

## RETARDO MEIÓTICO Y MODIFICACIONES EN LA RADIOSENSIBILIDAD INDUCIDOS POR EL PRETRATAMIENTO CON DIHIDROESTREPTOMICINA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

RODOLFO FÉLIX E. \*  
JUDITH ISABEL GUZMÁN R. \*  
JAVIER RAMÍREZ F. \*

### RESUMEN

En el presente trabajo se investigó el efecto del pretratamiento con dihidroestreptomicina sobre la espermatogénesis de adultos irradiados de *Drosophila melanogaster*, demostrándose el retardo meiótico inducido por el antibiótico, que es aditivo al producido por la irradiación. Se aplicó la técnica de separación de progenies, determinándose la frecuencia de mutaciones letales recesivas en el cromosoma X, la pérdida del fragmento *sc<sup>8</sup>* en el cromosoma Y, así como la pérdida del cromosoma X. El aumento en la frecuencia de los machos XO en la primera progenie del grupo pretratado con el antibiótico, indica la modificación de los procesos de reparación del daño producido por la irradiación durante la espermiogénesis.

Se presenta y se discute una hipótesis explicativa de los resultados observados, fundamentada en el efecto que muestra la dihidroestreptomicina sobre las membranas intracelulares de los eucariontes.

### ABSTRACT

Pre-treatment with dihydrostreptomycin was assayed in irradiated male adults of *Drosophila melanogaster*. A meiotic delay, which acted additively to the delay induced by the irradiation was demonstrated by means of the brood technique, measuring the frequencies of recessive sex-linked mutations, *sc<sup>8</sup>* loss in the Y chromosome and chromosome X loss. Indications on the modifications underlying the repair processes in sperm were detected by the increase of XO males recovered in the first brood from the group pre-treated with dihydrostreptomycin and irradiated.

A working hypothesis is presented which accounts for the results on the basis that dihydrostreptomycin changes the permeability of intracellular membranes.

### INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha reunido una evidencia experimental considerable sobre las diferencias en la radiosensibilidad entre algunas de las etapas de la espermatogénesis, explorándose extensivamente las condiciones externas e inter-

nas que afectan a los efectos genéticos de las radiaciones ionizantes en *Drosophila melanogaster*.

El estudio de la gametogénesis en los estados que preceden a las espermatogonias presenta muchos problemas; el

más crítico para *Drosophila* es la escasez de datos citomorfológicos, en contraste con el conocimiento detallado que se tiene para el ratón y para otros mamíferos (Oakberg, 1969), así como para el chapulín (Hannah-Alava), 1964. En el ratón se pueden identificar tres tipos de espermatogonias; el tipo A corresponde a las células tronco del epitelio seminífero, que mediante el proceso de renovación celular mantienen su propio número mientras dan origen a un número ilimitado de células diferenciadas. Las espermatogonias intermedias se derivan del tipo A, dividiéndose una vez para formar espermatogonias del tipo B, que a su vez se duplican para formar los espermatozoides primarios.

En *Drosophila melanogaster* se tiene alguna evidencia citológica sobre la existencia de 10 a 14 células primordiales, que está de acuerdo con la evidencia genética en favor de 13 células tronco progenitoras de los espermatozoides (Sonnenblick, 1950). Asimismo, se tienen datos sobre la reducción progresiva en el número de células tronco en relación con la edad del macho maduro, proceso que no se ha complementado con datos citológicos (Lüers, 1956; Abrahamson y Friedman, 1964; Hannah-Alava, 1964; Puro 1964). El único evento establecido en el testículo del macho maduro, consiste en la ocurrencia de cuatro divisiones sincrónicas y dicotómicas en las espermatogonias que originan un quiste de 16 espermatogonias definitivas que se transforman en 16 espermatozoides primarios (Pontecorvo, 1944; Cooper, 1950) que posteriormente dan origen a un conjunto de 64 espermatozoides. Con respecto a la secuencia de los eventos anteriores a las divisiones definitivas que ocurren en el testículo, dada la ausencia de información bien fundamentada, se asume que algunas células provenientes de la reserva de espermatogonias, se separan más o menos al azar, iniciando las divisiones definitivas, lo que deja sin

respuesta al problema de la renovación de las espermatogonias. Algunos autores opinan que las espermatogonias primarias, equivalentes a las espermatogonias del tipo A de los roedores pasan por una multiplicación dicotómica asincrónica antes de separarse y de dividirse cuatro veces para producir los quistes de 16 espermatozoides primarios (Tihen, 1946; Cooper, 1950; Kaufmann y Gay, 1963; Puro, 1964).

El procedimiento más generalmente empleado en los laboratorios de investigación para el estudio de la espermatogénesis en *Drosophila*, consiste en la separación de los descendientes de espermatozoides provenientes de células que fueron irradiadas durante alguna de las etapas de la espermatogénesis, mediante la cruce sucesiva de los machos irradiados con hembras vírgenes que oviponen posteriormente en cultivos separados (método de separación de progenies). El procedimiento, que data de las investigaciones de Muller (1928) y de Hanson y Heys (1929), ha sido utilizado por numerosos autores (Muller *et al.*, 1954, 1959; Oster, 1961; Strangio, 1962; Puro, 1963; Oster, 1963; Sobels, 1963, 1966).

La figura 1 ilustra la radiosensibilidad específica de las etapas de la espermatogénesis, según el porcentaje obtenido de letales recesivos en el cromosoma X, en machos que se cruzan inmediatamente después del tratamiento con seis hembras vírgenes que se substituyen en periodos de 48 horas. La representación esquemática de los estados que se muestran en cada progenie está basada en los trabajos de Chandley y Bateman (1962), Sävthagen (1961, 1963), Chandley (1962) y Tates y Leigh (1964). La aplicación de los diseños experimentales de estos autores posibilitó la identificación de los eventos citológicos que se suceden durante la espermatogénesis según la radiosensibilidad intrínseca, en determinadas condiciones, de las etapas correspondientes comprendidas entre las

espermatogonias y los espermatozoides maduros. Puro (1964) estudió la radiosensibilidad de los individuos provenientes de células tratadas en el estado de espermatogonia. Los cambios en la frecuencia de mutación registrados en periodos sucesivos después de la irradiación son una traducción dinámica del progreso de la espermatogénesis, ya que se muestrean sucesivamente células germinales cuya radiosensibilidad específica corresponde a los diferentes estados de la espermatogénesis durante la irradiación. Posteriormente se demostraron las diferencias en la radiosensibilidad comprendidas en el mismo estado de la espermatogénesis mediante la cruce de machos tratados por hembras en un número mayor y durante intervalos más cortos (Lüning, 1952, 1954; Baker y von Halle, 1953; Abrahamson y Telfer, 1956; Lüning y Henze, 1957; Lüning y Henriksson,

1959; Oster, 1961; Sobels, 1963, 1966; Puro, 1966).

La reducción de la fecundidad en el macho irradiado, probablemente debida a la inducción de letales dominantes (Hoenigsberg *et al.*, 1961; Hoenigsberg, 1964), es otro criterio aplicable a la localización en el tiempo, de los eventos que ocurren durante la espermatogénesis. El periodo de esterilidad se manifiesta al mismo tiempo que los primeros trans cruzamientos (crossing-over), indicando que el daño inducido en los espermatozoides y probablemente en las espermatogonias más avanzadas, constituye la causa de la esterilidad que se observa en la progenie que sigue al predominio de las espermátidas, en la que se produce la mayor proporción de letales recesivos. Auerbach (1954), Ives (1959, 1963), Strangio (1962) y Chandley (1962) encontraron que el porcentaje más alto de mutaciones producidas por irradiación con rayos X coincide con la progenie en la que se localiza la esterilidad más pronunciada que corresponde a los espermatozoides y probablemente a las primeras espermátidas tempranas. El periodo en que se presenta el grado mayor de esterilidad así como la frecuencia más alta de mutaciones está aún en discusión, aunque se localiza en un periodo muy cercano a la progenie proveniente de las espermátidas.

Kishin (1955), diseñó otro procedimiento para obtener muestras en las que predominan células en algunas de las etapas de la espermatogénesis, mediante el tratamiento por irradiación de algunos de los estadios del desarrollo larvario o pupal. El predominio de células germinales del mismo estado de la gametogénesis se confirma por la evidencia directa que proporciona el examen histológico.

Al agrupar las células en orden decreciente de radiosensibilidad, medida según la frecuencia de letales recesivos, se obtiene la siguiente clasificación (Oster,

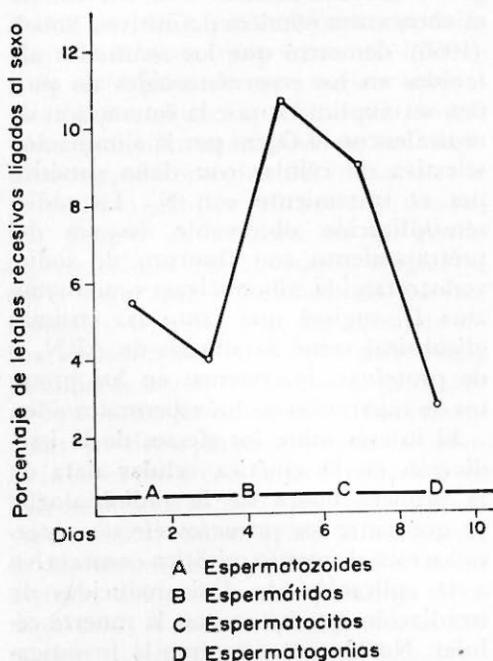


Figura 1. Radiosensibilidad diferencial durante las etapas de la espermatogénesis de *D. melanogaster*, según el porcentaje de mutaciones letales recesivas en el cromosoma X, inducidas por el tratamiento con 1,500 r.

1958a, 1958b; Ives, 1960): 1) espermatidas y espermatoцитos primarios, 2) espermatozoides en la hembra inseminada, 3) espermatoцитos secundarios, 4) espermatozoides maduros del primer día, 5) espermatozoides maduros del segundo día, 6) espermatogonias. Entre los dos extremos de esta escala de radiosensibilidad existen diferencias equivalentes aproximadamente a la multiplicación por un factor igual a 12. El análisis de las causas determinantes de esta diversidad tan notable, indica que están involucrados varios factores. En primer lugar, se pueden inducir diversos grados de daño potencial en función de las condiciones prevalentes durante la irradiación. Por otra parte, el daño potencial no se traduce en su totalidad en alteraciones genéticas detectables, sino que una proporción puede ser reparada, según el estado metabólico de la célula. No obstante, únicamente en los estados celulares más investigados, tales como las espermatidas y los espermatozoides, ha sido posible la distinción entre los factores determinantes de la sensibilidad inicial y los que intervienen en la reparación. En las dos etapas del proceso el grado de oxigenación desempeña un papel importante, como lo demuestran los experimentos en los que se comparan los efectos de los postratamientos con  $O_2$  y con  $N_2$  después de la irradiación en atmósferas de  $O_2$  o de  $N_2$  (Sobels, 1963, 1966). Los resultados indican que después de la irradiación con 3,000 r en condiciones anóxicas, la reparación de las espermatidas es favorecida por el oxígeno, mientras que la reparación de los espermatozoides es mayor en presencia de una atmósfera de nitrógeno. Por consiguientes, los efectos de los postratamientos en atmósferas diferentes en las espermatidas son contrarios a los observados en los espermatozoides. En estos experimentos Sobels empleó una línea de *Drosophila* portadora de un cromosoma X en forma de anillo, con el ob-

jeto de limitar los letales recesivos debidos a mutaciones puntuales y posiblemente a pequeñas deficiencias. En las espermatidas se obtiene la misma producción de mutaciones mediante la aplicación de 1,000 r en atmósfera de  $O_2$ , que con 3,000 r en atmósfera de  $N_2$ , con postratamiento con  $N_2$  en ambos casos, por lo que el grado de oxigenación determina la proporción de daño potencial inducido. La observación sobre el efecto de la atmósfera de  $O_2$ , que disminuye el grado de recuperación en espermatozoides, demuestra que el oxígeno no sólo posibilita un mayor daño potencial, sino que también reduce la capacidad de reparación.

La evidencia experimental sugiere que en ambos tipos de células, los efectos posteriores a la irradiación se originen en procesos enzimáticos de reparación de las lesiones potenciales que dan origen a las mutaciones o a los rompimientos cromosómicos definitivos. Sobels (1966) demostró que los resultados obtenidos en los espermatozoides no pueden ser explicados por la interacción de radicales con el  $O_2$ , ni por la eliminación selectiva de células con daño genético por el tratamiento con  $N_2$ . La radiosensibilización observable después del pretratamiento con fluoruro de sodio, yodoacetamida, ribonucleasa o actinomicina D, sugiere que tanto las enzimas glicolíticas como la síntesis de ARN, o de proteínas, intervienen en los procesos de reparación de los espermatozoides.

El interés sobre los efectos de la irradiación en la cinética celular data de la primera época de la radiobiología, ya que entre los primeros efectos observados está el retardo mitótico consecutivo a la aplicación de dosis reducidas de irradiación que no causan la muerte celular. No obstante, aunque la investigación sobre el efecto citado es muy abundante, no se ha fundamentado una teoría general sobre el retardo mitótico.

Cuando los cultivos de células en la

fase de crecimiento exponencial se irradian con una dosis de 500 r, el efecto más notable es el descenso inmediato del índice mitótico (proporción de células en mitosis) lo que se traduce en una disminución virtual en el número de células en el cultivo. La ausencia de actividad mitótica, seguida por un aumento subsecuente en el índice mitótico son dos aspectos característicos del retardo mitótico. Otro aspecto general del retardo mitótico inducido por irradiación es su efecto temporal.

Aunque los mecanismos causantes de este proceso no están bien interpretados, se tienen numerosos resultados experimentales que lo explican en parte. Puesto que el metabolismo del ADN es afectado por la irradiación, varios autores han investigado los procesos derivados de la inhibición de la síntesis del mismo (Okada, 1970). En algunos casos, el metabolismo del ADN es aparentemente normal a pesar del retardo de la división celular, como ocurre en los cultivos de tejidos, lo que sugiere que el proceso constituye una manifestación del daño inducido en alguno de los mecanismos que controlan la iniciación de la división celular. El retardo reversible debido al bloqueo en el estado  $G_2$  en células HeLa, puede originarse en el daño que se produce en los cromosomas, referible a su vez al estado de condensación del ADN que tiene lugar justamente antes, o durante el principio de la mitosis. Otras hipótesis, fundamentadas en datos experimentales, señalan la interferencia con la oxirreducción de los compuestos sulfhidrilos durante la división celular (Stern, 1956), la inhibición de los mecanismos determinantes de la división del citoplasma (Deering y Setlow, 1957) y la interferencia con la formación del huso (Okada, 1970).

En los cultivos de tejidos de mamíferos, el retardo mitótico más notable se localiza en el estado  $G_2$  o en el estado S, mientras que el retardo menos percep-

tible tiene lugar durante el estado  $G_1$ . Las diferencias entre los tres estados pueden explorarse mediante el estudio de algunos de los procesos modificados en el lapso comprendido entre la irradiación y la llegada a la mitosis consecutiva. El retardo observable durante el estado  $G_2$  se origina principalmente en el denominado "bloqueo del estado  $G_2$ " atribuible a alguno de los siguientes eventos: a) producción de aberraciones cromosómicas, b) desespiralización de los cromosomas condensados en la profase del estado M, que retroceden al estado no condensado característico de la interfase, y c) inhibición de la síntesis de las proteínas necesarias para la mitosis. El retardo de las células en el estado S se debe en parte a la depresión de la síntesis del ADN, y en parte a la prolongación del periodo  $G_2$ . El retardo de las células en el estado  $G_1$  se atribuye a la prolongación ligera del estado S, así como al alargamiento del estado  $G_2$ . Asimismo, el retardo del estado M se origina en la prolongación del estado S y del estado  $G_2$ . Por consiguiente, entre los efectos debidos a la irradiación son dos los que probablemente constituyen las causas principales del retardo mitótico: la depresión de la síntesis del ADN y el bloqueo del estado  $G_2$ , puesto que las células irradiadas en otros estados ( $G_1$  y M) se detienen al llegar a los estados S y  $G_2$ .

La espermatogénesis es un proceso continuo que tiene lugar a partir de las espermatogonias que finalmente dan origen a los espermatozoides a través de los cambios citogenéticos que caracterizan a las etapas premeióticas, a las divisiones meióticas y a la espermiogénesis. La abundante literatura que se tiene sobre la citología de las espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides, que se han examinado abundantemente con el microscopio óptico y con el microscopio electrónico, se com-

plementa con los datos obtenidos en experimentos sobre la radiosensibilidad específica que muestran las células durante cada una de las etapas citadas.

No obstante, sin el artefacto que constituye la radiación ionizante, no es posible la reconstrucción de los eventos citogenéticos que se suceden durante la

espermatogénesis, puesto que los parámetros aplicados para su delimitación en el tiempo, están basados en las diferencias en su radiosensibilidad, ya que la ocurrencia espontánea de los eventos mencionados es tan baja, que su determinación experimental resulta prácticamente imposible.

## MATERIALES Y TÉCNICAS

1. *Sistema de cruzas.* Se empleó el "sistema de cruzas Oster", para la detección de la pérdida del cromosoma X y del fragmento  $sc^8$  del cromosoma Y, así como la inducción de letales recesivos en el cromosoma X en los machos tratados. Los "machos Oster" tienen un cromosoma X en forma de anillo con los genes marcadores "yellow" (y) y Barra (B). La forma del cromosoma limita la recuperación de los letales recesivos a los que se originan en mutaciones puntuales y en pequeñas deficiencias,

ya que al fragmentarse dicho cromosoma solamente se recupera cuando al unirse los extremos libres se restituye el cromosoma original. El cromosoma Y tiene insertado un pequeño fragmento ( $sc^8$ ) del cromosoma X que contiene el alelo silvestre de "yellow" ( $y^+$ ), que a su vez impide la expresión del gene "yellow" del cromosoma X en anillo. Las hembras tienen sus cromosomas X con el marcador "yellow" (y) y las inversiones  $sc^{s1}$ , In49 y  $sc^8$  (Bridges y Brehme, 1944; Lindsley y Grell, 1967).

P  $X^{c2}$  y B/ $sc^8$  Y x y  $sc^{s1}$  In49  $sc^8$ /y  $sc^{s1}$  In49  $sc^8$   
(machos Barra) x (hembras "yellow")

F1 hembras normales ("yellow"-Barra):  $X^{c2}$  y B/y  $sc^{s1}$  In49  $sc^8$

machos normales (silvestres): y  $sc^{s1}$  In49  $sc^8$ / $sc^8$ Y

pérdida del cromosoma X: y  $sc^{s1}$  In49  $sc^8$  (machos "yellow")

pérdida de la porción  $sc^8$  del cromosoma Y:

y  $sc^{s1}$  In49  $sc^8$ /Y (machos "yellow")

Para distinguir los machos provenientes de la pérdida del cromosoma X, de los machos que provienen de la fragmentación del cromosoma Y, que carecen del fragmento  $sc^8$  portador del alelo silvestre de "yellow", se hace la prueba de fertilidad de los machos "yellow", cruzándolos con hembras vírgenes; solamente los machos con un fragmento del cromosoma Y son fértiles en contraste

con los machos XO que son estériles, ya que existen dos genes en el brazo corto y cinco genes en el brazo largo del cromosoma Y, que confieren fertilidad a los machos de *Drosophila melanogaster* (Suzuki, 1970).

El registro de las mutaciones letales recesivas inducidas en el cromosoma  $X^{c2}$  y B se hace mediante cultivos en frascos homeopáticos (cultivos individuales)

en los que se aísla la cruce de una hembra heterocigótica de la primera generación portadora del cromosoma anular:  $X^{e2}$  y  $B/y$   $sc^{s1}$   $In49$   $sc^8$ , por dos machos hermanos: y  $sc^{s1}$   $In49$   $sc^8/sc^8Y$ . La mitad de los machos descendientes en cada cultivo deben ser portadores del marcador ojos en Barra, cuya identificación en el fenotipo de los adultos es muy sencilla.

2. *Procedimiento experimental.* Se irradiaron machos adultos a la edad de 3 días que no se habían cruzado, o bien se inyectaron a los dos días de edad, irradiándolos 24 horas después de la inyección. Los machos tratados y los del grupo testigo se cruzaron con dos hembras vírgenes en cultivos individuales, con el propósito de distinguir la pérdida del cromosoma X, de la pérdida del fragmento  $sc^8$  unido al cromosoma Y, cuando alguno de los dos eventos tiene lugar durante la espermatogénesis de los machos progenitores:  $X^{e2}$  y  $B/sc^8Y$ . Los cultivos individuales se transvasaron cuatro veces renovándose las hembras al transcurrir periodos sucesivos de tres días cada uno, obteniéndose cuatro progenies al cabo de doce días. Las hembras ovipusieron en cada cultivo, eliminándolas después de cinco días. La cuenta de descendientes se hizo 16 días después de la iniciación de los cultivos individuales.

El registro de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo se hizo siguiendo el sistema de cruces indicado en los párrafos anteriores mediante cultivos individuales iniciados con individuos normales de la primera generación, apartándose aquellos cultivos entre cuyos descendientes no se encontraron machos con ojos en Barra, o bien los que presentaron machos de dicho fenotipo en una proporción menor al 10%. Los cultivos apartados como posibles portadores de letales recesivos se examinaron nuevamente después de tres días, iniciándose nuevos cultivos para obtener la tercera generación, con dos hembras heteroci-

góticas y tres o cuatro machos procedentes del mismo cultivo en cada caso. Así se obtuvieron más de 100 machos en las dos generaciones procedentes de la cruce de una hembra heterocigótica de la  $F_1$ . Después de examinar al microscopio las dos series de cultivos ( $F_2$  y  $F_3$ ), se clasificaron como portadores de letales los cultivos con menos del 5% de machos con ojos en Barra (Spencer y Stern, 1948; Baker y Edington, 1952; Levine e Ives, 1953).

Se empleó el medio de cultivo que regularmente se prepara en el laboratorio, con levadura de cerveza, harina de maíz y agar como ingredientes principales, añadiéndose tegosept y ácido propiónico para el control de microorganismos en todos los cultivos (Félix, 1969). La información sobre los detalles técnicos que posibilitaron la preparación y control de los cultivos en el volumen requerido, está contenida en publicaciones anteriores (Félix y Rodríguez, 1968 a y b; Félix, 1970 a, b y c; Félix y Salceda, 1970).

Los cultivos se mantuvieron a la temperatura de 25° C durante todo el experimento.

3. *Tratamiento con dihidroestreptomicina.* La dilución empleada de dihidroestreptomicina (Lakeside), de 400 microgramos por mililitro se determinó probando en un gradiente de concentración, la que no afectara a la viabilidad ni a la fertilidad de los adultos inyectados, ya que la concentración mayor a 1,000 microgramos por mililitro es letal. El antibiótico se administró en el abdomen empleando una micropipeta elaborada en el laboratorio (Félix y Salceda, 1964; Olivieri, 1967; Félix y Rodríguez, 1968a), con la que se inyectó un volumen aproximado de 0.22 microlitros por individuo.

4. *Irradiación.* Para la irradiación de los adultos se utilizó un equipo de rayos X Siemens Stabilipan del Departamento

de Radioterapia del Hospital General, con las siguientes constantes físicas: filtro de Cu de 0.5 mm, 250 Kv y 15 mA.

A 40 cm de la ventana se obtuvo una razón de dosis de 117 r/min. La dosis administrada fue de 2,000 r.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

*Retardo meiótico inducido por el pretratamiento con dihidroestreptomycinina.* Cuando una población celular asincrónica se expone a la radiación ionizante, se observa un descenso inmediato del índice mitótico, seguido por un incremento en la multiplicación celular, que se eleva sobre el nivel anterior al tratamiento. Los cultivos de células de mamíferos muestran dichas modificaciones del índice mitótico después de la irradiación, observándose el mismo proceso en otros tipos de células procedentes de organismos superiores (Lea, 1962). El tiempo transcurrido entre la irradiación y la recuperación del índice mitótico es, por definición, el periodo que comprende el retardo mitótico.

Aunque la información sobre los procesos modificados durante el retardo meiótico es escasa, no se tienen datos para justificar una distinción fundamental entre las conclusiones obtenidas para las células en mitosis y las observaciones derivadas de la investigación sobre el retardo meiótico.

Kaufmann y Gay (1963) lograron una especificación precisa de los estados de la espermatogénesis en *Drosophila melanogaster*, mediante un sistema de cronometría que proporciona datos complementarios sobre el tiempo que requieren los espermatoцитos primarios durante su desarrollo, para llegar a determinados estados posteriores. El sistema, basado en estudios citológicos, con aplicación de las técnicas usuales de autorradiografía, consiste en administrar timidina tritiada a larvas al principio del tercer estadio ninfal, o bien, a adultos de 2 días de edad, registrando la presencia del compuesto radiactivo en las células

durante su progreso en el testículo, dado que la timidina se incorpora a los cromosomas únicamente durante el estado S del ciclo celular, que está limitado a la interfase de los estados goniales y del espermatoцитo primario.

Estos estudios demuestran directamente la retardación en el progreso de las células durante la espermatogénesis debido a la irradiación externa, que comprende un periodo de 24 horas, según el tiempo en que se observan los primeros espermatoцитos y los primeros espermatozoides marcados (Tabla 1).

En el presente experimento se demuestra que el pretratamiento con dihidroestreptomycinina induce un retardo meiótico que es aditivo, o más notable que el producido por la dosis de irradiación de 2,000 r. Mediante el diseño experimental descrito, se separan progenies originadas en espermatozoides provenientes de células tratadas con el antibiótico e irradiadas en etapas de la espermatogénesis que difieren en su radiosensibilidad intrínseca, observándose un desplazamiento de la progenie proveniente del tratamiento de la etapa de mayor radiosensibilidad, hacia la derecha, al comparar con el grupo al que no se administró el antibiótico (Fig. 2, tablas 2 y 3). Los eventos genéticos examinados para la determinación de la radiosensibilidad son: el porcentaje de mutaciones letales recesivas en el cromosoma X anular ( $X^{e2}$  y B) y la frecuencia con que ocurre la pérdida del fragmento  $sc^8$  del cromosoma X translocado al cromosoma Y. Ambos eventos se desplazaron en la escala del tiempo de la progenie de 3 a 6 días a la progenie de 6 a 9 días posteriores a la irradiación. Ives

TABLA I

CÉLULAS GERMINALES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* CON ADN MARCADO ( $H^3$ )  
 LOS MACHOS SE DESARROLLARON A 25°C DESPUÉS DE SER ALIMENTADOS CON TIMIDINA TRITIADA  
 DURANTE LAS 4 PRIMERAS HORAS DEL TERCER ESTADIO LARVARIO  
 (Tomado de Kaufmann, 1963)

Horas después de la eclosión y estado de desarrollo	Horas después del tratamiento con $H^3$	Células marcadas más avanzadas	
		Control	Irradiadas
Tercer estadio	36	Espermatocitos primarios tempranos	Espermatogonias
Pupario	48	Espermatocitos primarios	Algunos espermatocitos primarios tempranos.
Pupa temprana	72	Algunos espermatocitos secundarios	Espermatocitos primarios
Pupa intermedia	96	Espermátidas tempranas	Espermatocitos secundarios
Pupa tardía	120	Espermátidas alargadas	Espermátidas tempranas
Adulto recién emergido	146	Espermátidas tardías	Espermátidas alargadas
Adulto de 12 hs.	158	Algunos espermatozoides	Espermátidas tardías
Adulto de 36 hs.	182	Espermatozoides	Algunos espermatozoides

(1960) y Sobels (1966) demostraron que la etapa de la espermatogénesis que muestra mayor esterilidad corresponde a los espermatoцитos. En el presente experimento la etapa de mayor radiosensibilidad, cuando este parámetro se determina según los dos eventos examinados, corresponde también a los espermatoцитos, ya que el retardo meiótico inducido en estas células prolonga el lapso que transcurre entre las divisiones meióticas y la secuencia posterior de maduración de los espermatozoides a partir de las espermatídas.

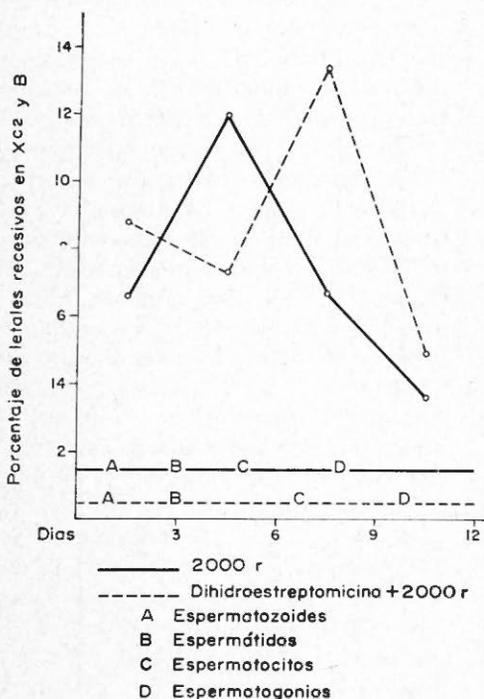


Figura 2. Retardo meiótico resultante del pretratamiento con dihidroestreptomicina e irradiación con 2,000 r en machos adultos de *D. melanogaster*.

En la figura 2 se ilustra el alargamiento del lapso que transcurre entre los espermatoцитos, identificados por su alta frecuencia de mutación, y la espermiogénesis. El efecto de retardo producido por la dihidroestreptomicina sobre

diversos tipos celulares tiene lugar en los espermatoцитos, que son las últimas células que se dividen durante la espermatogénesis.

Los autores del diseño experimental descrito estiman que su posible aplicación a los organismos multicelulares puede aclarar algunos de los efectos de las sustancias que retardan a la división celular, tanto al nivel citológico como al nivel molecular.

Algunos efectos de la irradiación tienen lugar cuando se aplica radiación ionizante densa, que induce daño en las estructuras celulares submicroscópicas que no son modificables por una ionización aislada, fragmentándose por el impacto de varias ionizaciones simultáneas dentro de un volumen reducido. Bacq y Alexander (1966) propusieron a las barreras intracelulares como estructuras involucradas en el daño inducido por irradiación ionizante, cuya ruptura posibilita la liberación de enzimas. El efecto amplificador que muestra el oxígeno sobre el daño biológico producido por radiaciones de baja transferencia lineal de energía, puede partir de la cadena autooxidativa iniciada por una ionización, que destruye a las barreras mencionadas constituidas, en parte, por fosfolípidos.

Es bien conocido el efecto de la radiación ionizante que conduce a la formación de diversos peróxidos en el material biológico, que pueden ser tóxicos para la célula (Latarjet, 1958). Los peróxidos originados en el ADN y en el ARN (Weiss, 1958), en los aminoácidos y péptidos (Okada, 1958), y en los lípidos, son materia de investigación radiobiológica. Algunos autores han enfocado atención especial en la peroxidación de los lípidos (Horgan *et al.*, 1957; Wills y Wilkinson, 1967), ya que estos compuestos son constituyentes significativos de las membranas intracelulares. Como un efecto derivado de tal proceso, las proteínas (Tsen y Collier, 1960; Wills

TABLA 2

PORCENTAJE DE LETALES RECESIVOS EN EL CROMOSOMA X<sup>2</sup> Y B EN LAS PROGENIES DE CADA UNO DE LOS GRUPOS. EL NÚMERO DENTRO DEL PARÉNTESIS CORRESPONDE A LOS INDIVIDUOS CON LETALES RECESIVOS ENTRE 400 MACHOS DE CADA PROGENIE

Progenie (días)	0 a 3	3 a 6	6 a 9	9 a 12
Testigo	0.00	0.00	0.00	0.00
Dihidroestreptomicina	0.00	0.00	0.00	0.00
2,000 r	(26) 6.50 ± 1.27%	(47) 11.75 ± 1.71%	(26) 6.50 ± 1.27%	(14) 3.50 ± 0.51%
Dihidroestrep. + 2,000 r	(35) 8.75 ± 1.48%	(29) 7.25 ± 1.35%	(53) 13.25 ± 1.82%	(19) 4.75 ± 1.09%

TABLA 3

PORCENTAJE DE MACHOS CON PÉRDIDA DEL FRAGMENTO SC<sup>8</sup> EN EL CROMOSOMA Y, EN LAS PROGENIES DE CADA UNO DE LOS GRUPOS

Progenie (días)	0 a 3	3 a 6	6 a 9	9 a 12
Testigo	(0/1,616)	(0/1,349)	(0/820)	(0/690)
Dihidroestreptomicina	(0/906)	(0/985)	(0/1,406)	(0/616)
2,000 r	(0/460)	(3/704)	(1/331)	(1/442)
Dihidroestrep. + 2,000 r	(0/351)	0.43 ± 0.25%	0.30 ± 0.30%	0.23 ± 0.23%
		(0/427)	(1/319)	(2/407)
			0.31 ± 0.31%	0.49 ± 0.32%

TABLA 4

PORCENTAJE DE MACHOS X/O EN LAS PROGENIES DE CADA UNO DE LOS GRUPOS

Progenie (días)	0 a 3	3 a 6	6 a 9	9 a 12
Testigo	(4/1,620) 0.25 ± 0.12%	(4/1,353) 0.30 ± 0.15%	(2/822) 0.24 ± 0.17%	(2/692) 0.29 ± 0.20%
Dihidroestreptomicina	(4/910) 0.44 ± 0.22%	(7/992) 0.71 ± 0.27%	(11/1,417) 0.78 ± 0.24%	(3/619) 0.48 ± 0.28%
2,000 r	(4/464) 0.86 ± 0.43%	(9/713) 1.26 ± 0.42%	(7/388) 2.07 ± 0.78%	(4/446) 0.90 ± 0.45%
Dihidroestrep. + 2,000 r	(9/360) 2.50 ± 0.83%	(7/434) 1.61 ± 0.60%	(6/325) 1.85 ± 0.76%	(3/410) 0.73 ± 0.42%

y Wilkinson, 1966), los cofactores, los electrolitos, etcétera, salen de las células, o bien se desprenden de las partículas subcelulares (Wills y Wilkinson, 1967) causando disturbios notables en la fisiología celular.

Misra *et al.* (1965) demostraron una reducción significativa del contenido en fosfolípidos y en colesterol libre de los tejidos del cerebro del cobayo, posterior a la inyección intramuscular de una solución salina de sulfato de dihidroestreptomomicina. Por otra parte, Finkelstein y Cass (1967) encontraron una disminución de la permeabilidad al agua de algunas membranas en función de su contenido de colesterol.

La depresión de la síntesis del ADN y de la división celular por la irradiación ionizante se han explorado ampliamente en poblaciones asincrónicas de células, con relación a los cuatro componentes más importantes que pueden intervenir en el proceso: los trifosfatos de ribonucleósidos, las enzimas, principalmente la polimerasa, las desoxirribonucleoproteínas y los activadores ( $Mg^{2+}$  y otros iones divalentes). Una hipótesis de trabajo sobre los mecanismos causantes de la depresión de la síntesis del ADN, señala que la radiación altera uno o varios de estos factores (Okada, 1970). Looney *et al.* (1965) demostraron la depresión de la poza de timidina como un efecto de la irradiación, que consecutivamente reduce la síntesis de ADN durante la regeneración del hígado de la rata.

La única modificación que puede ser relevante a los resultados experimentales reseñados en el presente trabajo, sobre el retardo meiótico inducido en *Drosophila* por la inyección de dihidroestreptomomicina, es la modificación de las membranas celulares, señalada por Misra *et al.* (1965) que produciría un descenso en la síntesis de ADN con la depresión consecutiva de la división celular, probablemente por la reducción de la poza

de trifosfatos de ribonucleótidos, según los resultados obtenidos por Looney *et al.* (1965).

*Pérdida del cromosoma X durante la espermiogénesis.* Los datos contenidos en la tabla 4 indican el aumento de la radiosensibilidad en la primera progenie, que corresponde a las últimas etapas de la espermiogénesis, en el grupo irradiado que se trató previamente con dihidroestreptomomicina.

Los cromosomas de los organismos superiores contienen proteínas asociadas al ADN, por lo que al investigar el daño cromosómico inducido, se deben analizar las modificaciones en el contenido proteico que pueden ser causantes de las modificaciones observadas en la radiosensibilidad.

Kaufmann y Gay (1963) hacen un estudio detallado de los cambios significativos en el contenido de proteínas asociadas al ADN durante las notables modificaciones que tienen lugar en el transcurso de la espermiogénesis, que involucra la transformación de las espermátidas en espermatozoides maduros con la pérdida de la mayor parte de los organelos citoplásmicos.

En todos los estados de la espermatogénesis de *Drosophila*, a excepción de los espermatozoides maduros, está presente una histona con alto contenido de lisina, que durante las últimas etapas de la maduración de los espermatozoides es substituida por una proteína rica en arginina.

La síntesis de proteínas en las espermátidas y en los espermatozoides es interesante, puesto que Olivieri y Olivieri (1965) demostraron que la síntesis de ARN no ocurre en las células posteriores a los espermatocitos en *Drosophila*, por lo que la síntesis de proteínas tiene lugar a partir del ARN preexistente durante la espermiogénesis. Con anterioridad se descubrió en los embriones del erizo de mar la presencia de ARN mensajero que persiste durante un tiempo

prolongado (Gross y Cousineau, 1964; Gross *et al.*, 1964).

El efecto de la dihidroestreptomicina sobre las membranas celulares en la espermiogénesis puede ser un factor significativo durante la inducción y la reparación del daño genético debido a la irradiación, que en este experimento se traduce como un incremento en la frecuencia de la pérdida del cromosoma X anular.

Las nucleasas tienen interés especial en radioquímica, al considerar las modificaciones que se pueden originar en los ácidos nucleicos por la irradiación ionizante. Roth y Eichel (1959) demostraron una disminución significativa en

la actividad de la ribonucleasa total en las fracciones subcelulares del bazo de la rata, así como un aumento correspondiente en el sobrenadante, después de la irradiación total con 600 r, lo que favorece a la hipótesis de la liberación enzimática inducida por la irradiación, postulada por Bacq y Alexander (1966).

Sobels (1964) demostró que el post-tratamiento con ribonucleasa aumenta la frecuencia de la mutación en los espermatozoides irradiados, lo que sugiere indirectamente la importancia que tiene la liberación de enzimas intracelulares durante los procesos de reparación del daño genético inducido por la irradiación de los espermatozoides.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento al doctor Rodolfo Díaz Perches y a los físicos Víctor Tovar, Jesús Velázquez y Noé Gómez del Departamento de Radioterapia del Hospital General, por las facilidades de equipo que pro-

porcionaron, así como por su colaboración durante la irradiación del material biológico.

Se agradecen las sugerencias, así como la cuidadosa revisión de este trabajo por el Dr. Rafael Villalobos-Pietrini.

#### LITERATURA

- ABRAHAMSON, S. y J. D. TELFER, 1956. The relative constancy of the X-ray induced mutation frequency of *Drosophila melanogaster* sperm in inseminated females. *Genetics* 41: 677-684.
- ABRAHAMSON, S. y E. FRIEDMAN, 1964. X-ray induced mutations in spermatogonial cells of *Drosophila* and their dose frequency relationships. *Genetics* 49: 357-361.
- AUERBACH, C., 1954. Variations in the response of *Drosophila* germ cells to mutagens. *Caryologia, Vol. Suppl.*: 690-692.
- BACQ, Z. M. y P. ALEXANDER, 1966. *Fundamentals of radiobiology*. Pergamon, Oxford.
- BAKER, W. K. y C. W. EDINGTON, 1952. The induction of translocations and recessive lethals in *Drosophila* under various oxygen concentrations. *Genetics* 37: 665-677.
- BAKER, W. K. y E. S. VON HALLE, 1953. The basis of the oxygen effect on X-irradiated *Drosophila* sperm. *Proc. natn. Acad. Sci.* 39: 152-161.
- BRIDGES, C. B. y K. S. BREHME, 1944. *The mutants of Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst., Washington Pub.
- CHANDLEY, A. C., 1962. The induction of mutations in spermatocytes of *Drosophila melanogaster* with X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 5: 305-321.
- CHANDLEY, A. C. y A. J. BATEMAN, 1962. Timing of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* using tritiated thymidine. *Nature* 193: 299-300.
- COOPER, K. W., 1950. Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In: Demerec, M. (Ed.) *Biology of Drosophila*. Wiley, Nueva York.
- DEERING, R. A. y R. B. SETLOW, 1957. Inhibition of cell division of *Escherichia coli* by low doses of ultraviolet light. *Science* 126: 397-398.
- FÉLIX, R. y V. M. SALCEDA, 1964. A technique for microinjection in *Drosophila*. *Drosoph. Inf. Serv.* 39: 135.

- FÉLIX, R. y R. RODRÍGUEZ, 1968a. A microinjection technique for *Drosophila*. *Drosoph. Inf. Serv.* 43: 180.
- FÉLIX, R. y R. RODRÍGUEZ, 1968b. Actinomycin D effects on the frequency of X-chromosome loss and non-disjunction in *Drosophila melanogaster* females. *An. Inst. Biol. Univ. Nat. Autón. México* 39. Ser. Biol. Exp. (1): 13-21.
- FÉLIX, R., 1969. Control of bacterial contamination in *Drosophila* food medium. *Drosoph. Inf. Serv.* 44: 131.
- FÉLIX, R., 1970a. High speed stirrer and mixer for *Drosophila* food medium. *Drosoph. Inf. Serv.* 45: 178.
- FÉLIX, R., 1970b. Durable plastic foam plugs used as stoppers for bottles and vials. *Drosoph. Inf. Serv.* 45: 182.
- FÉLIX, R., 1970c. A food medium dispenser device for filling vials. *Drosoph. Inf. Serv.* 45: 187.
- FÉLIX, R. y V. SALCEDA, 1970. A motorized, water-flown device to wash rapidly large numbers of culture bottles and vials. *Drosoph. Inf. Serv.* 45: 180-181.
- FINKELSTEIN, A. y C. CASS, 1967. Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes. *Nature* 216: 717-718.
- GROSS, P. R. y G. H. COUSINEAU, 1964. Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. *Expl. Cell Res.* 33: 368-395.
- GROSS, P. R., L. I. MALKIN y W. A. MOYER, 1964. Templates for the first proteins of embryonic development. *Proc. natn. Acad. Sci.* 51: 407-414.
- HANNAH-ALAVA, A., 1964. The brood-pattern of X-ray-induced mutational damage in the germ cells of *Drosophila melanogaster* males. *Mutation Res.* 1: 414-436.
- HANSON, F. B. y F. HEYS, 1929. Duration of the effects of X-rays on male germ cells in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* 63: 511-516.
- HOENIGSBERG, H. F., E. GALLUCI y A. GIARELLI, 1961. The oxygen effect in irradiated mature and meiotic germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 17: 1-8.
- HOENIGSBERG, H. F., 1964. Non linearity in dominant lethals induced with irradiation in *Drosophila melanogaster*. *Caldasia* 9: 129-136.
- HORGAN, V. J., J. ST. L. PHILPOT, B. W. PORTER y D. B. ROODYN, 1957. Toxicity of autoxidized squalene and linoleic acid, and of sim-  
pler peroxides in relation to toxicity of radiation. *Biochem. J.* 67: 551-565.
- IVES, P. T., 1959. The relationship between radiation dose and dominant visible mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 44: 968-978.
- IVES, P. T., 1960. The effects of gamma rays on fecundity and mutagenesis in Oregon-R males of *Drosophila*. *Int. J. Radiat. Biol.* 2: 54-67.
- IVES, P. T., 1963. Patterns of spontaneous and radiation induced mutation rates during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 48: 981-995.
- KAUFMANN, B. P. y H. GAY, 1963. Cytological evaluation of differential radiosensitivity in spermatogenous cells in *Drosophila*. In: Sobels, F. H. (Ed.) *Repair from genetic radiation damage*. Pergamon, Oxford; pp. 375-412.
- KISHIN, A. F. E., 1955. The response of the immature testis of *Drosophila* to the mutagenic action of X-rays. *Z. indukt. Abstamm.-u. Vererbungslehre* 87: 97-112.
- LATARJET, R. (Ed.), 1958. *Organic peroxides in radiobiology*. Pergamon, Londres.
- LEA, D. E., 1962. *Actions of radiations on living cells*. Camb. Univ. Press.
- LEVINE, R. P. y P. T. IVES, 1953. Mutation rates and lethal gene frequencies in populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. natn. Acad. Sci.* 39: 817-823.
- LINDSLEY, D. L. y E. H. GRELL, 1967. *Genetic variations of Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Washington Pub.
- LOONEY, W. B., L. O. CHANG, S. S. WILLIAMS, J. FORSTER, I. C. HAYDOCK y F. W. BANGHART, 1965. An autoradiographic and biochemical study of the effects of radiation on deoxyribonucleic acid synthesis in the intact animal. *Radiat. Res.* 24: 312-323.
- LÜERS, H., 1956. Examination of the number of active primary germ cells in the late imago of *Drosophila*. *Drosoph. Inf. Serv.* 30: 132-133.
- LÜNING, K. G., 1952. X-ray induced chromosome breaks in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 38: 321-338.
- LÜNING, K. G., 1954. Effects of oxygen on irradiated males and females of *Drosophila*. *Hereditas* 40: 295-312.
- LÜNING, K. G. y A. HENZE, 1957. The recovery phenomenon after irradiation in *Drosophila melanogaster*. III. The inactivation dose of the recovery process. *Hereditas* 43: 571-577.

- LÜNING, K. G. y H. O. HENRIKSSON, 1959. Recoverable lethal mutations in *Drosophila* sperm. *Nature* 138: 1211-1212.
- MISRA, R., U. K. MISRA y T. A. VENKITASUBRAMANIAN, 1965. Effect of dihydrostreptomycin on tissue lipid of guinea-pigs. *Nature* 207: 869-870.
- MULLER, H. J., 1928. The measurement of gene mutation rate in *Drosophila*, its high variability and its dependence upon temperature. *Genetics* 13: 297-357.
- MULLER, H. J., L. H. HERSKOWITZ, S. ABRAHAMSON e I. I. OSTER, 1954. A nonlinear relation between X-ray dose and recovered lethal mutations in *Drosophila*. *Genetics* 39: 741-749.
- MULLER, H. J., 1959. Advances in radiation mutagenesis through studies on *Drosophila*. *Prog. nucl. Energy Ser.* 6: 145-160.
- OKBERG, E. F., 1969. Relative biological effectiveness of gamma rays, X-rays, protons, and neutrons for spermatogonial killing. *ORNL-P-3085, Conf.* 670305-5
- OKADA, S., 1958. Formation of hydroperoxides from certain aminoacids and peptides in aqueous solutions by irradiation in the presence of oxygen. In: Latarjet, R. (Ed.) *Les peroxydes organiques en radiobiologie*. Masson, Paris.
- OKADA, S., 1970. Radiation effects on cell progress through the life cycle. In: Altman K. I., G. B. Gerber y S. Okada. (Eds.) *Radiation biochemistry*. Academic Press, Nueva York.
- OLIVIERI, G., y A. OLIVIERI, 1965. Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 2: 366-380.
- OLIVIERI, G., 1967. Comunicación personal.
- OSTER, I. I., 1958a. Frequency-dosage relations for mutations following X irradiation of sensitive and resistant germ cells. In: Wright, S. (Ed.) *Proc 10th Int. Congr. Genet.* Univ. of Toronto Press: 210-211.
- OSTER, I. I. 1958b. The spectrum of sensitivity of *Drosophila* germ cells stages to X irradiation. In: Martin, J. H. (Ed.) *Radiation biology. Proc. Ind. Australasian Conf. on Radiat. Biol.* Butterworths; pp. 253-271.
- OSTER, I. I., 1961. On recovery in X irradiated Germ Cells. *J. cell. comp. Physiol.* 58 Suppl. 1:203-207.
- OSTER, I. I., 1963. The mutational spectrum with special reference to the induction of mosaics. In: Sobels, F. H. (Ed.) *Repair from genetic radiation damage*. Pergamon, Oxford: 51-61.
- PONTECORVO, G., 1944. Synchronous mitoses and differentiation, sheltering the germ track. *Drosoph Inf. Serv.* 18:54-55.
- PURO, J., 1963. The brood pattern of X-ray induced crossing-overs in *Drosophila melanogaster* males. In: Geerts, S. J. (Ed.) *Genetics Today, Proc. 11th Int. Congr. Genet.*, Pergamon, Oxford; Vol. 1, p. 69.
- PURO, J., 1964. Temporal distribution of X-ray recessive lethals and recombinants in the post-sterile broods of *Drosophila melanogaster* males. *Mutation Res.* 1: 268-278.
- PURO, J., 1966. Mutational response of the premeiotic germ-cell stages of adult *Drosophila melanogaster* males to X-irradiation. *Annl. zool. Fenn.* 3: 9-126.
- ROTH, J. S. y H. J. EICHEL, 1959. The effect of total body X-irradiation on the distribution of ribonuclease activity in subcellular fractions of rat spleen. *Radiat. Res.* 11: 572-581.
- SÄVHAGEN, R., 1961. The effect of oxygen concentration on the frequency of induced XO males and non-disjunction females after irradiation of *Drosophila* males. *Hereditas* 47: 163-189.
- SÄVHAGEN, R., 1963. Cell stages and differential sensitivity to irradiation in males of *Drosophila melanogaster*. In: Sobels, F. H. (Ed.) *Repair from genetic radiation damage*. Pergamon, Oxford; pp. 343-353.
- SOBELS, F. H., 1963. Repair and differential radiosensitivity in developing germ cells of *Drosophila* males. In: Sobels, F. H. (Ed.) *Repair from genetic radiation damage*. Pergamon, Oxford; pp. 179-197.
- SOBELS, F. H., 1964. *Genetics Today. Proc. 11th Int. Congr. Genet., The Hague.* In: Geerts, S. J. (Ed.) Pergamon, Oxford; Vol. 2, pp. 235-255.
- SOBELS, F. H., 1966. Processes underlying repair and radiosensitivity in spermatozoa and spermatids of *Drosophila*. In: *Genetical aspects of radiosensitivity: mechanisms of repair*. I. A. E. A. Vienna, pp. 49-65.
- Sonnenblick, B. P., 1950. The early embryology of *Drosophila melanogaster*. In: Demerec, M. (Ed.) *Biology of Drosophila*. Wiley, Nueva York; pp. 62-167.
- SPENCER, W. P. y C. STERN, 1948. Experiments to test the validity of the linear r-dose/mutation frequency relation in *Drosophila* at low dosage. *Genetics* 33: 43-74.
- STERN, H., 1956. Sulfhydryl compounds and cell division *Science* 124: 1291-1293.

- STRANGIO, V. A., 1962. Radiosensitivity during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* 46: 145-149.
- SUZUKI, D., 1970. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. *Science* 170: 695-706.
- TATES, A. D. y B. LEIGH, 1964. Differential radiosensitivity for lethals and XO males in the pupal testis. *Drosoph. Inf. Serv.* 39: 108-109.
- TIHEN, J. A., 1946. An estimate of the number of cell generations preceding sperm formation in *Drosophila melanogaster*. *Am. Nat.* 80: 389-392.
- TSEN, C. C. y H. B. COLLIER, 1960. The protective action of tocopherol against haemolysis of rat liver erythrocytes by dialuric acid. *Can. J. Biochem. Physiol.* 38: 957-967.
- WEISS, J., 1958. Some effects of oxygen and the radiation induced formation of hydroperoxides from nucleic acids and related compounds. In: Latarjet, R. (Ed.) *Organic peroxides in radiobiology*. Pergamon, Londres.
- WILLS, E. D. y A. E. WILKINSON, 1966. Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. *Biochem. J.* 99: 657-671.
- WILLS, E. D. y A. E. WILKINSON, 1967. The effect of irradiation on lipid peroxide formation in subcellular fractions. *Radiat. Res.* 31: 732.