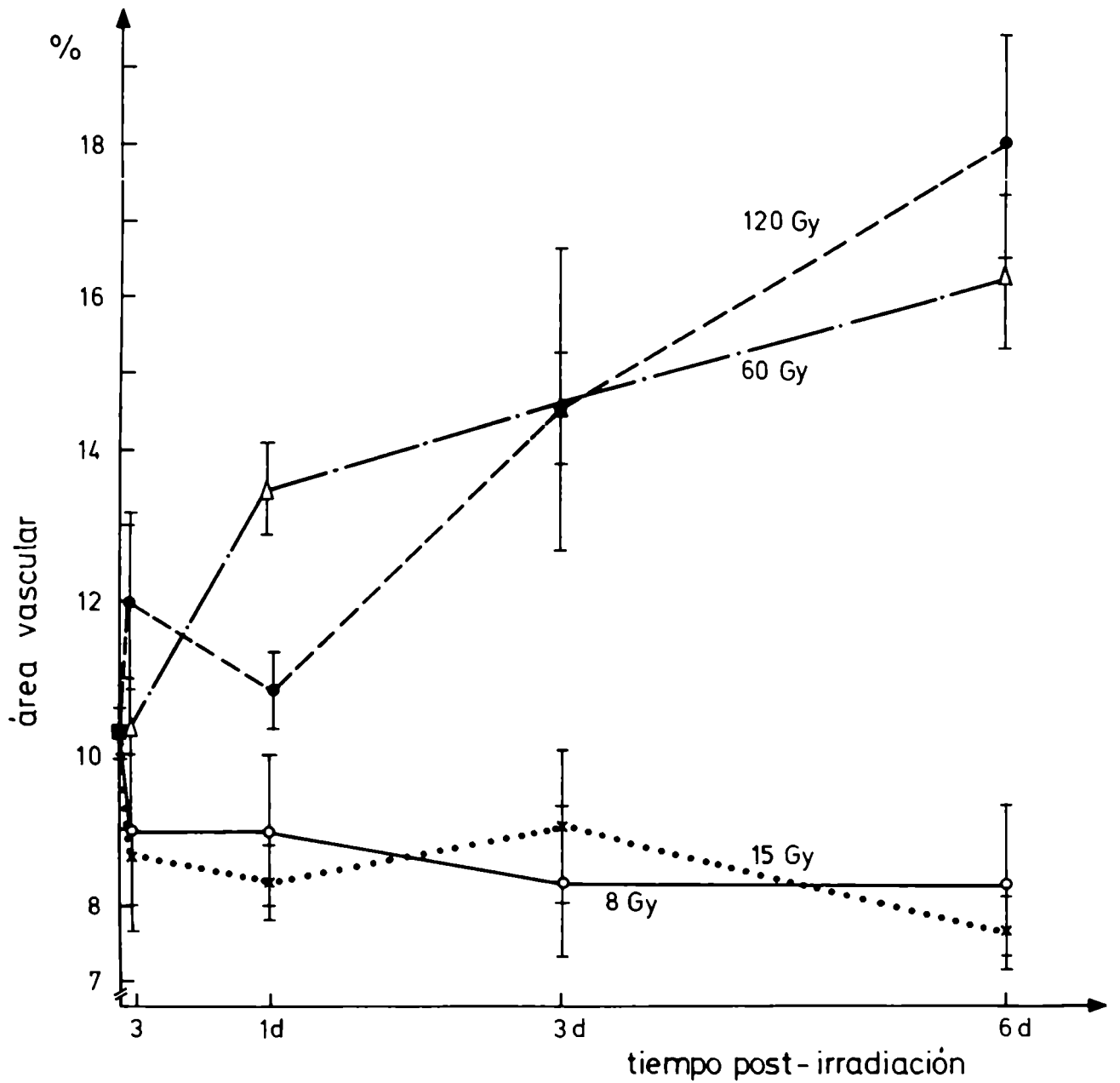


Fig.13: Volumen vascular relativo expresado en porcentaje del área de dermis ocupada por vasos sanguíneos en proyecciones de piel normal(■) e irradiada y graficada en función del tiempo post-exposición.



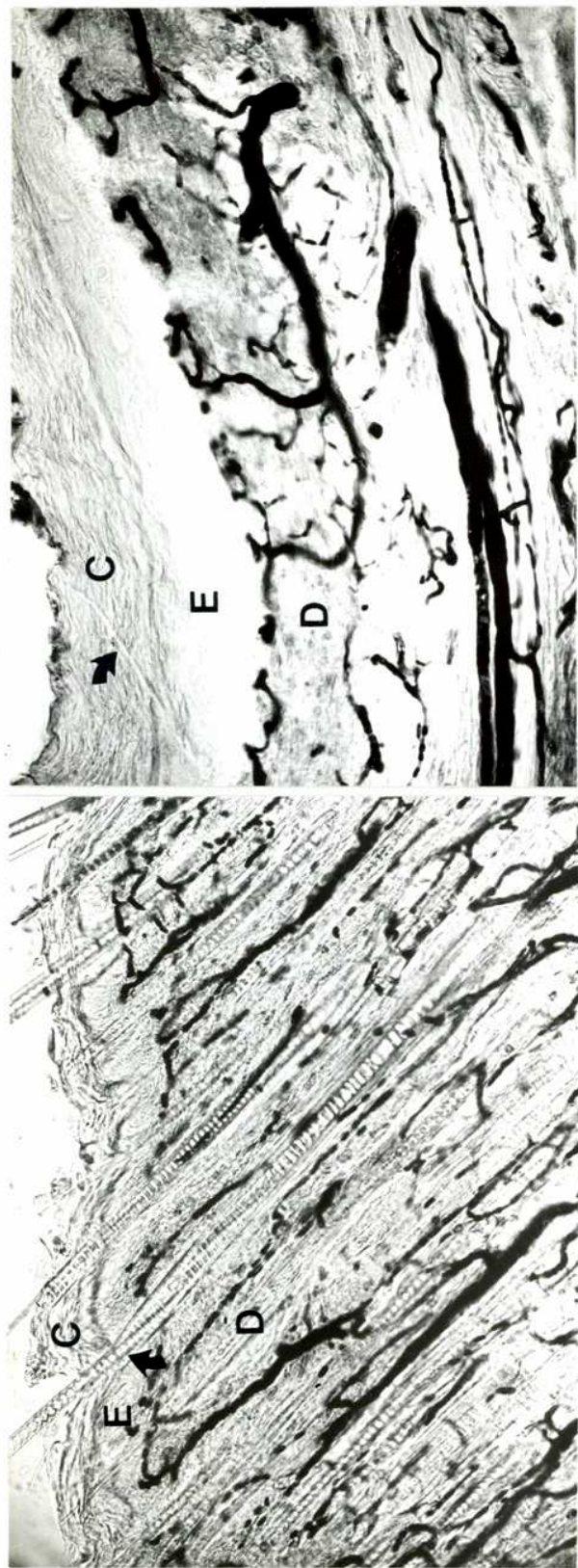


Fig.14:Piel de una rata neonata normal(izquierda) y de una rata neonata 6

días después de una irradiación local con 60 Gy de Rayos X(derecha)

ambas sacrificadas 5' después de una inyección intravascular de

peroxidasa.Se observa, en la piel irradiada, la atrofia de la dermis(D),

la acantosis del epitelio(E) y la hiperqueratosis evidenciada por

un aumento en el espesor de la capa córnea(C).Se ha marcado un pelo rema-

nente como evidencia que ambas fotos fueron tomadas con la misma mag-

nificación.(x 85 ).

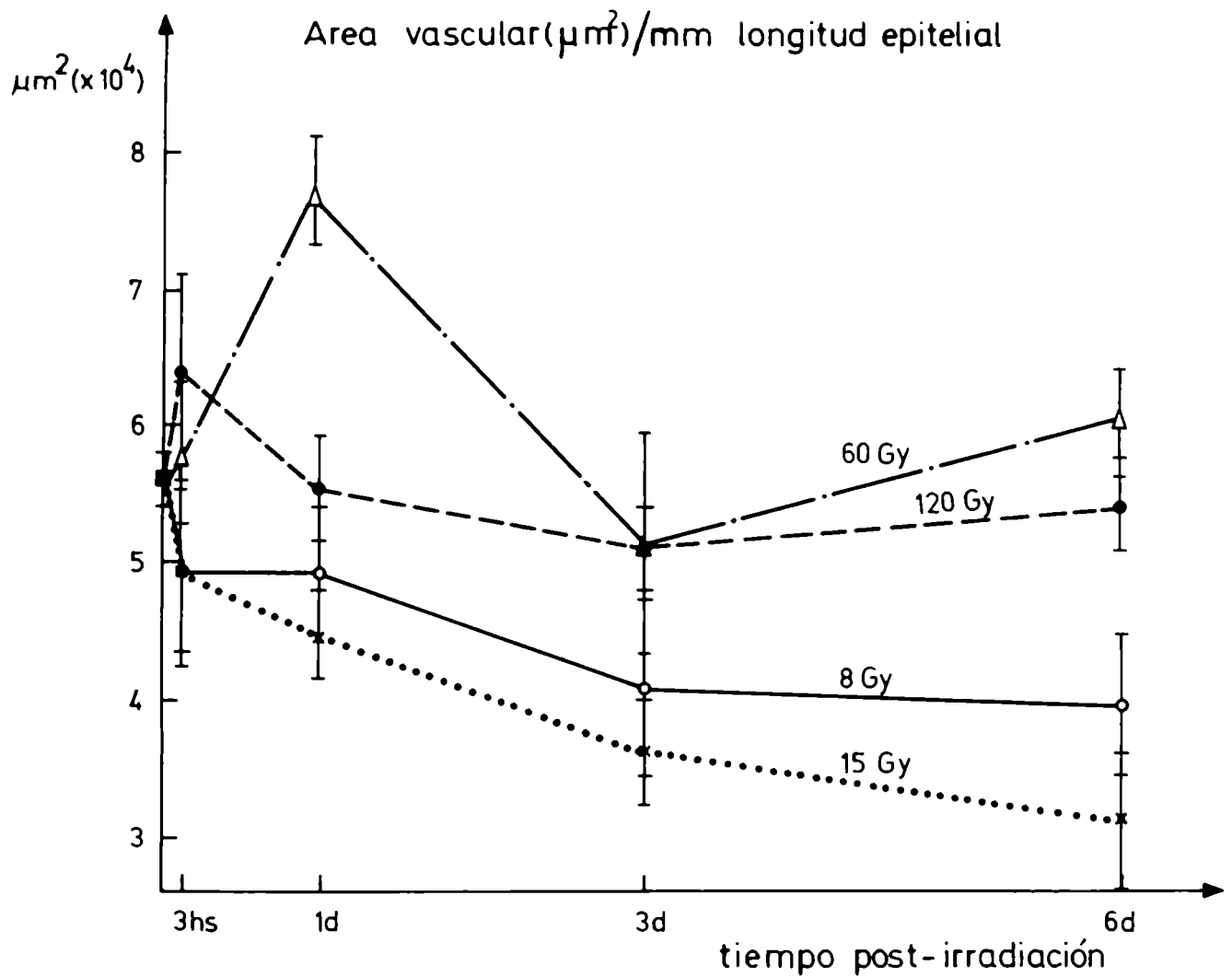


Fig.15: Volumen vascular, expresado en area ocupada por vasos sanguíneos en la dermis subyacente a 500  $\mu\text{m}$  lineales de epidermis en cortes histológicos de piel normal (■) e irradiada medida en función del tiempo post- exposición.

ó 120 Gy de Rayos X. Este efecto fue mayor con 60 Gy pero ocurrió más tempranamente con 120 Gy. Los valores luego tendieron a semejarse a los valores de los controles no irradiados. Dosis de 8 y 15 Gy indujeron una disminución en el volumen vascular que fue función del tiempo post-exposición.

La longitud vascular relativa y absoluta disminuyó con la dosis y el tiempo post-irradiación. El efecto fue mayor y ocurrió con menor tiempo de latencia después de la exposición a 120 Gy (Fig. 16 y 17).

El número de células que fagocitan la peroxidasa que permea el endotelio aumenta con el tiempo post-inyección para todos los tiempos de circulación de peroxidasa ensayados en las pruebas piloto (Fig. 18). En animales irradiados la incorporación de peroxidasa a células macrofágicas sufrió un marcado incremento lo cual sugiere un aumento en la permeabilidad capilar (Fig. 19). La diferencia entre la cantidad de células peroxidasa positivas en el tejido control y el irradiado después de un tiempo fijo de circulación de peroxidasa indicaron que existe un aumento radioinducido en la permeabilidad capilar 3 y 6 días después de la exposición a 15, 60 y 120 Gy de Rayos X (Fig. 20). La exposición a 8 Gy de Rayos X no indujo cambios significativos en la permeabilidad.

Se evaluó microfotométricamente la tinción en el tejido conectivo perivascular como evidencia adicional de alteraciones radioinducidas en la permeabilidad capilar del tejido 6 días después de la exposición a 120 Gy, condición en la cual la observación subjetiva en el microscopio óptico revela que la tinción intersticial es notablemente mayor (Fig. 21).

Longitud vascular ( $\mu\text{m}$ ) /  $\text{mm}^2$  de área de dermis

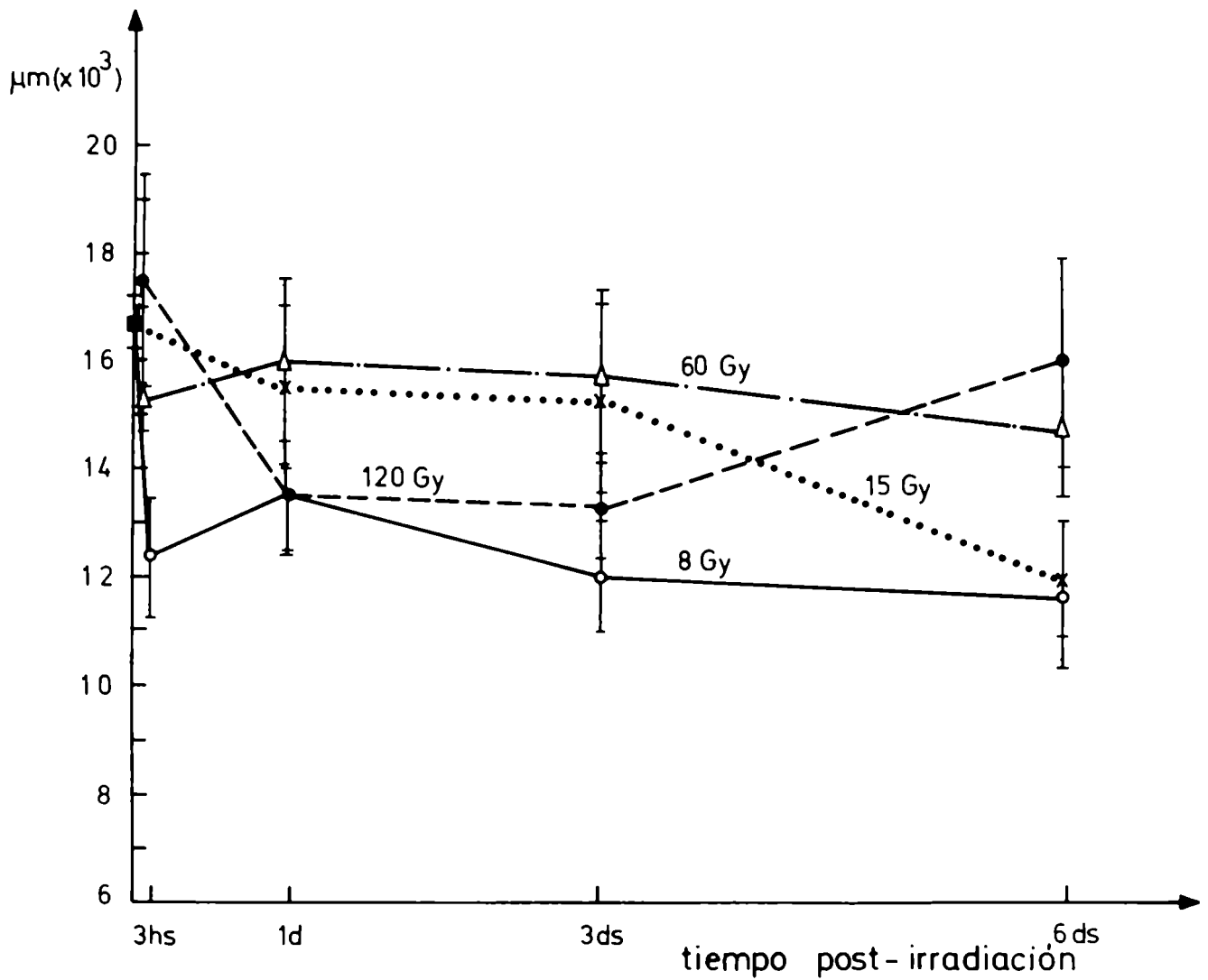


Fig.16: Longitud vascular expresada por  $\text{mm}^2$  de area de dermis de piel normal (■) e irradiada medida en función del tiempo post-exposición.

longitud vascular( $\mu\text{m}$ ) / mm longitud epitelial

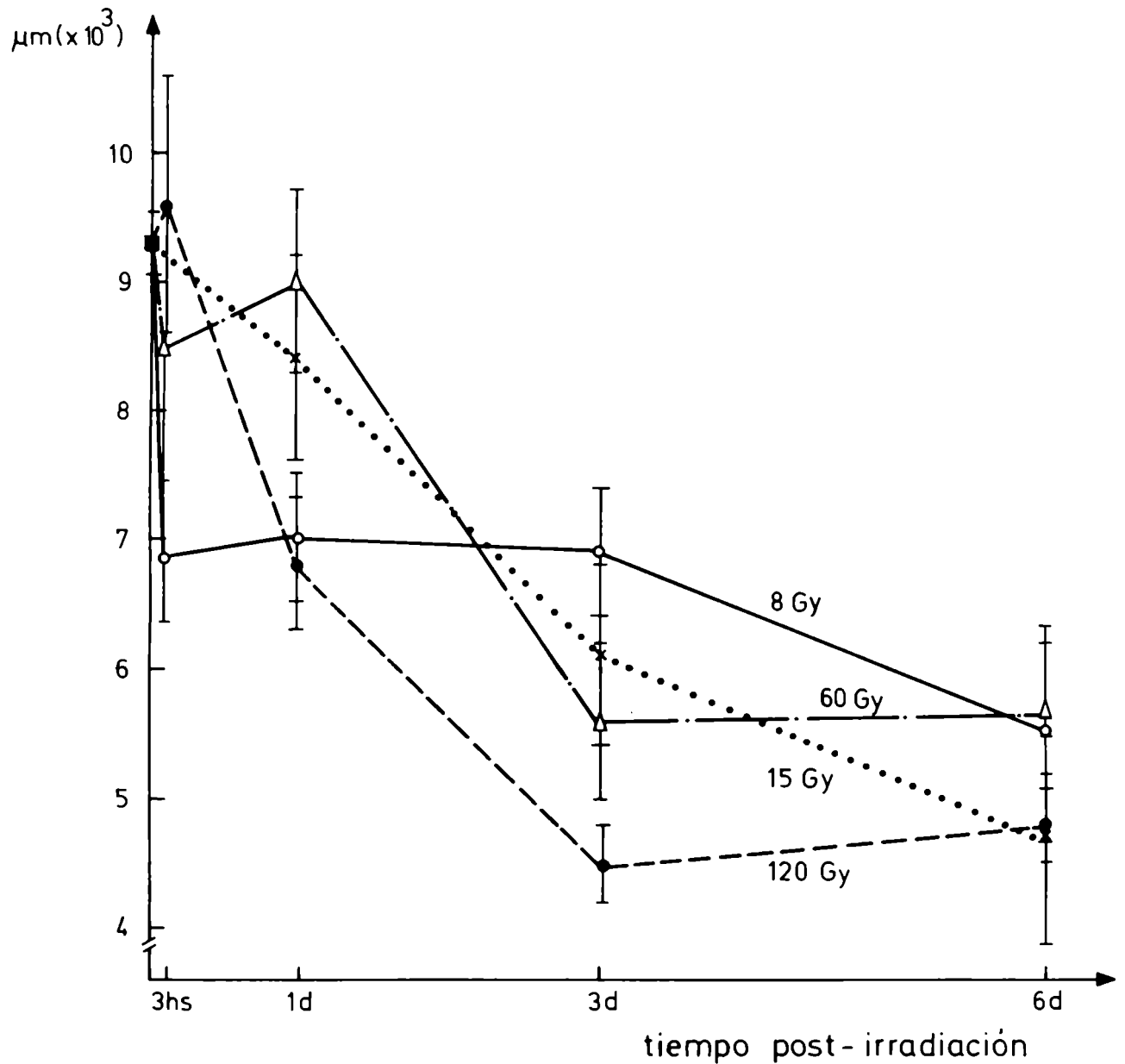


Fig.17: Longitud vascular medida en la dermis subyacente a 500  $\mu\text{m}$  lineales de epidermis en cortes histológicos de tejido normal ( $\blacksquare$ ) e irradiado en función del tiempo post-exposición.



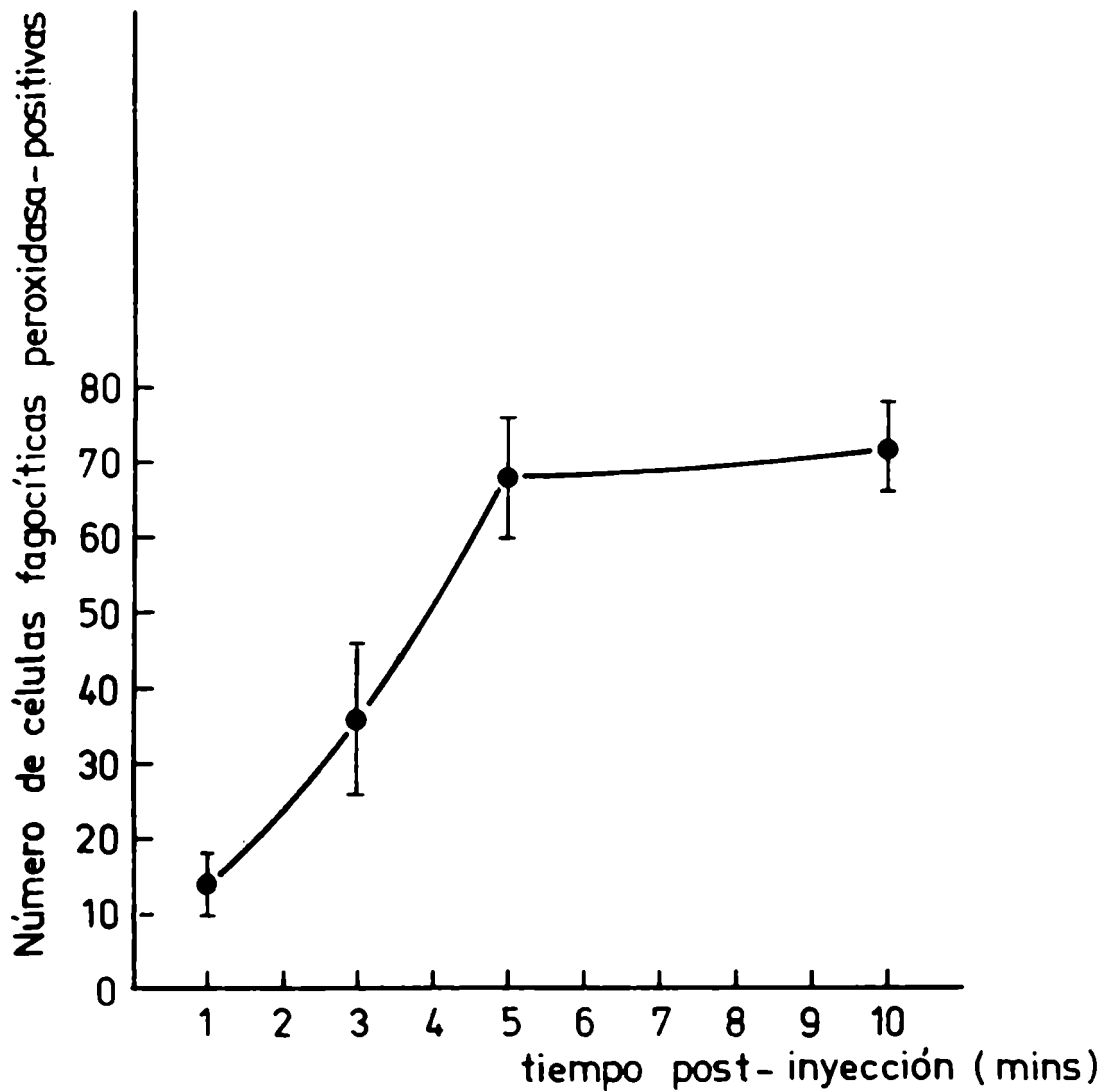


Fig.18: Número de células fagocíticas peroxidasa-positivas evaluadas en función del tiempo post-inyección intravascular de peroxidasa.

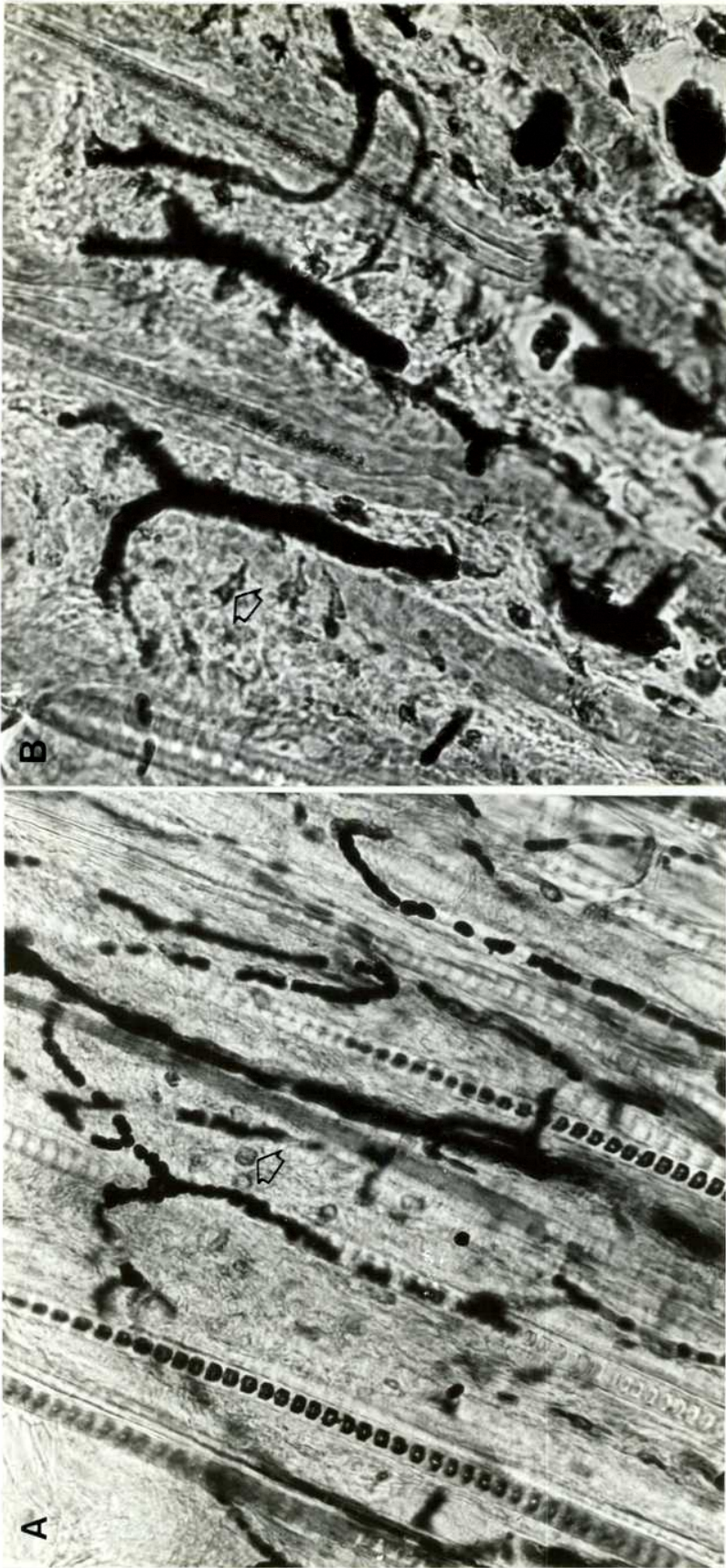


Fig.19: Células fagocíticas peroxidasa-positivas (flecha), 5 minutos después de una inyección intravascular de peroxidasa, en piel normal (a) y piel 3 días después de ser irradiada con 120 Gy de Rayos X (b), (x 180).

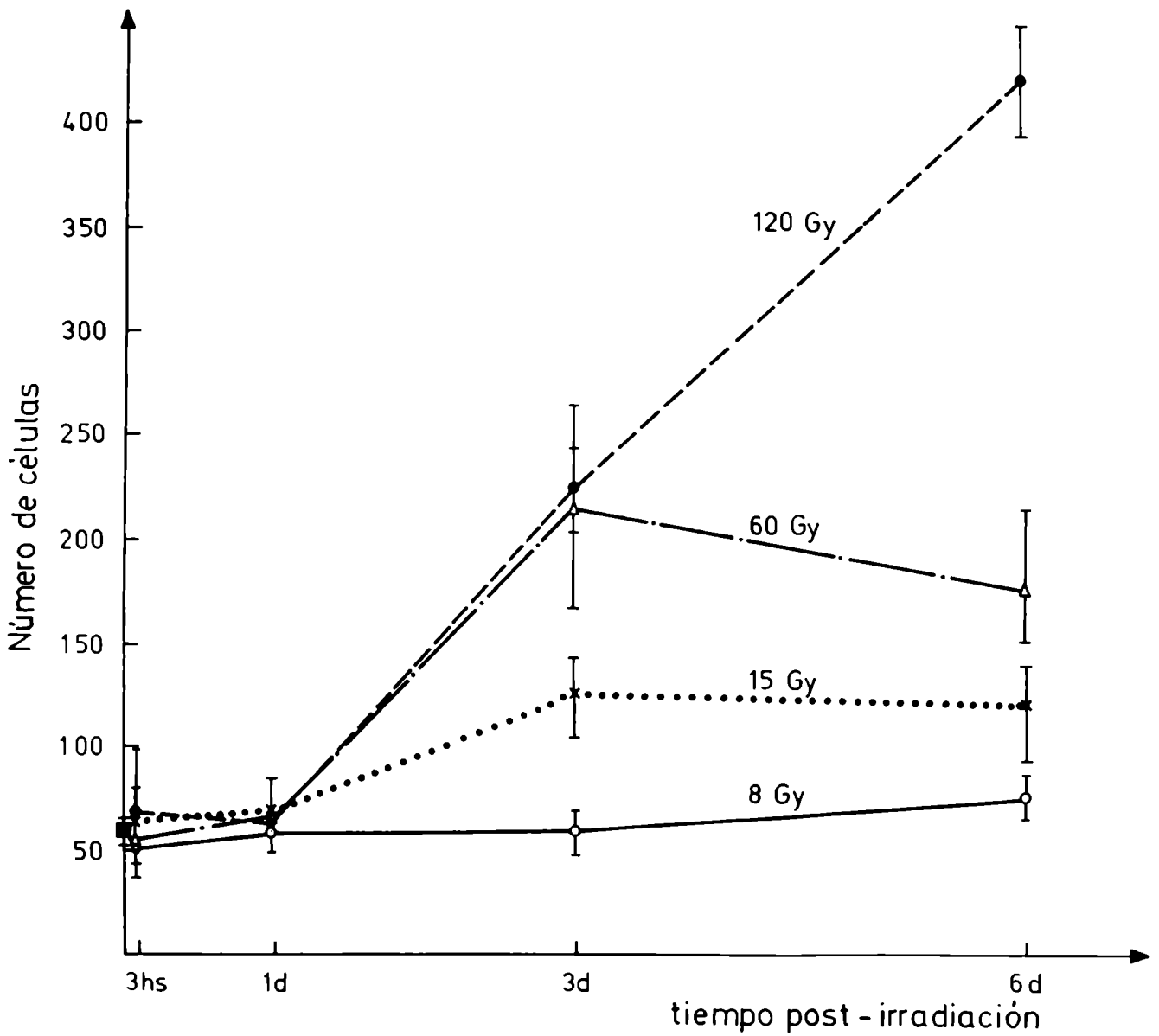


Fig.20: Número de células macrófágicas peroxidasa-positivas en  $0,25\text{mm}^2$  de dermis de piel normal (■) e irradiada medido en función del tiempo post-irradiación.

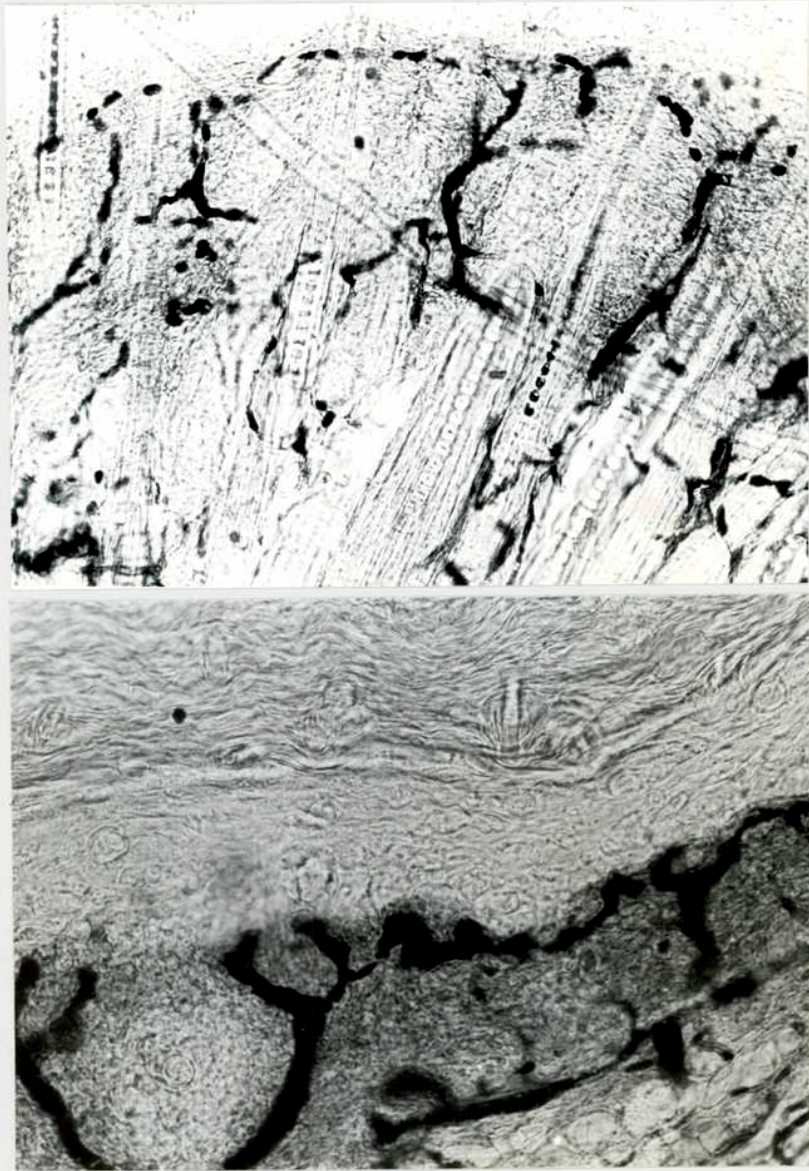


Fig.21:Piel de una rata neonata normal(arriba) y una rata neonata 6 días después de la exposición a 120 Gy de Rayos X(abajo) ambas sacrificadas 5' post-inyección intravascular de peroxidasa.Se observa un marcado aumento radioinducido de la tinción intersticial peroxidasa-positiva en el tejido conectivo perivascular,evidencia de una alteración en la permeabilidad vascular.  
( x 100)



Las lecturas microfotométricas revelan un aumento en la permeabilidad capilar medido en términos de la tinción del tejido conectivo:  $0,59 \pm 0,004$  unidades de densidad óptica para tejido irradiado y  $0,13 \pm 0,012$  para el control.

Los parámetros morfológicos anteriormente mencionados fueron evaluados en las mejillas de ratas localmente irradiadas y en animales controles. No obstante, se tomaron algunos especímenes de mejilla de animales irradiados incluyendo una porción del área irradiada y una porción del área adyacente de mejilla no irradiada para analizar el grado de correspondencia entre el área de incidencia de los Rayos X y la región de la microvasculatura afectada por la irradiación. La acantosis epidérmica se describe como un evento radioinducido que ocurre estrictamente en el área expuesta a la radiación ionizante(2) y fue usado como marcador de la zona expuesta a los Rayos X. El análisis de estos cortes de tejido mostró que los vasos sanguíneos afectados por la irradiación yacen exclusivamente en la trayectoria de los Rayos X. El área de transición que esperaba encontrarse lindando con la zona expuesta virtualmente no existía. Se verificó, en cambio, la presencia de una línea recta que coincide exactamente con el límite del área expuesta al haz de Rayos X que marca el límite entre la zona de vasos sanguíneos afectados por la radiación y la zona blindada (Fig. 22).

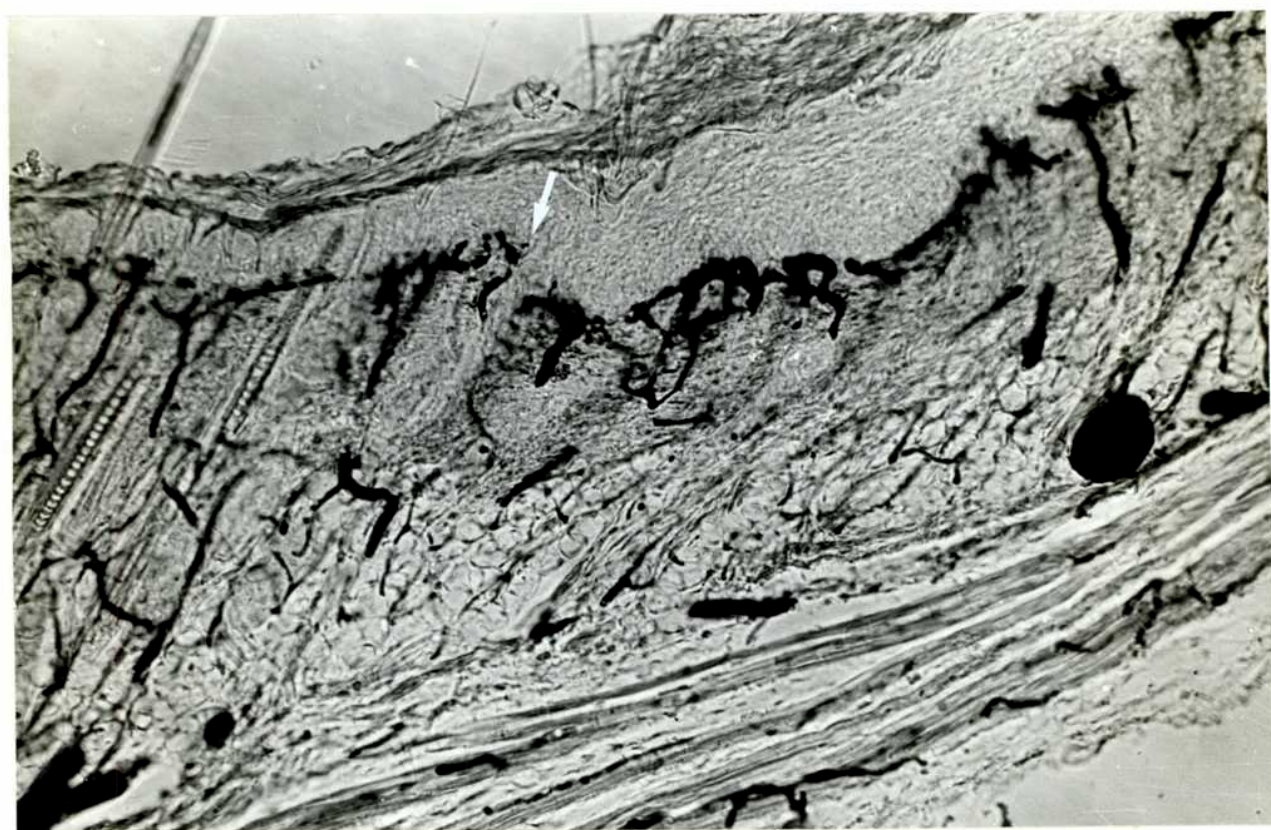


Fig.22:Un corte de piel de mejilla irradiada con 120 Gy de Rayos X 3 días después de la exposición, que incluye una zona de piel no irradiada. La acantosis epitelial se usó como marcador de la zona de incidencia del haz. El límite (flecha) entre la zona de vasos sanguíneos afectados por la irradiación y los normales coincide con el límite del área expuesta al haz de Rayos X. (x 95 ).

## Microscopía electrónica

Durante la etapa de ajuste de la técnica las observaciones se realizaron en músculo diafragmático, después de la inyección de peroxidasa por la vena jugular externa izquierda para reproducir lo más exactamente posible el método descrito por Williams y Wissig(67), quienes usaron este modelo para sus estudios de transporte endotelial. Se consideró ajustada la técnica cuando se obtuvieron imágenes a nivel de microscopía electrónica similares a las publicadas en el trabajo original.

El producto final de la reacción histoquímica peroxidasa-diaminobenzidina es osmeofílico, de modo que al ser post-fijado en solución de osmio se obtiene un producto electrónicamente denso que permite la localización, a nivel ultraestructural, de la peroxidasa inyectada. Las imágenes varían con el tiempo de circulación de peroxidasa. Cuando los animales se sacrificaron inmediatamente después de la inyección de peroxidasa se observó un lleno vascular muy denso. Se observó asimismo, el pasaje de peroxidasa entre las células endoteliales y su transporte en vesículas pinocitósicas que en los primeros momentos post-inyección aparecen abiertas a la superficie luminal del vaso o cerradas y libres en el citoplasma de la célula endotelial (Figs. 23 y 24). A medida que transcurre el tiempo post-inyección el contenido de peroxidasa intravascular se hace menos denso. Se observan mayor cantidad de vesículas pinocitósicas peroxidasa positivas, muchas de ellas ya cercanas a la superficie basal de la célula endotelial y que vuelcan su contenido en el tejido conectivo que rodea las células endoteliales. Parte de esta peroxidasa es luego captada por células macrofágicas (Figs. 25 y 26).

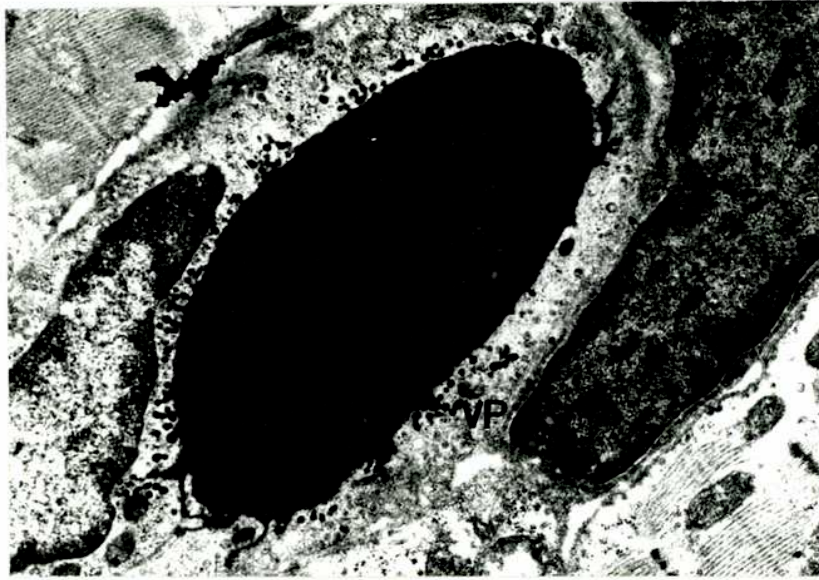


Fig.23:Capilar de diafragma de una rata neonata sacrificada 1' post-inyección intravascular de peroxidasa.Se observa un lleno vascular denso y el inicio del transporte de peroxidasa evidenciado por abundantes vesículas pinocitósicas(VP)peroxidasa-positivas sobre y en la cercanía del borde luminal.Las vesículas pinocitósicas cercanas a la membrana basal son aún,en su gran mayoría,peroxidasa-negativas.(x 9000 ).



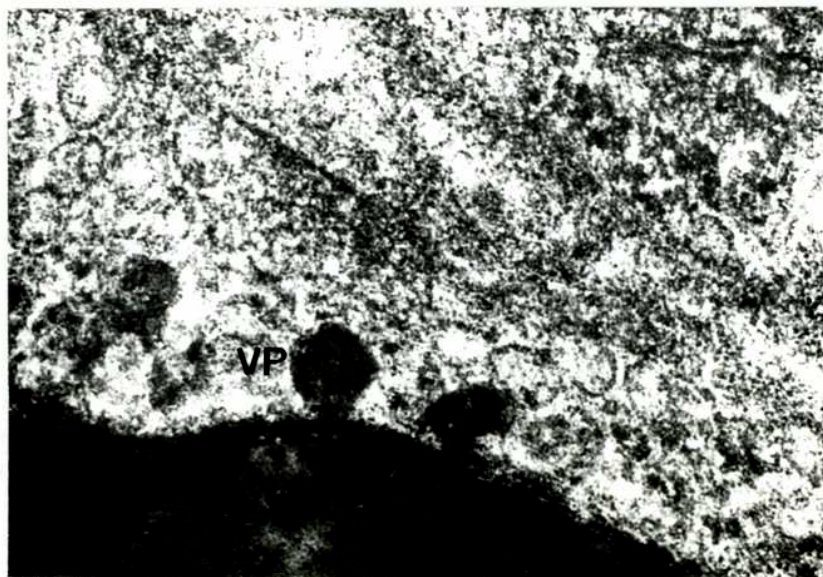


Fig.24:Se observa,a mayor aumento,un capilar de diafragma de una rata neonata sacrificada 1' post-inyección intravascular de peroxidasa.La presencia de vesículas pinocitósicas(VP) peroxidasa-positivas sobre el borde luminal del capilar evidencia el inicio del transporte de peroxidasa hacia el intersticio.(x 22.000).

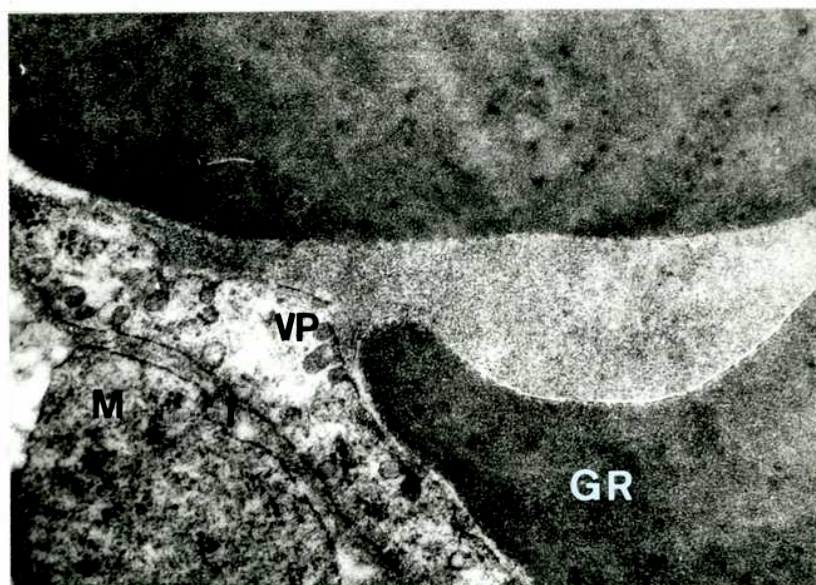


Fig.25:Capilar de diafragma de una rata neonata sacrificada 4' post-inyección intravascular de peroxidasa.En el lumen del vaso se observan 2 glóbulos rojos(GR) con su densidad electrónica habitual y el contenido intravascular de peroxidasa cuya densidad es menor que en la Fig.23.Se observan,asimismo,vesículas pinocitóticas(VP) cargadas de peroxidasa abiertas hacia el lumen y hacia el intersticio.Nótese la peroxidasa intersticial(I) y un macrófago(M) con contenido intracitoplasmático peroxidasa positivo.(x 11.000 ).



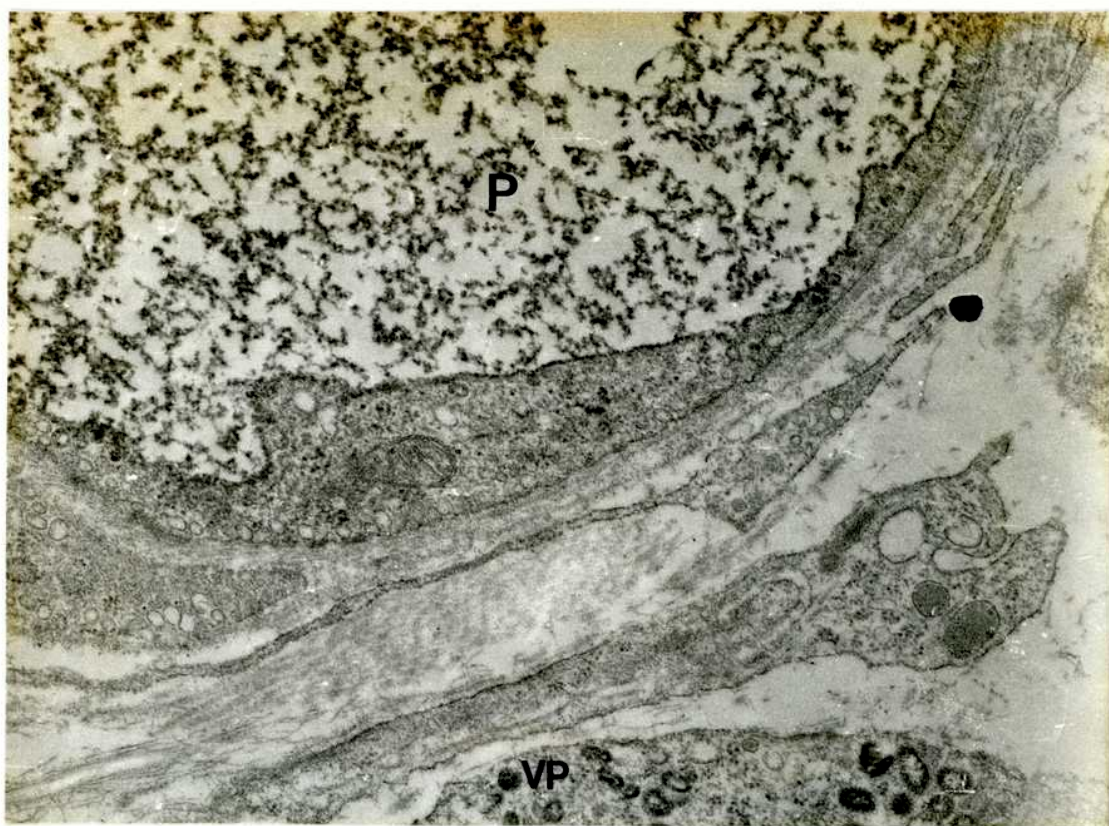


Fig.26:Capilar de diafragma de una rata neonata inyectada con peroxidasa y sacrificada 10' post-inyección.Se observa que el contenido intraluminal de peroxidasa (P) es menos denso que en la Fig.25.Asimismo,se verifica una mayor captación de peroxidasa extravasada en vesículas intracitoplasmáticas de macrófagos (VP).(x 9.800 ).

Las imágenes obtenidas en diafragma se reprodujeron cuando se analizó la piel de la mejilla de ratas neonatas sanas (controles no irradiados) inyectadas en la vena jugular externa izquierda con peroxidasa. En la piel irradiada se observaron lesiones de las células endoteliales caracterizadas, fundamentalmente, por irregularidad del contorno endotelial sobre la superficie luminal del vaso. El aumento de permeabilidad radioinducido a nivel de microscopía electrónica se evidenció por una disminución muy marcada del contenido intravascular de peroxidasa respecto del control con el mismo tiempo de circulación de peroxidasa (Fig. 27). Las células endoteliales mostraron una morfología alterada con una menor densidad de organelas y evidentes daños en sus membranas intracitoplasmáticas, particularmente las mitocondriales. Se observó, asimismo, una marcada dilatación del retículo endotelial (Fig. 28). Otra característica del daño endotelial fue la dilatación de las uniones estrechas, lo cual induce una mayor permeabilidad a la peroxidasa (Fig. 29).

Con dosis altas (120 Gy) y tiempos largos post-irradiación (6 días) las células endoteliales exhiben un daño muy evidente con claras imágenes de necrobiosis donde predominan imágenes de retículo endotelial dilatado, grandes espacios claros con ribosomas dispersos y una ausencia casi total de vesículas pinocitóticas (Fig. 30). Esto indicaría que la peroxidasa atravesaría el endotelio pasivamente por las uniones estrechas dilatadas y las discontinuidades de la pared endotelial.

Las células macrofágicas peroxidasa-positivas se observaron nítidamente en material normal e irradiado. Fueron más fácilmente localizadas en material irradiado por su mayor cantidad numérica.

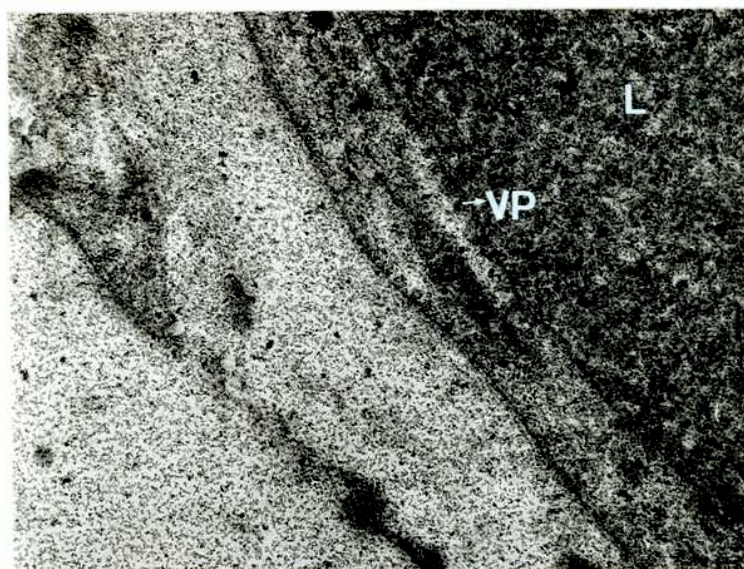


Fig.27 a:Capilar de mejilla de un animal control(no irradiado) inyectado con peroxidasa y sacrificado 3' post-inyección.Se observa homogeneidad del precipitado peroxidasa-positivo en la luz del vaso(L) y vesículas pinocitósicas(VP) iniciando el transporte de peroxidasa a través del endotelio.Se observa,asimismo,la continuidad y regularidad del borde endotelial.(× 9.800 ).



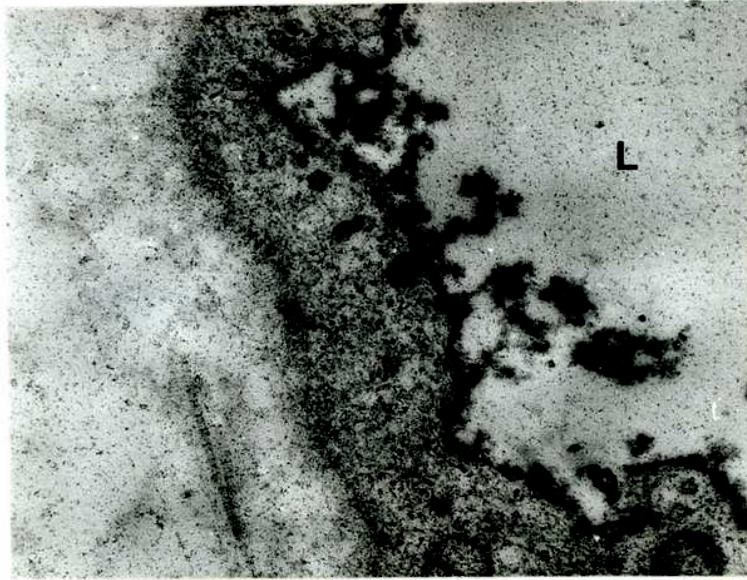


Fig.27 b:Capilar de piel de un animal localmente irradiado con 60 Gy de Rayos X,inyectado con peroxidasa 3 días post-exposición y sacrificado 5 minutos post-inyección.Se observan irregularidades del borde luminal del endotelio y escaso contenido de peroxidasa dentro del lumen(L) del vaso.( $\times 9.800$  ).

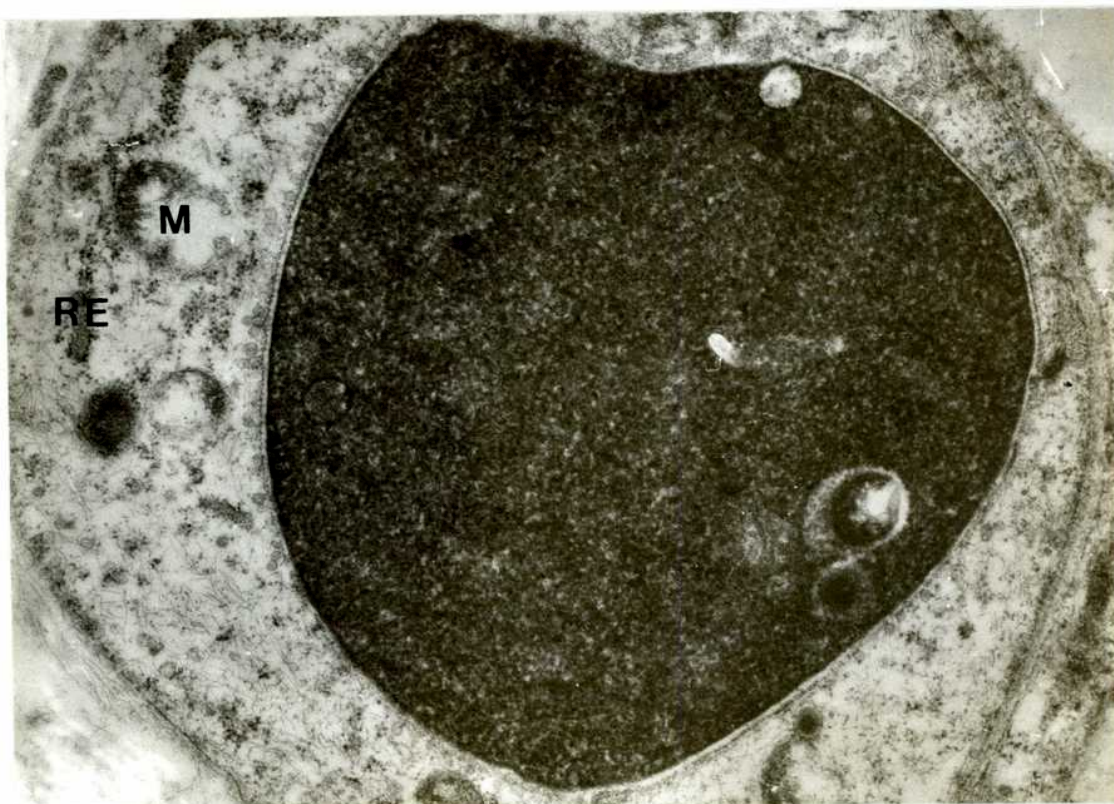


Fig.28:Capilar de piel irradiada con 60 Gy de Rayos X de un animal inyectado con peroxidasa 3 días después de la exposición y sacrificado 3' post-inyección. Se observa la alteración del citoplasma endotelial evidenciada por la presencia de espacios claros intracitoplasmáticos,daño a las membranas mitocondriales(M) y dilataciones del retículo endoplasmático(RE).(x 10.300 ).



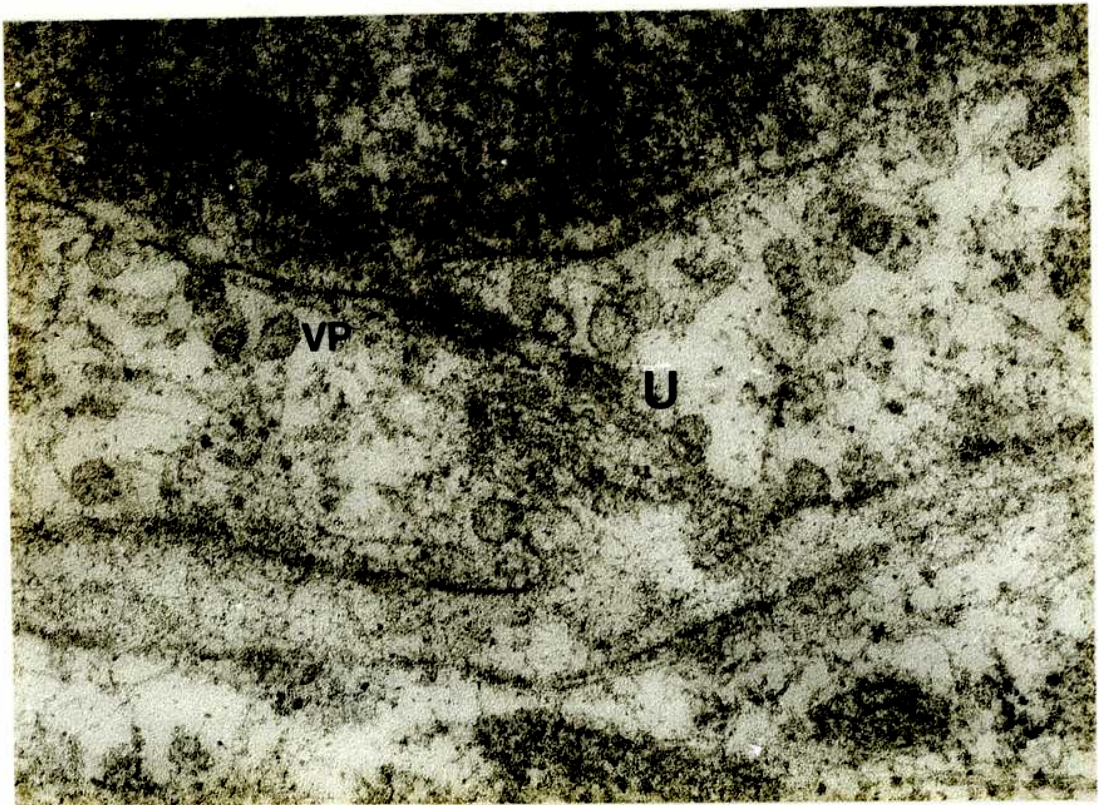


Fig.29:Capilar de piel de un animal localmente irradiado con 60 Gy de Rayos X , inyectado con peroxidasa 6 días después de la exposición y sacrificado 5' post-inyección.Se observa una marcada dilatación de la unión(U) entre 2 células endoteliales lo cual permite un mayor pasaje pasivo de la peroxidasa intraluminal hacia el intersticio.Asimismo se verifica un aumento en el transporte activo de la peroxidasa evidenciado por un marcado aumento en la cantidad de vesículas pinocitósicas(VP).  
(× 16.000 ).



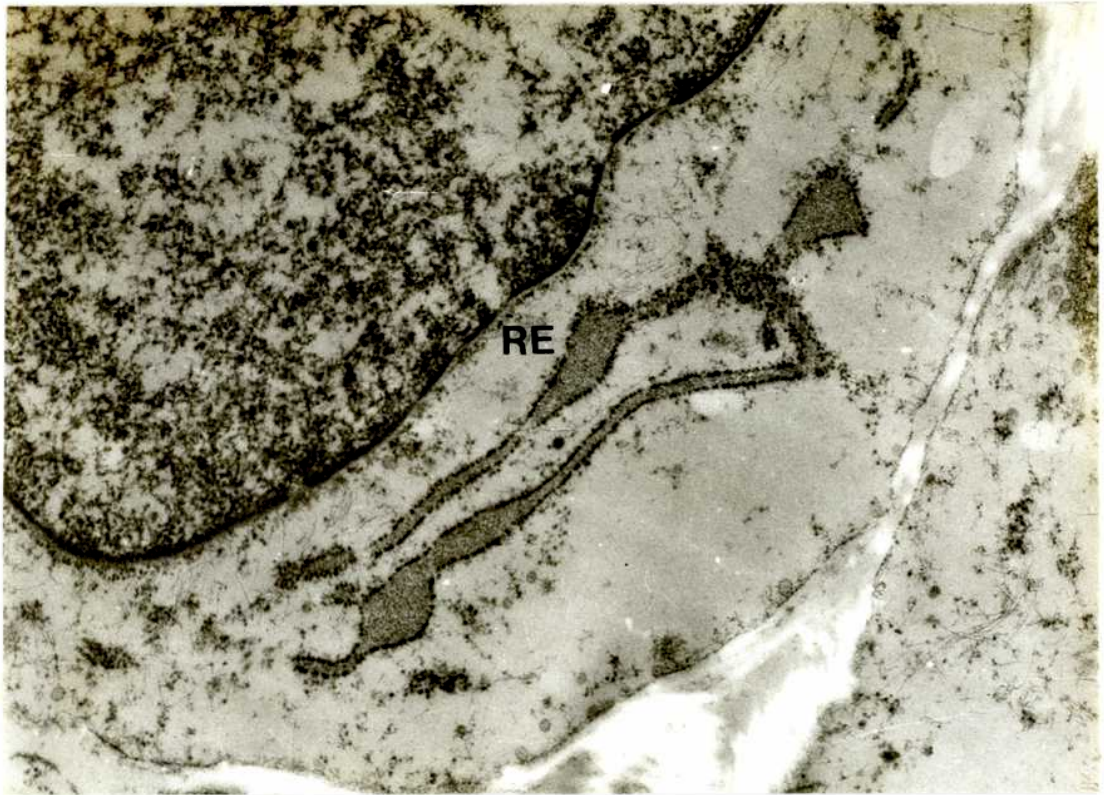


Fig.30: Célula endotelial de un capilar de piel de un animal inyectado con peroxidasa 6 días después de exposición local a 120 Gy de Rayos X y sacrificado 5' post-inyección. Se observa la existencia de necrobiosis con predominio de imágenes de retículo endotelial dilatado (RE), grandes espacios claros con ribosomas dispersos y una ausencia casi total de vesículas pinocitósicas. ( $\times 10.000$ ).

Los macrófagos presentes en el material irradiado no presentan signos de alteración morfológica ni de actividad macrofágica(Figs.31 y 32).

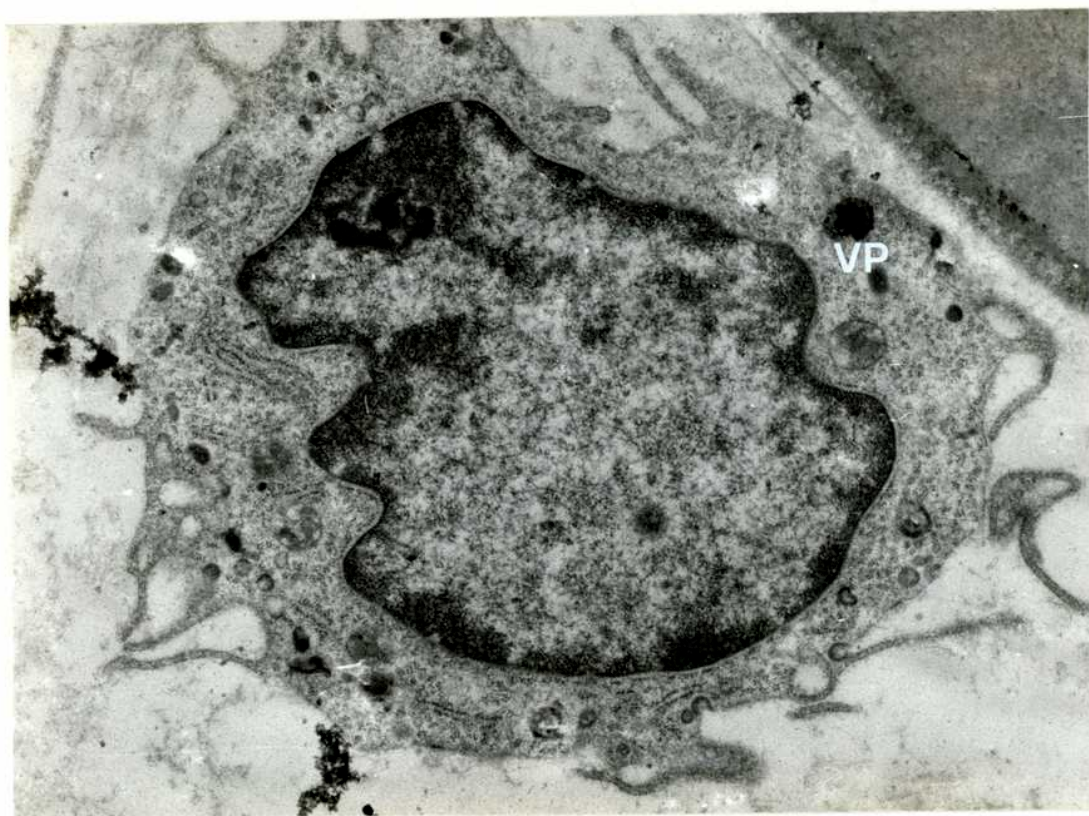


Fig.31:Piel irradiada con 60 Gy de Rayos X de un animal inyectado con peroxidasa 6 días después de la exposición y sacrificado 5' post-inyección:se observa un macrófago cuya actividad fagocitaria se hace evidente por la presencia de prolongaciones citoplasmáticas y vesículas peroxidasa-positivas intracitoplasmáticas(VP).(x 9.500 ).



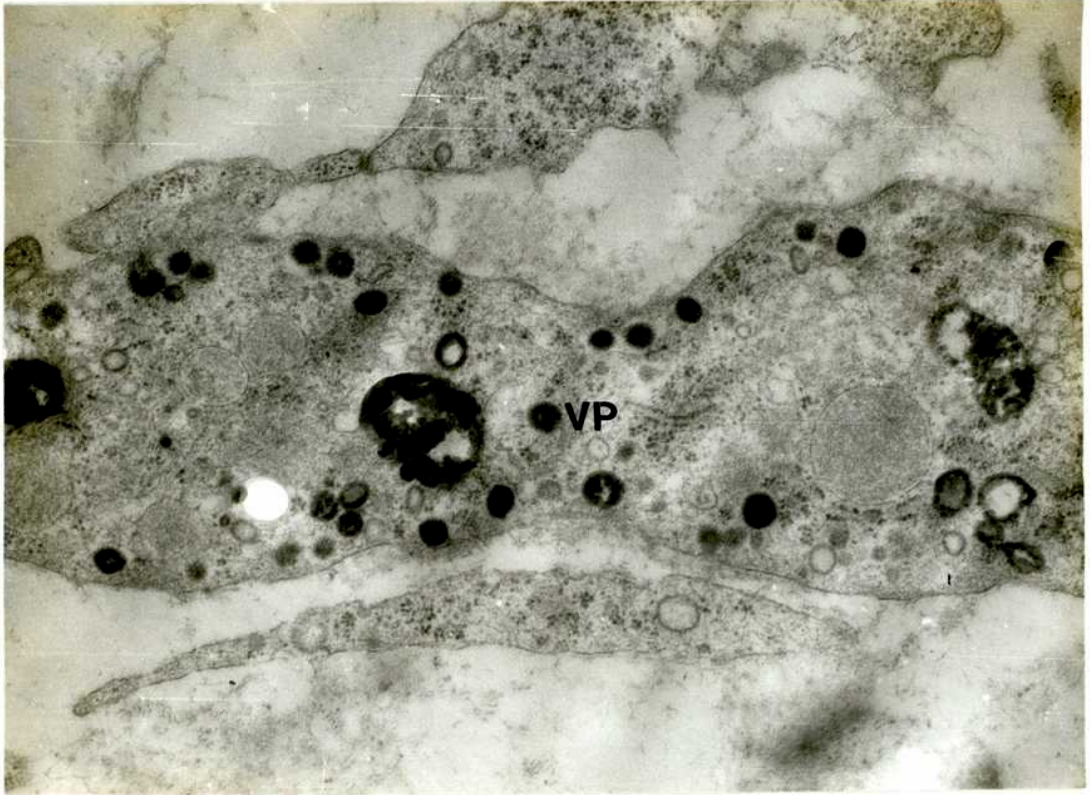


Fig.32:Piel normal de un animal inyectado con peroxidasa y sacrificado 5' post-inyección en la que se observa un sector de una prolongación citoplasmática de una célula macrofágica donde se evidencian numerosas vesículas peroxidasa-positivas(VP).(x 10.500 ).

## DISCUSION

El método de inyección intravascular de peroxidasa adaptado por nosotros para el presente estudio cuantitativo de lesiones agudas radioinducidas en la microvasculatura de la piel de la mejilla de la rata neonata permite la visualización de todos los vasos sanguíneos funcionantes, incluyendo a los capilares. Este método resulta así superior a los métodos de rutina utilizados para estudios de vascularización tales como la inyección intravascular de tinta china(77-81), colorantes vitales (78), sulfato de bario para estudios radiográficos(78,81) y la introducción de plásticos en la red vascular con posterior destrucción de los tejidos(82). El método de inyección de la peroxidasa brinda imágenes cuantitables de la morfología de la circulación terminal en cortes gruesos evidenciando vasos no observables generalmente con los métodos antes mencionados. Asimismo, dado que parte de la peroxidasa inyectada permea el endotelio en cantidades crecientes con el tiempo post-inyección, pasa al espacio perivascular y es fagocitada por macrófagos, se puede obtener información respecto a la permeabilidad capilar a partir de los mismos cortes de tejido, mediante el conteo de éstas células.

Los inconvenientes técnicos de la metodología empleada radican principalmente en la dificultad de la maniobra quirúrgica de inyección intravascular en la vena jugular de pequeñísimo calibre de la rata neonata y la supervivencia del animal durante el tiempo post-inyección establecido. La maniobra

quirúrgica se realizó con exactitud después de entrenamiento reiterado. Una inyección intravascular y el ajuste del método de anestesia permitió lograr una supervivencia durante el tiempo de circulación de peroxidasa superior al 90%.

Podría argüirse que la introducción de un agente extraño en un determinado volumen líquido en el torrente sanguíneo puede causar alteraciones morfológicas y funcionales que pueden interferir en la correcta interpretación de los resultados. De hecho, se observó que un aumento en la presión intravascular favorece el pasaje de peroxidasa a través de las uniones endoteliales en el pulmón de ratones (68). En cambio, en otra experiencia realizada en capilares de diafragma no se pudo demostrar este efecto (67). La inyección en un sitio relativamente alejado de los capilares en estudio, como en el caso del presente trabajo, minimizaría los cambios en el pasaje de líquido a través de la pared capilar debidos exclusivamente al aumento de presión mecánica. En cuanto a los efectos de la peroxidasa "per se", no hay evidencia de efecto citotóxico (69). Esto es de primordial importancia ya que el daño celular altera la permeabilidad de la membrana celular y por lo tanto un cambio en el pasaje de peroxidasa a través de las células endoteliales irradiadas podría deberse, parcialmente, a un daño celular no aparente morfológicamente causado por la molécula de peroxidasa. No obstante Haye et al. (70) encontraron que la presencia de HRP en el torrente circulatorio de conejos y cobayos produce una rápida disminución en las plaquetas circulantes y una caída en la SHF sanguínea lo cual podría alterar la función circulatoria. Sin embargo, otros estudios del efecto de

la peroxidasa sobre la permeabilidad capilar revelaron que, en músculo cardíaco y esquelético de ratones no existirían variaciones(58) a nivel capilar y solo pequeños cambios a nivel de vénulas y vasos pequeños(7,1).Según Clementi(73) y Karnovsky et al.(68) la peroxidasa podría afectar la permeabilidad del sistema de poros pequeños pero no del sistema de poros grandes.

Estos datos, no del todo coincidentes, revelan la absoluta necesidad de efectuar controles apareados rigurosos para que, si existiera una alteración de base del tipo que se describe en la literatura para algunos modelos ésta fuera idéntica en el tejido control y el experimental.

La literatura aporta información sobre el efecto de la radiación sobre la microvasculatura de la piel.No obstante, los resultados obtenidos a partir de distintos modelos experimentales y con técnicas diversas resultan difíciles de comparar, particularmente cuando el daño se evalúa subjetivamente. En una extensa revisión del tema Law (23) reconoce la carencia de datos que organicen los hallazgos de los diferentes investigadores para poder tener una mejor comprensión de la secuencia de daños vasculares que se producen en función del tiempo post-irradiación y las dosis administradas.La metodología empleada en el presente trabajo permite la evaluación cuantitativa de los parámetros que caracterizan el daño radioinducido en la microvasculatura mediante la cual se puede realizar más fácilmente un análisis secuencial del daño.De esta manera, los parámetros vasculares que se obtienen a partir de observaciones morfológicas pueden resultar de valor en la estimación de parámetros funcionales de los vasos sanguíneos.

La irradiación indujo una marcada vasodilatación en función de la dosis y el tiempo post-irradiación revelada por la distribución en frecuencia de los calibres vasculares. Esta vasodilatación temprana sería debida a la acción directa de la radiación sobre la pared vascular mientras que la vasodilatación más tardía descrita por Takahashi y Kallman(83) es, probablemente, el resultado de la fibrosis radioinducida en el tejido conectivo. De esta manera nuestros resultados sugieren que los cambios en volumen vascular relativo dependen no sólo de la atrofia post-irradiación de la dermis sino también de la vasodilatación radioinducida.

Asociada a la vasodilatación se verificó una disminución en la longitud vascular relativa y absoluta. El grado de difusión efectiva es inversamente proporcional a la distancia intercapilar la cual, a su vez, sería inversamente proporcional a la longitud vascular por unidad de volumen de tejido. Esto sugiere que porciones cada vez mayores de la dermis irradiada gradual y progresivamente entran en un estado de hipoxia y/o hiponutrición.

La vasodilatación asociada a una disminución en la longitud vascular redundante en una telangiectasia temprana que no ha sido descrita en otros modelos de irradiación experimental de piel. Este fenómeno ha sido descrito en asociación con la fibrosis y la hialinización que ocurren como alteraciones radioinducidas intermedias(2-6 meses) y tardías(6 meses en adelante)(23). En la piel de las ratas neonatas se verifica una inhibición muy temprana del crecimiento de los folículos pilosos con dosis bajas de Rayos X. Este fenómeno implicaría una acción directa de



la radiación sobre el DNA de las células de la matriz del folículo piloso que están en activa proliferación(84).Este hallazgo sugeriría que el daño a los folículos pilosos sería, en gran medida, la causa de la alteración tan temprana de la microvasculatura de la dermis irradiada observada en el presente trabajo.

Las dosis altas, indujeron un aumento muy temprano del volumen vascular que ha sido descripto por otros autores en modelos experimentales distintos y empleando metodologías diversas (83,85).El método morfológico del presente trabajo revela que en la piel de la rata neonata los cambios telangiectáticos tempranos van asociados a un aumento del volumen vascular. Para dosis menores(8 y 15 Gy)no obstante, la vasodilatación radioinducida no logró compensar la oclusión de algunos capilares originada, probablemente, por la atrofia de los folículos pilosos, causando así una disminución en el volumen vascular.

La permeabilidad capilar en nuestro modelo sufrió un aumento progresivo con la dosis y el tiempo post-exposición.Otros autores han descripto picos de permeabilidad en diversos modelos(85,37,46,41,15).Esta discrepancia podría ser atribuída, asimismo, a la marcada radiosensibilidad de la piel de la rata neonata.

Es de destacar que en el presente estudio el grado de permeabilidad ha sido inferido a partir de la evaluación microfotométrica de la peroxidasa que atravesó el endotelio hacia el espacio perivascular y del conteo de células fagocíticas que captaron parte de la peroxidasa permeabilizada.Los resultados aportados por éste último método deben ser analizados

teniendo también en cuenta posibles alteraciones radioinducidas en los macrófagos. El macrófago es una célula radioresistente. No obstante, se ha observado una exacerbación de la capacidad fagocítica de macrófagos alveolares a partir de los 7 días post-irradiación con dosis mayores que 7,5 Gy (86). Asimismo, puede haber un aumento del número de macrófagos ocasionado por la liberación de sustancias tóxicas en las primeras fases de las alteraciones inflamatorias de la lesión por radiación. El conteo de macrófagos peroxidasa-positivos no estima directamente las alteraciones de la permeabilidad, pero sí resulta un indicador de valor en conjunción con los datos aportados por la evaluación microfotométrica de la tinción intersticial y las observaciones a nivel de microscopía electrónica. Los tres métodos coinciden en señalar un aumento de la permeabilidad capilar que podría significar cambios en el transporte activo en las primeras etapas y al cual se sobreagregarían luego las alteraciones debidas al daño a la célula endotelial observadas a nivel de microscopía electrónica. De modo que, pasada la etapa del daño inmediato por radiación predominarían los efectos del daño a la pared vascular (87).

A primera vista un aumento de permeabilidad como el observado en el presente estudio parecería indicar un aumento en la capacidad de intercambio de oxígeno y metabolitos. No obstante, la presencia de telangiectasias tan tempranas asociadas a este aumento de permeabilidad hacen suponer que se instala en este modelo una rémora circulatoria que alteraría cualitativamente la nutrición del tejido irrigado. Este hecho se contrapone al hallazgo de un aumento de flujo temprano en otros modelos en

donde, por otra parte, la telangiectasia se describe como una consecuencia tardía de la irradiación(39). La observación de nuestro material por debajo del área dérmica analizada en el presente estudio mostró un aumento de volumen y permeabilidad de los vasos de mediano calibre de la capa muscular subdérmica. Se podría inferir que al igual que en las otras experiencias antes mencionadas existiría en esa zona un aumento de flujo hasta el nivel de vaso mediano mantenido por circulación a través de shunts arterio-venosos. De esta forma el retorno circulatorio ocurriría a nivel de la primera capa muscular induciendo en la red capilar irradiada de la dermis una circulación deficiente. Así, la rémora circulatoria aunque acompañada de un aumento de permeabilidad, no compensaría las necesidades nutricionales de la epidermis y la dermis superficial.

El efecto agudo de la irradiación en nuestro modelo fue dosis dependiente. No obstante el efecto de las dosis bajas(8 y 15 Gy) fue escaso. Este hecho sugeriría la existencia de una dosis umbral entre 15 y 60 Gy para la lesión de la microvasculatura de la dermis de la rata neonata como ha sido descrito en otros modelos(83).

Se ha descrito que la radiación no sólo daña las células inhibiendo la división celular sino que induce, asimismo, una reacción inflamatoria localizada causada, probablemente, por la liberación de enzimas proteolíticas(75). Este tipo de mecanismo se asocia a hiperemia y un aumento de permeabilidad. No obstante, la exactitud con que el área afectada por la radiación coincide con la zona expuesta al haz de Rayos X sugeriría que en este modelo predomina un mecanismo de daño directo a la

pared vascular asociado a la acción, in-situ, de mediadores de la inflamación liberados por las células dañadas. Los cambios de permeabilidad detectados en el presente trabajo podrían, así, ser la consecuencia de la despolimerización de la membrana basal de los capilares, la apertura de las uniones endoteliales, la acción de mediadores como la serotonina y la histamina estrictamente en el sitio de la injuria y, posiblemente, una alteración en el transporte via vesículas.

La influencia del daño vascular en la biología de la piel parece indudable. Trabajos previos en modelos similares de irradiación experimental de piel de ratas neonatas describen alteraciones importantes en la epidermis. Existe una acantosis marcada dependiente de las dosis y el tiempo post-irradiación dada por un aumento del índice de proliferación celular detectado mediante técnicas histométricas(2) y un aumento del volumen celular de las células existentes detectado mediante técnicas morfométricas(3,4). El aumento del volumen celular ocurriría via 2 mecanismos: el edema inter e intracelular(3,4) responsable en pequeña medida y un aumento de la síntesis de organelas, principalmente tonofibrillas y mitocondrias, asociado a marcadas alteraciones nucleares tales como plegamientos de la membrana nuclear y un incremento en el tamaño del núcleo(6). Estudios histoquímicos revelaron, además, que estas alteraciones morfológicas ocurren asociadas a variaciones metabólicas. Se encuentra aumentada la actividad de fosfatasa ácida, enzima hidrolítica vinculada a la queratinización, hecho que corrobora la hiperqueratosis detectada a nivel de microscopía óptica(11). Asimismo se verifica, a nivel de microscopía electrónica, un aumento del número de queratinosomas, organela específica que contie-

ne fosfatasa ácida(6).El estudio de otras enzimas indicadoras de cambios metabólicos reveló que las actividades glucolíticas del ciclo de Krebs disminuyen en favor de la que ocurre via el shunt de las pentosas(7).Este desvío metabólico se traduce en una síntesis de RNA aumentada en la que intervienen derivados del shunt de las pentosas y, en consecuencia, en el aumento de la síntesis de tonofibrillas descripto anteriormente. Estos estudios aclararon aspectos del comportamiento básico de la célula epidérmica aislada pero no aportan información respecto a si estos cambios son una respuesta directa de la radiación o son, básicamente, un efecto secundario de las alteraciones inducidas en la dermis. Se podría suponer que el daño vascular encontrado en el presente trabajo que implica la existencia de telangiectasias y, consecuentemente, rémora circulatoria, causaría alteraciones en la nutrición y tensión de oxígeno de las células epiteliales. Desde esta óptica el desvío del ciclo de Krebs al shunt de las pentosas que requiere menor tensión de oxígeno, podría interpretarse como secundario al daño vascular en la dermis. Una vez desencadenado el cambio metabólico los productos intermedios del shunt de las pentosas serían aprovechados para la síntesis ulterior de las proteínas involucradas en la queratinización. La hipótesis que la alteración vascular sería el daño previo y que la acantosis sería consecuencia de las variaciones metabólicas y morfológicas que éste trae aparejado puede sustentarse además por experiencias en las cuales un daño vascular provocado sin daño epitelial previo, determinó la aparición de acantosis, hiperqueratosis y altera-

ciones de los mecanismos oxidativos. En estos trabajos(88) produjeron una isquemia experimental en mucosas sanas por inyección de microesférulas plásticas en el torrente circulatorio que ocluían la circulación en un porcentaje de los capilares subepiteliales. El epitelio suprayacente sufrió alteraciones similares a las que ocurren con la irradiación: acantosis e hiperqueratosis y un desvío de las actividades metabólicas del ciclo de Krebs hacia el shunt de las pentosas. Estos hallazgos sugerirían que el daño vascular sería probablemente, el desencadenante de la lesión en el epitelio.

Una alteración radioinducida en la morfología y la función circulatoria como la que revela el presente trabajo podría, pues, ser la causa fundamental de los trastornos metabólicos y nutricionales de la epidermis de la piel irradiada.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se encaró en este trabajo el estudio de las alteraciones agudas radioinducidas en la microvasculatura de la piel de la rata neonata. Las finalidades de este trabajo han sido:

a) Establecer parámetros histométricos y esterelógicos que permitieran evaluar cuantitativamente los cambios vasculares para correlacionarlos numéricamente con las dosis de radiación aplicadas y el tiempo post-irradiación.

b) Analizar la influencia de las alteraciones vasculares en el daño total producido en la piel por irradiación, teniendo en cuenta que en el modelo experimental seleccionado se habían caracterizado previamente las variaciones morfológicas y metabólicas de la epidermis.

Se adaptó la técnica de inyección intravascular de peroxidasa que permite la visualización de todos los vasos funcionantes, incluyendo los capilares, en cortes gruesos de tejido, y se establecieron parámetros morfológicos que caracterizan el patrón vascular. Asimismo, dado que parte de la peroxidasa inyectada permea el endotelio, pasa al tejido conectivo perivascular y es fagocitada por macrófagos, fue posible obtener información sobre cambios radioinducidos en la permeabilidad capilar a partir del contaje directo de células macrofágicas peroxidasa positivas y de la evaluación microfotométrica de la peroxidasa presente en el tejido conectivo revelada histoquímicamente. El hecho de que el producto final de la reacción histoquímica para detección de la peroxidasa es electrónicamente denso permitió

el estudio a nivel ultraestructural del material irradiado.

Se irradió localmente la mejilla de la rata neonata con 8, 15,60 ó 120 Gy de Rayos X y se realizó la inyección intravascular de peroxidasa 3 horas, 1 día, 3 días y 6 días después de la exposición. El estudio morfométrico reveló que el patrón vascular normal sufre alteraciones en función de la dosis y el tiempo post-irradiación con un aumento de la frecuencia de los calibres vasculares mayores a expensas de los menores, un aumento del volumen vascular y una disminución de la longitud vascular. La vasodilatación asociada a una disminución en la longitud vascular redundante en una telangiectasia temprana no descrita en otros modelos de irradiación experimental de piel. La permeabilidad capilar inferida del conteo de células macrofágicas peroxidasa-positivas y la evaluación microfotométrica de la peroxidasa presente en el tejido conectivo perivascular sufrió un aumento progresivo con el tiempo post-irradiación. La presencia de telangiectasias tan tempranas asociadas a este aumento de permeabilidad sugiere que se instala en este modelo una rémora circulatoria que alteraría cualitativamente la nutrición del tejido irrigado.

La exactitud con que el área afectada por la irradiación coincide con la zona expuesta al haz de Rayos X y el daño endotelial a nivel ultraestructural sugeriría que, en este modelo, predomina un mecanismo de daño directo a la pared vascular. El daño vascular sería así la lesión previa que induciría una hipoxia parcial de la epidermis cuyas células experimentarían consecutivamente las alteraciones morfológicas y metabólicas previamente estudiadas que conducen a la acantosis, hiperqueratosis y posterior necrobiosis.



M. S. Bertin



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wolbach SB: The pathological histology of chronic X-ray dermatitis and early X-ray carcinoma. J. Med. Res. 21:415(1909).
2. de Rey BLM y Klein-Szanto AJP: A histometric study of acute radiation effects on rat tail epidermis. Strahlentherapie 143: 699-704(1972).
3. Klein-Szanto AJP, de Rey BM y Cabrini RL: Volumetric modifications of X-irradiated keratinocytes. J. Cutan. Pathol. 4:23-31 (1977).
4. Lanfranchi H, Klein-Szanto AJP, de Rey BM y Cabrini RL: Dose-dependent volume changes in X-irradiated keratinocytes. Int. J. Radiat. Biol. 36:6, 659-663(1979).
5. Itoiz ME y Frasc ACC: Variations in the enzymatic behaviour of irradiated epidermis as function of age and lesion localization. Int. J. Radiat. Biol. 31:499-502(1977).
6. de Rey BM, Klein-Szanto AJP y Cabrini RL: Ultrastructural stereology of X-irradiated epidermis. Radiat. Res. 77:103-116(1979).
7. Klein-Szanto AJP y Cabrini RL: Microspectrophotometric study of oxidative enzymes in irradiated epidermis. Int. J. Radiat. Biol. 38:235-241(1970).
8. Cabrini RL, Itoiz ME, Mayo J, Smolko EE y Klein-Szanto AJP: Microspectrophotometric study of histoenzymic reactions subjected to 0.5Mrad of deuteron irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 18:415-421(1970).
9. Conti CJ, Gimenez IB y Cabrini RL: Microspectrophotometric study of nucleic acid and protein in irradiated epidermis. Strahlentherapie 111:236-239(1976).

10. Volco HE, Itoiz ME y Frasch ACC: Methodology for microspectrophotometric quantitation of histochemical reactions. I. Investigation of sulfhydryl and disulfide groups in squamous epithelium. *Cell. Mol. Biol.* 23:249-255(1978).
11. Itoiz ME, Frasch ACC, Volco HE y Klein-Szanto AJP: Microspectrophotometric study of acid phosphatase activity in irradiated squamous epithelium. *Strahlentherapie* 147:643-648(1974).
12. de Rey BM, Itoiz ME, Frasch ACC y Cabrini RL: Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in normal and irradiated epidermis. *J. Cutaneous Pathol.* 3:25-34(1976).
13. Reinhold HS: Cell viability of the vessel wall. *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 10:9-28(1974).
14. Hilmas DE y Gillette EL: Morphometric analyses of the microvasculature of tumors during growth and after X-irradiation. *Cancer* 33,1:103-110(1974).
15. Ullrich RL y Casarett GW: Interrelationship between the early inflammatory response and subsequent fibrosis after radiation exposure. *Rad. Res.* 72:107-121(1977).
16. Stearner SP y Sanderson MH: Early vascular injury in the X-irradiated chick embryo: An electron microscope study. *The J. Pathol.* 99,3:213-218(1969).
17. Maisin JR: The ultrastructure of the lung of mice exposed to a supralethal dose of ionizing irradiation on the thorax. *Rad. Res.* 44:545-564(1970).
18. Dimitrievich GS, Hausladen FL, Kuchnir FT y Griem ML: In vivo observation of microvascular damage and sublethal repair following fast neutrons and X-ray irradiation of the rabbit ear chamber. *Rad. Res.* 62:610(1975).

19. Narayan K y Cliff WJ: Morphology of irradiated microvasculature: A combined in vivo and electron microscopic study. *Am. J. Pathol.* 106:47-62(1982).
20. Reinhold HS: Influence of radiation on blood vessels and circulation. IV. Structure changes in blood vessels. *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 10:58-74(1974).
21. Ross R, Utley J, Woodward M y Hurn I: The ultrastructure of chronic radiation damage in rat skin. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 152:171-178(1981).
22. Sams A: Effect of X-irradiation on the circulatory system of the hind limb of the mouse. *Int. J. Radiat. Biol.* 7,2:113-129 (1963).
23. Law MP: Radiation induced vascular injury and its relation to late effects in normal tissues. *EM Lett* JT y Adler H *Advances in Radiation Biology*, Vol. 9, 37-73. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press(1981).
24. Maisin JR: The influence of radiation on blood vessels and circulation. III. Ultrastructure of the vessel wall. *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 10:29-57(1974).
25. Ohuchi K, Chang LF y Tabachnick J: Radiation fibrosis of guinea pig skin after beta irradiation and an attempt at its suppression with proline analogs. *Rad. Res.* 79:273-288(1979).
26. Stearner SP, Devine RL y Christian JB: Late changes in the irradiated microvasculature: An electron-Microscope study of the effects of fission neutrons. *Rad. Res.* 65:351-370(1976).
27. Broerse JJ, Reinhold HS, Buisman GH y Engels AC: Effects of 15-MeV Neutrons On Capillary Endothelium in the Rat. *Rad. Res.* 56 :180-185(1973).
28. Lamberts HB y de Boer WGRM: Contributions to the study of

- immediate and early X-ray reactions with regard to chemoprotection.VII.X-ray induced atheromatous lesions in the arterial wall of hypercholesterolaemic rabbits.Int.J.Rad.Biol.6,4: 343-350(1963).
- 29.Konings AWT,Hardonk MJ,Wieringa RA y Lamberts HB:Initial events in radiation-induced atheromatosisI.Activation of lysosomal enzymes.Strahlentherapie 150:444-448(1975).
- 30.Aarnoudse MW y Lamberts HB:Arterial wall damage by X-rays and fast neutrons.Int.J.Radiat.Biol.31,1:87-94(1977).
- 31.Gillette EL,Maurer GD y Severin GA:Endothelial repair of radiation damage following Beta irradiation.Radiology 116: 175-177(1975).
- 32.Keyeux A,Dunjic A,Royer E,Jovanovic D y Van de Merckt J: Late functional and circulatory changes in rats after local irradiation.Int.J.Radiat.Biol.20:7-25(1971).
- 33.DeGowin RL,Lewis LJ,Mason RE,Borke MK y Hoak JC:Radiation-induced inhibition of human endothelial cells replicating in culture.Rad.Res.68:244-250(1976).
- 34.Sholley MM,Gimbrone MA y Cotran RS:Cellular migration and replication in endothelial regeneration-A study using irradiated endothelial cultures.Lab.Investig.36,1:18(1977).
- 35.Philpott DE y Takahashi A:The disappearance of the blood vessel mucopolysaccharide lining after X-irradiation.Eighth International Congress on Electron Microscopy,Canberra,Vol.II (1974).
- 36.Jovanovic D:The influence of radiation on blood vessels and circulation.V.Noncellular factors.VI.Lymphatics.Current Topics Radiation Research Quarterly 10:75-97(1974).

37. Mount D y Bruce WR: Local plasma volume and vascular permeability of rabbit skin after irradiation. *Rad. Res.* 23:430-445(1964).
38. Song CW y Levitt SH: Effect of X-Irradiation on Vascularity of normal tissues and experimental tumor. *Radiology* 94:445-447(1970).
39. Hopewell JW: Early and late changes in the functional vascularity of the hamster cheek pouch after local X-irradiation. *Rad. Res.* 63:157-164(1975).
40. Cutright DE and Brady JM: Long-term effects of radiation on the vascularity of rat bone-quantitative measurements with a new technique. *Rad. Res.* 48,2:402-408(1971).
41. Dunjic A: The influence of radiation on blood vessels and circulation X. Blood flow and permeability in irradiated skin. *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 10:151-169(1974).
42. de Ruiter J y van Putten LM: Measurement of blood flow in the mouse tail after irradiation. *Rad. Res.* 61:427-438(1975).
43. Keyeux A: The influence of radiation on blood vessels and circulation. IX. Blood flow and permeability in the Central Nervous System. *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 10:135-150(1974).
44. Horn NL, Thompson M, Howes AE, Brown JM, Kallman RF y Probert JC: Acute and chronic effects of X-irradiation on blood flow in the mouse limb. *Radiology* 113:713-722(1974).
45. Stearner SP y Christian EJB: Long-term vascular effects of ionizing radiations in the mouse: Capillary blood flow. *Rad. Res.* 73:553-567(1978).
46. Song CW, Anderson RS y Tabachnick J: Early effects of Beta irradiation on dermal vascular permeability to plasma proteins. *Rad. Res.* 27:604-615(1966).

47. Leith JT, Schilling WA, Lyman JT, Howard J y Baker DG: Comparison of skin responses of mice after single or fractionated exposure to cyclotron-accelerated Helium ions and 230 kV X-irradiation. *Rad. Res.* 62:195-215(1975).
48. Eassa EHM y Casarett GW: Effect of Epsilon-Amino-n-Caproic Acid (EACA) on radiation-induced increase in capillary permeability. *Radiology* 106:679-688(1973).
49. Willoughby DA: Pharmacological aspects of the vascular permeability changes in the rat's intestine following abdominal irradiation. *Vol. XXXIII*, 392:515-519(1960).
50. Hampton JC y Rosario B: The distribution of exogenous peroxidase in irradiated mouse intestine. *Rad. Res.* 34:209-227(1968).
51. Stearner SP y Christian EJB: Radiation effect on the microcirculation ; Relation to early mortality in the chick embryo. *Rad. Res.* 34:138-152(1968).
52. Stearner SP y Christian EJB: Mechanisms of acute injury in the gamma irradiated chicken. In vivo studies of dose protraction effects on the microvasculature. *Rad. Res.* 47:741-755(1971).
53. Hampton JC: Acute radiation effects in kidney. *Rad. Res.* 52:316-323 (1972).
54. Chien S, Sinclair DG, Chang C, Peric B y Dellenback RJ: Simultaneous study of capillary permeability to several macromolecules. *Am. J. Physiol.* 207, 3:513-517(1964).
55. Majno G, Palade GE y Schoefl GI: Studies on inflammation II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree. *The J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:607-626(1961).
56. Karnovsky MJ y Rice DF: Exogenous cytochrome c as an ultrastructural tracer. *J. Histochem. Cytochem.* 17, 11:751-753(1969).

57. Bruns RR y Palade GE: Studies on blood capillaries II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. The J. of Cell Biol. 37:277-299(1968).
58. Karnovsky MJ: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. The J. of Cell Biol. 35: 213-236(1967).
59. Graham RC y Karnovsky MJ: The early stages of absorption of injected Horseradish Peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14, 4: 291-302(1965).
60. Becker NH, Novikoff AB y Zimmerman HM: Fine structure observations of the uptake of intravenously injected peroxidase by the rat choroid plexus. J. Histochem. Cytochem. 15, 3: 160-164(1966).
61. Schneeberger-Keeley EE y Karnovsky MJ: The ultrastructural basis of alveolar-capillary membrane permeability to peroxidase used as a tracer. The J. of Cell Biol. 37: 781-793(1968).
62. Zacks SI y Saito A: Uptake of exogenous Horseradish Peroxidase by coated vesicles in mouse neuromuscular junctions. J. Histochem. Cytochem. 17, 3: 161-169(1969).
63. Graham RC, Limpert S y Kellermeyer RW: The uptake and transport of exogenous proteins in mouse liver. Ultrastructural cytochemical studies with peroxidase tracers. Lab. Investig. 20, 3: 298 (1969).
64. Parsons PA, Klinger AH y Garrett JR: Adrenergic influences on the permeability of rabbit submandibular salivary glands to blood-borne horseradish peroxidase. Histochem. J. 9: 419-433(1977).
65. Lorenz M y Plenk H: A perfusion method of incubation to demonstrate Horseradish Peroxidase in bone. Histochemistry 53: 257-263 (1977).

66. Squier CA: The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to Horseradish Peroxidase. *J. Ultrastructure Research* 43:160-177(1973).
67. Williams MC y Wissig SL: The permeability of muscle capillaries to horseradish peroxidase. *The J. Cell Biol.* 66:531-555(1975).
68. Schneeberger EE y Karnovsky MJ: The influence of intravascular fluid volume on the permeability of newborn and adult mouse lungs to ultrastructural protein tracers. *The J. of Cell Biol.* 49:319-334(1971).
69. Geyer G, Schmidt HP y Biedermann M: Horseradish peroxidase as label of injured cells. *Histochem. J.* 11:337-344(1979).
70. Haye R, Sjaastad ØV, Blom AK y Vegge T: The effects of horseradish peroxidase on the concentration of 5-Hydroxytryptamine and platelet counts in blood of rabbits and guinea pigs. *Histochemistry* 58:71-77(1978).
71. Cotran RS y Karnovsky MJ: Vascular leakage induced by horseradish peroxidase in the rat. *P. S. E. B. M.* 126:557-561(1967).
72. Vegge T y Haye R: Vascular reactions to horseradish peroxidase in guinea pig. *Histochemistry* 53:217-222(1977).
73. Clementi F: Effect of horseradish peroxidase on mice lung capillaries' permeability. *The J. Histochem. Cytochem.* 18,12:887-892(1970).
74. Zweifach BW y Kivy-Rosenberg E: Microcirculatory effects of whole-body X-irradiation and radiomimetic procedures. *Am. J. Physiol.* 208,3:492-498(1965).
75. Reinhold HS, Keyeux A, Dunjic A, Jovanovic D y Maisin JR: The influence of radiation on blood vessels and circulation. XII. Discussions and Conclusions. *Current Topics in Radiation Research Quarterly* 10:185-198(1974).



76. Frasch ACC; Itoiz ME y Cabrini RL: Microspectrophotometric quantitation of the diaminobenzidine reaction for histochemical demonstration of cytochrome oxidase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 26:157-162(1978).
77. Bernick S: Age changes in blood supply to molar teeth of rats. *Anat. Rec.* 144:265-274(1962).
78. Cohen L: Methods of investigating the vascular architecture of the mandible. *J. Dent. Res.* 38:920-931(1959).
79. Goldman HM: Gingival vascular supply in induced occlusal traumatism. *Oral Surg.* 9:939-941(1956).
80. Keller GJ y Cohen DW: India ink perfusions of the vascular plexus of oral tissues. *Oral Surg.* 8:539-542(1955).
81. Trueta J y Harrison MHM: The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. *J. Bone Joint Surg.* 35-B:442-461 (1953).
82. Espinal EG, Kurtzbart R, Perec CJ, Itoiz ME y Cabrini RL: Vascular alterations in the submandibular glands caused by X-radiation. *J. Dent. Res.* 63:608(1984).
83. Takahashi M y Kallman R: Quantitative estimation of histological changes in subcutaneous vasculature of the mouse after X-irradiation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2:61-68 (1977).
84. Klein-Szanto AJP y de Rey BM: Surface architecture of X-irradiated hair follicles. *J. Cutan. Pathol.* 5:184-192(1978).
85. Law MP y Thomlinson: Vascular permeability in the ears of rats after X-radiation. *Br. J. of Radiology* 51:895-904(1978).
86. Sablonniere B, Nicolas J, Neveux Y y Drouet J: Effect of whole-body irradiation on phagocytic activity of rat alveolar macro-

phages .Int.J.Radiat.Biol.44,6:575-584(1983).

87.Maisin JR:The influence of radiation on blood vessels and circulation IV.Ultrastructure of the vessel wall.Curr.Topics in Radiat.Res.Quart.10:29-57(1974).

88.Itoiz ME,Litwack P,Kennedy JE y Zander HA:Experimental ischemia in monkeys.Histochemical analysis of gingival epithelium. J.Dent.Res.48:895-900(1969).