

00381

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

50

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DEL EFECTO MODULADOR DE
DIVERSOS COMPUESTOS SOBRE EL DAÑO
INDUCIDO POR LA IRRADIACIÓN CON
NEUTRONES MEDIANTE LA PRUEBA SMART EN
Drosophila

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A:

M. en C. JOSÉ FERNANDO ZAMBRANO ACHIRICA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JUDITH ISABEL GUZMÁN RINCÓN

2008-10



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
OFICIO: FCIEN/DEP/1654/2000

DRA. JUDITH ISABEL GUZMAN RINCON
Presente .

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) alumno(a) **M. EN C. JOSE FERNANDO ZAMBRANO ACHIRICA**, quién desarrolló el trabajo de tesis titulado: "EVALUACION DEL EFECTO MODULADOR DE DIVERSOS COMPUESTOS SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA IRRADIACION CON NEUTRONES MEDIANTE LA PRUEBA SMART EN DROSOPHILA"

Así mismo, les comunico a los siguientes miembros que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, los ha designado como sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS (BIOLOGIA).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DR.	RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI
PRIMER VOCAL	: DRA.	ROSARIO RODRIGUEZ ARNAIZ
SEGUNDO VOCAL	: DRA.	JUDITH ISABEL GUZMAN RINCON
TERCER VOCAL	: DRA.	MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
SECRETARIO	: DRA.	SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO
SUPLENTE	: DR.	MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO
SUPLENTE	: DR.	JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 19 de octubre de 2000
JEFE DE LA DIVISIÓN

DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

Arbol del conocimiento
...si comen de este árbol se aliviarán vuestros
ojos y conocerán el bien y el mal, serán como
dioses...(Génesis, 3.4)

CARMINA

Mi amante esposa. Sólo tu sabes lo que significa esta tesis para nosotros...

Eres como mi estrella favorita en mi cielo.

Fernando y Trinidad

Mis padres, a quienes les debo, no sólo la vida sino los valores que me enseñaron.

Isaías y Estela

Gracias queridos suegros, por su afecto y por haber depositado a Carmina en mis manos.

Alejandra

Con tu llegada iluminaste nuestro matrimonio. Estamos orgullosos y tenemos un gran amor por ti.

Adriana

Fuiste una segunda luz en nuestro hogar... y un primer cambio en nuestras vidas. Te queremos mucho.

Fernanda

Nuestra pequeña. Nunca pensamos que nos pudieras dar tantas alegrías. Tu presencia unió más nuestra familia. Te amamos.

Eduardo

Representas al *hijo* que deseamos. Ojalá que siempre estés con nosotros... aunque sea de corazón.

Edith, Alfonso, Alfonso

Manita, es una dicha que la vida siempre nos ha mantenido unidos. A ti, mi gran cuñado y a mi sobrino, DJ.

**Paco, Jenny, Lizania, Cynthia, Hanssi, Javier, Javiercito y
Brandon**

Gracias por haber compartido toda su vida con nosotros. Siempre juntos.

Mónica e Ignacio

Que siempre estén unidos y con la alegría que los identifica.

Dra. Judith Guzmán Rincón

Ing. Lydia Paredes Gutiérrez

Judith, sin tu presencia, este trabajo nunca se hubiera realizado. Gracias por el apoyo que me brindaron en los momentos que más lo necesitaba.

Un agradecimiento muy especial por su ayuda y comentarios a:

M. en C. Olga Olvera R., Biól. Susana Murillo R., M.en C. Patricia Ramírez V., Biól. Carolina Arceo M., T. Dora Luz Barrón M., M. en C. Arturo Delfín L., Dr. Ulrich Graf, Dr. Fernando Ureña N., Biól. Aynet García B., Dr. Stanley Zimmering, M.en C. Matilde Breña V., Q.F.B. Lauro Reyes H., Q.F.B. Carlos H. Cruz de León, Dr. José Alanís M. y Dr. Victor Salceda S.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Materiales Radiactivos y de Biología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

Agradezco a las autoridades del ININ las facilidades otorgadas para la realización del mismo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (CONACyT) por el apoyo financiero brindado en el Proyecto No. 26007-M, así como la Beca de Cátedras Patrimoniales otorgada al autor de esta tesis, a los sinodales el apoyo, las sugerencias y sobre todo la revisión de este trabajo y a los compañeros del Reactor TRIGA Mark III las facilidades proporcionadas para la irradiación de las muestras.

Con amistad sincera para mis compañeros del ININ, especialmente para los de los Departamentos de Biología, de Materiales Radiactivos y del Reactor, así como para todos aquellos que me ayudaron a realizar esta tesis.

INDICE

1 RESUMEN	10
2 ABSTRACT	12
3 JUSTIFICACIÓN	13
4 INTRODUCCIÓN	14
4.1 ANTECEDENTES	14
4.2 NEUTRONES	15
4.3 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS NEUTRONES	17
4.4 CAPTURA DE NEUTRONES POR BORO	18
4.5 MUTACIONES INDUCIDAS POR RADIACIÓN IONIZANTE	22
4.6 ANTIMUTAGÉNESIS	25
4.7 ÁCIDO ASCÓRBICO	25
4.7.1 Actividad mutagénica del ácido ascórbico	26
4.7.2 Naturaleza de la mutagenicidad del ácido ascórbico	26
4.7.3 Ejemplos de inactivación de mutágenos por ácido ascórbico	28
4.7.4 Antigenotoxicidad del ácido ascórbico: razones y posibilidades	30
4.7.5 Sinergismo entre vitaminas y otras consideraciones importantes	32
4.8 CLOROFILINA	32
4.8.1 Evidencias de la antimutagénesis de la clorofilina	33
4.8.2 Mecanismos de acción	36
4.8.2.1 Captura de radicales libres	36
4.8.2.2 Formación de complejos moleculares con la clorofilina	37
4.8.2.3 Inhibición de las enzimas del citocromo P_{450}	37
4.9 <i>Drosophila melanogaster</i>	38
4.9.1 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
4.9.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba	41
4.10 BIOENSAYO DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS	42
4.10.1 Discos imaginales	43
4.10.2 Marcadores para la prueba de las alas	46
4.10.3 Cruzas	47

4.10.4 Tratamiento de las larvas	48
4.10.5 Progenie resultante de las cruzas	48
4.11 SISTEMA CITOCROMO P_{450}	48
4.11.1 Citocromo P_{450}	48
4.11.2 Reacciones catalizadas por el citocromo P_{450}	50
4.11.3 Funciones metabólicas del citocromo P_{450}	51
4.11.4 Inducción e inhibición del citocromo P_{450}	51
5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
5.1 HIPÓTESIS	53
5.2 OBJETIVOS	53
5.3 OBJETIVOS PARTICULARES	53
6 DESARROLLO EXPERIMENTAL	55
6.1 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO	55
6.2 PROLIFERACIÓN DE MOSCAS	55
6.3 AISLAMIENTO DE MOSCAS POR SEXO	56
6.4 CRUZAS	57
6.5 OBTENCIÓN DE LARVAS	57
6.6 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE IRRADIACIÓN	57
6.7 TRATAMIENTO CON MODULADORES	60
6.7.1 Ácido ascórbico y clorofilina	60
6.7.2 Ácido bórico (H_3BO_3)	60
6.7.2.1 Determinación de las dosis subtóxicas	60
6.7.2.2 Pretratamiento con ácido bórico	61
6.8 PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA SU IRRADIACIÓN	61
6.9 ELABORACIÓN DE PREPARACIONES	62
6.10 ANÁLISIS EN ADULTOS	62
6.11 PROGENIE	63
6.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE SMART	64
6.13 MAPEO DEL FLUJO DE NEUTRONES	65
7 RESULTADOS	66
7.1 CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE ALAS Y CÉLULAS ANALIZADAS	67
7.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE IRRADIACIÓN CON NEUTRONES	68
7.3 INFLUENCIA DE LA EDAD LARVAL EN LAS FRECUENCIAS EN CÉLULAS SOMÁTICAS	68

7.4 RESULTADOS CON LOS MODULADORES DEL DAÑO INDUCIDO CON NEUTRONES	69
7.4.1 Ácido ascórbico	70
7.4.2 Clorofilina	71
7.4.3 Ácido bórico	73
8 DISCUSIÓN	102
8.1 RESPUESTA DEL SISTEMA SMART A LA EXPOSICIÓN AL FLUJO DE NEUTRONES	102
8.2 FUNCIÓN ANTIGENOTÓXICA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO ANTE LOS DAÑOS NEUTRÓNICOS	106
8.3 COMPORTAMIENTO ANTIMUTAGÉNICO DE LA CLOROFILINA ANTE LOS DAÑOS NEUTRÓNICOS	109
8.4 SINERGISMO ENTRE EL B Y LOS NEUTRONES	112
9 CONCLUSIONES	114
9.1 RESPUESTA DEL SISTEMA SMART AL DAÑO INDUCIDO POR NEUTRONES	114
9.2 INFLUENCIA DE LA EDAD LARVARIA EN LA FRECUENCIA DE MANCHAS	114
9.3 EFECTO DE LOS MODULADORES QUÍMICOS EN EL DAÑO INDUCIDO POR NEUTRONES	114
9.3.1 Efecto del ácido ascórbico ante el daño inducido con neutrones	115
9.3.2 Efecto de la clorofilina ante el daño inducido con neutrones	115
9.3.3 Efecto del ácido bórico en la captura de neutrones por Boro	116
10 REFERENCIAS	117

1.

RESUMEN

Se ha empleado el ensayo de mutación y recombinación en células somáticas (Somatic Mutation and Recombination Test: SMART) en *Drosophila melanogaster* para la detección de diversos agentes químicos con actividad genotóxica. En este trabajo se estudiaron los efectos biológicos de ciertos moduladores químicos ante la irradiación con neutrones térmicos del reactor TRIGA Mark III de México usando el sistema SMART para alas.

Con las potencias del reactor de 300 y 1000 kW, se encontró una relación directa entre la razón de dosis y los efectos estudiados. Las dosis absorbidas fueron de 1.5992 y 3.1986 Gy para la potencia de 300 kW y de 0.8425 y de 1.6852 Gy para la de 1000 kW. Se observó una proporción lineal entre la dosis de radiación y las frecuencias de mutación y recombinación en células somáticas. Se presentó influencia de la edad larval para las frecuencias de mutación y recombinación, siendo mayores para larvas de 96 h que para las de 72 h, aunque en las primeras las manchas fueron muchas y pequeñas y en las de 72 h, pocas y grandes. El análisis de la progenie con balanceador heterocigoto dio una respuesta lineal, aunque menor que la encontrada en las moscas con marcador transheterocigoto.

Se probaron tres moduladores químicos: la vitamina C ó ácido ascórbico (AA), la clorofilina (CLNA) y el ácido bórico (AB). El AA es la forma enólica de la 3-ceto-L-glucofuranolactona y esta relacionado con el proceso de transporte de electrones donde actúa como un agente reductor. La CLNA es una sal de sodio y cobre derivada de la clorofila, cuando se presentan ciertas condiciones *in vivo*, se ha demostrado que ambas sustancias son antimutagénicas en diversos organismos como en *Drosophila*. Usando el sistema SMART, a larvas de 72 h de edad de las cruza estándar (ET) y de bioactivación elevada (BE), se les dio un pretratamiento con AA (concentraciones subtóxicas de 71 y 285 mM) o CLNA (45.5 y 182 mM). 24 h después se irradiaron con neutrones térmicos y rápidos a la potencia de 1000 kW, a 41 min 40 seg. Posterior a la irradiación se disectaron las alas de los adultos y se analizaron al microscopio a 400X. No hubo diferencias en las frecuencias de manchas, entre los grupos pretratados y el testigo a las concentraciones subtóxicas, sin embargo, estas aumentaron de 0.4 hasta 7.4 en los grupos irradiados. En los animales pretratados e irradiados se encontró una reducción del 35% para el AA, independientemente del tipo de cruza. Para la CLNA la disminución fue de 18.5% para la cruza ST y del 49.6% para la cruza BE. Se discuten los mecanismos involucrados.

La terapia de captura de neutrones por boro (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT) es un tratamiento binario para tumores del cerebro que está basado en la reacción que se presenta entre el ^{10}B y los neutrones térmicos. Un neutrón de baja energía es capturado por el núcleo, que se desintegra en dos muy ionizantes: un núcleo de Litio y otro de Helio, este último es una partícula alfa con una alta transferencia lineal de energía. Se encontró

un efecto sinérgico en el SMART provocado por la presencia del ^{10}B del ácido bórico, a concentraciones de 0.25 y 1.0 mM, en el momento de la irradiación con neutrones térmicos. Estos efectos son dependientes de la concentración del boro en el momento de la irradiación y sólo se observó en la cruza ET pero no en la BE, posiblemente porque el boro ya no estuvo presente en el momento de la irradiación, debido al metabolismo acelerado propio de la cruza BE. Estos resultados dan la posibilidad de usar el SMART para estudios radiobiológicos para la BNCT.

2.

ABSTRACT

Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *D. melanogaster* have been used for detection of chemicals with genotoxic activity. SMART of wings was used to detect those biological effects induced by thermal neutrons from the TRIGA Mark III reactor in Mexico, in order to determine the dose rate effect, two different potencies of the reactor were used, 300 and 1000 kW and two absorbed doses were proved for each potency: 1.5992 and 3.1986 Gy for 300 kW, and 0.8425 and 1.6852 Gy for 1000 kW. A linear relationship was observed between the radiation dose and the somatic recombination and mutation frequencies. Furthermore, increasing neutron dose rate resulted in increased frequencies of mutations and recombination. Moreover, the frequencies of damage were affected by larval age. In 96 h old larvae those frequencies were considerably increased, but the size of spots was smaller than in 72 h old larvae. On the other hand, the analysis of the balancer-heterozygous progeny showed a linear dose response relationship, but clearly lower than that found in the marker-trans-heterozygous flies.

With those irradiation facilities, three neutron chemical modulators were used: ascorbic acid (AA), chlorophyllin (CHLN) and boric acid (BA). Vitamin C or ascorbic acid (AA) is the enolic form of 3-keto-L-glucofuranolactone, it takes and active part in tissue metabolism and is connected with numerous electron-transport processes, where it behaves as a strong reducing agent. Chlorophyllin (CHLN) is the sodium-copper salt of chlorophyll, under certain *in vivo* conditions both substances have demonstrated to be antimutagenic in different organisms like *Drosophila*. Using SMART, 72 h age larvae of standard (ST) and improved high bioactivation crosses (IHB) were pretreated for 24h with AA or CHLN at low (71 and 45.5mM respectively) and high (285 and 182mM respectively) subtoxic concentrations. At 96 h they were irradiated with thermic and fast neutrons at a potency of 1000 kW, at 41min 40seg. After irradiation; wings of adults were dissected to be analyzed at 400X at microscope. There were not differences between pretreated groups at subtoxic concentrations and the control. Those frequencies increased from 0.4 up to 7.4 in irradiated groups. In those pretreated and irradiated groups, there were reduction of about 35% for AA despite ST or HB. For CHLN that reduction goes from 18.5% for ST until 49.6% for IHB. Probably mechanisms are discussed.

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) is a binary treatment modality for cranial tumors. It is based on the reaction occurring between the isotope ^{10}B and thermal neutrons. A low energy neutron is captured by the nucleus and it disintegrates into two densely ionizing particles: Li nucleus and He nucleus (alpha particle with high biological effectiveness). We found a synergistic effect on SMART bioassay caused by the presence of ^{10}B of boric acid, at concentrations of 0.25 and 1.0mM, in the moment of irradiation with thermal neutrons. Those effects depended on ^{10}B concentration and it was observed only for ST cross but not for IHB cross, possible because of it's accelerated metabolism B was not present at the moment of irradiation. Results give the possibility to use SMART for radiobiological studies for BNCT.

3.

JUSTIFICACIÓN

Los tumores cerebrales primarios son responsables del 2% de todas los decesos por cáncer, por esta razón mueren aproximadamente 10,000 personas anualmente en los Estados Unidos (Walker *et al.*, 1980). La mayoría de estos fallecimientos se deben a la presencia de un alto grado de gliomas, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas multiformes. Hasta el momento, no hay tratamientos satisfactorios para este tipo de tumores, sino que se recurre a dos tipos de terapias adyuvantes: la fotodinámica (Photodynamic Therapy: PDT) y la de captura de neutrones por boro (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT) (Hill *et al.*, 1992). Estas técnicas son relativamente recientes, por lo que se ha empezado a incorporar el uso de neutrones como fuente de radiación en tratamientos contra este tipo de cáncer. Esta es la razón por la cual resulta de especial interés conocer la respuesta que los seres vivos presentan ante la exposición a diferentes tipos y dosis de neutrones, así como de compuestos que puedan potenciar, modular o disminuir estos efectos. A pesar de estas aplicaciones de los neutrones, se tienen pocos estudios acerca de sus efectos biológicos, inclusive se desconocía si en el bioensayo SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) en *Drosophila melanogaster*, donde se han probado más de 350 agentes genotóxicos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995), se podía obtener alguna respuesta a los daños inducidos por neutrones. Por estas razones y por las ventajas que representa el uso del sistema SMART, aunado a la experiencia acumulada, se estudiaron en esta prueba los efectos de los neutrones, así como la influencia de diversos moduladores. De esta forma, se procedió en primer lugar a establecer si el ensayo SMART era sensible al daño inducido por neutrones, posteriormente a usar moduladores, para quienes ya se tenían antecedentes sobre sus efectos antígenotóxicos y finalmente a estudiar compuestos de boro.

4.

INTRODUCCIÓN

4.1 Antecedentes

Todos los seres vivos inclusive el hombre, están expuestos a diversos tipos de radiaciones en grado mínimo, y a una gran cantidad de agentes químicos, por lo que el resultado de algunos cambios genéticos en ellos se deben a la exposición a ambos agentes, físicos y químicos, además de los biológicos; este es el verdadero escenario de la vida en nuestro planeta. En general, los estudios de genotoxicidad se hacen tomando en cuenta los agentes físicos ó químicos por separado, pero pocos se realizan considerando esta dualidad, ya que estos trabajos son más complicados y laboriosos que cuando se toma en cuenta un solo factor (Müller, 1992). Por estas razones, se necesitan hacer experimentos en donde se consideren ambos factores para llegar a conclusiones más adecuadas, ya que cuando se observa una desviación, es difícil establecer si la respuesta a una exposición radiactiva es debida a la dosis de radiación recibida o a la interacción de todos los agentes participantes en la exposición (Vrana y Brabec, 1986). Aún así, es difícil reproducir en el laboratorio condiciones semejantes a las que se presentan en los seres vivos, ya que en organismos completos se pueden obtener diferentes respuestas, las cuales son debidas a varios factores que son difíciles de controlar en el laboratorio.

Varios sistemas biológicos o bioensayos se pueden emplear para estudiar el efecto de la radiación a dosis bajas y su interacción con agentes químicos (Zambrano, 1980), sin embargo, algunos de ellos son sumamente complicados o simplemente, no son lo suficientemente sensibles como para detectar tales efectos. Con el ensayo de Mutación y Recombinación en células Somáticas (SMART: Somatic Mutation And Recombination Test) desarrollado en *Drosophila*, es posible detectar los efectos genotóxicos, lo que permite relacionar el daño genético en las células somáticas con la actividad de diferentes agentes físicos, químicos o ambos, esto lo hace un modelo ideal para realizar estudios que contribuyan al conocimiento de los fenómenos de mutación y recombinación

(Zambrano y Guzmán, 1997). Los resultados obtenidos aportarían quizás la toma de medidas que impliquen un menor riesgo en las personas que normalmente están expuestas a diversos tipos de mutágenos (Zimmering *et al.*, 1985) ó a bajas dosis de radiación por exposición ocupacional, ó inclusive podrían usarse en radioterapia. En el caso del personal ocupacionalmente expuesto a radiaciones (POE), el uso de antimutágenos podría reducir el daño genético que pudiera presentarse en su trabajo habitual (Barquinero *et al.*, 1995).

4.2 Neutrones

Los neutrones son partículas nucleares, emitidos, en algunos casos, por radionúclidos artificiales. La fuente más común de grandes cantidades de neutrones proviene de la fisión del uranio (Meijne *et al.*, 1992; Stankus *et al.*, 1995) que es el combustible de los reactores nucleares (Balcer-Kubiczek *et al.*, 1993). La masa de los neutrones es aproximadamente igual a 1 uma, debido a que no tienen carga, tampoco existe un campo eléctrico asociado con su movimiento, por lo que no pueden ionizar directamente a los átomos de los materiales por los que viajan, pudiendo penetrar muy cerca del núcleo. También pueden ser capturados, formando un nuevo tipo de núcleo, diseminados o desviados en un proceso denominado dispersiones elásticas, de forma similar al movimiento de las bolas de billar, las cuales pueden desviarse por contacto de unas con otras. Parte de la energía del neutrón se transfiere al núcleo blanco en las dispersiones elásticas y aparece como energía cinética, esto es, energía de movimiento del núcleo blanco (Azorín, 1997). Gran parte de la energía del neutrón se transmite al núcleo de peso atómico menor que al de peso atómico alto. De acuerdo con esto, los materiales que contienen una gran cantidad de átomos de hidrógeno como el agua y la parafina, son muy efectivos para remover parte de la energía de los neutrones frenándolos o "moderándolos".

En una serie de colisiones inelásticas, en donde parte de la energía cinética inicial de los neutrones es disipada de alguna forma, estos van perdiendo cada vez más su fuerza hasta que se mueven muy lentamente y cuando alcanzan la misma energía cinética que las moléculas del medio en el que se mueven, los neutrones son llamados térmicos. Los

neutrones térmicos y los lentos son capturados rápidamente por la mayoría de los núcleos atómicos, produciéndose estructuras inestables y radiación gamma que se libera fácilmente. El átomo resultante es frecuentemente radiactivo.

Resumiendo, la energía de un neutrón es transferida por impacto a los núcleos de hidrógeno en forma de energía cinética. El resultado es una partícula cargada en movimiento, el protón, el cual es capaz de ionizar las moléculas del medio que atraviesa. Esta ionización por protones es, probablemente, el mecanismo más importante de los efectos biológicos producidos por neutrones (Arroyo *et al.*, 1986).

Existen algunos núcleos que decaen emitiendo neutrones por lo que su número de masa disminuye en una unidad por cada neutrón emitido pero su número atómico no cambia, es decir, este tipo de radiación se presenta en pocos casos. Los neutrones de importancia en la física de reactores se dividen en varias clases, de acuerdo a su energía (**tabla I**).

TABLA I. CLASIFICACIÓN DE LOS NEUTRONES

Denominación De los neutrones	Características	Intervalo de energía
• Rápidos	Neutrones de todas las energías presentes en un reactor nuclear	0.5MeV a 2MeV
• Intermedios de resonancia	Comprendidos entre lentos y rápidos	100eV a 0.5MeV
• lentos		1eV a 300eV
• epicádmicos		1eV a 10eV
• subcádmicos		> 0.6eV
• Epitérmicos	Neutrones con energía mayor que los térmicos	< 0.4eV
• Térmicos	Neutrones en equilibrio térmico con el medio ambiente	> 0.02eV
		0.025eV

Según (Azorín, 1997).

Los neutrones lentos con energías cercanas a las de los átomos de agitación térmica, y cuya energía más probable es 0.025eV a 293°K, son llamados neutrones térmicos. Neutrones lentos con energías mayores a 1eV son llamados neutrones de resonancia debido a las muchas resonancias en la sección eficaz del medio en este intervalo.

No existen radionuclidos naturales emisores de neutrones. En la aplicación práctica existen tres tipos principales de fuentes artificiales de neutrones, que son: a) fuentes

basadas en reacciones (α , n) y (γ , n) en núcleos ligeros, b) aceleradores de partículas y c) fuentes de fusión y de fisión, inducida o espontánea; estos últimos son los utilizados para desarrollar este estudio y son aquellos emitidos durante la fisión del uranio en el reactor nuclear TM-III.

4.3 Efectos biológicos de los neutrones

Se conoce muy poco acerca de los efectos biológicos inducidos por la irradiación con neutrones en células somáticas (Ayaki *et al.*, 1990). Se han hecho estudios de la efectividad biológica relativa (RBE) en cultivos de células humanas con neutrones de fisión (Peak *et al.*, 1991), en cacahuete (*Arachis hypogaea*) (Soriano, 1984) con neutrones rápidos, en frijol de soya (Davronov y Zakharov, 1986) y en *Tradescantia* (Pihet *et al.*, 1984), observándose en esta última una relación directa entre la cantidad de mutaciones y la dosis de radiación con neutrones (Underbrink *et al.*, 1978). En *Drosophila melanogaster* se hicieron estudios sobre los efectos genéticos de los rayos X, γ y neutrones, en la prueba de manchas en las alas, observándose que la inducción de mutaciones era mayor con exposición a neutrones de 2.3 MeV que de 14.1 MeV en promedio. La proliferación *in vitro* de células epiteliales de mamíferos expuestas a carcinógenos físicos como la radiación γ y los neutrones provoca una alteración en el crecimiento de estas células, dando origen a la proliferación de grupos epiteliales (GE) que pueden subcultivarse indefinidamente en condiciones en donde morirían las células testigo, sin exposición. Para estudiar los efectos producidos por la radiación se debe considerar el tipo de radiación y la razón de dosis, ya que, por ejemplo, en el caso de radiación γ , al reducir la razón de dosis disminuye el número de GE, mientras que reduciendo la razón de dosis absorbida de neutrones se incrementó la frecuencia de GE (Ullrich *et al.*, 1992). Zambrano *et al.* (1997; 1998c) obtuvieron una relación directa entre la dosis y la razón de dosis de neutrones de reactor y las frecuencias de mutación y recombinación en células somáticas en *D. melanogaster*.

En otros estudios se han obtenido gráficas de dosis-respuesta para radiación γ y neutrones rápidos, cuantificando manchas sencillas grandes y gemelas. En estos trabajos se encontraron curvas de dosis-respuesta después de la irradiación de las larvas

de 3 días de edad de la craza estándar (ET). La dosis empleada fue de 2.15 MeV de neutrones generados por un acelerador Van de Graff (Guzmán-Rincón *et al.*, 1994b). Se analizaron las alas transheterocigotas y las portadoras del cromosoma balanceador, en ambos tipos de alas no se observó una dosis-respuesta para manchas pequeñas, que pueden deberse tanto a eventos mutacionales como recombinacionales, en contraste, se obtuvieron frecuencias altas para manchas grandes en las alas con marcador transheterocigoto. Se encontraron frecuencias bajas para manchas gemelas, que son producidas exclusivamente por recombinación mitótica. La elevada actividad recombinogénica originada por la irradiación de neutrones rápidos se demuestra por la frecuencia baja de manchas observadas en las alas portadoras del cromosoma balanceador, donde son eliminados la mayoría de todos los eventos recombinacionales (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

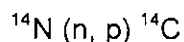
Algunos autores han encontrado diferencias entre la RBE de las radiaciones ionizantes y los neutrones de reactor (Conklin y Smith, 1969; Kappas *et al.*, 1972; Murakami, 1973; Muramatsu *et al.*, 1973; Shellabarger *et al.*, 1974; Broerse *et al.*, 1981; Ullrich, 1983; Storer y Ullrich, 1983; Terzaghi-Howe, 1989; Grahn *et al.*, 1992; Potten, 1993; Tsunemoto *et al.*, 1994), o de neutrones de ^{252}Cf (Takahashi *et al.*, 1992), o entre radiaciones X y γ (Figueroa *et al.*, 1972), encontrándose en general una RBE mayor para neutrones que para las radiaciones ionizantes (Law *et al.*, 1984; McNally *et al.*, 1985).

4.4 Captura de neutrones por boro

La Terapia de Captura de Neutrones por Boro (BNCT), es una técnica segura contra los tumores craneales con ciertas características, se ha usado para eliminar glioblastomas y melanomas que no pueden ser tratados por los métodos convencionales (Fairchild *et al.*, 1989). La BNCT se aplica como radioterapia postoperante, en cuatro fracciones, después de la eliminación del tumor. Generalmente se utiliza una dosis inicial de aproximadamente el 80% de la dosis que produce efectos neurológicos en animales grandes (Hideghety *et al.*, 1999). Otros estudios se basan en la medición del porcentaje de supervivencia en células de criceto chino *in vitro* (Laster *et al.*, 1989), de la frecuencia de micronúcleos (Masunaga *et al.*, 1998), supervivencia celular (Ono *et al.*, 1998a), entre otros. Estos tipos de tumores cerebrales son responsables del $\approx 2\%$ de todas las muertes por cáncer, lo que

significa que fallecen alrededor de 10,000 personas anualmente, tan sólo en los Estados Unidos de América. La mayoría de estos decesos se deben a la presencia de una cantidad alta de gliomas, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas multiformes (Hill *et al.*, 1992; Wielopolski *et al.*, 1999).

La BNCT ha sido posible gracias al avance de los reactores nucleares, que son fuente de neutrones a gran escala. Los reactores nucleares se usan para inducir reacciones nucleares, en primer lugar del tipo (n, γ) , por captura de neutrones. Se necesitan energías mucho más altas para otro tipo de reacciones producidas por neutrones, por ejemplo, (n, p) , (n, α) , $(n, 2n)$. Estas energías incrementan el número atómico del núcleo blanco y por lo tanto las reacciones son empleadas en la producción de isótopos de unos cuantos elementos ligeros como:



La separación de radionuclidos de productos de fisión, constituye una alternativa para la producción de isótopos en reactores nucleares, en este caso el blanco es U natural, ^{235}U enriquecido o compuestos de U. Los intentos para realizar reacciones nucleares involucrando partículas cargadas como p , d , t , α , en reactores nucleares, son relativamente recientes.

Existen reacciones nucleares secundarias, que pueden ser de dos tipos: las dobles, que se presentan cuando las partículas cargadas se originan como resultado de una reacción nuclear primaria y las indirectas. Ejemplos específicos de reacciones nucleares dobles aparecen en la **tabla II**.

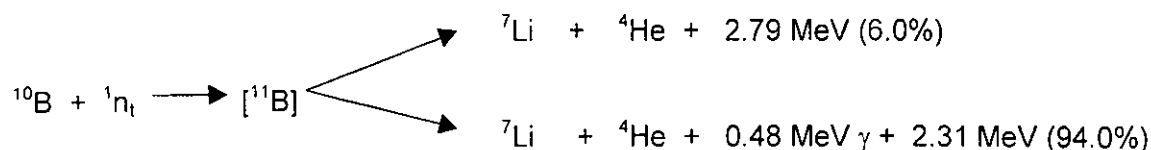
TABLA II. REACCIONES NUCLEARES DOBLES

Reacción primaria	Reacción secundaria
$^6\text{Li} (n, \alpha) ^3\text{H}$	$^{10}\text{B} (\alpha, n) ^{13}\text{N}$
$^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$	$^{10}\text{B} (\alpha, n) ^{13}\text{N}$

El interés histórico del ^{13}N se debe al estudio de la reacción $^{10}\text{B}(\alpha, n)^{13}\text{N}$ lo cual dio lugar al descubrimiento de la radiactividad inducida por I. y F. Joliot-Curie en 1933. El ^{13}N puede producirse por varios tipos de reacciones secundarias. Comparado con los principales componentes de los tejidos (C, H, O, N, S y P), algunos isótopos (^6Li , ^{10}B , ^{113}Cd , ^{157}Gd) tienen una σ , o sea la sección eficaz de absorción para neutrones térmicos, extremadamente grande (Kruger *et al.*, 1992). El ^{10}B es un elemento estable con una abundancia isotópica del 19.9%, el 80.1% restante de este elemento está en la forma de ^{11}B , sin embargo la σ , en el ^{10}B es la siguiente: $\sigma_\gamma = 0.3$ barns ($1 \text{ barn (b)} = 10^{-24} \text{ cm}^2$) y $\sigma_\alpha = 3840$ b, lo que permite tener una probabilidad alta de que ocurra la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$. Por el contrario, el ^{11}B sólo tiene una $\sigma_\gamma = 0.005$ b, la cual es despreciable (Parrington *et al.*, 1996). La interacción del ^{10}B estable con neutrones térmicos da como resultado la emisión de partículas α como reacción primaria: $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ (Walker *et al.*, 1983). La captura de las partículas α por el ^{10}B da lugar a la reacción secundaria: $^{10}\text{B}(\alpha, n)^{13}\text{N}$. El ^{13}N es un radisótopo con una vida media de tan sólo 9.96 min y decae emitiendo radiación β^+ de 1.2 MeV. El ^{14}N , con una abundancia del 99.64% y el ^{15}N (0.36%) son los isótopos estables del N. El ^7Li es el elemento estable, con abundancia isotópica del 92.5% y una σ de 0.037 b (Nagy *et al.*, 1971).

Dos son las principales reacciones nucleares de captura $^{14}\text{N}(n, p)^{14}\text{C}$ y $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$, son la principal fuente de energía disipada en una pequeña muestra de material biológico expuesta a neutrones térmicos. La captura de neutrones por B (BNC) está basada precisamente en la reacción que se presenta entre el isótopo ^{10}B y los neutrones térmicos. Un neutrón de baja energía es absorbido por el núcleo del ^{10}B y éste se desintegra en dos partículas: un núcleo de Litio (Li) y otro de Helio (He), este último es una partícula alfa con una alta transferencia lineal de energía (LET), por lo que es capaz de ionizar fuertemente una región muy pequeña, de algunos micrómetros, adyacente al lugar en donde se originó esta partícula (Hideghety *et al.*, 1999), además de un fotón γ de 0.48 MeV (Kahl *et al.*, 1990).

Esta reacción nuclear se presenta de la siguiente forma (Ecochard y Oosterheert, 1966):



Este tratamiento para el cáncer, la BNCT, apareció en los sesenta (Dong y Mo, 1998) y para él se utilizan reactores del tipo TRIGA en diferentes países como, Portugal, Australia, Finlandia, Estados Unidos (Venhuizen *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 1999), Argentina, Holanda (Sauerwein *et al.*, 1999), Brasil, Suiza, China (Dong y Mo, 1998) y otros. La BNCT es un tratamiento binario que requiere un compuesto con ^{10}B , el cual debe alojarse en el tumor y una fuente de neutrones térmicos para la irradiación (Ma *et al.*, 1999). Debido a la baja energía de los neutrones, estos son absorbidos por el núcleo del ^{10}B y se desintegran en dos partículas, una de las cuales es muy ionizante, sin embargo, se conoce poco sobre la radiobiología *in vivo* de la BNCT (Venhuizen *et al.*, 1999).

Hasta el momento se han desarrollado gran número de compuestos químicos que contienen boro (B), algunos de ellos están enriquecidos con ^{10}B , como en el caso de ácido bórico usado por Ono *et al.*, (1998a), ya que como se mencionó, la abundancia isotópica del ^{10}B es de tan sólo 20%. Los análogos borados de estructuras orgánicas poseen un alto grado de selectividad por las células neoplásicas e incluyen aminoácidos (Galindo y Ureña, 1993; Masunaga *et al.*, 1998), precursores de ácidos nucleicos, porfirinas (Hill *et al.*, 1992; 1995), promacinas y lípidos (Weissfloch *et al.*, 1999). La segunda generación de estos compuestos involucra el uso de anticuerpos monoclonales borados contra los antígenos asociados a tumores (Alam *et al.*, 1989). Los compuestos se evalúan en animales, para lo cual es necesario usar disolventes orgánicos que sean solubles en agua como el dimetil sulfóxido (DMSO). El más común de los compuestos empleados es una sal de B, como el borocaptato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$: BSH), que se une a la albúmina, también se han empleado otros tipos de compuestos como la p-borofenilalanina fructuosa (BPA-F) (Wheeler *et al.*, 1999), tetrafenilporfirina borada (BTPP) (Kahl *et al.*, 1990), 2,4-(α , β -dihidroxietil) deuteroporfirina IX ester tetraciscarborano carboxilato (BOPP) (Hill *et al.*, 1995), que es soluble en agua y se ha encontrado dentro de las mitocondrias de las células tumorales en proporción de 400:1, con respecto a las células normales de cerebro. La borofenilalanina-fructuosa (BPA-F) es un compuesto no tóxico acarreador de B que se acumula preferentemente en las células tumorales, después de la inyección intravenosa en pacientes con glioblastoma (Ma *et al.*, 1999).

La eficiencia potencial de la BNCT para el glioma maligno se debe no sólo al compuesto acarreador de B, sino también a las características biofísicas de los pacientes y al haz de

neutrones epitérmicos, de alrededor de 10 keV, y térmicos, por lo que, no sólo se necesita contar con instalaciones adecuadas en el reactor nuclear, sino que se requiere además de una buena dosimetría (Charlton y Allen, 1993; Delfin *et al.*, 1998a, b) y hasta de microdosimetría (Verrijk *et al.*, 1994), para determinar la dosis de neutrones térmicos, de rayos γ (Nigg *et al.*, 1991; Burmeister *et al.*, 1999), además de la concentración del compuesto dentro de las células tumorales en el momento de la irradiación (Bleuel *et al.*, 1998; Masunaga *et al.*, 1998). Algunos autores proponen el uso de fuentes alternativas de neutrones como los aceleradores de tipo Van de Graff (Wielopolski *et al.*, 1999). Un diseño tipo de una instalación para BNCT se encuentra en Harling *et al.* (1990).

Para que la BNCT sea efectiva se requiere que esté en una concentración apropiada del compuesto de B en el tumor cuando esta área sea expuesta a los neutrones epitérmicos y térmicos. En este momento la reacción (n,α) se presenta y da como resultado la activación del B. Por lo tanto la magnitud de la respuesta de la BNCT dependerá, en parte, de la concentración de este elemento en el momento de la irradiación. Por estas razones, Ono *et al.* (1998b), combinaron el borocaptato de sodio enriquecido con ^{10}B (BSH) con ácido flavín-acético (FAA) como un sistema que causa contracción vascular en el carcinoma de células escamosas en ratón (tumores SCCVII) y que podría incrementar la proporción del ^{10}B en las células tumorales. Para esto se procedió de la siguiente manera: se inyectó FAA (200 mg/kg, intraperitoneal), 5 min después se inyectó, por vía intravenosa el BSH (75 mg/kg) y de 15 a 180 min más tarde, se irradió con neutrones térmicos, encontrando que efectivamente, el uso del FAA fue necesario para aumentar la concentración de BSH en las células tumorales, lo cual presentó un efecto de la radiación directamente proporcional a la concentración del ^{10}B en el momento de la irradiación. La concentración del B se determinó por espectrometría de rayos gamma. En el caso de los pacientes, se necesita hacer un estudio para cada caso en particular, ya que existen diversos factores fisiológicos que pueden cambiar la cantidad de B presente en el tumor durante la irradiación con neutrones (Hideghety *et al.*, 1999).

4.5 Mutaciones inducidas por radiación ionizante

La radiación ionizante se origina cuando se presenta una colisión entre un fotón incidente y un electrón del átomo, parte de la energía incidente se transforma en energía cinética ó

de movimiento, es decir, electrones rápidos y otra parte de la energía es dispersada en forma de fotones. El mecanismo de los procesos de interacción de la radiación ionizante con la materia viva es complejo. La serie de reacciones causadas por las radiaciones ionizantes para producir un efecto biológico puede ser descrita en cuatro etapas: la primera tiene una duración del orden de una cuatrillonésima de segundo (10^{-24} s) después de la incidencia de la radiación. En esta etapa ocurren los fenómenos físicos de ionización, el electrón rápido se moverá a alta velocidad, interaccionando a su vez con otros electrones cediéndoles parte de su energía a través de colisiones, generando cadenas de electrones secundarios, que se mueven aleatoriamente dentro del tejido, ocasionando excitaciones de los átomos de las células del cuerpo humano debido a la absorción de energía, pasando a una órbita más energética ó ionizaciones en otros átomos. Durante la segunda etapa, llamada fisicoquímica, se rompen los enlaces químicos de las moléculas dando lugar a la formación de radicales libres. La tercera etapa con una duración variable, desde unos cuantos segundos hasta semanas y es una etapa química durante la cual son muy reactivos los radicales libres que se formaron en la fase anterior y pueden dañar importantes moléculas de la célula tales como proteínas y ácidos nucleicos. En la cuarta etapa ocurren eventos bioquímicos y fisicoquímicos que producen alteraciones morfológicas, funcionales o ambas y su duración también es variable desde horas hasta años (Levin, 1989; Azorin, 1992).

La acción de los efectos debidos a la radiación ionizante dependerá del sitio de interacción de esta radiación con la célula. La energía depositada provoca cambios químicos como son modificaciones morfológicas o funcionales de la célula, ya sea por acción directa sobre las moléculas sensibles o por acción química indirecta, afectando moléculas críticas.

Los efectos producidos se pueden presentar a nivel celular o de organismo. Dentro de la célula esta modificación altera su información genética, su organización, aptitud para almacenar energía y su capacidad de reproducción, llegando a producir diversos tipos de cáncer y, en situaciones extremas, la muerte celular (Ames y Gold, 1991; Renan, 1992; Cox, 1994; Wheldon, 1994).

El núcleo es la parte más sensible de la célula y por consecuencia la modificación en el

ADN es la más seria (Helm, 1994), provocando mutaciones que pueden ser:

- a) Cambio (transiciones y transversiones), corrimiento del mensaje (deleciones, inserciones).
- b) Ruptura de algún enlace de hidrógeno.
- c) Fractura de uno de los lados de la escalera.
- d) Ruptura en ambos lados de la cadena, entre otras (Watson *et al.*, 1987; Alberts *et al.*, 1989).

La magnitud del daño va a estar sujeto al tipo de célula que recibe la radiación y al grado de desarrollo que presente al momento de ser irradiada. En células somáticas el daño causado por radiación es más intenso cuando están en la etapa inicial de su desarrollo, y este va disminuyendo a medida que la célula alcanza su madurez (Zambrano y Cejudo, 1998). Los daños provocados pueden ser reparados por procesos enzimáticos celulares (Zambrano, 1982) como la reparación por escisión (Zimmering y Deitemeyer, 1981), por recombinación o inclusive, la fotorreactivación que repara dímeros de timina inducidos por radiación ultravioleta, en presencia de la luz (Zambrano y Santiago, 1985). Después de la actuación de los sistemas de reparación, el ADN retorna a su forma original sin ninguna alteración o puede sufrir pequeños cambios como resultado de la acción de los sistemas de reparación mutagénicos que dan lugar a moléculas de ADN viables, pero con mutaciones. A este tipo de sistema de reparación se le ha llamado SOS, quizás para dar idea de una última oportunidad de supervivencia para la célula (Boiteaux *et al.*, 1978). La consecuencia más crítica que se puede derivar en estas células debido a los mutágenos, es la aparición de cáncer. Tal vez sería menos dañina la muerte celular que su transformación en una célula cancerosa. En humanos la ataxia telangiectasia y el xeroderma pigmentosum son claros ejemplos de deficiencias en los sistemas de reparación, lo que se traduce en la aparición más frecuente de diversos tipos de cáncer en los individuos que la presentan.

En células gaméticas, el daño producido por radiación también está sujeto al grado de madurez que presenten al momento de ser irradiadas, pero las consecuencias en este tipo de células son mayores ya que su alteración se puede extender hacia las futuras generaciones.

4.6 Antimutagénesis

Basándose en el uso de pruebas microbianas, se han identificado un gran número de mutágenos y carcinógenos, y además sustancias que disminuyen o anulan los efectos genotóxicos de los mutágenos (Hartman y Shankel, 1992; Olvera *et al.*, 1997; Zambrano *et al.*, 1999b). A estas moléculas se les conoce como antimutágenos (Hayatsu *et al.*, 1993). Muchos de estos compuestos forman parte natural de la dieta humana e inhiben la mutagénesis, la carcinogénesis y son muy importantes en la prevención del cáncer, además, no tienen efectos genotóxicos en los organismos vivos. Son sustancias que pueden ser obtenidas de los alimentos o sintetizadas por las células, que poseen actividad inhibidora sobre mutágenos naturales o fabricados por el hombre, como la clorofilina, la cual es un derivado de la clorofila que se ha administrado a pacientes geriátricos para su protección (Young y Beregi, 1980). Probablemente muchos de estos compuestos están incluidos en los sistemas de defensa de los organismos, protegiéndolos de los daños a los que está expuesto constantemente el material genético y otros componentes de la célula (Gichner *et al.*, 1987). Algunos de estos compuestos protectores son las vitaminas, por ejemplo, E, A y C, las cuales inhiben la acción genotóxica de muchos mutágenos químicos, de la radiación y de la transformación celular inducida por virus, actuando directa o indirectamente, desintoxicando del efecto de diversos mutágenos, específicamente de radicales del tipo oxígeno que son producto de muchos procesos metabólicos. En algunos casos se desconoce si estas vitaminas son simples captadoras de radicales libres o su acción antimutagénica se debe a procesos más complejos (Odin, 1997).

4.7 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) ó vitamina C, como también se le conoce, es una alfa-cetolactona cuya fórmula empírica es $C_6H_8O_6$. Es una sustancia soluble en agua, que está presente con abundancia en las frutas. Las soluciones acuosas de la vitamina C se oxidan rápidamente al contacto con el aire, mostrando así su naturaleza antioxidante. El AA está distribuido parcialmente en todos los tejidos del cuerpo. Sus concentraciones más altas se encuentran en el tejido glandular y las más bajas en músculo y grasa. Tiene un papel activo en el metabolismo de tejidos y está relacionado con numerosos procesos en el transporte de electrones, en donde se comporta como un fuerte agente reductor. En

condiciones fisiológicas el AA se encuentra en su forma ionizada como el anión ascorbato AH^- (figura 1)(Odin, 1997).

4.7.1 Actividad mutagénica del ácido ascórbico

En las pruebas de Ames, el AA es mutagénico a concentraciones altas cuando se emplea agua de la llave para preparar el medio de cultivo, sin embargo, el uso de agua desionizada previene la mutagenicidad del AA (Norkus *et al.*, 1983). Esta genotoxicidad puede aumentar al añadir ion $Cu(II)$ ó disminuir al agregar ácido etilen diamino tetracético (EDTA) y catalasa. El AA también fue mutagénico en células V79 (Speit *et al.*, 1980). Se encontró que a cantidades altas fue mutagénico en el sistema X/X0, pero a bajas redujo la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en el mismo sistema. Probablemente a concentraciones bajas, es predominante el proceso de captador de iones O_2^- , mientras que a altas quizás mostró sus propias características genotóxicas (Nandi y Chatterjee, 1987).

El AA disminuyó el número de rompimientos cromosómicos inducidos por la radiación UV en *E. coli*, esta actividad del AA cambió en algunos casos, dependiendo del material empleado, aún en las mismas condiciones (Rossman *et al.*, 1986).

4.7.2 Naturaleza de la mutagenicidad del ácido ascórbico

Es importante destacar algunas aspectos relevantes relacionados con la mutagenicidad del AA. El AA no mostró genotoxicidad en ninguno de los experimentos *in vivo*, sin embargo fue mutagénico cuando los ensayos se hicieron *in vitro*. Por otra parte, se demostró que las propiedades mutagénicas del AA dependían de la cantidad de oxígeno, ya que un medio anaeróbico se eliminó la supuesta mutagenicidad del AA (Stich *et al.*, 1976; MacRae y Stich, 1979). Es probable que el grupo enediólico del AA esté involucrado con la actividad mutagénica, ya que el compuesto más simple conteniendo el grupo triosa reductona manifestó una actividad similar a la del AA (Omura *et al.*, 1978). No fue mutagénico un compuesto derivado del AA, llamado ascorbil, donde los grupos hidroxil enediólicos estaban esterificados (Stich *et al.*, 1976).

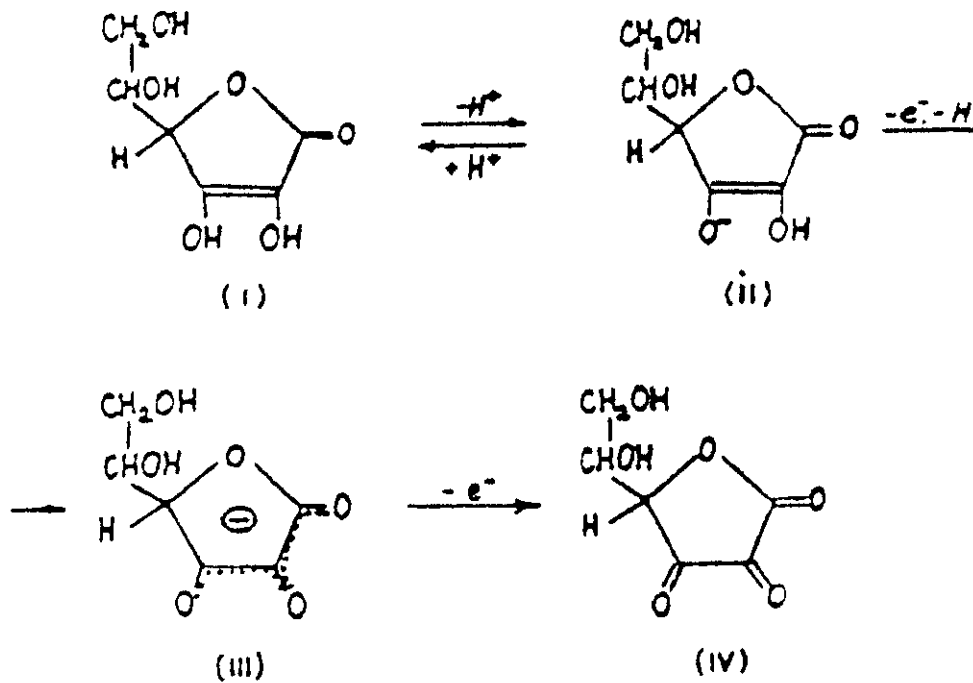


Fig.1. Fórmula del ácido ascórbico (I), ácido monodehidroascórbico (II), radical ascorbil estable (III) y ácido dehidroascórbico (IV) (Odin, 1997).

El EDTA añadido al medio de cultivo de células indujo la formación de complejos con iones metálicos y AA, inhibiendo así la posible actividad mutagénica del ascorbato (Norkus y Kuenzig, 1985). Se eliminó la genotoxicidad del AA cuando se usó agua desionizada en lugar de agua de la llave para la preparación de medio de cultivo, (Norkus *et al.*, 1983; Norkus y Kuenzig, 1985). Cuando se les dió a ratones una dieta enriquecida con AA no se observó disminución de los daños inducidos por rayos X, (Hoyes *et al.*, 1995), pero fue efectivo cuando se incorporó en el agua (Henson *et al.*, 1991).

Se puede mencionar que el AA por sí mismo no actúa como un mutágeno activo, sino que su mutagenicidad está mediada por los radicales oxi que aparecen durante la oxidación del AA por oxígeno molecular. Mediante un proceso enzimático se forman el O_2^- y la H_2O_2 durante la oxidación del AA en medio oxigenado, esto explica el incremento en la actividad mutagénica del AA cuando se adicionan pequeñas cantidades de iones metálicos en el medio de cultivo (Stich *et al.*, 1976). Posiblemente el hecho de que el AA no fue genotóxico en pruebas *in vivo* puede deberse a la separación espacial de los componentes del sistema generador de radicales oxi en los organismos o también a la existencia de un sistema antioxidante que inactiva los radicales oxi antes de que actúen sobre el ADN.

4.7.3 Ejemplos de inactivación de mutágenos por ácido ascórbico

El AA inhibió la mutagenicidad de la aflatoxina B₁ en *Salmonella typhimurium* TA100 hasta el 57% en la concentración más alta (Bhattacharya *et al.*, 1987), sin embargo, Raina y Gurtoo (1985) encontraron el mismo efecto en la prueba de Ames, pero a baja concentración. Estas diferencias se debieron posiblemente a las distintas condiciones en que se realizaron los experimentos. La antimutagenicidad del AA se encontró también en la cepa TA1978 de *Salmonella typhimurium* (Namiki y Osawa, 1986) y en otras cepas de *S. typhimurium* (Shamberger *et al.*, 1979), en donde inhibió la mutagenicidad de la β-propiolactona. Así mismo, el AA redujo los daños inducidos por neutrones en *Drosophila melanogaster* (Guzmán *et al.*, 1999).

Concentraciones altas de vitamina C inhibieron la carcinogénesis del benzo[a]pireno en ratas (Kallistratos y Fasske, 1980). En *S. typhimurium* cepa TA1530 se reportó que inhibió la mutagénesis por metil *N* nitroso guanidina (MNNG) y *N*-nitrodimetilamina (DMN) (Guttenplan, 1977). El AA también inhibió la mutagenicidad de 1,4-dinitro-metilpirrol. Esta actividad fue dependiente del pH, ya que cuando fue bajo el AA fue inactivo y en condiciones fisiológicas, esta mutagenicidad se redujo casi completamente (Osawa *et al.*, 1980).

En la prueba de revertantes his⁻ a his⁺ de *S. typhimurium*, el AA disminuyó, casi hasta niveles del testigo, la mutagenicidad inducida por extractos de peces tratados con nitritos (Marquardt *et al.*, 1977). En estudios con compuestos nitrosos se encontró que el AA fue antimutagénico en alrededor de 30%, ante los daños provocados por nitrofuranos como la nitrofurazona y la furozolidona en la cepa TA98 del ensayo de Ames (Khudoley *et al.*, 1981; Gajewska *et al.*, 1990). También se ha descrito actividad mutagénica del AA ante DMN, que aumentó en presencia de iones de Cu (II). Un efecto similar se presentó para MNNG (Norkus y Kuenzig, 1985). El AA inhibió hasta el 80% la formación de compuestos *N*-nitrosos como el MNU, *N*-nitrosocimetidina y *N*-nitrosoaminopurina (Khudoley *et al.*, 1981; Barale *et al.*, 1983a, b). Olvera *et al.* (1994, 1995) señalaron que el AA ejerció un efecto protector ante el trióxido de cromo y la radiación gamma en células somáticas de *Drosophila*.

O' Connor *et al.* (1985) encontraron que el AA disminuyó la genotoxicidad del jugo gástrico. Los autores discuten su posible uso en la quimio prevención del cancer gástrico. En ensayos *in vitro* en células V79 de criceto se mostró el carácter antimutagénico del AA ante etil metano sulfonato (EMS) (Kuroda, 1990; Kojima *et al.*, 1992).

En cuanto al requerimiento o no de activación metabólica, un aspecto interesante es que en células CHO se demostró la antigenotoxicidad del AA ante levodopa, noradrenalina y dopamina, sin necesidad de activación metabólica (Iwawaki *et al.*, 1988) y en cultivo de linfocitos humanos ante trenimona con y sin fracción S9 (Gebhart, 1984; 1985). El AA también disminuyó la mutagenicidad inducida por bleomicina con o sin mezcla S9. Esta vitamina redujo moderadamente la cantidad de rompimientos cromosómicos causados por DMBA en cultivo de leucocitos (Shamberger *et al.*, 1973). La vitamina C provocó el

decremento de la frecuencia de células micronucleadas producidas por la droga antiamebiana diyodohidroquinolina, en médula ósea de ratón suizo albino (Ghaskadbi y Vaidya, 1989). El AA fue capaz de disminuir el número de células con micronúcleo inducidos por Cr (VI), en médula ósea de rata y cuyo. En esas condiciones el AA por sí mismo no indujo ninguna actividad genotóxica (Ginter *et al.*, 1989; Chorvatovicova *et al.*, 1991). El AA no incrementó significativamente el número de ICH *in vivo*, sin embargo, concentraciones mayores de AA disminuyeron proporcionalmente los niveles de ICH, aproximadamente del 50% inducidos por ciclofosfamida (CP) y mitomicina C (MMC) en células de médula ósea y de timo de ratón (Krishna *et al.*, 1986). Este ácido redujo significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas y de ICH inducidos por CP en blastocitos de ratón (Kola *et al.*, 1989).

En células de plantas (*Arabidopsis thaliana*) el AA inhibió significativamente la formación de compuestos mutagénicos inducidos por compuestos *N*-nitrosos como el NaNO₂. Para el *N*-nitrosopropoxur la inhibición fue del 30% aproximadamente (Gichner *et al.*, 1987). Existen experimentos interesantes realizados en grupos humanos expuestos profesionalmente a dosis cada vez mayores de mutágenos químicos. Se ha demostrado que el consumo continuo por vía oral, de grandes cantidades de AA por un período largo de tiempo, es un método capaz de reducir significativamente la cantidad de rompimientos cromosómicos provocados por varios xenobióticos en linfocitos humanos (Sram *et al.*, 1986). Se han hecho pruebas similares acerca de la antimutagenicidad del AA y se ha encontrado que esta vitamina reduce las aberraciones cromosómicas causadas por bleomicina. Este tipo de experimentos no sólo tienen un significado teórico, sino un valor muy práctico que demuestra que el AA es una vitamina que puede prevenir el daño genético.

4.7.4 Antigenotoxicidad del ácido ascórbico: razones y posibilidades

Existen varias hipótesis que podrían explicar el efecto antimutagénico del AA observado en diversos bioensayos. Bielski *et al.* (1981) propusieron que una de las posibilidades está relacionada con los cambios oxidantes y/o reductores del AA, a través de la formación del ácido monodehidroascórbico o más probablemente a la forma desionizada

de un radical anión ascorbil estable $A^{\cdot-}$, con muchos electrones no apareados (Bielski, 1982). El radical $A^{\cdot-}$ es la forma más estable entre los materiales biológicos y estos autores proponen que esto explica su no-toxicidad. El radical $A^{\cdot-}$ actúa como una herramienta conveniente para la captura activa de los radicales libres. El AA funcionó como un fuerte antioxidante biológico, soluble en agua (Wayner *et al.*, 1986), que es capaz, por ejemplo, de atrapar iones $O^{\cdot-}$ (Cabelli y Bielski, 1983) y OH^{\cdot} (von Sonntag, 1987).

Frei *et al.* (1988) describieron al AA como el antioxidante más importante de todos los antioxidantes naturales conocidos. El AA puede inhibir los radicales libres provenientes de la oxidación microsómica que convierte a los promutágenos en mutágenos pero su actividad *in vitro* es muy baja, para aquellos mutágenos indirectos como la AFB₁, CP, trenimona y otros. Sin embargo, la actividad inhibidora contra esos mutágenos, *in vivo*, fue significativamente mayor tanto en animales como en humanos (Sram *et al.*, 1986). Probablemente el AA *in vivo* intensifica las propiedades protectoras de los organismos.

En 1974, Edgar reportó una interacción de los agentes alquilantes electrofílicos y el AA, especialmente con el anión ascorbil $AH^{\cdot-}$ que posee actividades nucleofílicas potenciales. Algunos autores han mencionado que debe excluirse la influencia del AA en procesos de reparación o en el incremento de la resistencia celular, porque en los estudios entre la interacción del etil metano sulfonato (EMS) y el AA se encontró que el pretratamiento de las células con AA, no dio resultados positivos con relación a esos dos mecanismos, únicamente la adición simultánea de AA y EMS aumentó las propiedades antimutagénicas del AA.

Otros autores señalan que la presencia de Cu (II) ó de Fe (II) puede potenciar el carácter antimutagénico del AA. Esta vitamina puede dar lugar a un efecto inhibitor sobre la mutagénesis inducida por DMN, en presencia de Cu (II). Norkus y Kuenzig en 1985, confirmaron estos resultados, ya que el AA fue inactivo ante la mutagenicidad de la MNNG, en la prueba de Ames, únicamente al usar agua desionizada para la preparación del medio de cultivo. Mientras que cuando se utilizó agua destilada estéril o agua desionizada con Cu (II), disminuyó la actividad mutagénica de la MNNG y este efecto se bloqueó con EDTA.

En ocasiones el AA produce radicales libres oxi que son responsables de la mutagenicidad del AA en algunos ensayos. Se podría suponer que los productos derivados del H_2O_2 y OH^\cdot descomponen preferentemente las moléculas del mutágeno, antes que lleguen al ADN, produciendo así un efecto antimutagénico. Esta hipótesis está parcialmente confirmada por el hecho de que el H_2O_2 fue capaz de descomponer a la MNNG, destruyendo así su genotoxicidad (Norkus y Kuenzig, 1985).

El AA por sí mismo no es un potente captador de radicales libres o nucleófilo, siendo probable que su acción esté mediada por derivados oxi, *in vitro*, o por algunos otros bio-antimutágenos, *in vivo*. Algunos autores indican que una deficiencia del AA en los organismos puede producir niveles altos de daño genético, pero el papel del AA en humanos requiere de más investigación (Odin, 1997).

4.7.5 Sinergismo entre vitaminas y otras consideraciones importantes

Chorvatovicova *et al.* (1991) sugieren una acción sinérgica entre las vitaminas E y C. Weitberg *et al.* (1985) reportaron actividad sinérgica antimutagénica entre las vitaminas E y A en células CHO expuestas a actividad mutagénica en el sistema X/X0. El AA parcialmente reducido de la forma A (pero no de la DAA), a la activa AH^\cdot por NADPH, asegura la circulación en tejidos. Tanto las vitaminas E y A como la C, son mucho más activas *in vivo* que *in vitro*. Es importante considerar que los procesos de regulación en los organismos vivos, están constituidos, no sólo por compuestos de bajo peso molecular sino también por enzimas de naturaleza desintoxicante como las superóxido dismutasa, catalasa, GSH-peroxidasa, DT-diaforasa y otras, así como enzimas proteolíticas o que intervienen en la reparación del ADN, destruyendo y/o reparando macromoléculas dañadas, como si actuara un sistema antioxidante secundario.

4.8 Clorofilina

La clorofilina (CLNA) es una sal de sodio y cobre derivada de la clorofila, es estable y soluble en agua, pertenece al grupo de compuestos denominados porfirinas que

contienen un ion metal quelado en el centro de la molécula. La CLNA puede estar formada por una mezcla compleja de porfirinas cloradas y no cloradas, con un número variable de grupos carboxilo (**figura 2**), en algunos casos el Cu puede estar sustituido por algún otro metal como el Fe (**figura 3**) (Chernomorsky, 1997).

4.8.1 Evidencias de la antimutagénesis de la clorofilina

En los años 40 se hicieron las primeras investigaciones, en las que se observó que la clorofila tenía la capacidad de actuar como agente terapéutico en la restauración de lesiones ulcerosas, ayudando a la formación de tejido epitelial y a su posterior cicatrización (Gruskin, 1940; Buergi, 1943).

Tomando en cuenta esta propiedad Smith y Sano (1944) demostraron que la CLNA tenía la capacidad de estimular el crecimiento celular, eliminando el período de latencia, en un cultivo de tejidos de fibroblastos. En 1978 Lai *et al.*, sugirieron que la CLNA, derivada del extracto acuoso de las hojas del tallo de trigo tenía la capacidad de inhibir la activación metabólica de algunos carcinógenos.

Se han realizado gran cantidad de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar los efectos antígenotóxicos y antimutagénicos de la CLNA, así como también posible acción contraria o inocua. En este sentido, se ha demostrado que la CLNA tiene la capacidad de actuar como un poderoso protector con un amplio margen de efectividad ante la acción directa e indirecta de carcinógenos y mutágenos, entre los cuales se incluyen las aflatoxinas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas heterocíclicas, los agentes alquilantes y ambientales (Hadnagy y Seemayer, 1988) y varios otros compuestos. Atenúa la toxicidad de algunas fármacos antitumorales como la ciclofosfamida, bleomicina, doxorubina y cisplatino.

Se han realizado múltiples estudios *in vitro* para comprobar las propiedades mencionadas y ampliar más el conocimiento por medio del cual la CLNA tiene la capacidad de presentar propiedades antimutagénicas. Por mencionar algunos de los trabajos realizados, se ha demostrado que en bacterias inhibe o reduce la mutagenicidad del pimiento negro y el

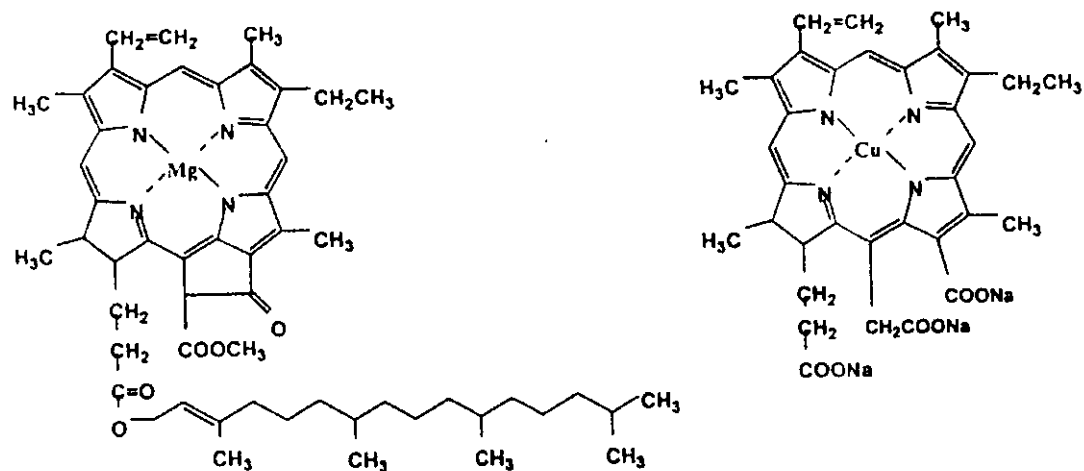


Fig. 2. Estructuras de la clorofila (izquierda) y de la clorofilina (derecha) (Chung *et al.*, 1999).

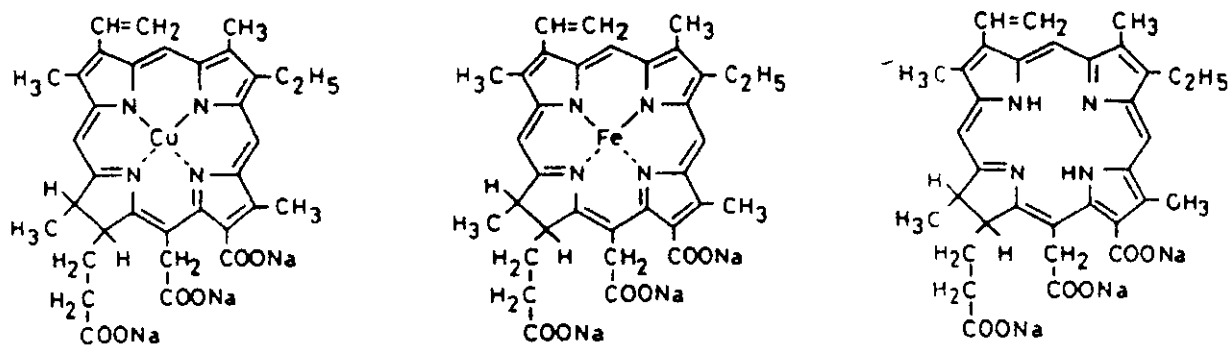


Fig. 3. Estructuras de diversas clorofilinas (Arimoto *et al.*, 1993).

vino tinto (Warner, 1991). Reduce directamente la mutagenicidad inducida por el Trp-P-2, 3-amino-1-metil-5H-pirido(4,3-b) indol en *Chlorella vulgaris* (Negishi *et al.*, 1989), así como la del ICR-170, Quinacrina, IQ, AF-2 y 4-nitroquinolina 1-oxido (4NQO) (Arimoto *et al.*, 1993). Protege efectivamente al ADN del plásmido pBR322 de los daños causados por radiación ionizante (Kumar *et al.*, 1999).

En estudios realizados *in vivo* en *Drosophila*, se ha encontrado que disminuye el daño provocado por los rayos γ (Zimmering *et al.*, 1990; Olvera *et al.*, 1993), así como por neutrones (García *et al.*, 1999; García, 2000), inhibe la mutagenicidad del Trp-P-2 (Negishi *et al.*, 1989). Suprime la toxicidad del 4NQO, cuando el 4NQO y CLNA se administran simultáneamente (Negishi *et al.*, 1997).

En el modelo animal de trucha arcoiris, redujo en 95% la formación de aductos hepáticos de aflatoxina B₁ (AFB₁-DNA), y la hepatocarcinogénesis en 20.5% (Breinholt *et al.*, 1999). Se observó una reducción del 89% en la formación de aductos de dibenzo [a,l] pireno (DBP-DNA) y de un 72% en la incidencia de tumores utilizando la concentración de 400 ppm de CLNA (Harttig y Bailey, 1998). Se demostró que la CLNA es muy efectiva en la inhibición de carcinogénesis multiorgánica ya que cuando la trucha fue expuesta a una dieta con DB[a,l]P conjuntamente con CLNA, se redujo la incidencia de cáncer en vejiga en 94%, seguido de hígado en 71% y de 63% en estómago (Reddy *et al.*, 1999). Hayashi *et al.* (1999), encontraron que la CLNA bloqueó la formación de tumores y la cantidad de aductos en el ADN inducidos por aflatoxina B₁.

Se halló que puede inhibir la promoción y el progreso de cáncer de piel en ratón causado por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) y 12-O-tetradecanol-forbol-13-acetato (TPA). En ratones, reduce el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) inducidos por radiación (Mendiola, 1994). Inhibe la mutagénesis inducida por DMBA en *Salmonella typhimurium* y en ratones (Chung *et al.*, 1999).

En estudios en humanos se ha comprobado que la CLNA puede disminuir la mutagenicidad en vías urinarias provocada por ciertos alimentos (Ohyama *et al.*, 1987). Reduce los aductos AFB₁-ADN en la hepatocarcinogénesis cuando el inhibidor y el

carcinógeno es coadministrado en la dieta (Hayatsu *et al.*, 1993). La sal de CLNA se ha usado en el tratamiento de pacientes geriátricos (Yun *et al.*, 1995).

Se han iniciado estudios sobre la acción de la CLNA en cierta población china, en donde debido a su dieta diaria, se presentan altos niveles de AFB₁ en sus alimentos. A esta población se le suministró cierta cantidad de CLNA esperando una reducción en los daños genéticos provocados por los procarcinógenos presentes en su dieta.

4.8.2 Mecanismos de acción

Existen varios mecanismos de acción, por medio de los cuales la CLNA puede presentar un efecto antimutagénico y anticarcinogénico, sobre diversos agentes cancerígenos y mutagénicos tanto de acción directa como indirecta (Zimmering *et al.*, 1990). Se ha encontrado que las porfirinas se acumulan preferentemente en células tumorales (Dashwood *et al.*, 1998). El efecto de la CLNA depende de su localización, ya que puede detectarse en mitocondrias, lisosomas, membranas o en el núcleo de las células (Reddy *et al.*, 1999). En algunos casos el tipo de respuesta está condicionado a la concentración que se utilice, ya que como se mencionó, en células de mieloma se comprobó que la CLNA a bajas concentraciones no es tóxica y con concentraciones altas si lo es. También se ha observado que el efecto de la CLNA depende del grado de pureza, ya que en muestras de diferentes lotes se ha encontrado que la pureza no es la misma, al ser estudiados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Chernomorsky *et al.*, 1997). Por lo cual es conveniente realizar estudios previos acerca de la pureza de la CLNA, con el objeto de disminuir errores en los resultados. Los mecanismos propuestos son:

4.8.2.1 Captura de radicales libres

Hadnagy y Seemayer (1988) observaron la reducción de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en fagocitos polimorfonucleares causada por la CLNA, a través de la inactivación de radicales oxígeno como el O₂[•], OH[•] y el HO₂[•], los cuales están involucrados en las rupturas de las cadenas de ADN. Kumar *et al.* (1999) demostraron la

capacidad de la CLNA para atrapar iones OH^* y ROO , creando con esto, un efecto inhibidor del daño inducido por la irradiación del ADN del plásmido pBR322. La CLNA tiene la capacidad de atrapar radicales peroxil desoxiribosa, generados durante la exposición del plásmido pBR322 a la radiación.

4.8.2.2 Formación de complejos moleculares con la clorofilina

La CLNA tiende a acumularse preferentemente en células tumorales que en células normales. El grupo hemo inhibe selectivamente la actividad de mutágenos que tienen estructuras policíclicas, mediante la formación de complejos con ellos (Hayatsu *et al.*, 1993). En la fase inicial la CLNA participa como un agente bloqueador sobre el daño al ADN, debido a una interacción entre el carcinógeno y el inhibidor, actuando como un interceptor molecular *in vivo* (Dashwood *et al.*, 1998).

Otros autores, indican que la CLNA forma complejos moleculares reversibles, con carcinógenos aromáticos planares grandes y sugieren que esta interacción sirve para limitar y detener la viabilidad del carcinógeno en el intestino, siendo desechado en las heces fecales (Breinholt *et al.*, 1999). Hayashi *et al.* (1999) por su parte mencionan, que la CLNA forma complejos no covalentes 1:1 con aflatoxina B_1 (AFB_1), teniendo como consecuencia la reducción de aflatoxina B_2 (AFB_2) equivalentes en hígado. La CLNA tiene la capacidad de atrapar al 4-nitroquinolino1-óxido (4NQO) formando complejos, acelerando así el paso del mutágeno por el tracto digestivo (Negishi *et al.*, 1997).

La fuerza estabilizadora más importante en la formación de complejos entre la CLNA y algunos mutágenos aromáticos, incluyendo AFB_1 , involucran la formación de numerosas interacciones del tipo Van der Waals.

4.8.2.3 Inhibición de las enzimas del citocromo P450

Se ha propuesto que las enzimas del sistema cit P_{450} son inhibidas por la CLNA, impidiendo que se activen los mutágenos indirectos, disminuyendo de esta forma su capacidad mutagénica (Yun *et al.*, 1995). Negishi *et al.* (1989) mencionaron que es posible que se presenten alteraciones en la activación metabólica del 4NQO en el cuerpo,

provocada por el efecto inhibitorio que ejerce la CLNA sobre las enzimas del cit P_{450} . La CLNA produce una captura electrofílica inhibiendo la acción enzimática de las enzimas del cit P_{450} .

En otros trabajos realizados *in vivo* se ha reportado que la CLNA afecta diferentes enzimas intra y extracelulares (Sato *et al.*, 1984). Se ha demostrado también que disminuye e inhibe la actividad de las enzimas hepáticas microsómicas que forman parte del sistema del metabolismo de drogas o genotoxinas. Entre estas enzimas se encuentran la aminopirina N-demetilasa, anilina-hidrogenasa y NADPH-citocromo c reductasa (Imai *et al.*, 1986).

4.9 *Drosophila melanogaster*

La *Drosophila melanogaster* es una mosca de la fruta que presenta varias ventajas para la detección de agentes químicos con actividad genotóxica, así como también para el estudio de los efectos biológicos inducidos por diversos tipos de radiaciones, entre las cuales se puede citar el hecho de que es un animal con tiempos cortos de generación, 10 días a 25°C, de fácil detección de caracteres morfológicos controlados genéticamente, con gran número de mutantes, con diferentes cepas fácilmente disponibles, con medio de cultivo que no es costoso, además permite el apareamiento de gran número de animales de una manera sencilla, finalmente, con este animal se pueden activar enzimáticamente promutágenos y procarcinógenos *in vivo*.

Los mamíferos están más relacionados fisiológicamente con el hombre, las pruebas *in vivo* pueden detectar rompimientos cromosómicos, mutaciones génicas y no disyunción. Sin embargo, el tiempo requerido así como el costo de este tipo de estudios, dificultan su realización rutinaria.

Los microorganismos ofrecen la ventaja de detectar mutaciones génicas con rapidez, ser económicos y tener alta sensibilidad. Los sistemas huésped-intermediario permiten además que se realice la activación metabólica *in vivo* de algunos mutágenos, sin embargo, las conclusiones obtenidas con este tipo de sistemas deben ser confirmadas en

organismos pluricelulares, con metabolismo similar al del humano y en este sentido, *Drosophila melanogaster* presenta algunas ventajas. También ha sido utilizada durante muchos años en estudios de genética básica y es uno de los organismos más adecuados para realizar experimentos sobre los efectos genéticos de diferentes mutágenos, ya que no solamente permite estudiar variaciones hereditarias, sino que además se han desarrollado técnicas que garantizan la existencia de muestras homogéneas en poblaciones celulares meióticas en algunas de las etapas sucesivas en su ciclo de vida, lo que permite emplearlas como un indicador de daño genético.

4.9.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El ciclo de vida de la mosca de la fruta presenta un periodo de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvarios que culminan con la metamorfosis completa llamada holometábola de la que finalmente surge un imago o adulto.

El desarrollo embrionario que sigue de la fertilización del cigoto, tiene lugar dentro de las membranas del huevo. El huevecillo produce una larva que vive aproximadamente de 4 a 5 días, durante los cuales pasa por tres estadios resultantes de dos mudas (Salceda y Gallo, 1998). En el último o tercer estadio, alcanza una longitud de 4.5 milímetros aproximadamente. Esta larva al alimentarse y crecer se transforma en pupa. La pupa a su vez, se convierte en "imago" o adulto. La duración de estos estados varía con la temperatura, a 20°C el tiempo promedio del estado larvario es de 8 días, a 25°C es solamente de 5 días. La vida pupal a 20°C dura alrededor de 6.3 días, mientras que a 25°C, se reduce a 4.2 días. El ciclo de vida se completa aproximadamente en 10 días a 25°C, mientras que a 20°C se requieren 15 días (Demerec y Kaufmann, 1975). La pequeña larva, que eclosiona del huevo después del desarrollo embrionario, se encuentra formada por doce segmentos no aparentes: un segmento de la cabeza, 3 torácicos y 8 abdominales. La pared de su cuerpo está constituida por una cutícula externa y una epidermis celular interna, la cutícula está compuesta por dos capas: la exocutícula y la endocutícula (Ramos *et al.*, 1993).

Las células que forman el cuerpo de la larva se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y sólo aumentan su volumen; en algunas se presentan cromosomas

politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente (Ramírez, 1999). Las células imagales no están involucradas en la integración del cuerpo de la larva, son de tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, conservan la capacidad de división celular, están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva sufre la metamorfosis, se localizan en estructuras denominadas discos imagales, los cuales aumentan de tamaño por divisiones mitóticas que ocurren en determinados tiempos durante el desarrollo larvario (Demerec y Kaufmann, 1975).

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, este proceso involucra la destrucción de ciertos tejidos y órganos de la larva y la organización de las estructuras del adulto, a partir de un complejo de células primitivas, los discos imagales, de los cuales se forman todos los órganos del adulto.

Los túbulos de Malpighi se alteran poco durante la metamorfosis, aunque sí sufren algunos cambios en su composición estructural; el tórax se forma por la combinación de varios discos imagales. Las extremidades, ojos, antenas, alas y el aparato genital se diferencian a partir de su disco imagal respectivo que sufre histogénesis durante el desarrollo pupal, dando origen a las distintas partes del cuerpo del adulto (Ramos *et al.*, 1993).

El reconocimiento del sexo en la mosca adulta es determinado de varias maneras. El extremo del abdomen es alargado en la hembra y un poco redondeado en el macho. A medida que la hembra crece se facilita la distinción del sexo a simple vista ya que el abdomen aumenta de volumen por los huevecillos maduros que contiene. El abdomen de la hembra tiene siete segmentos los cuales se discriminan fácilmente, mientras que el macho tiene solo cinco segmentos estando estos muy juntos por lo que se observan a simple vista como una sola franja gruesa. Los machos cuentan con una fila de aproximadamente diez cerdas cortas y gruesas de color negro, en la superficie distal de la pata anterior, llamado peine sexual. Esta es una característica sexual que está ausente en las hembras.

4.9.2 *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba

En experimentos previos con *Drosophila*, se ha descrito que la radiación ionizante aplicada a larvas, afecta principalmente a los discos imagales, los cuales son pequeños grupos de células que durante la metamorfosis dan lugar a varias estructuras de la mosca adulta, como los ojos, las alas, labios, antenas, etc. Cualquier alteración genética ocurrida en alguna de las células de los discos imagales durante la proliferación mitótica, estará presente en todas las células descendientes y formarán un clon de células mutantes, este fenómeno es llamado expansión clonal. Si la alteración genética produce un cambio visible en el fenotipo, el clon de células mutantes puede ser detectado en el cuerpo del adulto (Guzmán *et al.*, 1990; Guzmán y Graf, 1995). Estas propiedades han permitido desarrollar dos pruebas, del ala y del ojo, que se han utilizado para estudiar los efectos genéticos de las radiaciones, comprobando así que estos agentes físicos pueden producir mutaciones y aberraciones cromosómicas (Sankaranarayanan y Ferro, 1985). Los sistemas de prueba desarrollados con *D. melanogaster* ofrecen la posibilidad de determinar la frecuencia de mutaciones inducidas en las diferentes etapas del desarrollo de las células germinales (Lee *et al.*, 1983; Sankaranarayanan y Ferro, 1985).

Otra ventaja es que *Drosophila* es un organismo que puede realizar ciertas funciones enzimáticas semejantes a las que se efectúan en los microsomas del hígado humano, en donde se activan gran cantidad de los carcinógenos y mutágenos indirectos. El metabolismo de carcinógenos químicos involucra frecuentemente reacciones catalizadas por el sistema del cit P_{450} , de hecho, muchos carcinógenos químicos no son reactivos químicamente, sino hasta que sufren activación metabólica. Los análisis bioquímicos realizados tanto en larvas como en organismos adultos de *Drosophila melanogaster*, han revelado que tienen capacidad de activación-desintoxicación de compuestos exógenos como fármacos, carcinógenos, disolventes y pesticidas, así como de sustancias endógenas (Hällström y Blanck, 1985), gracias a la presencia de enzimas dependientes del cit P_{450} , similares a las encontradas en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Baars *et al.*, 1980).

El sistema cit P_{450} de estos organismos se encuentra distribuido principalmente en el intestino medio, en los cuerpos grasos pericuticulares y en los túbulos de Malpighi. A nivel

subcelular, las monooxigenasas están localizadas en el retículo endoplásmico liso y en las mitocondrias (Hodgson y Randy, 1991; Murillo, 1997).

4.10 Bioensayo de mutación y recombinación en células somáticas

En *Drosophila* se ha desarrollado un sistema *in vivo* para medir la genotoxicidad inducida, por agentes químicos y físicos. Con este bioensayo es posible analizar diversos aspectos relacionados con la irradiación con neutrones, como por ejemplo los efectos a bajas dosis de radiación, de la razón de dosis, del uso de diferentes energías, etc. Este sistema responde al nombre de Prueba de la Mutación y Recombinación en células Somáticas (SMART) (Graf *et al.*, 1984; Graf, 1994), con la cual se pueden detectar mutaciones puntuales, deleciones, aberraciones cromosómicas, conversión génica o ciertos tipos de translocaciones, así como también la recombinación mitótica y la monosomía. El ensayo está basado en el principio de que la pérdida de heterocigosis de ciertos genes marcadores en células de los discos imagales en las larvas, puede conducir a la formación de clones de células mutantes, los cuales se expresan como manchas en las alas o en los ojos de las moscas adultas. En la prueba de la mancha del ojo, es usada la mutación que produce ausencia de color en los ojos y por lo tanto estos son blancos (*w*, 1-1.5) y en el ensayo de manchas en el ala, los marcadores pelos múltiples (*mwh*, 3-0.3) y de flama (*flr*³, 3-38.8), están localizados en el brazo izquierdo del cromosoma 3. Ambas pruebas están basadas en el hecho de que durante las primeras fases del desarrollo embrionario existen grupos de células o discos imagales que proliferan mitóticamente durante el desarrollo larval y se diferencian durante la metamorfosis en estructuras fácilmente distinguibles en el cuerpo de la mosca adulta. De esta forma se pueden analizar grandes poblaciones de células que crecieron mitóticamente en los discos imagales de las larvas. Si se presenta una alteración genética en cualquiera de los discos imagales, ya sea espontánea o inducida por un mutágeno, como los neutrones, durante el proceso de diferenciación de las células de los discos, ésta dará origen a una estirpe celular con la misma característica alterada, originando un clon que podrá ser observado como una mancha de células mutantes en la cutícula de las alas o en los ojos en las moscas adultas, en la estructura imagal correspondiente (Vogel y Zijlstra, 1987). La mancha está formada por pelos múltiples, pudiéndose identificar manchas pequeñas

simples (de una a dos células de tamaño), grandes simples (de más de dos células) y gemelas (*mwh* y *flr³*).

En este ensayo se pueden obtener resultados en una sola generación de moscas, aproximadamente en 10 días (Würgler y Vogel, 1986), en lugar del ensayo de genes letales recesivos ligados al sexo (Clark, 1982), en donde se necesita de al menos un mes para llegar al final de la prueba.

En el desarrollo de tumores como en el retinoblastoma, los tumores de Wilm y otros, se ha demostrado que se presenta la "pérdida de heterocigosis", la cual se debe a una proliferación de células hijas homocigotas; después de la expansión clonal esto puede dar lugar al fenotipo clásico de los tumores (Graf *et al.*, 1998). La conversión génica y en especial la recombinación mitótica son mecanismos potentes que conducen a pérdida de heterocigosis. Por estas razones es interesante contar con un sistema *in vivo* que nos permita detectar simultáneamente los cambios mutacionales clásicos así como los rearrreglos genéticos por recombinación (Graf *et al.*, 1996).

El SMART permite establecer cambios ocurridos en las células de los discos imagales de ojos y alas de los organismos adultos. De esta manera detecta la actividad genotóxica de agentes químicos que inducen diferentes tipos de mutaciones además de recombinación mitótica (**figuras 4 y 5**). También permite reconocer si los compuestos químicos actúan en el momento del tratamiento o si lo hacen posterior a él, ya que el tamaño de las manchas observadas en la cutícula de las alas depende del tiempo en el que se induce el clon, o sea que, si ocurre tempranamente la mancha es de mayor tamaño que cuando sucede a la mitad o al final del desarrollo larvario (Guzmán *et al.*, 1998b). La formación de las manchas en las células de las alas puede deberse a mutación, delección o recombinación mitótica.

4.10.1 Discos imagales

Las células imagales no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva, son de tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, conservan la capacidad de división celular, están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva

1 Célula	Mitosis	2 Células	Clon Resultante	Mecanismo Genético Asociado
----------	---------	-----------	-----------------	-----------------------------

Brazo izq. del cromosoma No. 3

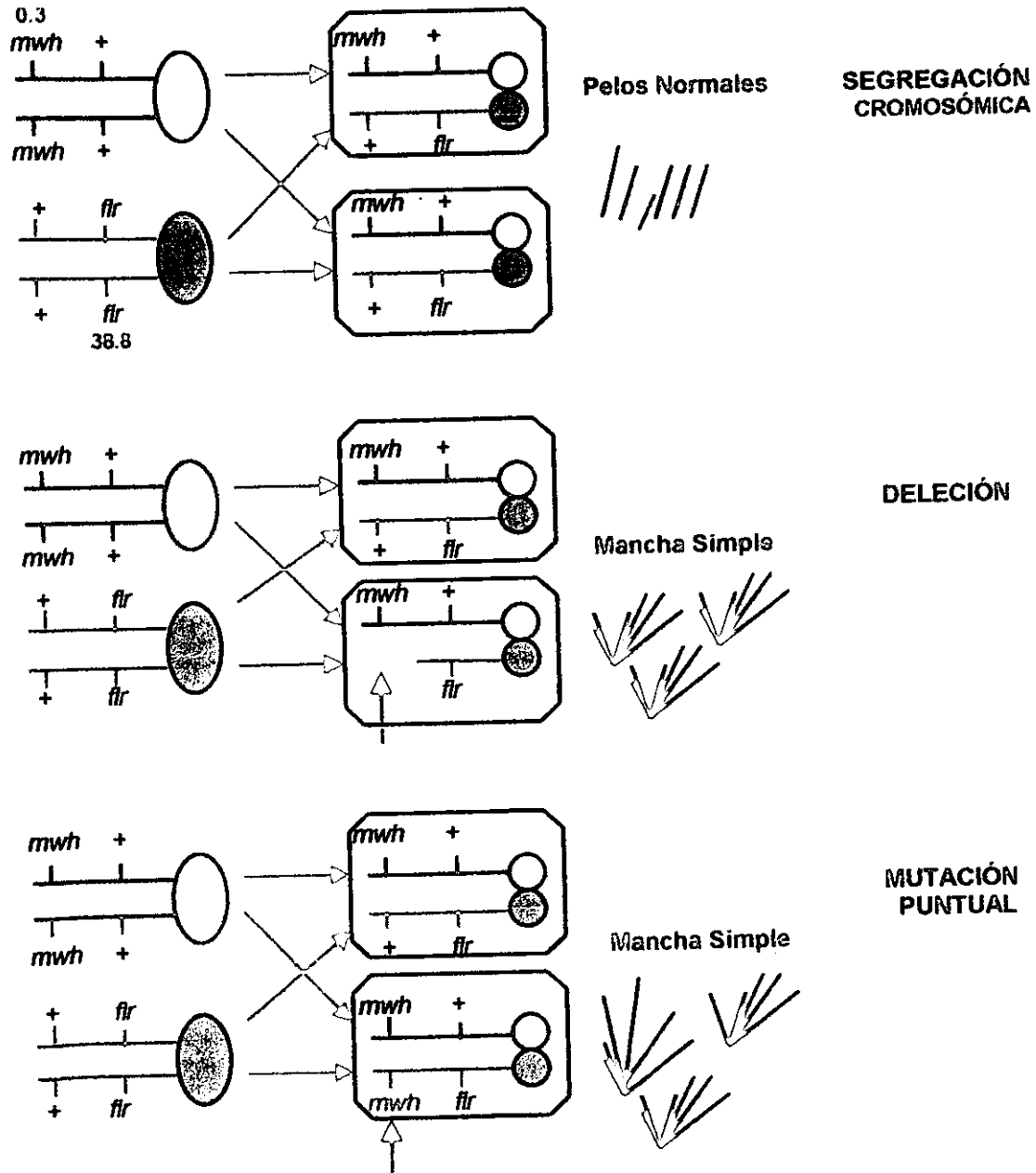


Fig. 4. Mecanismos genéticos involucrados en la obtención de manchas en las alas en *Drosophila melanogaster*.

1 Célula	Mitosis	2 Células	Clon Resultante	Mecanismo Genético Asociado
----------	---------	-----------	-----------------	-----------------------------

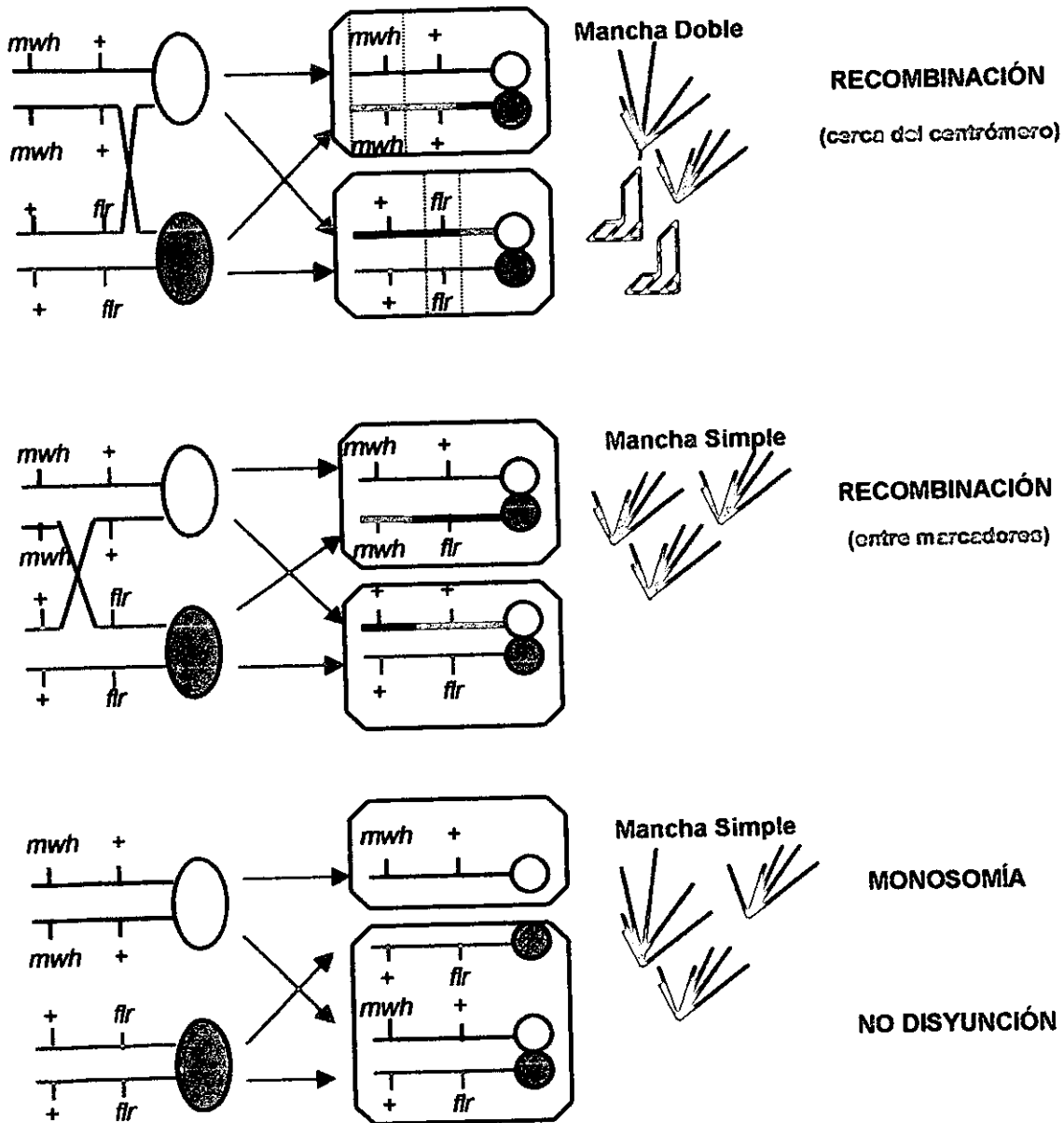


Fig. 5. Mecanismos genéticos involucrados en la obtención de manchas en las alas en *Drosophila melanogaster*. Las manchas gemelas son únicamente producto de la recombinación. Las manchas simples, ya sea *fir* que se presentan a una frecuencia muy baja ó *mwh*, pueden ser resultado de la recombinación o no.

sufre la metamorfosis, estas células se localizan en estructuras denominadas discos imagales, los cuales aumentan de tamaño por divisiones mitóticas que ocurren en determinados tiempos durante el desarrollo larvario. Los discos imagales dan origen a las diferentes estructuras del adulto como las, antenas, ojos, patas y alas. En el caso de las larvas de 72 h de edad los discos imagales son más pequeños que en aquellas de 96 h, específicamente el disco imagal de las alas cuenta con 50 a 100 células en el primer estadio larvario y llega hasta aproximadamente 25,000 células en la etapa de pupa temprana, cuando se inicia la diferenciación (Ransom, 1982; Graf, 1995; Zambrano *et al.*, 1998a)

Los discos son bolsas epiteliales que durante la metamorfosis se evaginan y transforman en las estructuras del adulto. Si durante el proceso de diferenciación de las células de los discos, ocurre una alteración heredable, éstas darán origen a una estirpe celular con la misma característica alterada, originando así un clon que será observado como una mancha en la estructura imagal correspondiente al emplear los marcadores fenotípicos adecuados. Debido a que se han detectado y caracterizado mutaciones en *D. melanogaster* que alteran la formación final de las células que darán origen a los tricomas, es posible utilizarlas como marcadores fenotípicos.

4.10.2 Marcadores para la prueba de las alas

Para la prueba del ala, se han usado principalmente dos marcadores: *flare*³ y *mwh*. El marcador *flr*, es una mutación recesiva que origina pelos en forma de flama, se ubica a

38.8 unidades de mapa del cromosoma 3 (3-38.8) y en condición homocigótica es letal, ya que los cigotos de cualquiera de los 3 alelos mutantes de *flr* no son capaces de desarrollar moscas adultas, pero las células homocigóticas en los discos imagales del ala pueden originar células mutantes en las alas. Debido a esta letalidad, los alelos *flr* necesitan mantenerse en un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (TM3), que además porta el marcador dominante "serratia" (Ser), que permite el reconocimiento fenotípico de la línea *flr³/TM3, Bd^s* (TM3, Bd^s Tercero múltiple 3, Beaded-Serrate). El otro marcador es el *mwh*: (multiple wing hair) esta es una mutación homocigótica recesiva viable, su presencia origina pelos múltiples en el ala. En ocasiones llegan a presentar de 2 hasta 5 tricomas por célula en lugar de uno normal que presentaría el fenotipo silvestre. El marcador *mwh* se encuentra cerca del extremo del brazo izquierdo del cromosoma 3, a tan solo 0.3 unidades de mapa (3-0.3). Se han evaluado más de 300 compuestos usando el SMART (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). La prueba ha mostrado gran sensibilidad para la detección de agentes genotóxicos, tanto químicos (Graf *et al.*, 1992; Spanó *et al.*, 1994; Ortiz-Martello *et al.*, 1994), como físicos (Guzmán *et al.*, 1998a; Zambrano *et al.*, 1998b). Además, esta prueba se ha utilizado para evaluar mezclas complejas que forman parte de la dieta del ser humano (Guzmán-Rincón *et al.*, 1994a; Graf *et al.*, 1994), inclusive del aire que respiramos (Delgado-Rodríguez *et al.*, 1994).

4.10.3 Cruzas

Para la cruce estándar (ET) se utilizan hembras con el genotipo *flr³/TM3, Bd^s* y machos *mwh/mwh*, con los descendientes de esta cruce se pueden estudiar los efectos genéticos inducidos por mutágenos llamados directos, en los que no se necesita de la activación metabólica del agente mutagénico, como en el caso de los neutrones, o cualquier otro tipo de radiación. La cruce, de bioactivación elevada (BE), lleva en los cromosomas 1 y 2 de una línea Oregon R(R) resistente al DDT que le confiere constitutivamente niveles elevados de cit P_{450} (Graf y van Schaick, 1992). En este caso se cruzan hembras con genotipo *OR(R)1/OR(R)1; OR(R)2/OR(R)2; flr³/TM3, Bd^s* con machos *mwh/mwh*, este tipo de cruce permite analizar agentes químicos que necesitan de la activación metabólica, vía cit P_{450} para poder actuar como mutágenos (Hällström y Blank, 1985). En este último caso se ha observado que los análisis bioquímicos realizados tanto en larvas como en adultos de *Drosophila melanogaster*, han revelado que tienen capacidad de activación-

desintoxicación de compuestos exógenos como drogas, carcinógenos, disolventes y pesticidas, así como de sustancias endógenas (Saner *et al.*, 1996).

4.10.4 Tratamiento de las larvas

Las larvas de las cruzas ET y BE se pueden tratar con diferentes compuestos en forma crónica, de 1 a 4 días, o aguda, por períodos de 1 a 6 h por vía oral, por inhalación o por inyección directa.

4.10.5 Progenie resultante de las cruzas

Después de la eclosión se producen dos tipos de progenie, que se pueden distinguir fenotípicamente por el marcador Bd^s . i) Moscas con marcador transheterocigoto ($mwh, flr^+ / mwh^+ flr^3$), fenotípicamente con alas tipo silvestre ii) Moscas con balanceador heterocigoto ($mwh, flr^+ / TM3, Bd^s$), fenotípicamente con alas tipo serrata. Mayores detalles de este tema y del análisis estadístico de los resultados, se incluyen en el capítulo de desarrollo experimental y en la **figura 6**.

4.11 Sistema citocromo P_{450}

El sistema citocromo P_{450} (cit P_{450}) de estos organismos está distribuido principalmente en el intestino medio, en los cuerpos grasos pericuticulares y en los túbulos de Malpighi. A nivel subcelular, las monooxigenasas están localizadas en retículo endoplásmico liso y en las mitocondrias de la corteza suprarrenal y en los microsomas hepáticos.

4.11.1 Citocromo P_{450}

En 1958 fue descubierto un pigmento microsómico (P) asociado al bióxido de carbono cuyo espectro de acción fotoquímica demostró ser una oxidasa terminal del sistema enzimático hepático responsable del metabolismo oxidante de medicamentos. Por su

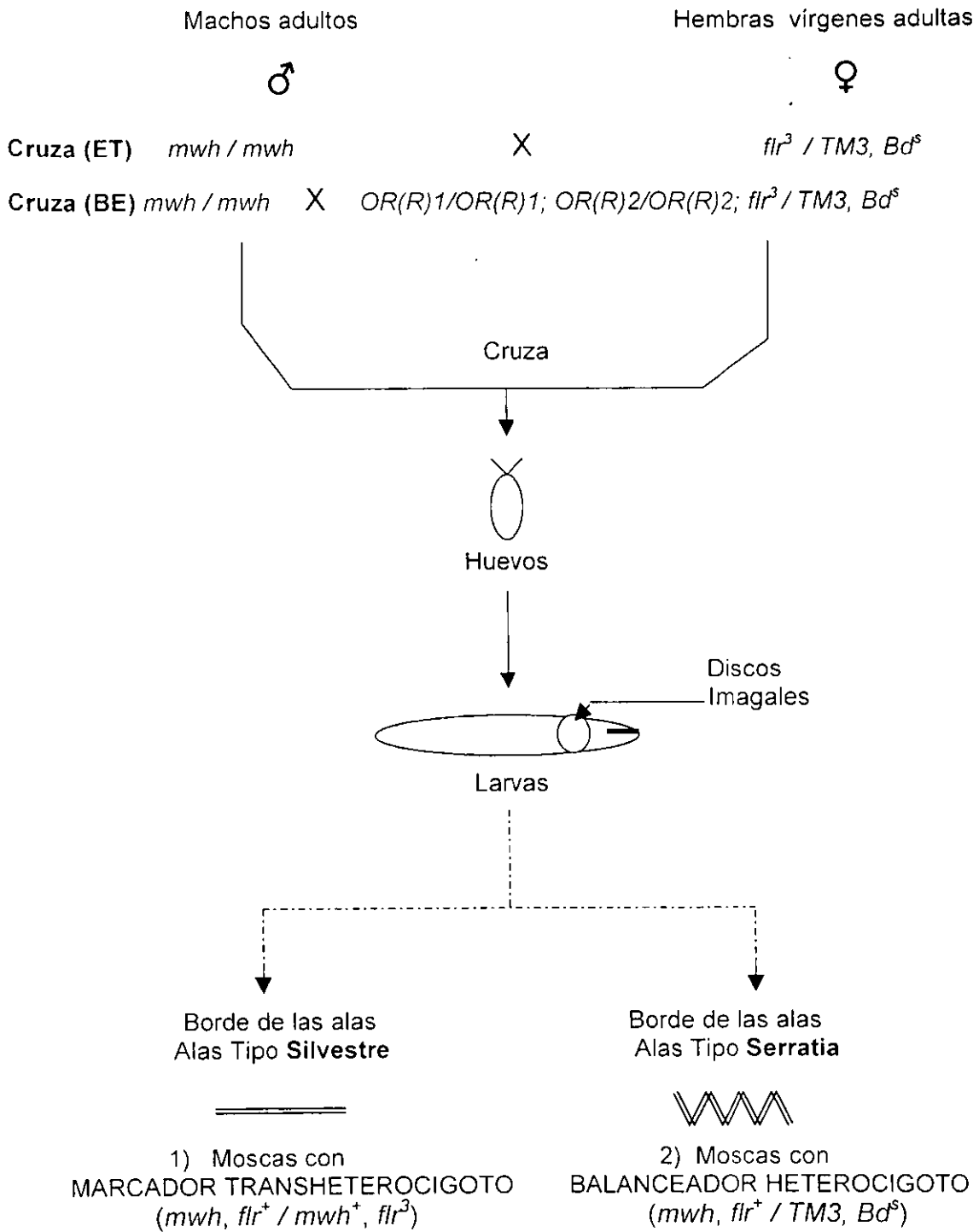


Fig. 6. Representación esquemática de las cruzas empleadas en el sistema SMART para manchas en las alas.

único pico de absorbencia a 450 nm se le llamó cit P_{450} , el cual fue aislado, caracterizado e identificado como una hemoproteína con un átomo de hierro unido al azufre de un residuo de cisteína (Nebert y González, 1987).

El cit P_{450} de los seres vivos sin membrana nuclear se encuentra en el citoplasma y en los organismos superiores, tanto en el retículo endoplásmico como en mitocondrias desde levaduras, hongos, plantas, invertebrados, peces, anfibios y reptiles (Nebert y González, 1984).

4.11.2 Reacciones catalizadas por el citocromo P_{450}

En general, el metabolismo de los xenobióticos en mamíferos involucra dos tipos de reacciones enzimáticas: las de fase I y las de fase II, en las primeras los grupos polares son hidrofílicos haciendo a estos, sustratos disponibles para las reacciones de la Fase II. El primer paso del metabolismo de los compuestos lipofílicos es la oxidación catalizada por el sistema monooxigenasa dependiente del cit P_{450} , localizado en el retículo endoplásmico del hígado y de otros tejidos. Generalmente en esta oxidación se realiza la incorporación de un grupo hidroxilo en el compuesto. Los productos metabólicos de esta fase, sufren conjugación con varios sustratos endógenos tales como glutatión, sulfatos, ácido glucorónico, aminoácidos y otros. Las reacciones de conjugación son denominadas Fase II, de las cuales resultan compuestos solubles en agua que son fácilmente excretados por el cuerpo vía urinaria o en las heces, estos conjugados pueden ser hidrolizados, liberados y reabsorbidos en el tracto intestinal (Parke *et al.*, 1991).

Las reacciones de la Fase I guían a la formación de metabolitos reactivos que pueden unirse covalentemente a las macromoléculas de los tejidos, tales como el ADN, los aminoácidos y las proteínas, ocasionando daño subcelular, carcinogénesis, mutagénesis o efecto teratogénico (Nebert, 1991), lo cual no significa que el daño subcelular o el cáncer siempre ocurra, ya que existen múltiples factores que determinan que el metabolito pueda ser tóxico o no, por ejemplo, el mecanismo de desintoxicación enzimática llevado a cabo por el organismo, el estado del sistema inmune, el estado nutricional, la predisposición genética y los factores ambientales (Guengerich, 1988).

4.11.3 Funciones metabólicas del citocromo P_{450}

Los cit P_{450} en las fracciones microsómicas hepáticas tienen como papel fundamental llevar a cabo la desintoxicación o la modificación de toxicidad ya sea incrementándola, disminuyéndola, anulándola o formando especies de oxígeno muy reactivos para el ADN (Parke *et al.*, 1991).

En todos los organismos superiores las enzimas cit P_{450} son importantes para el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos, como también para la desintoxicación de sustancias extrañas (compuestos xenobióticos), del mismo modo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos se hidroxilan mediante el sistema P_{450} . La introducción de grupos hidroxilo suministra centros de conjugación con moléculas muy polares como por ejemplo el glucuronato o sulfato, los cuales potencian notablemente la solubilidad de la molécula aromática modificada. En los insectos como *Drosophila*, las monooxigenasas participan en el metabolismo de hormonas, en los procesos de desintoxicación e incluso en eventos como la resistencia a plaguicidas e insecticidas sintéticos (Gandhi *et al.*, 1992). En los vertebrados participa principalmente en la biosíntesis de hormonas esteroideas y en los procesos de desintoxicación de xenobióticos. En el ser humano es esencial ya que los diferentes cit P_{450} son responsables de la producción esencial de esteroides, la regulación de los niveles de agentes terapéuticos en la sangre, de la eliminación de productos químicos no deseados, los cuales pueden acumularse por sus propiedades lipofílicas y en la generación de metabolitos tóxicos que pueden causar daño al material genético o producir cáncer o tumores (Porter y Coon, 1991).

4.11.4 Inducción e inhibición del citocromo P_{450}

En 1960 se descubrió que los cit P_{450} de vegetales y animales son inducidos por sustancias exógenas y endógenas. Los mecanismos pueden ser a nivel transcripcional o postranscripcional, lo cual ha hecho difícil predecir el mecanismo de inducción. Por ejemplo el etanol, la acetona y el fenobarbital inducen a genes de diferentes subfamilias

de cit P_{450} , en un caso puede ser a nivel transcripcional y en otro postranscripcional, el 3-metilcolantreno induce el cit P-448 y el aroclor 1254 inducen ambos tipos de citocromos (Gandhi *et al.*, 1992; Guttenplan *et al.*, 1976). La expresión de los genes en los mamíferos tiene control a nivel transcripcional en respuesta a los xenobióticos, condiciones ambientales o situaciones específicas del tejido (Nebert y González, 1984; Murillo, 1997).

En este trabajo se hicieron ensayos en donde los animales, con características genéticas muy semejantes a las del hombre, se expusieron a agentes físicos y químicos. El agente físico empleado fue una fuente de neutrones (Delfín *et al.*, 1997) y los compuestos químicos: la vitamina C o ácido ascórbico (Guzmán *et al.*, 1999; Zambrano *et al.*, 2000a), la clorofilina (Zambrano *et al.*, 1999a) y el ácido bórico (Zambrano *et al.*, 2000b). Se usaron neutrones porque existe poca información del efecto radiobiológico de los mismos, ya que se están usando en radioterapia y para aprovechar las facilidades del reactor Triga MARK III del Centro Nuclear de México. Los agentes químicos fueron seleccionados por sus antecedentes, ya que se ha demostrado que la vitamina C y la clorofilina son agentes antimutagénicos. Los compuestos de boro (B) son empleados en estudios de radioterapia con neutrones, para disminuir la cantidad de células malignas de tumores profundos, en donde los métodos tradicionales no han sido satisfactorios. Debido a estas propiedades a dichos productos químicos empleados se les llama moduladores, ya que estas sustancias pueden modular el daño inducidos por los neutrones, ya sea aumentándolo o potenciándolo (Zambrano y Mouton, 1975; Cebulska-Wasilewska *et al.*, 1981; Mirzayans *et al.*, 1992), también pueden disminuirlo (antimutágenos) o en algunos casos, simplemente acumularse selectivamente en un órgano específico para modular el efecto causado por la radiación (Mazar y Muñoz, 1980).

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1 Hipótesis

- La radiación por neutrones es capaz de inducir daño genético que puede ser evaluado por SMART.
- La magnitud del daño es cuantificable y es mayor a medida que la potencia del reactor (razón de dosis) es mayor.
- La presencia de moduladores químicos como el ácido ascórbico, la clorofilina y el ácido bórico influirá en la respuesta de SMART a la radiación.
- Existe antimutagénesis del AA y la CLNA del daño inducido por neutrones.
- El daño por neutrones aumenta cuando está presente el boro.
- Se pueden estudiar la antimutagénesis y la captura de neutrones por boro en SMART.

5.2 Objetivo general

- Estudiar los efectos moduladores del ácido ascórbico, de la clorofilina y del ácido bórico, del daño inducido por neutrones en *Drosophila melanogaster*, mediante el uso de SMART.

5.3 Objetivos particulares

- Determinar la respuesta cuantitativa de SMART al daño inducido por neutrones y establecer si este efecto es dependiente de la razón de dosis.

- Estudiar si existe una influencia de la edad larval en la respuesta de SMART.
- Establecer si la respuesta observada es modificable por la presencia de ciertos moduladores químicos, como el ácido ascórbico, la clorofilina y el ácido bórico.
- Evaluar el efecto antígenotóxico del ácido ascórbico y la clorofilina.
- Determinar si la presencia del ácido bórico durante la irradiación, provoca un efecto sinérgico con el daño por neutrones
- Establecer si el grado de la modulación es afectado por la concentración de cada uno.
- Evaluar si la presencia de mayor capacidad metabólica influye en el grado o tipo de respuesta.
- Estudiar la influencia de la recombinación mitótica en la modulación de la respuesta.
- Comparar el tipo de respuesta de los tres moduladores químicos.

6.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Preparación de medio de cultivo

El desarrollo de los animales, las cruzas entre las diferentes líneas de moscas y el crecimiento de las larvas, se hicieron en medio de cultivo preparado con agar en polvo, harina de maíz, sacarosa, dextrosa, levadura, nipagin y ácido propiónico. Tanto la harina de maíz, como el azúcar y la levadura son nutrientes básicos. El agar permite contar con un medio sólido al calentarse y después enfriarse. El ácido propiónico y el nipagin al 1.25% son fungicidas, el ácido propiónico es además bactericida, por lo que estos compuestos evitan la posible contaminación de los cultivos por microorganismos, los cuales al competir interfieren en el desarrollo de las larvas de *Drosophila*. Los fungicidas se deben agregar al medio cuando éste tenga una temperatura de 50°C.

6.2 Proliferación de moscas

Para la obtención de un buen número de moscas, se colocó un grupo de aproximadamente 50 moscas entre hembras y machos, de las tres líneas por separado, en frascos que contenían medio de cultivo con un poco de levadura en pasta sobre su superficie. Estas moscas fueron conservadas a 25°C y 65% de humedad y trasvasadas cada tercer día, en frascos con el mismo tipo de medio. Los frascos donde fueron retiradas las moscas se conservaron bajo las mismas condiciones de laboratorio, ya que el medio estaba lleno de huevecillos, que tardaron de 11 a 14 días para completar su desarrollo. Se trasvasaron adultos, machos y hembras, en frascos con medio de cultivo recién preparado, para las tres líneas de moscas usadas en este trabajo (tabla III):

- a) $flr^3 / TM3, Bd^f$
- b) $OR(R)1/OR(R)1; OR(R)2/OR(R)2; flr^3 / TM3, Bd^f$
- c) mwh / mwh

TABLA III. INDIVIDUOS HETERÓCIGOTOS PARA LOS MARCADORES flr^3 Y Bd^S : $flr^3/TM3, Bd^S$ (Lindsley y Zimm, 1990; Ramírez, 1999).

		Gametos femeninos	
Gametos Masculinos		flr^3	$TM3, Bd^S$
	flr^3		flr^3 / flr^3 Letal
$TM3, Bd^S$		$flr^3 / TM3, Bd^S$	$TM3, Bd^S / TM3, Bd^S$ Letal

6.3 Aislamiento de moscas por sexo

Es fundamental contar con hembras vírgenes al hacer las cruzas experimentales entre moscas pertenecientes a las diferentes líneas flr^3 y *ORR*. Como regla, las hembras no son fecundadas antes de las primeras ocho horas después de emerger, de manera que si todas las moscas son retiradas de la botella de cultivo, las hembras colectadas en las 8 horas siguientes tendrán una buena probabilidad de ser vírgenes.

Se tomaron las moscas trasvasadas y se pasaron a un eterizador, se separaron cuidadosamente las hembras vírgenes de las cepas flr^3 y *ORR*, observándolas en el microscopio de disección, las cuales se identificaron por su color claro y se separaron en frascos homeopáticos con medio de cultivo fresco, aproximadamente cada seis horas, ya que a las ocho horas de edad alcanzan su madurez sexual (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992). Los frascos homeopáticos se pusieron horizontalmente para evitar que las moscas recién emergidas se pegaran al medio de cultivo del fondo.

Los machos *mwh* se separaron tres días antes de la cruce, de la misma forma como se hizo para aislar las hembras vírgenes. Se colocaron las hembras vírgenes durante una

semana en frascos con medio de cultivo fresco y levadura, con el fin de aumentar el número de huevos depositados por las hembras.

6.4 Cruzas

Se utilizaron dos tipos de cruzas, en la estándar (ET), hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster* de la línea *flr³/TM3, Bd^s* fueron fecundadas por machos *mwh/mwh*, que crecieron a 25°C y 65% de humedad relativa. Para la segunda, de bioactivación elevada (BE), se emplearon hembras vírgenes de la línea *OR(R)1/OR(R)1; OR(R)2/OR(R)2; flr/TM3, Bd^s*, resistente al DDT (Dapkus y Merrell, 1977), que se cruzaron con machos *mwh/mwh*, incubados a las mismas condiciones de temperatura y humedad. Los individuos obtenidos se caracterizan por tener niveles elevados de cit P_{450} , responsable de activar metabólicamente a un amplio número de promutágenos. Se requirió un estricto control de la temperatura, ya que un cambio en esta puede afectar el tamaño de las manchas.

6.5 Obtención de larvas

Una vez realizada la cruce se colectaron huevos en botellas de cultivo con medio fresco con levadura durante 8 h a 25°C, se eliminaron los progenitores y se incubaron los huevos durante 72 h ó 96 h, según los requerimientos del experimento, bajo las mismas condiciones de laboratorio. Cuando las larvas cumplieron 72 h de edad, se aislaron del medio de cultivo con una solución de sacarosa al 20%, para protegerlas de la osmolaridad alta, utilizando el método de Nöthinger (1970), que se basa en la formación en el frasco de un gradiente de densidad al permitir la flotación de las larvas separándose del medio de cultivo, disminuyendo así el efecto de manipulación. Posteriormente se agregó agua al embudo, quedando las larvas en el fondo del mismo. Finalmente se colectaron las larvas en una coladera cubierta con un cedazo, se tomaron con una espátula y se depositaron en los contenedores de lucita o en los viales, según las condiciones del experimento.

6.6 Establecimiento de las condiciones de irradiación

Para establecer las condiciones de irradiación se probaron diferentes dosis, a dos potencias del reactor TRIGA Mark III (RTMIII) del Instituto Nacional de Investigaciones

Nucleares (ININ) de México y larvas de dos edades distintas. Se procedió de la siguiente manera: después de cruzar machos y hembras de las líneas ET y BE, se colectaron huevos durante 8h en botellas de cultivo conteniendo medio fresco con levadura en su superficie. A las 72 ± 4 h ó 96 ± 4 h de la colecta de huevos, se agregó una solución de sacarosa al 20% a cada frasco con las larvas y se colocaron en un embudo de separación, en la forma como se describe en el inciso de obtención de larvas (figuras 7 y 8).

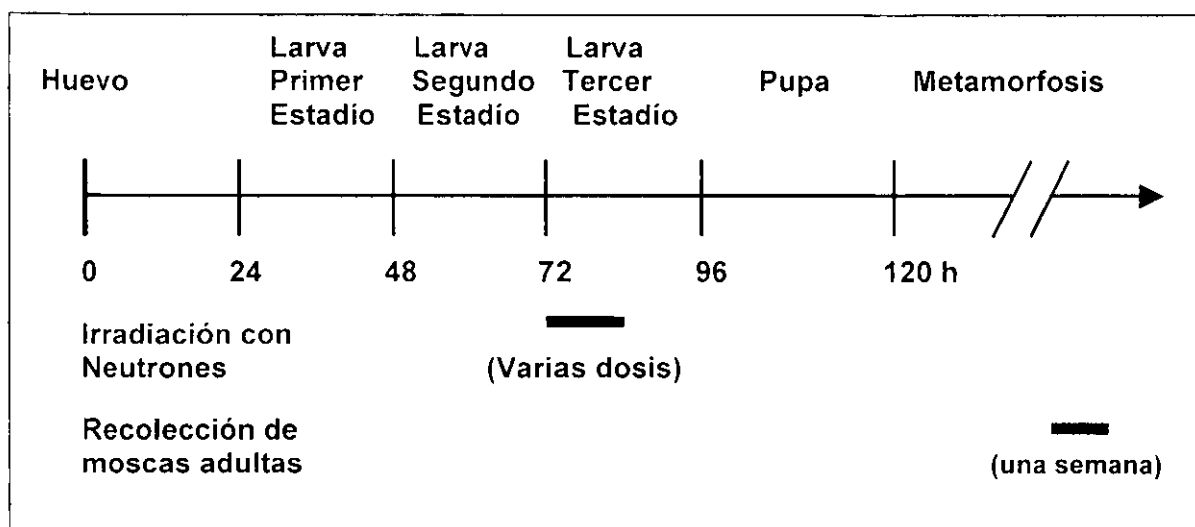


Fig. 7. Protocolo de irradiación con neutrones a larvas de 72 h de edad, en el sistema SMART en *Drosophila melanogaster*.

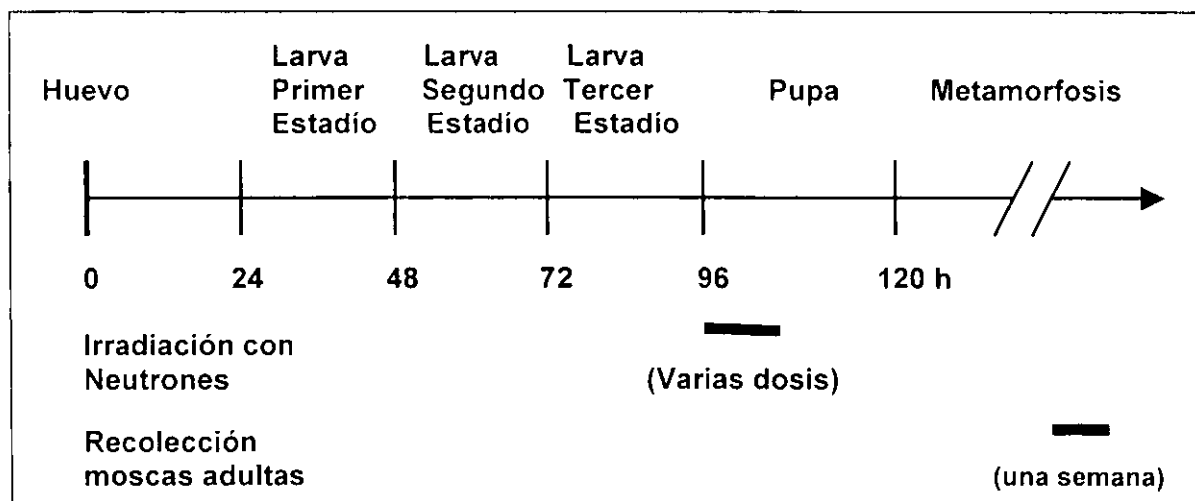


Fig. 8. Protocolo de irradiación con neutrones a larvas de 96 h de edad, en el sistema SMART en *Drosophila melanogaster*.

Se colocó una monocapa de larvas en cajas de lucita, las cuales están compuestas de hidrógeno y una pequeña cantidad de oxígeno, estas tienen una sección eficaz de 0.0034 y 0.00018 barns, respectivamente, por lo que este material tiene una baja probabilidad de una reacción nuclear del tipo n, γ (Attix, 1986). Las cajas tienen forma de polvera, con 7.6 cm de longitud, 7.6 cm de ancho y 0.9 cm de fondo, con una cavidad circular de 6.4 cm de diámetro y 0.2 cm de profundidad. La tapa de estos contenedores tiene varios orificios para permitir la entrada de oxígeno. Para la irradiación, se puso previamente un círculo de papel filtro humedecido con una solución de sacarosa al 4%, que funcionó como fuente de carbono para permitir la supervivencia de las larvas durante el tiempo de irradiación. Se colocó una gasa cubriendo las larvas y se sellaron con cinta adhesiva todos los contenedores con las larvas.

Para proceder a la irradiación, se colocaron los contenedores de lucita en la columna térmica del RTMIII, que está hecha de grafito, rodeado por una capa de aluminio que se extiende desde la periferia del núcleo del reactor hasta el blindaje de concreto. La cavidad donde se colocan las muestras es llamada "*hohlraum*", tiene una sección transversal de 0.91 m X 0.91 m y una longitud de 1 m aproximadamente, está rodeada de boro, polietileno y bloques de grafito. En el RTMIII existe una proporción de cadmio de 4.9%, que significa que existe una pequeña contribución de neutrones rápidos en comparación con los neutrones térmicos, estos últimos tienen una energía de 0.025 eV. A pesar de esta diferencia, la influencia de neutrones rápidos fue calculada en la dosis equivalente total, debido a que los neutrones rápidos tienen un factor de calidad de 20 contra 5 de los neutrones térmicos. La contribución de radiación γ es despreciable, porque se encuentra en la escala de los mGy/h. Cuatro cajas de lucita se pusieron verticalmente en un soporte de acrílico colocado en el centro del *hohlraum*, con el objeto de asegurar que todas las larvas recibieran una dosis uniforme. Se operó el RTMIII a las potencias de 300 y 1000 kW con un período del reactor de 10 seg. El período es el tiempo que necesita el reactor para incrementar el flujo de neutrones en un factor e , cuando e es el número Euler. Se determinaron la dosis absorbida y la equivalente para cada potencia, estas fueron: 1.5992 Gy (8.0 Sv) y 3.1986 Gy (16.0 Sv) para 300 kW y 0.8425 Gy (4.2 Sv) y 1.6852 Gy (8.5 Sv) para 1000 kW, respectivamente. Estas dosis corresponden a 72 min 28 seg, 144 min 56 seg, 20 min 48 seg, 41 min 40 seg respectivamente, con razones de dosis de 1.84 ± 0.36 mSv/s para 300 kW y 3.37 ± 0.37

mSv/s para 1000 kW. Se hicieron tres series de experimentos que incluyeron a los testigos negativos. Los detalles de la dosimetría están en preparación (Delfín *et al.*, 2001).

6.7 Tratamiento con moduladores

6.7.1 Ácido ascórbico y clorofilina

Se pesaron 250 mg y 1 g por separado, de cada modulador, ya sea ácido ascórbico (AA) ó clorofilina (CLNA). Se agregaron 20 ml de agua destilada a cada vaso para obtener las concentraciones de 1.25 y 5%. En dos viales con 0.7 g de puré de papa molido se colocaron 5 ml de la concentración baja y en otros dos 5 ml de la alta de cada modulador. Para los viales testigo e irradiado, se agregaron solamente 5 ml de agua destilada. Se separaron las larvas de 72 h de edad de los frascos de cultivo con el método ya descrito en "obtención de larvas". Se dividieron los viales en seis grupos: i) testigo, ii) concentración baja, iii) concentración alta, iv) irradiado, v) concentración baja más irradiación y vi) concentración alta más irradiación y se colocó aproximadamente la misma cantidad de larvas en cada vial que contenía el modulador. Se incubaron por 24 h dentro del cuarto de cultivo a 25°C y 65% de humedad relativa. En esta situación las larvas se alimentaron durante 24 ± 4 h con concentraciones: baja, 71 mM (1.25%), y alta 285 mM (5%) de AA y baja 45.5 mM (1.25%) y alta, 182 mM (5%) para CLNA. El mismo tratamiento fue aplicado a otros 6 grupos de larvas de la línea BE. Las concentraciones empleadas se establecieron con base en la literatura y en experiencias previas en el laboratorio (Olvera *et al.*, 1995; Murillo, 1997; Ramírez, 1999). El protocolo se seleccionó de acuerdo con criterio establecido por Graf y Singer (1992).

6.7.2 Ácido bórico (H_3BO_3)

6.7.2.1 Determinación de las dosis subtóxicas

Se seleccionaron las dosis subtóxicas de 0.25 y 1 mM para los pretratamientos con AB, ya que a éstas concentraciones no se observó efecto sobre la viabilidad.

6.7.2.2 Pretratamiento con ácido bórico

Se pesaron 0.123 g de AB, se disolvieron hasta su totalidad con 10 ml de agua bidestilada, calentándolo ligeramente, para hacer una solución madre de 200 mM. Posteriormente se tomaron 0.25 ml y se disolvieron en 49.75 ml obteniéndose así la concentración de 1 mM. De esta solución se tomaron 25 ml y se diluyeron en 25 ml de agua bidestilada (0.5 mM), repitiéndose este paso para obtener la solución con la concentración de 0.25 mM.

6.8 Preparación de material biológico para su irradiación

Después de 24 ± 4 h de pretratamiento con alguno de los tres moduladores (AA, CLNA o AB), se colectaron las larvas simplemente dejando caer un chorro de agua en los viales y se pasaron a través de una coladera. En cada uno de los contenedores de lucita se colocó un círculo de papel filtro humedecido con una solución de sacarosa al 4%, sobre los cuales se depositaron las larvas, se sellaron cada uno de ellos con cinta adhesiva, se pusieron en una caja térmica y se llevaron a irradiar. Los contenedores testigo, concentración baja y concentración alta se transportaron al RTMIII pero no se irradiaron, los otros tres contenedores (irradiado, concentración baja más irradiación y concentración alta más irradiación), se llevaron al RTMIII y se acomodaron verticalmente en un soporte de acrílico, que se puso en el centro del *hohlraum*, con el objeto de asegurar que todas las muestras recibieran una dosis uniforme. Se operó el RTMIII a la potencia de 1000 kW y dosis de 1.6852 Gy (8.5 Sv), correspondiente a 41 min 40 seg. Inmediatamente después de la irradiación, se depositaron las larvas dentro de botellas de cultivo con medio fresco y se incubaron a 25°C y 65% de humedad relativa durante una semana (figura 9).

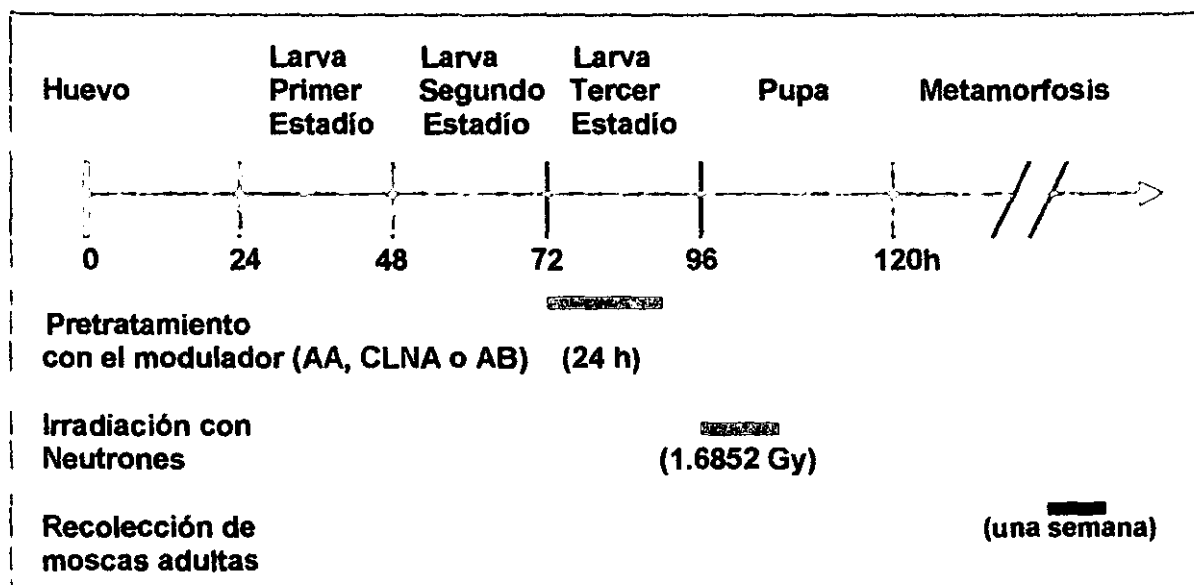


Fig. 9. Protocolo que muestra los tiempos del pretratamiento con los diversos moduladores, el tratamiento con neutrones y la recolección de las moscas adultas, en el sistema SMART en *Drosophila melanogaster*.

6.9 Elaboración de preparaciones

Después de la eclosión, se colectaron las moscas adultas con ayuda de un eterizador y se pusieron en etanol al 70%. 24 h después se prepararon laminillas, disectando las alas de los adultos y colocándolas en un portaobjetos con solución de Faure, (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de cloral hidratado y 50 ml de agua destilada), acomodando 10 pares de alas de moscas hembras en una línea superior del portaobjetos y otros 10 pares de moscas machos en una línea inferior. Se dejaron secar en una platina térmica durante 24 h, al cabo de las cuales se procedió a colocar los cubreobjetos sobre cada preparación, agregando una o dos gotas de solución de Faure y se dejaron secar en una platina térmica otras 24 h (Graf *et al.*, 1984).

6.10 Análisis en adultos

Se analizaron las superficies ventral y dorsal de las 40 alas de cada preparación y de tres experimentos por separado, hasta llegar a un mínimo de 120 alas, que es el tamaño de muestra más recomendable (Frei y Würigler, 1994; Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Se analizaron las alas a una amplificación de 400 X (Graf *et al.*, 1984), se consideró la

ubicación de las manchas en el ala, ya que en ellas se pueden identificar siete secciones: A, B, C, C', D, D' y E (García-Bellido y Merriam, 1971). Debido a que existe una correlación entre el tiempo de inducción del cambio genético en las células somáticas y el tamaño de la mancha resultante (Graf *et al.*, 1994; Graf, 1995), se tomó en cuenta el tamaño de las mismas, aparte del tipo y número de manchas para determinar su frecuencia. En cuanto al tipo de manchas, se identificaron las simples pequeñas, formadas por 1 a 2 células, las simples grandes, de más de 2 células y las gemelas, con fenotipos *mwh*, junto a los clones *flr*. Las manchas se analizaron por separado y en los clones grandes se contabilizaron como independientes aquellos que se encontraron separados por tres o más hileras de tricomas normales (Würgler y Graf, 1990).

6.11 Progenie

En la población de moscas resultantes de cada experimento se pueden identificar dos tipos de progenies, que se distinguen fenotípicamente, con base en el marcador Bd^S ,

- i) Moscas con marcador transheterocigoto: $mwh, flr^{3+}/mwh^+, flr^3$. Alas tipo silvestre con cromosomas normales estructuralmente, en las cuales tanto los eventos derivados de mutación y/o recombinación, dan lugar a la formación de manchas simples, ya sean con fenotipos *mwh* ó *flr* y/ó gemelas con clones con fenotipos *mwh*, adyacentes a los clones *flr*.
- ii) Moscas con el balanceador heterocigoto TM3: $mwh, flr^{3+}/TM3, Bd^S$, con alas serradas, en donde son eliminados la mayoría de los eventos de recombinación debido a la presencia de inversiones múltiples y funciona como un balanceador. En este caso únicamente se obtienen manchas simples, con fenotipo *mwh*. Estas manchas *mwh* son el resultado de eventos mutacionales solamente, debido a que no es viable la recombinación mitótica entre el cromosoma TM3 con múltiples inversiones y el cromosoma homólogo, estructuralmente normal (**tabla IV**) (Frei *et al.*, 1992; Graf *et al.*, 1994; Campesato *et al.*, 1997).

TABLA IV. PROGENIE RESULTANTE DE LA CRUZA ORIGINAL: $mwh / mwh \times flr^3$ y $TM3, Bd^6$ (CRUCES, 1999).

		Gametos femeninos	flr^3	$TM3, Bd^6$
Gametos Masculinos				
	mwh		mwh / flr^3 Manchas simples, fenotipo mwh ó flr y/ó manchas gemelas Mutación y recombinación	$mwh / TM3, Bd^6$ Manchas simples, fenotipo mwh Sólo mutación, sin recombinación

6.12 Análisis estadístico de los datos de SMART

Para el análisis estadístico se determinó la frecuencia de manchas por ala en los grupos tratados, comparados con los testigos, usando un procedimiento de decisión múltiple para establecer si los resultados son positivos, ligeramente positivos, dudosos o negativos (Frei, 1994). El procedimiento está basado en dos hipótesis: (1) cuando la frecuencia de mutación inducida más la espontánea en grupos tratados, no es más grande que la frecuencia de mutación en un grupo testigo y (2) cuando la frecuencia de mutación inducida en las series tratadas no es menor que "m" veces la observada en grupos testigos. Ambas hipótesis son aprobadas a un nivel de significación del 5%. El valor de "m" para las manchas pequeñas y totales, que presentan una frecuencia de mutación espontánea relativamente alta, es de 2. Para las manchas grandes simples y para las gemelas, que tienen baja frecuencia espontánea, el valor es de 5 (Frei y Würigler, 1988). Para el diseño óptimo de un experimento se analizan igual número de alas para el testigo como para las series tratadas, de tal forma que para evitar resultados dudosos se evalúan por lo menos 120 alas en cada serie. Se debe tomar en cuenta que se analizan aproximadamente 25,000 células por cada ala, ahora bien, tomando en cuenta las 40 alas de cada preparación, se contabilizan aproximadamente 1×10^6 células por preparación (García-Bellido y Dapena, 1974; Frei y Würigler, 1994).

6.13 Mapeo del flujo de neutrones

Los flujos de neutrones se obtuvieron utilizando el método de activación de laminillas, para lo cual se colocaron cuatro arreglos constituidos por diez laminillas de oro cada uno, en la instalación de irradiación de la columna térmica del RTMIII. Para el montaje de cada arreglo se tomaron cinco laminillas de oro y cada una se envolvió en un papel absorbente, se tomaron otras cinco y se cubrieron con cadmio por ambas caras, para que sólo reaccionaran con neutrones de energías mayores a 0.48 eV, finalmente se envolvieron con papel absorbente y cinta adhesiva. Se colocaron las diez laminillas alternadamente, en una hoja de cartón que preservó un área similar a la utilizada para irradiar larvas. Dos arreglos se emplearon para activarlos a la potencia de 300 kW y dos más para 1000 kW, cada arreglo con un tiempo determinado de irradiación. Terminada la irradiación y con el reactor en modo apagado, se retiró cada arreglo llevándolo a un cuarto de conteo, donde se estimó la actividad de cada laminilla por medio de un detector de Germanio hiperpuro y electrónica asociada. Con los datos obtenidos se ejecutó el programa CALFLUX para determinar el flujo de neutrones subcádmicos y epicádmicos así como las razones de cadmio. Finalmente se calcularon las dosis con los parámetros del ICRP publicación 90 (Delfín-Loya *et al.*, 2000).

7.

RESULTADOS

7.1 Cálculo de la cantidad de alas y de células analizadas

Para establecer las condiciones de irradiación más adecuadas para el estudio con los moduladores se hicieron cinco experimentos separados, en fechas diferentes, utilizando larvas de 72 h de edad, operando el reactor Triga MARK III (RTMIII) del Centro Nuclear de México con tres potencias diferentes, 300, 500 (datos no presentados) y 1000 kW. Debido a que las frecuencias de manchas totales para los fenómenos de mutación y recombinación en células somáticas eran bajas, comparadas con las del testigo sin irradiar, se realizaron tres experimentos utilizando larvas de 96 h de edad, obteniéndose de esta forma una diferencia considerable entre el testigo y las muestras irradiadas. En cada uno de los experimentos se contaron 40 alas de adultos, 20 de hembras y 20 de machos, hasta un total de 200 alas, para dos potencias del RTMIII (300 y 1000 kW) para las larvas de 72 h y de 120 alas para las larvas de 96 h de edad. En cada una de las alas se contaron aproximadamente 24,400 células, por lo que se contabilizaron alrededor de 4.88×10^6 células para las larvas de 72 h y de 2.92×10^6 células para las larvas de 96 h. Si estos valores se multiplican por los cinco puntos de la gráfica para el tratamiento con neutrones a larvas de 72 h, la **tabla V** y **figura 10** son el resultado del análisis de 24.4×10^6 células y la **tabla VI** y **figura 10** del conteo de 14.6×10^6 células más o menos. En la **tabla VI** y **figura 10** se presentan además los resultados, no sólo de las moscas con marcador transheterocigoto, sino también con balanceador heterocigoto, por lo que se contaron aproximadamente 29.2×10^6 células. Para establecer las condiciones de irradiación se analizaron en total 24.4×10^6 células + $29.2 \times 10^6 = 53.68 \times 10^6$ células en 2,200 alas.

En el caso de los moduladores se contaron diversos grupos i) testigo negativo (sin pretratamiento y sin irradiar), ii) con pretratamiento a concentración baja del modulador, iii)

con pretratamiento a concentración alta del modulador iv) testigo positivo (sin pretratamiento y con irradiación con neutrones), v) con pretratamiento a concentración baja del modulador e irradiación 24 h después, vi) con pretratamiento a concentración alta del modulador e irradiación 24 h después. Para cada una de las muestras se contaron 120 alas X 6 muestras, para las moscas con marcador transheterocigoto, lo que nos da un total de 720 alas; multiplicadas por 2, para las moscas con balanceador heterocigoto es igual a 1,440 alas para cada modulador, dando un total de 35.13×10^6 células analizadas para cada modulador. Siendo para los tres moduladores 105.39×10^6 células en 4,320 alas.

En total para este trabajo se analizaron 158.99×10^6 células en 6,520 alas.

7.2 Establecimiento de las condiciones de irradiación con neutrones

En todas las tablas de resultados se incluye el tratamiento, número de alas analizadas, manchas simples pequeñas (de 1 a 2 células de tamaño), grandes (de más de 2 células), gemelas y totales, además de manchas con mutación *mwh* y el tamaño promedio del clon.

Se analizaron las dos subpoblaciones que se obtienen después de la cruce entre los machos *mwh* con las hembras *flr³/TM3, Bd^s*: la población de adultos con marcador transheterocigoto: *mwh flr³/mwh⁺ flr³*, fenotípicamente con alas tipo silvestre en donde los eventos de mutación y/o recombinación, dan lugar a la formación de manchas simples, ya sean con fenotipos *mwh* ó *flr* y/o gemelas con clones con fenotipos *mwh*, adyacentes a los *flr* y las moscas con el balanceador heterocigoto TM3: *mwh flr³/TM3, Bd^s*, fenotípicamente con alas serradas, en donde son eliminados la mayoría de los eventos de recombinación debido a la presencia de inversiones múltiples, funcionando como un balanceador. En este caso únicamente se obtienen manchas simples, con fenotipo *mwh*. Estas manchas *mwh* son el resultado de eventos mutacionales solamente, debido a que no es viable la recombinación mitótica entre el cromosoma TM3 con múltiples inversiones y el cromosoma homólogo, estructuralmente normal (Frei *et al.*, 1992; Graf *et al.*, 1994; Campesato *et al.*, 1997).

El mapeo de flujo de neutrones realizado para estos experimentos reportó un promedio de $\phi_{\text{subc}} = 2.0681 \times 10^9 \text{ n/cm}^2\text{-s}$, $\phi_{\text{epic}} = 1.0166 \times 10^7 \text{ n/cm}^2\text{-s}$. Se despreció el fondo proveniente de la radiación gamma debido a que es muy bajo en la columna térmica. Las frecuencias de manchas obtenidas a 300 kW con las dosis de 1.5992 y 3.1986 Gy y a 1000 kW con las dosis de 0.8425 y 1.6852 Gy, se presentan en las **tablas V y VI**, así como en la **figura 10**. Los resultados de la dosimetría se encuentran en Delfín *et al.* (2000).

Los experimentos se realizaron con larvas de 72 y 96 h de edad, encontrándose que para las de 72 h, se nota una relación directamente proporcional entre la dosis de neutrones a 300 kW y la frecuencia de manchas grandes, gemelas y totales. Sin embargo, para manchas pequeñas las frecuencias en el testigo son mayores que en los tratados. Por otra parte, a pesar de que la frecuencia de manchas gemelas se incrementó en forma proporcional a la dosis, esta diferencia no fue muy grande, apenas del doble. En los experimentos de 1000 kW con distintas dosis, los resultados muestran también la misma proporción lineal para manchas grandes, gemelas y totales, pero este efecto no se observa en las manchas pequeñas, ya que también la frecuencia es menor en las muestras irradiadas que en el testigo. Nuevamente la frecuencia de manchas no es significativa con respecto a las del testigo sin irradiar. Comparando las dosis administradas a 1000 kW con las de 300 kW, se evidencia que los valores obtenidos a la primera potencia del RTMIII, se encuentran por arriba de las de 300 kW (**figura 10**), sin embargo, aunque las diferencias son mayores con respecto al testigo, aún no son lo suficientemente grandes como para usar estas condiciones con moduladores.

Los resultados para larvas de 96 h muestran la relación de dosis-respuesta característica y son similares a los de las larvas de 72 h, excepto que para las manchas pequeñas, también se encuentra un aumento muy considerable en la frecuencia al aumentar la dosis de radiación. Este efecto es más evidente para manchas totales.

7.3 Influencia de la edad larval en las frecuencias en células somáticas

Comparando los resultados de las larvas de 72 h (**tabla V y figura 10**) con los de 96 h (**tabla VI y figura 10**), se presenta una diferencia mayor, de hasta 19 X, para las larvas de

96 h, que para las de 72 h, pero el valor de los clones *mwh* y del tamaño promedio del clon son semejantes para larvas de la misma edad, aunque diferentes con larvas de cada una de las edades. Estas manchas fueron más pequeñas aunque más numerosas para larvas de 96 h, que para las de 72 h. En la **figura 11** se observa la distribución del tamaño de los clones y su frecuencia para larvas de 72 y 96 h de edad, tanto para la progenie con el marcador transheterocigoto como con balanceador heterocigoto. En las larvas de 72 h, aparte del incremento en el tamaño promedio del clon, existe una reducción en las manchas con mutación *mwh*, comparadas con los estadios larvarios de 96 h. El tamaño promedio de manchas para individuos de 72 h es de 10 a 30 células, en cambio para larvas de 96 h es de 1 a 8 (**figura 11**) (Zambrano *et al.*, 1997, 1998a).

En los resultados con balanceador heterocigoto, para larvas de 96 h, se puede observar una relación lineal de dosis-respuesta, pero las frecuencias de las manchas son menores que las encontradas en las moscas con cromosomas estructuralmente normales. La frecuencia de manchas gemelas, que son exclusivamente producto de recombinación somática, es de 0, lo cual se nota en las **tablas V y VI**. La diferencia entre la progenie estándar y con balanceador, es debida al hecho de que en este último caso sólo es posible recuperar los eventos mutacionales y de esta manera se puede calcular la cantidad de daño debido a recombinación, el cual, en este caso, es del 65% aproximadamente.

7.4 Resultados con los moduladores del daño inducido con neutrones

Se realizaron tres experimentos, en fechas diferentes, para cada uno de los moduladores y se compararon los resultados obtenidos en cada uno de ellos con sus respectivos testigos, tanto negativos (sin pretratamiento y sin irradiar) como positivos (sin pretratamiento pero con irradiación). El análisis de regresión lineal se presenta en la **figura 12**.

Se analizó la subpoblación con marcador transheterocigoto: *mwh*, *flr³⁺/mwh⁺*, *flr³*, fenotípicamente con alas tipo silvestre y la subpoblación con el balanceador heterocigoto TM3: *mwh*, *flr³⁺/TM3*, *Bd^s*, fenotípicamente con alas serradas.

7.4.1 Ácido ascórbico

En la **tabla VII** se presentan las frecuencias de mutación y recombinación en células somáticas para la cruce estándar (ET), con marcador transheterocigoto en la que se observa que no existen diferencias significativas para las frecuencias de manchas entre los grupos tratados con ácido ascórbico (AA) a concentraciones baja (71 mM) y alta (285 mM). Este efecto fue claro principalmente para manchas totales.

El tratamiento con neutrones a la dosis de 1.6852 Gy, incrementó significativamente la frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales, aumentando más de 12 X, en las manchas totales. Este efecto fue más evidente para manchas pequeñas y totales, comparadas con las frecuencias del testigo, para los mismos tipos de manchas. Para los grupos pretratados con AA, el daño producido por la irradiación disminuyó en 35% en promedio. El efecto pudo notarse claramente para manchas pequeñas, gemelas y totales y se comprobó que es independiente de la concentración de AA usada en el pretratamiento (**tabla VII** y **figura 13**).

En la **tabla VIII** se presentan los resultados para la cruce de bioactivación elevada (BE), con marcador transheterocigoto y se puede observar que los resultados son semejantes a los de la cruce ET. Los grupos que únicamente recibieron un pretratamiento con AA, no mostraron diferencias significativas en cuanto a sus frecuencias de manchas cuando se compararon con el grupo testigo. Sin embargo, cuando se analizaron los resultados obtenidos para los grupos irradiados con neutrones, se incrementó la frecuencia de manchas pequeñas grandes, gemelas y totales. (**figura 13**). Cuando se compararon los resultados obtenidos en ambas cruces (ET y BE) para los grupos irradiados, se pudo comprobar que no existen diferencias significativas.

Al comparar los valores de la cruce BE de los grupos irradiados ya mencionados con los que recibieron pretratamiento con diferentes concentraciones de AA, previos a la irradiación, se encuentra que la cantidad de manchas disminuye significativamente y este efecto es independiente de la concentración. En la cruces ET y BE, se detecta que para la concentración de 71 mM los valores se redujeron, lo que no reflejó diferencias significativas entre las dos cruces para esta concentración. La concentración de 182 mM,

tampoco da una diferencia significativa. Cuando se compararon los resultados obtenidos en las **figuras 13 y 14** se observa que las frecuencias de mutación espontánea son ligeramente mayores para la craza BE que para la ET (**tablas VII y VIII**). El efecto protector del AA en la craza BE es aproximadamente del 33.4 y 40.8% para las concentraciones baja y alta de AA, en comparación con el 33.9 y 33.4% de la craza ET, para las mismas concentraciones (**figura 20**).

En los resultados obtenidos para las cruzas ET y BE con el balanceador heterocigoto, se obtuvieron valores menores que para las moscas con el marcador transheterocigoto, no existiendo una diferencia entre el testigo negativo y las muestras pretratadas con el AA únicamente, sin embargo al irradiar a las larvas el aumento fue considerable. En este caso también se observa una disminución en las frecuencias de mutación al comparar los datos de las muestras irradiadas con las que recibieron un pretratamiento con AA. Es poco aparente, pero si se nota la disminución en las frecuencias de mutación, dependiente de la concentración del AA en el pretratamiento y del tipo de craza (**tablas IX, X; figuras 14 y 21**).

7.4.2 Clorofilina

Las frecuencias de mutación y recombinación en células somáticas para la craza ET se presentan en la **tabla XI**, en donde se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos pretratados con clorofilina (CLNA) y el testigo negativo.

Los resultados obtenidos en la craza BE (**tabla XII**) denotan que no existen diferencias significativas entre las frecuencias registradas para manchas en el testigo y en los individuos que recibieron pretratamiento con concentraciones de 45.5 mM y 182 mM de CLNA sin irradiación.

En los grupos irradiados, se observó que el tratamiento con neutrones a la dosis de 1.6852 Gy a 1000 kW, aumentó los valores significativamente, hasta más de 8 X. Este efecto fue significativo para manchas pequeñas y totales en ambas cruzas.

El daño producido por la irradiación se redujo cuando las larvas de 72 h recibieron un pretratamiento con CLNA, antes de ser irradiadas, los valores de las frecuencias disminuyeron para la concentración baja (45.5mM) en la craza ET y en la BE. Para la concentración alta (182 mM) las frecuencias se redujeron aún más para ambas cruza. En la craza BE la inhibición fue mayor que en la craza ET y pudo observarse claramente que es dependiente de la concentración de CLNA usada en el pretratamiento, sin embargo, al realizar el análisis estadístico únicamente se encontraron diferencias significativas en el grupo de la craza BE a concentración alta (**tablas XI, XII; figuras 15 y 20**).

Al comparar los resultados obtenidos en la craza ET con los de la BE, se observa que las frecuencias de mutación obtenidas en los diferentes grupos son ligeramente mayores, para la craza de BE, pero estas diferencias no son significativas (**figuras 15 y 20**).

Los grupos que recibieron pretratamiento con CLNA mostraron una reducción en las frecuencias de manchas, al compararlas con los grupos que únicamente habían recibido el tratamiento de irradiación. El porcentaje de reducción en la frecuencia del número total de manchas para los individuos de la craza ET fue de 18.5 y 26.6% para las concentraciones baja y alta. Estos porcentajes de disminución fueron mayores para la craza BE, llegando a ser de 34.0 y 50.3%, para las concentraciones baja y alta, respectivamente.

La comparación de los datos de la craza ET con alas normales, con los individuos de la misma craza pero con alas tipo serratia (**tabla XIII y figura 16**), muestra que la frecuencia de manchas en el testigo, no presenta variación significativa, para ambos grupos. Aunque en general son menores, pero en este caso con alas serratia, tampoco se observan valores significativos entre los individuos que recibieron pretratamiento de CLNA a concentraciones de 45.5 mM y 182 mM sin irradiación y el testigo negativo.

Para el testigo con irradiación la frecuencia de mutación, en todos los casos, fue del 35% en promedio para las manchas totales, en los individuos con balanceador heterocigoto. En tanto que para los individuos que recibieron pretratamiento de 45.5 mM de CLNA

antes de ser irradiados, la frecuencia de manchas totales disminuyó en un 71% comparado con la frecuencia obtenida con el mismo tratamiento pero con alas normales.

Se redujo la frecuencia de manchas pequeñas y grandes en los individuos con alas normales que recibieron pretratamiento de CLNA a 182 mM antes de ser irradiados, lo mismo sucedió para este tipo de manchas pero para moscas con alas tipo serrata.

En el caso de la CLNA son muy constantes los valores de las muestras con pretratamiento e irradiación, comparadas con los testigos positivos con irradiación, encontrándose valores del 33% en promedio, tanto para la cruce ET como para la BE (**tabla XIV; figuras 16 y 21**).

7.4.3 Ácido bórico

En la **figura 17** se observa que las dosis de 0.25 y 1 mM de ácido bórico (AB) son subtóxicas para las cruces ET y BE, ya que no afectan la viabilidad de las larvas y las frecuencias de mutación y recombinación son semejantes a las del testigo negativo. El AB a cantidades mayores a 1 mM fue tóxico para los individuos, de tal forma que sobrevivieron muy pocas larvas después del tratamiento con este ácido.

Con el AB se obtuvieron valores diferentes a los obtenidos con los antimutágenos AA y CLNA, ya que se esperaba, que la presencia del AB en las larvas potenciara el efecto causado por el flujo de neutrones.

Como en el caso del AA y la CLNA, las frecuencias observadas en las muestras con pretratamiento a dosis subtóxicas y sin irradiación fueron semejantes a las del testigo, tanto con la concentración baja, de 0.25 mM, como con la alta, de 1 mM.

En las muestras irradiadas los valores aumentan hasta más de 9 X, lo que se observa al comparar los valores del testigo positivo, con irradiación únicamente, con las frecuencias para manchas pequeñas, grandes gemelas y totales (**tablas XV y XVI**). Nuevamente se observan diferencias que no son significativas, entre la cruce BE y la ET.

El sinergismo mencionado se observa al comparar los valores de las manchas entre la muestra irradiada y aquellas que recibieron pretratamiento con AB (**figura 18**), obteniéndose un incremento de los daños, con relación al testigo positivo con irradiación pero sin pretratamiento con AB, del orden del 14.7% para la muestra con concentración baja y del 45.3% para la de concentración alta.

Sin embargo, para la cruce BE los datos siguientes reflejan que no hubo un efecto sinérgico (**figuras 18 y 20**). En este caso al comparar con el testigo positivo irradiado y sin pretratamiento con AB, los aumentos fueron sumamente pequeños, de 0.007% a baja concentración y de 0.003% a concentración alta.

Las frecuencias en la cruce ET con balanceador heterocigoto son menores que en las del marcador transheterocigoto, sin embargo, estas frecuencias son iguales en las muestras de baja y alta concentración, para la cruce ET (**tabla XVII**) y BE (**tabla XVIII y figura 21**).

Resumiendo, los datos encontrados muestran efectos antimutagénicos ante los daños inducidos por neutrones en el caso del AA, que es independiente de la concentración y aparentemente con las cantidades de AA empleadas se satura el sistema antimutagénico, ya que es aproximadamente el mismo para las dos concentraciones de la cruce ET, baja (33.9%) y alta (33.4%) y para la cruce BE, la baja de 71 mM (29.5%) y la alta de 285 mM (40.8%). Sin embargo existe un incremento en las frecuencias de mutación para la subpoblación de moscas con alas tipo serratia que es mayor en el siguiente orden: cruce ET, concentración baja (21.7%) y alta (35.8%); cruce BE concentración baja (45.3%) y alta (46.9%) (**tablas VII, VIII, IX y X; figuras 13, 14, 20 y 21**).

En el caso de la CLNA también se encuentra un efecto antimutagénico, sin embargo, a diferencia del AA, este es dependiente de la concentración y de la activación metabólica, lo que se observa en los siguientes datos: cruce ET concentración baja (45.5 mM) porcentaje de inhibición 18.5% y alta (182 mM), 26.6%; cruce BE concentración baja, 34% y alta 50.3%. Por el contrario, la subpoblación de alas serratia presenta porcentajes muy parecidos cruce ET a concentración baja 35.4%, alta 34.8%; cruce BE a concentración baja 30.5% y alta 31.8% (**tablas XI, XII, XIII y XIV; figuras 15, 16, 20 y 21**).

Para el AB se obtuvieron resultados diferentes a los de los antimutágenos, ya que se tiene un efecto sinérgico entre el B y el haz de neutrones. En este caso se obtuvieron los siguientes porcentajes para la cruce ET a concentración baja (0.25 mM), 14.7%, alta (1 mM), 45.3%. En la cruce de BE se encontró lo siguiente: concentración baja 0.007% y alta 0.003%. Para las moscas con balanceador heterocigoto los valores son muy semejantes: 35.4% para la cruce ET a concentración baja, 34.8% a alta y para la cruce BE, concentración baja, 24.1% y alta 33.3% (**tablas XV, XVI, XVII y XVIII; figuras 18, 19, 20 y 21**).

TABLA V. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS POR NEUTRONES TÉRMICOS DE REACTOR EN *Drosophila melanogaster*. SE IRRADIARON LARVAS DE 72 h \pm 4 h DE EDAD, EN EL RTMIII A LA POTENCIA DE 300 kW A DOSIS DE 1.5992 Y 3.1986 Gy. A LA POTENCIA DE 1000 kW, LAS DOSIS FUERON DE 0.8425 Y 1.6852 Gy

Tratamiento	No. alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.

(a) Potencia del reactor: 300 kW

0	200	0.39	(78)	0.06	(12)	0.01	(2)	0.46	(92)
1.5992	200	0.28	(55) -	0.28	(55) +	0.06	(12) +	0.61	(122) w
3.1986	200	0.31	(63) -	0.56	(113) +	0.12	(23) +	1.00	(199) +

(b) Potencia del reactor: 1000 kW

0	200	0.39	(78)	0.06	(12)	0.01	(2)	0.46	(92)
0.8425	200	0.22	(45) -	0.29	(59) +	0.06	(13) +	0.58	(117) w
1.6852	200	0.25	(51) -	0.47	(95) +	0.09	(19) +	0.82	(165) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; w, débil positivo. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. f, frecuencia; No., número. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA VI. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS POR NEUTRONES TÉRMICOS DE REACTOR EN *Drosophila melanogaster*. SE IRRADIARON LARVAS DE $96 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ DE EDAD A LA POTENCIA DE 300 (A) Y 1000 kW (B), EN UN RTMIII: A) MOSCAS CON MARCADOR TRANSHETEROCIGOTO, CON GENOTIPO: $mwh \text{ flr}^+ / mwh^+ \text{ flr}^3$; FENOTÍPICAMENTE CON ALAS TIPO SILVESTRE. B) MOSCAS CON BALANCEADOR HETEROCIGOTO, CON GENOTIPO: $mwh \text{ flr}^+ / TM3, Bd^S$; FENOTÍPICAMENTE CON ALAS SERRADAS, DONDE ÚNICAMENTE SE CUANTIFICAN LOS EVENTOS DE MUTACIÓN, ELIMINÁNDOSE LOS DE RECOMBINACIÓN

Tratamiento	No. alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.

(A) Moscas con marcador transheterocigoto

(a) Potencia del reactor: 300 kW

0	120	0.39	(47)	0.03	(4)	0.03	(4)	0.46	(55)
1.5992	120	3.52	(422) +	0.86	(103) +	0.07	(8) i	4.44	(533) +
3.1986	120	6.58	(790) +	1.94	(233) +	0.23	(28) +	8.76	(1051) +

(b) Potencia del reactor: 1000 kW

0	120	0.39	(47)	0.03	(4)	0.03	(4)	0.46	(55)
0.8425	120	3.12	(375) +	0.75	(90) +	0.12	(14) +	3.99	(479) +
1.6852	120	6.37	(765) +	1.42	(170) +	0.20	(24) +	7.99	(959) +

(B) Moscas con balanceador heterocigoto

(a) Potencia del reactor: 300 kW

0	120	0.43	(52)	0.01	(1)	0.00	(0)	0.44	(53)
1.5992	120	1.59	(191) +	0.21	(25) +	0.00	(0) i	1.80	(216) +
3.1986	120	2.78	(334) +	0.43	(52) +	0.00	(0) i	3.22	(386) +

(b) Potencia del reactor: 1000 kW

0	120	0.43	(52)	0.01	(1)	0.00	(0)	0.44	(53)
0.8425	120	1.75	(210) +	0.18	(22) +	0.00	(0) i	1.93	(232) +
1.6852	120	2.81	(337) +	0.33	(40) +	0.00	(0) i	3.14	(377) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. f, frecuencia; No., número. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA VII. EFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA ESTÁNDAR
(A) ALAS CON MARCADOR TRANSHETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.38	(46)	0.06	(7)	0.04	(5)	0.48	(58)
AA 71 mM	120	0.40	(48) -	0.05	(6) -	0.03	(3) -	0.47	(57) -
AA 285 mM	120	0.37	(44) -	0.03	(3) -	0.02	(2) -	0.41	(49) -
Irradiado (1.6852 Gy)	120	3.91	(469) +	1.71	(205) +	0.42	(50) +	6.03	(724) +
AA 71 mM + 1.6852 Gy	120	2.19	(263) +	1.37	(165) +	0.42	(50) +	3.98	(478) +
AA 285 mM + 1.6852 Gy	120	2.69	(323) +	1.08	(130) +	0.23	(28) +	4.01	(481) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA VIII. EFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA
(A) ALAS CON MARCADOR TRANSHETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.49	(59)	0.03	(4)	0.00	(0)	0.52	(63)
AA 71 mM	120	0.43	(51) -	0.05	(6) i	0.02	(2) i	0.49	(59) -
AA 285 mM	120	0.47	(56) -	0.03	(4) -	0.03	(3) i	0.52	(63) -
Irradiado (1.6852 Gy)	120	3.82	(458) +	1.58	(189) +	0.66	(79) +	6.05	(726) +
AA 71 Mm + 1.6852 Gy	120	2.24	(269) +	1.52	(182) +	0.50	(60) +	4.26	(511) +
AA 285 mM + 1.6852 Gy	120	2.06	(247) +	1.09	(131) +	0.43	(52) +	3.58	(430) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

TABLA IX. EFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA ESTÁNDAR
(B) ALAS CON BALANCEADOR HETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.39	(47)	0.02	(2)	0.00	(0)	0.41	(49)
AA 71 mM	120	0.37	(44) -	0.00	(0) -	0.00	(0) i	0.37	(44) -
AA 285 mM	120	0.42	(50) -	0.01	(1) i	0.00	(0) i	0.43	(51) -
Irradiado (1.6852 Gy)	120	1.38	(166)+	0.32	(38) +	0.00	(0) i	1.70	(204) +
AA 71 mM + 1.6852 Gy	120	1.05	(126)+	0.28	(33) +	0.00	(0) i	1.33	(159) +
AA 285 mM + 1.6852 Gy	120	0.89	(107)+	0.20	(24) +	0.00	(0) i	1.09	(131) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA X. EFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA
(B) ALAS CON BALANCEADOR HETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.54	(65)	0.01	(1)	0.00	(0)	0.55	(66)
AA 71 mM	120	0.46	(55) -	0.02	(2) i	0.00	(0) i	0.47	(57) -
AA 285 mM	120	0.52	(62) -	0.01	(1) i	0.00	(0) i	0.52	(63) -
Irradiado (1.6852 Gy)	120	2.34	(281)+	0.26	(31) +	0.00	(0) i	2.60	(312) +
AA 71 mM + 1.6852 Gy	120	1.13	(136)+	0.28	(34) +	0.00	(0) i	1.42	(170) +
AA 285 mM + 1.6852 Gy	120	1.18	(142)+	0.20	(24) +	0.00	(0) i	1.38	(166) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA XI. EFECTO MODULADOR DE LA CLOROFILINA (CLNA) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA ESTÁNDAR
(A) ALAS CON MARCADOR TRANSHETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.41	(49)	0.05	(6)	0.00	(0)	0.46	(55)
CLNA 45.5 mM	120	0.57	(68) i	0.04	(5) -	0.03	(3) i	0.63	(76) i
CLNA 182 mM	120	0.47	(56) -	0.08	(9) -	0.01	(1) i	0.55	(66) -
Irradiado (1.6852 Gy)	120	2.98	(358)+	1.37	(164)+	0.46	(55)+	4.81	(577)+
CLNA 45.5 mM + 1.6852 Gy	120	2.15	(258)+	1.33	(160)+	0.44	(53)+	3.92	(471)+
CLNA 182 mM + 1.6852 Gy	120	1.75	(210)+	1.34	(161)+	0.44	(53)+	3.53	(424)+

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA XII. EFECTO MODULADOR DE LA CLOROFILINA (CLNA) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA
(A) ALAS CON MARCADOR TRANSHETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.56	(67)	0.03	(4)	0.02	(2)	0.61	(73)
CLNA 45.5 mM	120	0.66	(79) -	0.04	(5) -	0.02	(2) i	0.72	(76) -
CLNA 182 mM	120	0.60	(72) -	0.04	(5) -	0.01	(1) i	0.65	(78) -
Irradiado (1.6852 Gy)	120	2.68	(322) +	1.80	(216) +	0.73	(88) +	5.22	626) +
CLNA 45.5 mM + 1.6852 Gy	120	1.57	(188) +	1.27	(152) +	0.61	(73) +	3.44	(413) +
CLNA 182 mM + 1.6852 Gy	120	1.07	(128) +	1.17	(140) +	0.40	(48) +	2.63	(316) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA XIII. EFECTO MODULADOR DE LA CLOROFILINA (CLNA) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD

**CRUZA ESTÁNDAR
(B) ALAS CON BALANCEADOR HETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.40	(48)	0.01	(1)	0.00	(0)	0.41	(49)
CLNA 45.5 mM	120	0.54	(65)i	0.03	(4)i	0.00	(0)i	0.57	(69)i
CLNA 182 mM	120	0.55	(66)i	0.00	(0)i	0.00	(0)i	0.55	(66)i
Irradiado (1.6852 Gy)	120	1.39	(167)+	0.32	(39)+	0.00	(0)i	1.72	(206)+
CLNA 45.5 mM + 1.6852 Gy	120	0.90	(108)+	0.21	(25)+	0.00	(0)i	1.11	(133)+
CLNA 182 mM + 1.6852 Gy	120	0.87	(105)+	0.25	(30)+	0.00	(0)i	1.12	(135)+

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24.400 células por ala.

TABLA XIV. EFECTO MODULADOR DE LA CLOROFILINA (CLNA) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA
(C) ALAS CON BALANCEADOR HETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.56	(67)	0.04	(5)	0.00	(0)	0.60	(72)
CLNA 45.5 mM	120	0.87	(105) w	0.07	(8) i	0.00	(0) i	0.94	(113) w
CLNA 182 mM	120	0.82	(98) w	0.02	(2) -	0.00	(0) i	0.83	(100) w
Irradiado (1.6852 Gy)	120	1.92	(231) +	0.37	(44) +	0.00	(0) i	2.29	(275) +
CLNA 45.5 mM + 1.6852 Gy	120	1.34	(161) +	0.25	(30) +	0.00	(0) i	1.59	(191) +
CLNA 182 mM + 1.6852 Gy	120	1.28	(154) +	0.28	(33) +	0.00	(0) i	1.56	(187) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente; w, débil positivo. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA XV. EFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO BÓRICO (AB) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA ESTÁNDAR
(A) ALAS CON MARCADOR TRANSHETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.40	(48)	0.06	(7)	0.03	(3)	0.48	(55)
AB 0.25 mM	120	0.45	(54) -	0.03	(4) -	0.00	(0) -	0.48	(76) -
AB 1 mM	120	0.43	(51) -	0.03	(3) -	0.00	(0) -	0.45	(66) -
Irradiado (1.6852 Gy)	120	2.66	(319) +	1.12	(134) +	0.50	(60) +	4.28	(577) +
AB 0.25 mM + 1.6852 Gy	120	2.62	(314) +	1.70	(204) +	0.59	(71) +	4.91	(471) +
AB 1 mM + 1.6852 Gy	120	3.87	(464) +	1.88	(226) +	0.47	(56) +	6.22	(424) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA XVI. EFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO BÓRICO (AB) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA
(A) ALAS CON MARCADOR TRANSHETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.52	(63)	0.03	(4)	0.01	(1)	0.57	(68)
AB 0.25 mM	120	0.57	(69) -	0.02	(2) -	0.00	(0) i	0.59	(71) -
AB 1 mM	120	0.51	(61) -	0.03	(3) -	0.00	(0) i	0.53	(64) -
Irradiado (1.6852 Gy)	120	2.86	(343) +	1.80	(216) +	0.52	(63) +	5.18	(622) +
AB 0.25 mM + 1.6852 Gy	120	2.80	(336) +	1.67	(201) +	0.74	(89) +	5.22	(626) +
AB 1 mM + 1.6852 Gy	120	2.76	(331) +	1.73	(208) +	0.71	(85) +	5.20	(624) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA XVII. EFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO BÓRICO (AB) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA ESTÁNDAR
(B) ALAS CON BALANCEADOR HETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.40	(48)	0.01	(1)	0.00	(0)	0.41	(49)
AB 0.25 mM	120	0.54	(65) i	0.03	(4) i	0.00	(0) i	0.57	(69) d
AB 1 mM	120	0.55	(66) i	0.00	(0) i	0.00	(0) i	0.55	(66) d
Irradiado (1.6852 Gy)	120	1.39	(167) +	0.32	(39) +	0.00	(0) i	1.72	(206) +
AB 0.25 mM + 1.6852 Gy	120	0.90	(108) +	0.21	(25) +	0.00	(0) i	1.11	(133) +
AB 1 mM + 1.6852 Gy	120	0.87	(105) +	0.25	(30) +	0.00	(0) i	1.12	(135) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; i, inconcluyente. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

TABLA XVIII. EFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO BÓRICO (AB) SOBRE LA MUTACIÓN Y LA RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS SOMÁTICAS INDUCIDAS CON NEUTRONES, EN *Drosophila melanogaster*, CON LARVAS DE 96 h DE EDAD.

**CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA
(B) ALAS CON BALANCEADOR HETEROCIGOTO**

Tratamiento	No. Alas	Frecuencia y número de manchas por ala ^a							
		pequeñas		grandes		gemelas		totales	
		f	No.	f	No.	f	No.	f	No.
0	120	0.52	(62)	0.02	(2)	0.00	(0)	0.53	(64)
AB 0.25 mM	120	0.50	(60) -	0.00	(0) -	0.00	(0) i	0.50	(60) w
AB 1 mM	120	0.45	(54) -	0.03	(3) i	0.00	(0) i	0.47	(57) w
Irradiado (1.6852 Gy)	120	1.81	(217) +	0.26	(31) +	0.00	(0) i	2.07	(248) +
AB 0.25 mM + 1.6852 Gy	120	1.21	(145) +	0.36	(43) +	0.00	(0) i	1.57	(188) +
AB 1 mM + 1.6852 Gy	120	1.10	(132) +	0.28	(34) +	0.00	(0) i	1.38	(166) +

^a Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988). Se hizo la comparación con los testigos correspondientes: +, positivo; -, negativo; d, dudoso; w, débil positivo. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Se analizaron aproximadamente 24,400 células por ala.

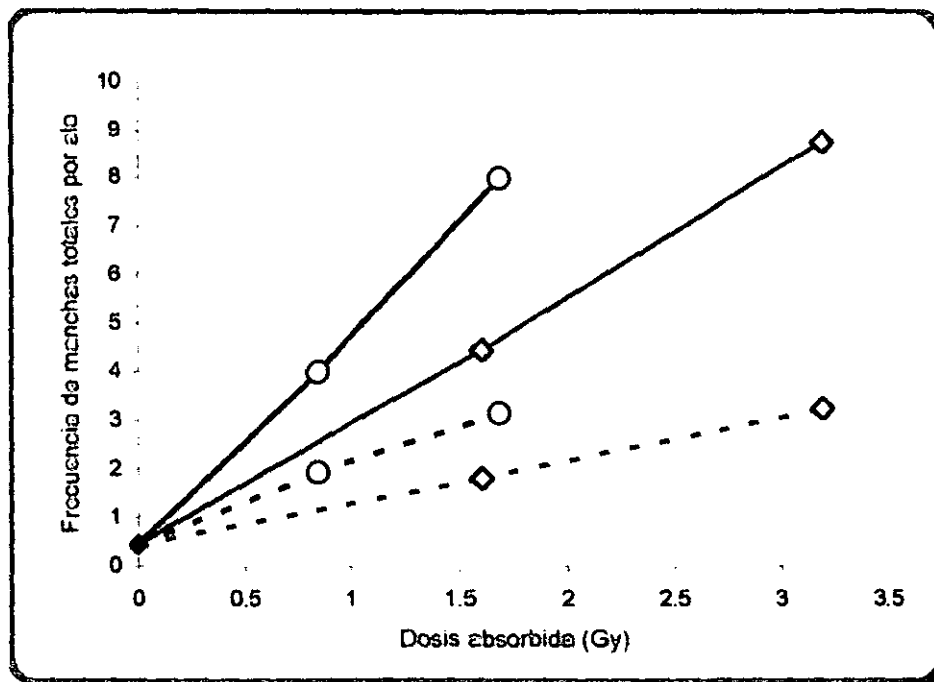
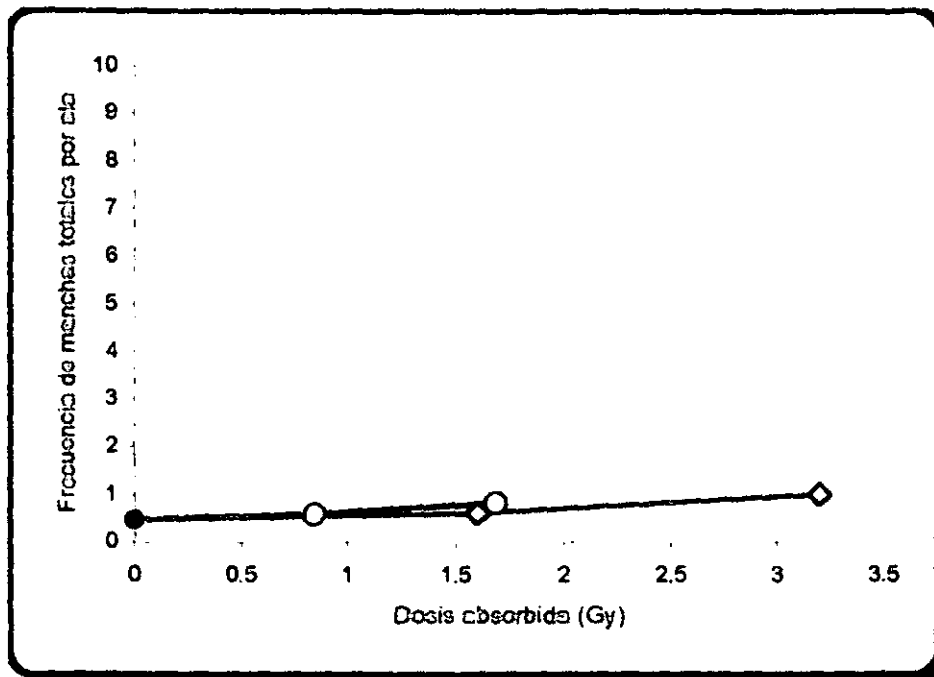
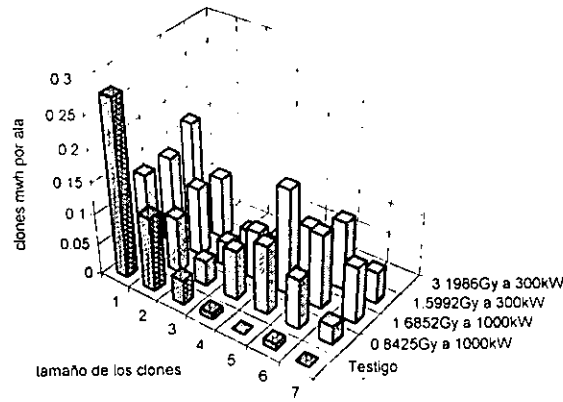
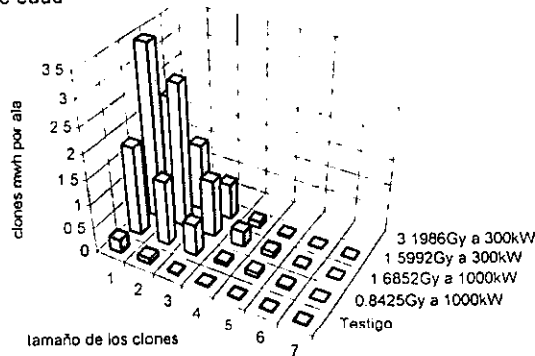


Fig. 10. Frecuencias de mutación y recombinación en células somáticas inducidas por neutrones térmicos de reactor en *Drosophila melanogaster*. Larvas de 72 h (gráfica superior) y de 96 h de edad (gráfica inferior), a las potencias de 300kW (◊) y 1000kW (○). Las líneas continuas corresponden a las moscas con marcador transheterocigoto, fenotípicamente con alas tipo silvestre y las discontinuas, a las moscas con balanceador heterocigoto, fenotípicamente con alas tipo serratia.

a. CRUZA ESTÁNDAR
 Marcador transheterocigoto
 larvas de 72h de edad



b. CRUZA ESTÁNDAR
 Marcador transheterocigoto
 larvas de 96h de edad



c. CRUZA ESTÁNDAR
 Balanceador heterocigoto
 larvas de 96h de edad

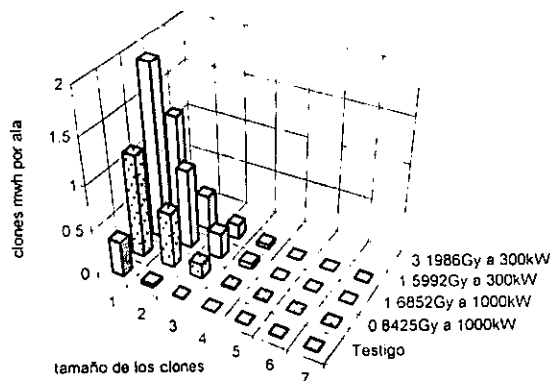


Fig. 11. Distribución del tamaño de los clones *mwh* en moscas con marcador transheterocigoto y balanceador heterocigoto en la cruce estándar. a) larvas de 72 +/- 4h, b y c) larvas de 96 +/- 4h. Tamaño de los clones: 1, 1 célula; 2, 2 células; 3, 3 a 4 células; 4, 5 a 8 células; 5, 9 a 16 células; 6, 17 a 32 células; 7, más de 32 células.

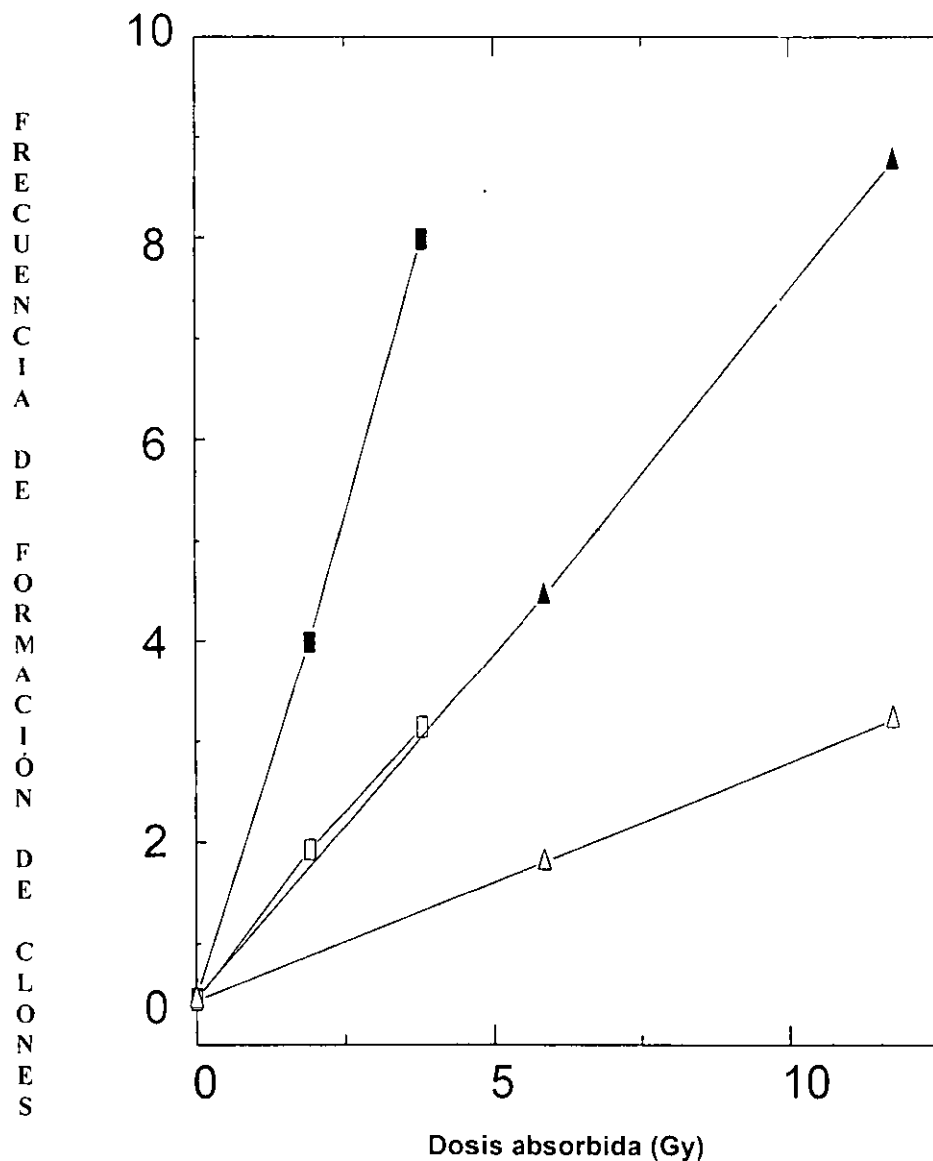


Fig. 12. Análisis de regresión lineal de la relación dosis-respuesta: Simbología: cuadros llenos, cruza estándar, moscas con marcador transheterocigoto a 1000 kW (pendiente [s] = 0.04361); cuadros vacíos, cruza estándar, moscas con balanceador heterocigoto a 1000 kW ([s] = 0.0526); triángulos llenos, cruza estándar, moscas con marcador transheterocigoto a 300 kW ([s] = 0.0436); triángulos vacíos, cruza estándar, moscas con balanceador heterocigoto a 300 kW ([s] = 0.0146).

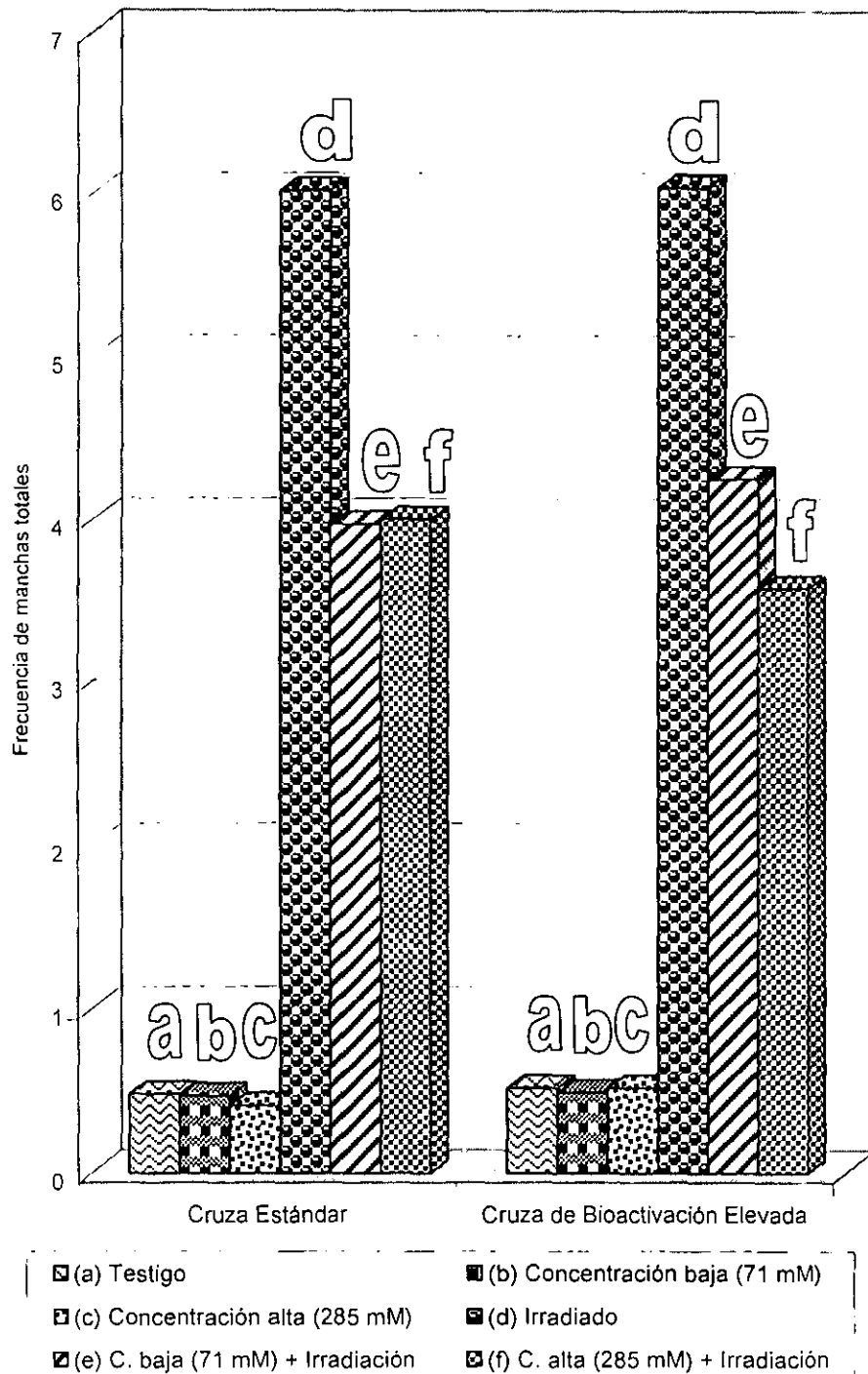


Fig. 13. Efecto modulador del ACIDO ASCÓRBICO en el daño inducido por neutrones, en las cruza estándar y de bioactivación elevada con marcador transheterocigoto, fenotípicamente con alas tipo silvestre.

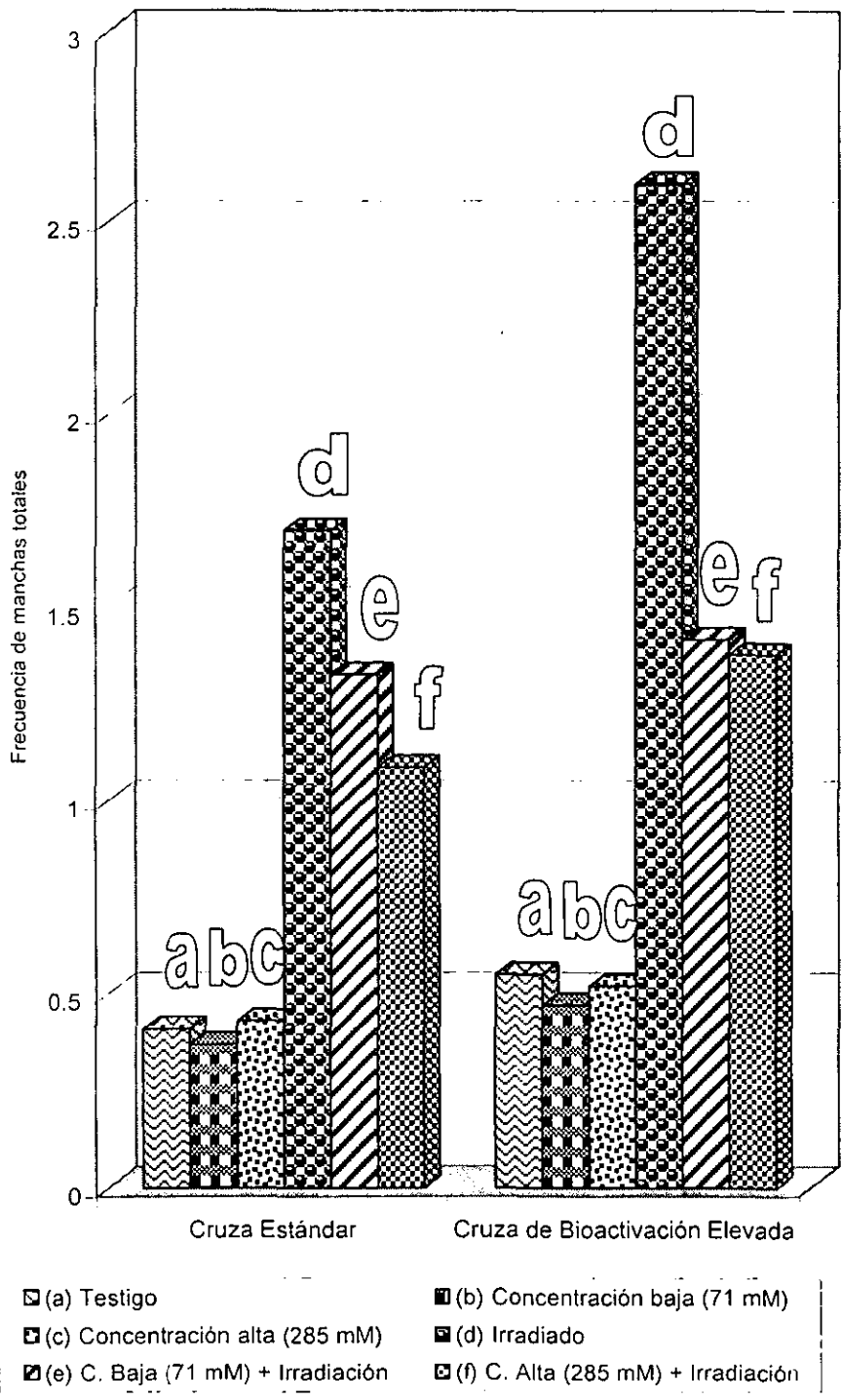


Fig. 14. Efecto modulador del ACIDO ASCÓRBICO en el daño inducido por neutrones, en las cruza estándar y de bioactivación elevada con balanceador heterocigoto, fenotípicamente con alas tipo serrata.

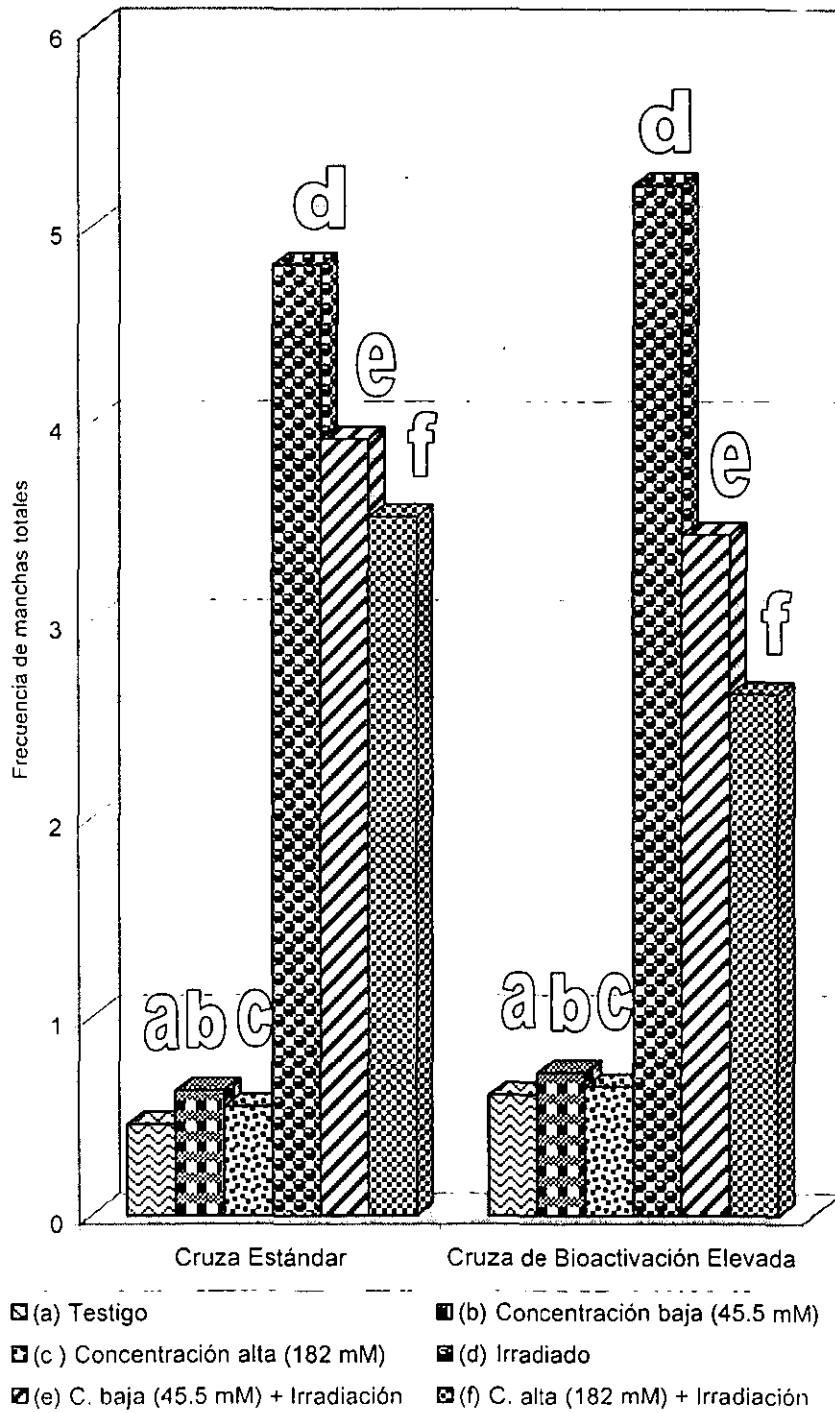


Fig. 15. Efecto modulador de la CLOROFILINA en el daño inducido por neutrones, en las cruza estándar y de bioactivación elevada con marcador trans-heterocigoto, fenotípicamente con alas tipo silvestre.

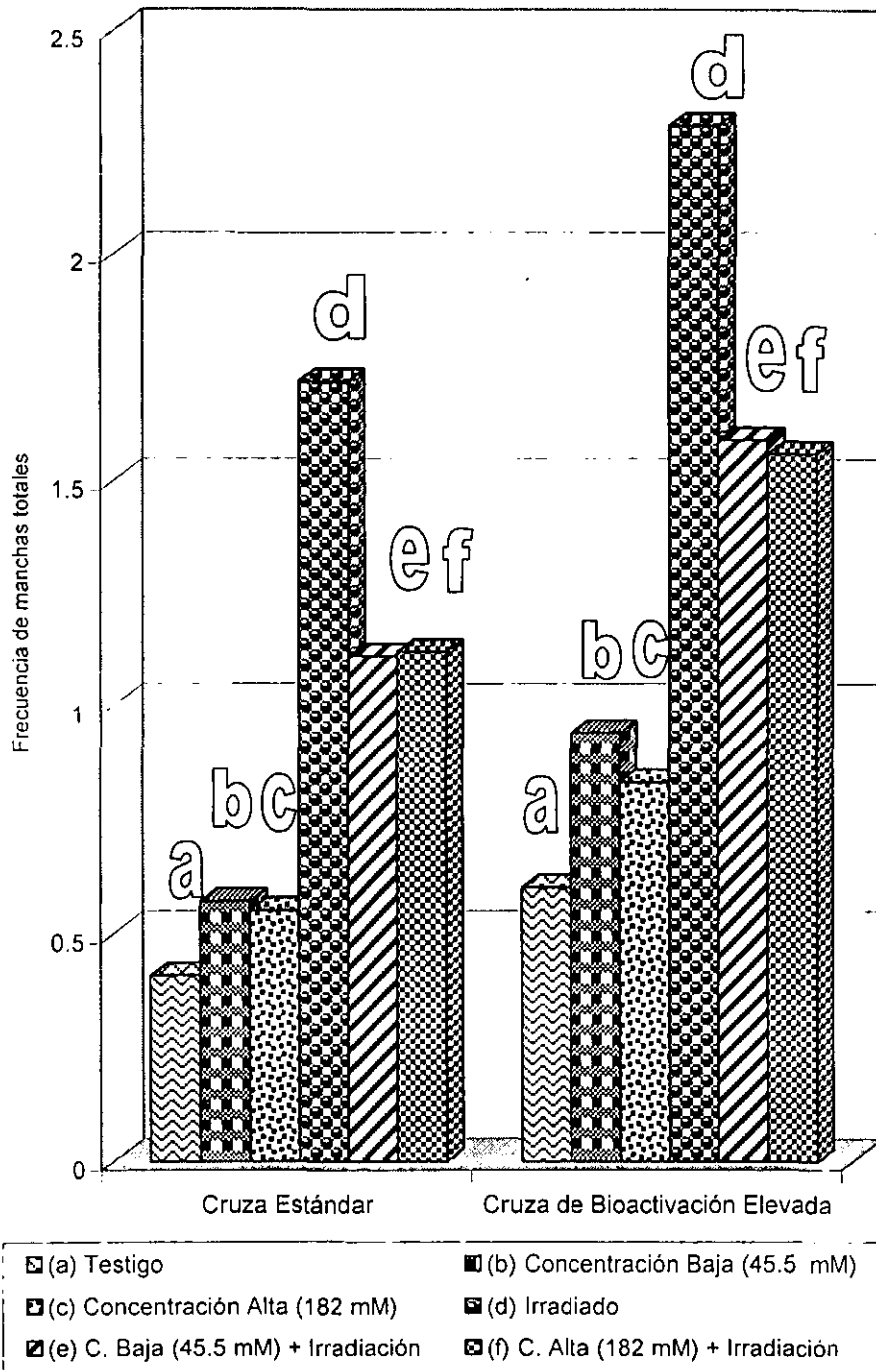


Fig.16. Efecto modulador de la CLOROFILINA en el daño inducido por neutrones, en las cruza estándar y de bioactivación elevada con balanceador heterocigoto, fenotípicamente con alas tipo serratia.

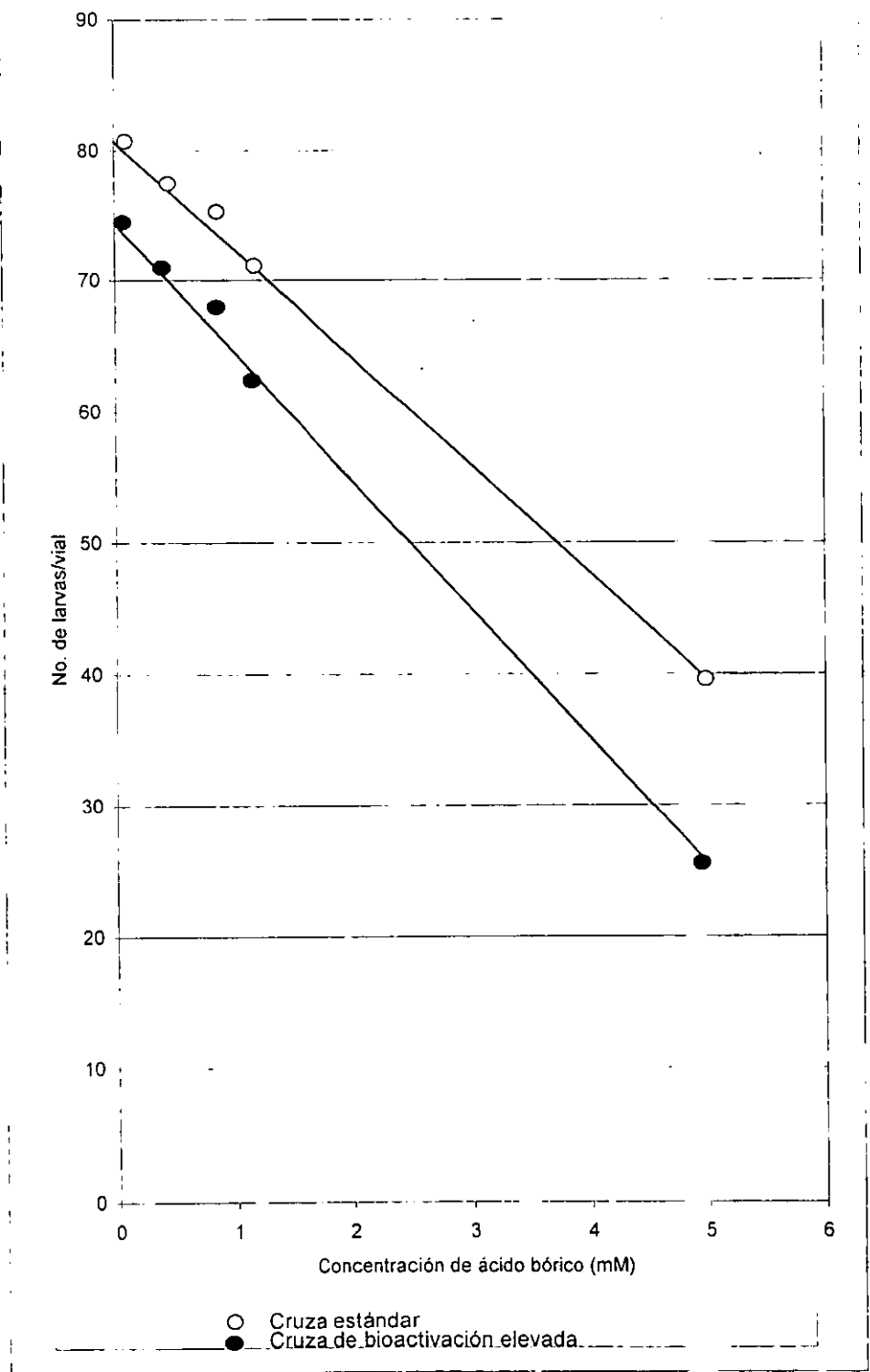


Fig. 17. Efecto del ácido bórico (AB) sobre la viabilidad de las larvas procedentes de las cruza estándar (ET) y de bioactivación elevada (BE),

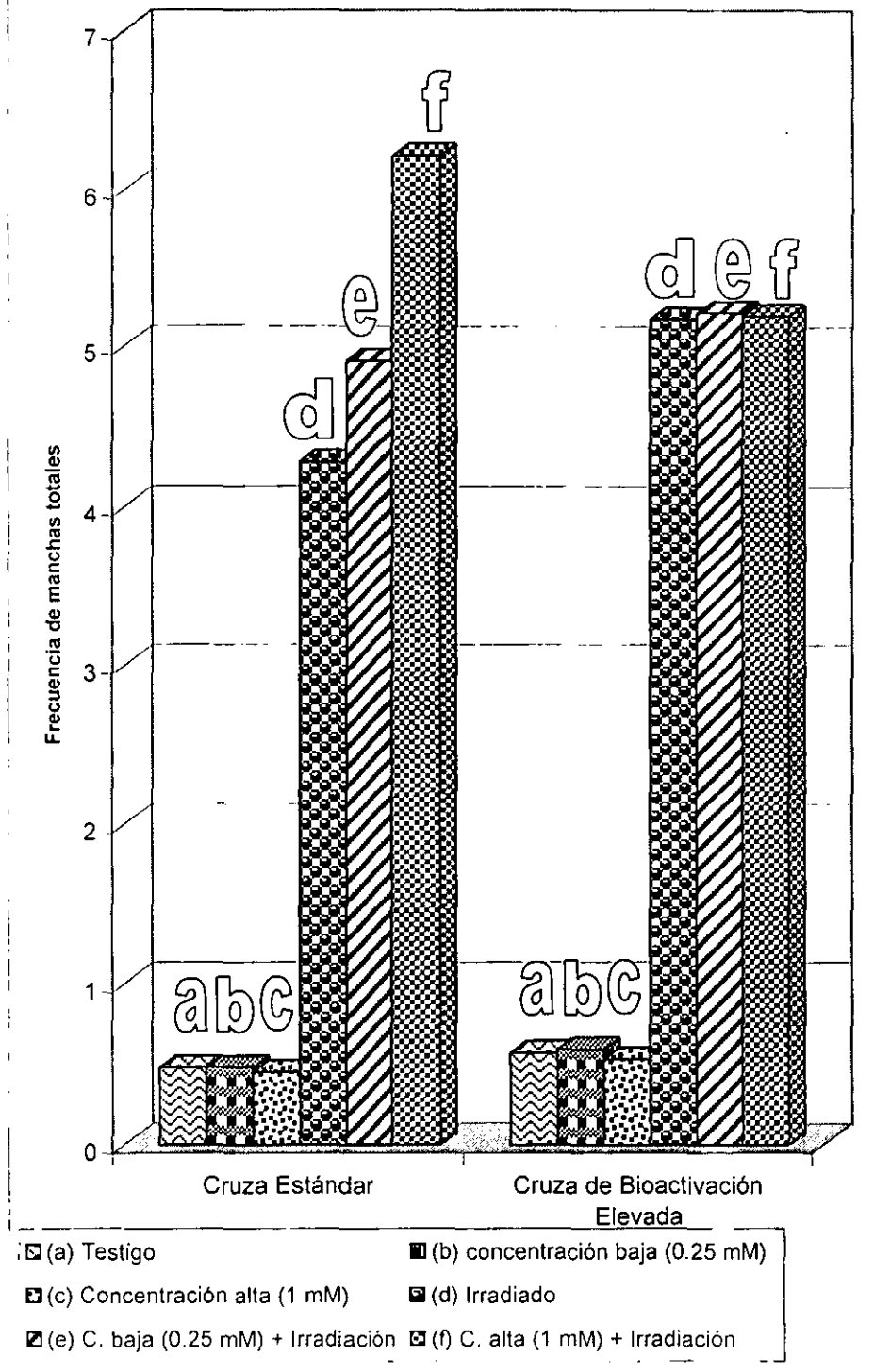


Fig. 18. Efecto modulador del ÁCIDO BÓRICO en el daño inducido por neutrones, en las cruza estándar y de bioactivación elevada con marcador transheterocigoto, fenotípicamente con alas tipo silvestre.

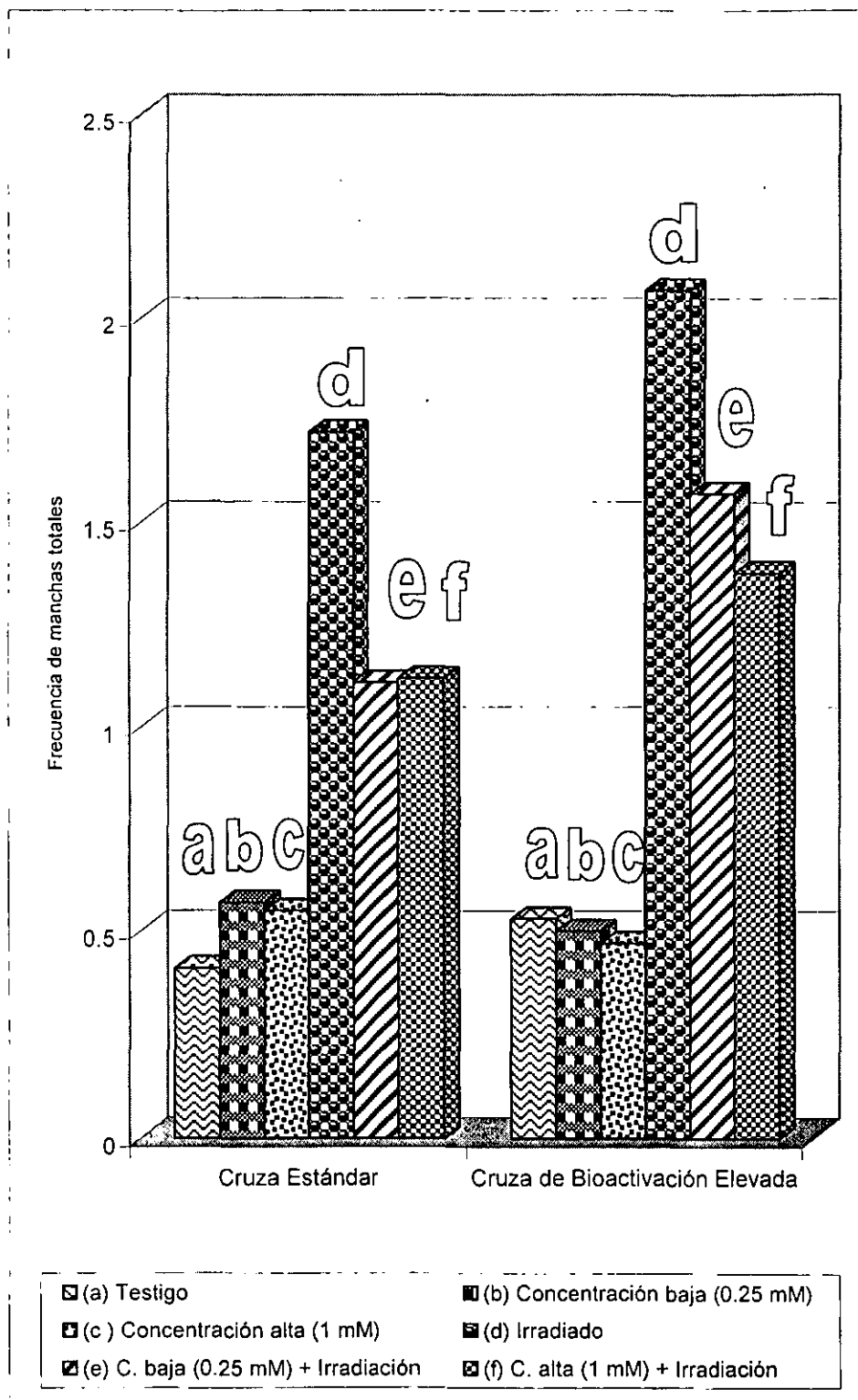


Fig.19. Efecto modulador del ÁCIDO BÓRICO en el daño inducido por neutrones, en las cruza estándar y de bioactivación elevada con balanceador heterocigoto, fenotípicamente con alas tipo serrata.

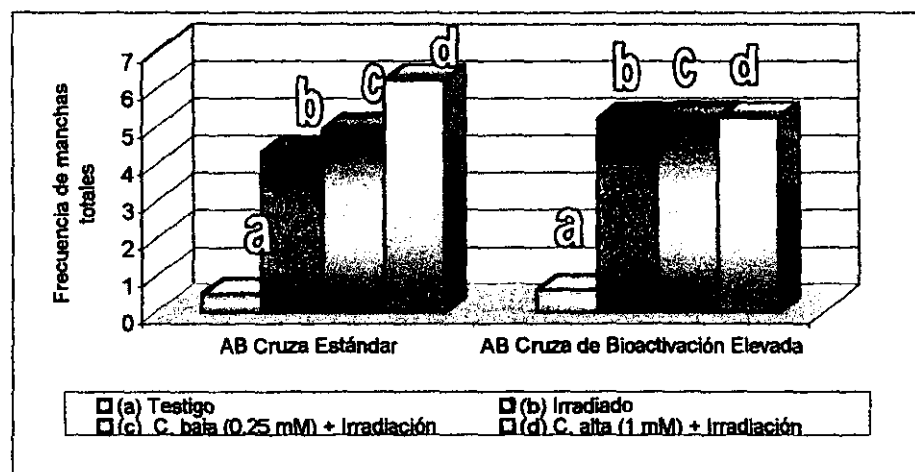
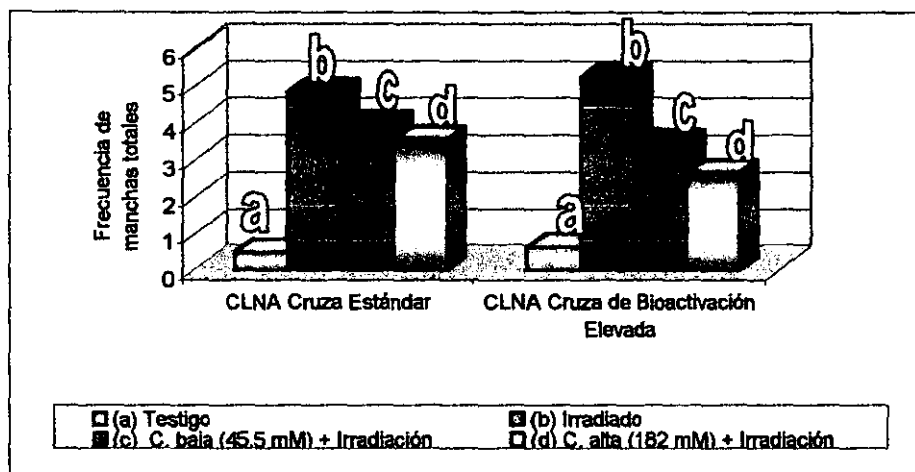
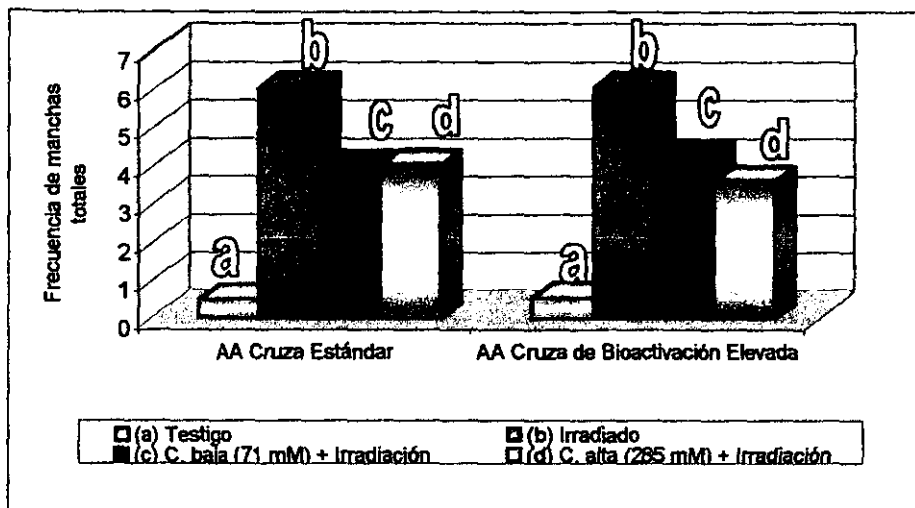


Fig. 20. Efecto modulador del ácido ascórbico (AA), clorofilina (CLNA) y ácido bónico (AB) sobre el daño inducido por neutrones, en las cruza estándar y de bioactivación elevada con marcador transheterocigoto, fenotípicamente con alas tipo silvestre.

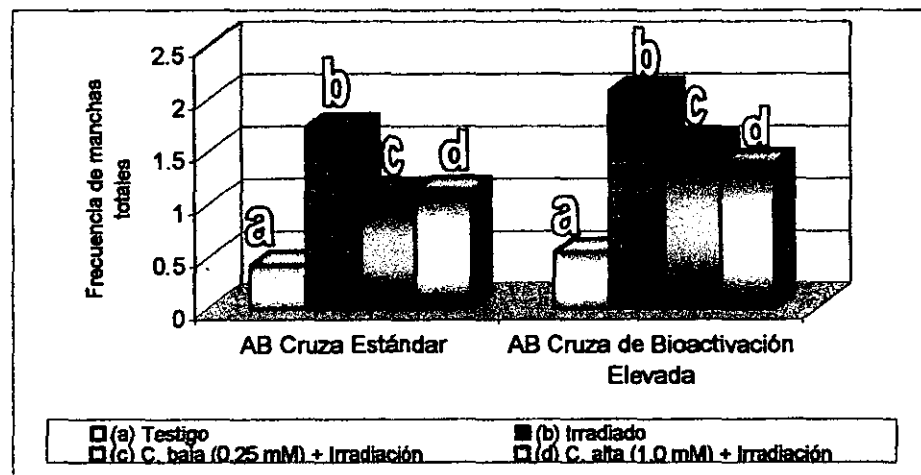
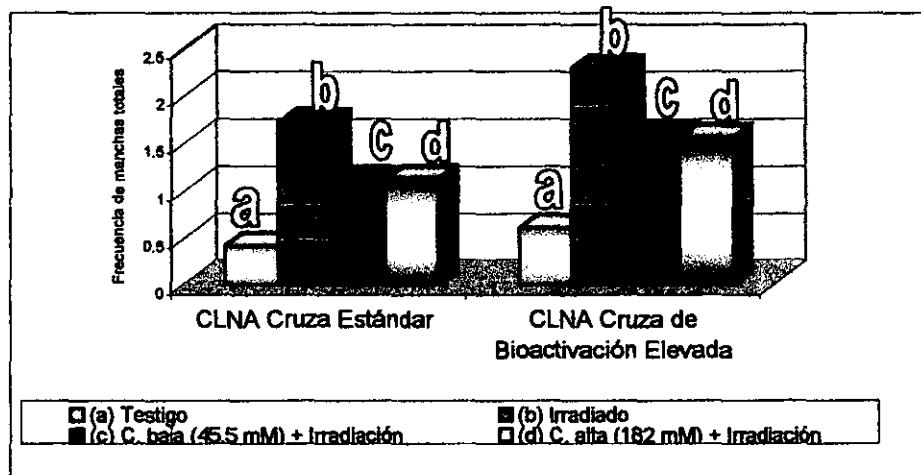
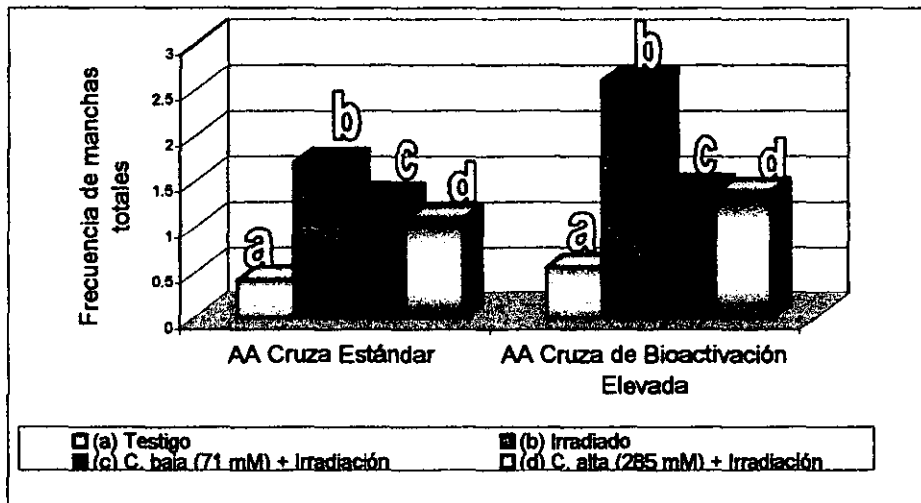


Fig. 21. Efecto modulador del ácido ascórbico (AA), cloroflina (CLNA) y ácido bórico (AB) sobre el daño inducido por neutrones, en las cruza estándar y de bioactivación elevada con balanceador heterocigoto, fenotípicamente con alas tipo serrata.

8.

DISCUSIÓN

8.1 Respuesta del sistema SMART a la exposición al flujo de neutrones

Ullrich *et al.* (1992) encontraron que al reducir la razón de dosis con neutrones, se incrementaba la frecuencia de grupos epiteliales. En este trabajo se encontró una relación directa entre la dosis de radiación con neutrones y su efecto sobre la mutación y la recombinación en células somáticas en todos los experimentos, medida por el conteo de manchas en la cutícula de las alas de *D. melanogaster*. Las manchas se clasificaron en pequeñas (de una a dos células de tamaño) grandes (de más de dos células), gemelas y totales. Ya que el tamaño de las manchas es proporcional al número de divisiones celulares que se presentan después de las lesiones, la cantidad de manchas grandes que se encontraron en las alas, indica que la radiación con neutrones actuó como un mutágeno directo, es decir, en donde no hay influencia del metabolismo para inducir daños genéticos, esto se confirma al comparar los resultados obtenidos entre la cruce de bioactivación elevada (BE) con la estándar (ET), ya que la diferencia entre las dos es muy pequeña, aunque ligeramente mayor en la BE (figura 20). En las larvas de 96 h se observó una frecuencia alta de manchas pequeñas, que no se notó en las larvas de 72 h, posiblemente esto se debe a que se originaron en la etapa de prepupa, esto es que la alta frecuencia en las manchas pequeñas de larvas de 96 h, se puede deber a que después de la radiación se dañaron grandes cantidades de células pero ya no pudieron dividirse ó se dañaron en la última fase de la etapa larvaria (Graf, 1995; Zambrano *et al.*, 1998a). En esta etapa los datos para manchas pequeñas, no muestran una tendencia lineal porque se originaron en la etapa de prepupa, muy posterior al tiempo de irradiación, por lo tanto reflejan únicamente la frecuencia espontánea de mutación.

Con respecto a la frecuencia de manchas totales con relación a la edad de las larvas, Zambrano *et al.* (1997) hallaron que en larvas de 72 h las frecuencias de mutación y

recombinación en células somáticas inducidas no eran significativas (Guzmán-Rincón *et al.*, 1998), debido a que el blanco de la radiación, es decir, las células imagales, eran pocas (alrededor de 487). Sin embargo, al usar larvas de 96 h los discos imagales tenían mayor número de células, así se contó con blancos de tamaño mayor, 3492 células aproximadamente (**figura 22**). Normalmente los discos imagales que darán lugar a las alas contienen, al inicio, de 50 a 100 células, a medida que pasa el tiempo y después de varias divisiones celulares, el número de éstas se va incrementando hasta llegar a 25,000, de las cuales se cuentan alrededor de 24,400, que son las que dan lugar a las manchas en células somáticas, lo que se alcanza en etapa de prepupa, por lo que el blanco de la radiación para el sistema SMART, es también mayor en individuos de 96 h (García-Bellido y Merriam, 1971). La relación inversa entre el tamaño del clon y su frecuencia, en función de la edad, se demostró con metil metano sulfonato (MMS) (Graf, 1995).

Se tiene que considerar que las células de los discos imagales en individuos de 72 h sufren más divisiones celulares que las de los individuos de 96 h, ya que estos últimos se encuentran en etapa de prepupa y entrarán en la de diferenciación celular al llegar a ser pupas, por lo que las frecuencias de mutación y recombinación son mayores para individuos de 96 h que para 72 h, sin embargo, el tamaño de las manchas es menor para larvas de 96 h que de 72 h, ya que es proporcional al número de divisiones celulares posteriores a la producción de la lesión (Graf, 1995). Los diferentes tipos de manchas se deben a varios mecanismos: mutación puntual, delección, diversos tipos de translocaciones, recombinación mitótica y tal vez, a monosomía. La frecuencia de manchas simples es principalmente del fenotipo *mwh* y raramente del tipo *flr*, en contraste, las manchas gemelas están compuestas de clones *flr* y *mwh* que resultan exclusivamente de recombinación mitótica entre el marcador proximal *flr* y el centrómero del cromosoma 3 (**figuras 4 y 5**). Consecuentemente, hay un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas gemelas, como es el caso, se puede concluir que el tratamiento con neutrones induce actividad recombinogénica, no importando la potencia, de la dosis ó la edad larvaria (Graf, 1995).

El hecho de que se consiguieron valores mayores en las frecuencias de mutación y recombinación en larvas de 96 h de edad, permitió el uso de estas condiciones de

LARVAS DE 96 h

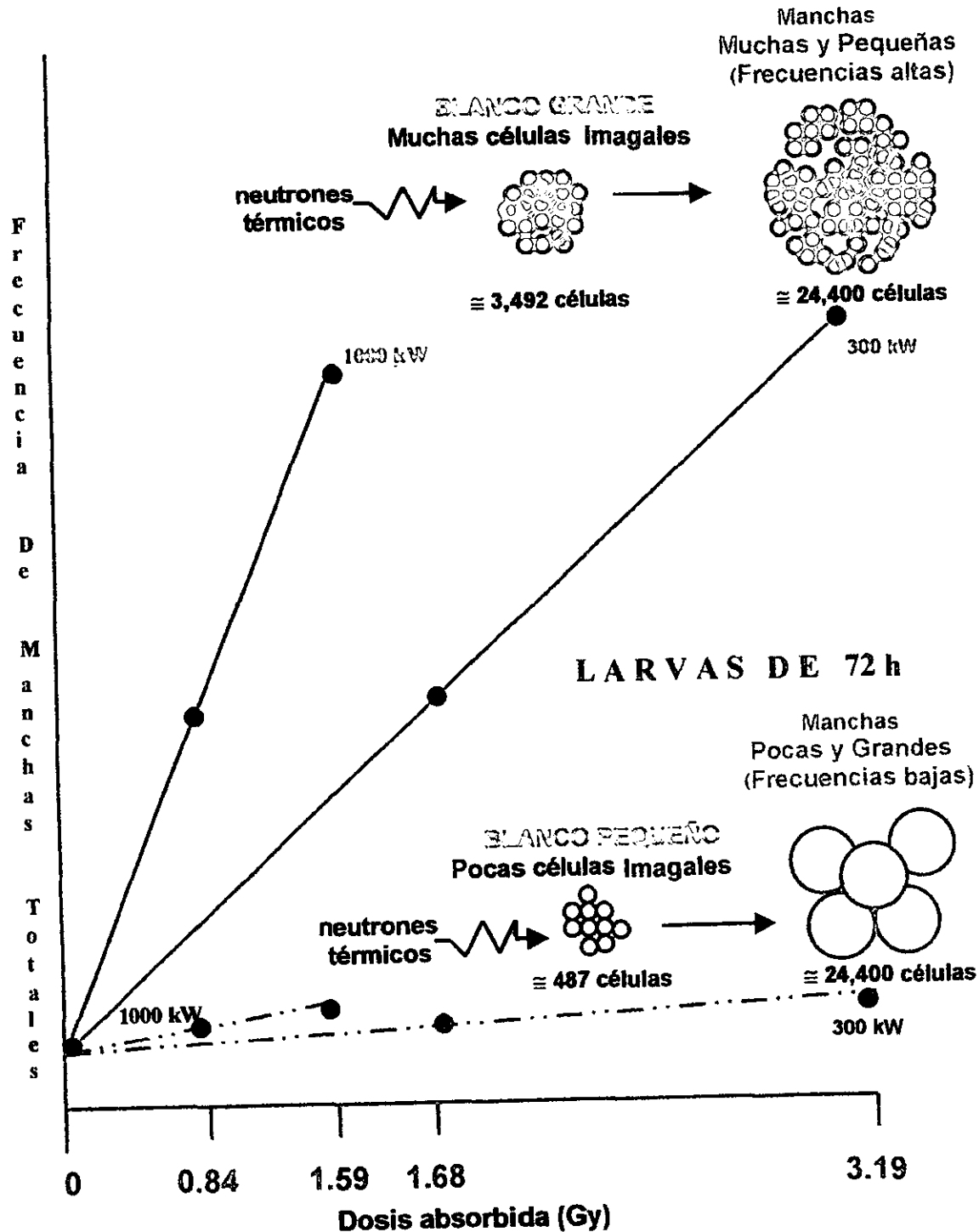


Fig. 22. Representación esquemática de la frecuencia de manchas totales para los fenómenos de mutación y recombinación en células somáticas en SMART para larvas de 72 y 96 h de edad, en donde se observa que existe una relación entre el número de células blanco y el tipo y frecuencia de las manchas (Cruces, 1999).

irradiación, para evaluar el efecto de moduladores químicos en el daño inducido con neutrones térmicos y rápidos de reactor.

Cuando se compararon las pendientes de las curvas de dosis-respuesta a las dos potencias empleadas, 300 y 1000 kW, se encontró que era mayor la pendiente a la potencia de 1000 kW que a la de 300 kW, lo que indica que el efecto producido por los neutrones es dependiente de la potencia usada en el reactor y de la razón de dosis (**figura 12**) (Guzmán *et al.*, 1998a).

Nuestros resultados son diferentes a los reportados por Ayaki *et al.* (1990), debido a que sus condiciones de irradiación fueron otras, en primer lugar, usaron una potencia de 1 W, en lugar de 300 y 1000 kW, además, se irradió en esta investigación con razones de dosis 10 X mayor, de 4.8679 Gy/h, en lugar de 0.43 Gy/h. Por otra parte, Ayaki y col. (1990) irradiaron en el centro del reactor y en este sitio alcanzan a llegar mezclas de neutrones rápidos, térmicos y radiación γ , en lugar de la columna térmica, que se utilizó en este trabajo. En esta columna, debido al blindaje y a las características de su construcción, la cantidad de radiación gamma es despreciable, también existe una baja contribución del flujo de los neutrones rápidos respecto de los térmicos, que es del orden del 4.9%, sin embargo, su peso en la dosis equivalente total es aproximadamente del 52.2%, por lo que se consideró en los cálculos de la dosimetría de neutrones (Delfin *et al.*, 1998).

Tomando en consideración la naturaleza química de las larvas de *Drosophila* y las secciones eficaces correspondientes a neutrones térmicos, las dos interacciones importantes que se llevan a cabo en presencia de C, H, O y N, que son los principales constituyentes de las células, son la captura de neutrones por el nitrógeno y la captura de neutrones por el hidrógeno. Es probable que los efectos inducidos por las reacciones nucleares del tipo $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$ y $^1\text{H}(n,\gamma)^2\text{H}$, sean las principales responsables de las manchas observadas (Delfin *et al.*, 2001).

Se debe tomar en cuenta que la respuesta de las larvas de 72 y 96 h usando el sistema SMART está basada en el hecho de que i) las manchas simples *mwh* se originan de una mutación/delección en el locus *mwh*⁺ o a un intercambio entre los marcadores *mwh* y *flr*³. ii) las manchas simples *flr*³ se originan de una mutación o delección en el locus *flr*³. iii) Las manchas gemelas se forman después de un intercambio entre *flr*³ y el centrómero

(Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Generalmente todas las manchas pequeñas simples son de fenotipo *mwh*, lo que sugiere que los eventos mutacionales en el locus *fir*⁺ son raros o que el alelo *fir*³ no se expresa por sí mismo sino a partir de clones que tengan un cierto tamaño (Graf *et al.*, 1984).

El análisis de dos genotipos diferentes (*mwh/fir*³ y *mwh/TM3*), permite la determinación cuantitativa de la actividad recombinogénica, ya que en la progenie *mwh/fir*³ se pueden detectar los eventos mutacionales y recombinacionales (**figuras 4 y 5**)(Cruces, 1999). Por el contrario las moscas que llevan el balanceador heterocigoto en su genotipo, permite detectar únicamente los procesos de mutación, ya que la mayoría de los eventos de recombinación son eliminados, debido a la presencia de múltiples inversiones (Frei *et al.*, 1992; Graf *et al.*, 1994; Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Campesato *et al.*, 1997). La diferencia entre las frecuencias de manchas en ambas progenies, corresponde a la frecuencia de recombinación, en estos resultados dicha frecuencia corresponde al 65% aproximadamente en la dosis de 1.6852 Gy.

La actividad recombinogénica alta originada por la irradiación con neutrones térmicos se demuestra por la baja frecuencia de manchas observadas en las alas con el balanceador heterocigoto TM3, donde se eliminan todos los eventos de recombinación, debido a la presencia de inversiones múltiples y sólo los eventos mutacionales pueden dar lugar a manchas simples del tipo *mwh* (Ransom, 1982).

De esta parte se puede concluir que el sistema SMART en las alas de *Drosophila melanogaster* es un bioensayo de un animal *in vivo* que puede ser utilizado para estudiar los efectos biológicos inducidos por neutrones rápidos y térmicos de reactor, encontrándose una relación lineal entre la dosis de radiación y las frecuencias de mutación y recombinación en células somáticas. Dicho efecto es mayor en larvas de 96 h de edad, debido a que el blanco de la radiación (células imagales) es más grande.

8.2 Función antígenotóxica del ácido ascórbico ante los daños neutrónicos

El hecho de que no existieron diferencias significativas en las frecuencias de manchas totales para la cruce estándar (ET) y de bioactivación elevada (BE), entre las muestras de larvas pretratadas con ácido ascórbico (AA) y las testigo sin pretratamiento, hace suponer

que el AA a una concentración de 71 mM y 285 mM no es tóxico para las larvas de *D. melanogaster*, lo que permite su crecimiento completo, por otra parte, en los individuos tratados únicamente con estas cantidades de AA se obtienen frecuencias semejantes a las espontáneas.

Se observa que la frecuencia de manchas totales es menor para los individuos pretratados con AA e irradiados, que para aquéllos que fueron sometidos únicamente a radiación con neutrones, lo que permite proponer la existencia de un efecto antígenotóxico del AA frente a los daños inducidos por neutrones. En las condiciones en las que se llevó a cabo este estudio, este comportamiento resultó independiente de la concentración de AA, ya que se encontraron frecuencias semejantes a concentraciones bajas y altas. Esta función antimutagénica del AA, también fue estudiada por Krishna *et al.* (1986), quienes reportaron que concentraciones altas de AA disminuían los niveles de ICH, en alrededor del 50%. En cuanto a las manchas pequeñas y gemelas, se observa también un comportamiento semejante al de las manchas totales, lo que es importante, porque puede reflejar tanto el momento en que se originaron las mutaciones, como el fenómeno biológico involucrado, ya que las manchas gemelas sólo se originan por recombinación somática (Graf *et al.*, 1984; Guzmán y Graf, 1995).

En ambas cruzas se observa, la reducción de la frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales al comparar las muestras irradiadas, con aquéllas en donde las larvas fueron pretratadas con AA antes de irradiarse. Los efectos antimutagénicos del AA son similares en las dos líneas utilizadas (ET, BE), aproximadamente del 33%. Esto podría sugerir que el sistema antígenotóxico implementado por el AA se saturaba desde la concentración más baja y que, aunque aumentara, este efecto no iba a ser mayor. Sería interesante usar concentraciones menores de AA en experimentos futuros, para observar si esta hipótesis es correcta. Al igual que otros autores, (Gebhart, 1984; Gebhart *et al.*, 1985; Iwawaki *et al.*, 1988), se encontró que la acción antimutagénica del AA no necesita de la actividad metabólica para actuar como antimutágeno. Otros autores hallaron que la mutagenicidad del AA era dependiente del tipo de agua empleada en la preparación del medio de cultivo (Norkus *et al.*, 1983). El hecho de haber encontrado una inhibición del 35% en promedio para la craza ET y BE a baja y alta concentración, podría sugerir una saturación del sistema involucrado en la antimutagénesis y que por más que se aumentara la concentración de AA, no se detectaría un efecto mayor.

Estos efectos contradictorios permiten suponer que el AA puede actuar como un mutágeno efectivo, dependiendo de varios factores entre los cuales se puede mencionar la concentración del AA, la cantidad de daño que exista, la interrelación con otras vitaminas, la presencia de algunos iones, como el Cu(II) (Norkus y Kuenzig, 1985) o Fe (II), inclusive el sistema inmunológico en el momento en que se presenten los daños, el pH, etc. Por lo que es importante considerar que aunque se tengan varias evidencias de que el AA es un potente captador de radicales libres (Odin, 1997), esta actividad depende no sólo de compuestos de bajo peso molecular sino también de la presencia de enzimas de naturaleza desintoxicante o de enzimas de la reparación ya que *in vivo*, no sólo la vitamina C, sino la A y la E (Chorvatovicova *et al.*, 1991) son mucho más eficientes que *in vitro* (Weitberg *et al.*, 1985; Sram *et al.*, 1986). Todos estos datos hacen suponer que al igual que con radiación γ (Olvera *et al.*, 1994, 1995), en donde se generan radicales libres o rupturas químicas de compuestos biológicos vitales (Sánchez-Reyes *et al.*, 1996), el AA puede ejercer un efecto protector ante los daños inducidos con neutrones térmicos de reactor, sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción.

Se halló además que el propio AA produce radicales libres oxo que son los responsables de la mutagenicidad que se ha reportado en algunos ensayos. Se ha propuesto inclusive, aunque no es el caso de la radiación, ya que es un mutágeno directo y no necesita ser metabolizado, que los radicales oxo H_2O_2 y $\cdot OH$ podrían descomponer las moléculas del mutágeno antes de llegar al ADN, originando de esta forma un efecto antígenotóxico, lo cual es probable ya que el H_2O_2 pudo descomponer a la MNNG (Norkus y Kuenzig, 1985).

Estos posibles mecanismos, aparte de que algunos cambios oxidantes y/o reductores del AA, como la constitución del ácido dehidroascórbico (Fig. 4.1), o más probablemente la forma desionizada del radical ascorbil estable $A^{\cdot-}$, con un alto grado de electrones no apareados serían los responsables de la actividad antimutagénica del AA, sin embargo, se necesitan de más estudios, sobre todo en los seres humanos (Odin, 1997), para llegar a conclusiones más definitivas. Lo que sí es un hecho es que el AA, junto con otras vitaminas y macromoléculas forman parte del intrincado proceso de la vida, en donde

interactúan diversos tipos de fuerzas en pro o contra la estabilidad orgánica y que del conjunto de todas ellas favorecerá o no dicha estabilidad.

8.3 Comportamiento antimutagénico de la clorofilina ante los daños neutrónicos

Se ha encontrado que la clorofilina (CLNA) puede reducir los daños producidos por mutágenos indirectos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, agentes alquilantes, ambientales y ciertas mezclas complejas como el condensado de humo de cigarro (Chung *et al.*, 1999), así como por mutágenos directos como la radiación γ y los neutrones (Zimmering *et al.*, 1990; Zambrano *et al.*, 1999a, 2000c).

Usando el bioensayo SMART se pudo establecer que la CLNA redujo los daños genéticos mutacionales y recombinacionales inducidos por neutrones, hasta en un 50%.

Las frecuencias de CLNA a concentraciones baja (45.5 mM) y alta (182 mM) fueron muy semejantes a las del testigo negativo, por lo que se supone que no influyen *per se* en las frecuencias de las muestras con pretratamiento e irradiación.

En los resultados obtenidos se observó que las frecuencias de mutación y de recombinación son menores para los individuos pretratados con CLNA e irradiados, que para los sometidos únicamente a irradiación, lo que nos lleva a suponer que existe un efecto de reducción del daño genético provocado por la CLNA, ante los daños inducidos por neutrones rápidos y térmicos. Este comportamiento guarda una relación directamente proporcional con la concentración de CLNA, ya que a altas cantidades su efecto protector es mayor. En ambas cruza se observa una reducción en la frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales al comparar a las muestras irradiadas con aquéllas en donde las larvas fueron pretratadas con CLNA antes de irradiarse. Este efecto antimutagénico es mayor al cambiar el tipo de cruza, ya que es del 18% de la cruza ET y de 34% en la cruza BE, cuando se emplea una concentración baja de CLNA y es todavía mayor al aumentar la concentración de CLNA, llegando hasta el 27% en la cruza ET y al 50% en la BE, lo que indica que la CLNA podría estar ejerciendo mayor protección ante

los daños provocados por neutrones, cuando existe un metabolismo elevado, tal vez debido a su modificación química.

Para distinguir el aporte debido a la recombinación en los eventos analizados, se estudió una subpoblación de moscas con balanceador heterocigoto que permitió separar las frecuencias de mutación y de recombinación (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). Los datos obtenidos en las cruzas ET y BE con balanceador heterocigoto muestran la disminución de la frecuencia de manchas para las dos concentraciones diferentes de CLNA, con respecto al testigo positivo irradiado, pero con relación a la concentración, lo que hace suponer que la CLNA ejerce una mayor influencia en los eventos de recombinación y que además estos eventos también son independientes de la concentración. En todos los casos se presenta la reducción de la frecuencia de mutación del 33% en promedio, cuando se comparan la craza ET y BE con su testigo positivo correspondiente, a las dos concentraciones y del 65% para la recombinación en la craza ET y del 50% para la BE, también para ambas concentraciones.

A pesar de que desconocemos su mecanismo de acción para este estudio específico, se han propuesto varios sistemas de acción antimutagénica de la CLNA. Precisamente la craza BE se selecciona para tratar de conocer el comportamiento de la CLNA frente al cit P_{450} , en combinación con un mutágeno directo como son los neutrones, que no requieren del metabolismo que involucra a las enzimas del cit P_{450} para ejercer efectos mutacionales sobre el ADN.

Aunque la CLNA es muy estable, posiblemente su hidroxilación puede cambiar sus propiedades y hacerla más eficiente en la captura de radicales libres y especies reactivas de O_2 , este es un mecanismo propuesto por Hadnagy y Seemayer (1988) y Kumar (1999), al que puede deberse el papel antimutagénico, ya que cuando el organismo está expuesto a la radiación con neutrones, se generan radicales libres (Sánchez-Reyes *et al.*, 1996) que provocan la ruptura de macromoléculas biológicas, por ejemplo, cambios o pérdida de bases, ruptura de las cadenas de ADN, ruptura de los enlaces de hidrógeno, etc., dando como consecuencia el aumento de iones cerca de la molécula, causando así daños secundarios y no por la acción directa de los neutrones. En este trabajo se encontró que la presencia de una mayor cantidad de CLNA en las larvas, aumenta su función

antimutagénica, tanto en la cruza ET como en la BE, lo cual puede deberse también, a que al haber más CLNA, también es mayor su función en la captura de iones.

Aunque otro de los mecanismos propuestos es que CLNA inhibe la acción de las enzimas del sistema del cit P_{450} , provocando así la no activación de promutágenos (Yun, 1995; Negishi *et al.*, 1989), este efecto no puede ser confirmado en este caso por haber utilizado un mutágeno directo.

Dado que la CLNA puede encontrarse en mitocondrias, lisosomas, membranas o núcleo (Reddy *et al.*, 1999), se ha planteado que su efecto, al igual que con el AA, es dependiente de su localización en el momento en que se presentan los daños. En algunos casos el tipo de respuesta está condicionado a la concentración que se utiliza (Chernomorsky *et al.*, 1997), ya que mientras que con bajas concentraciones actúa como un citostático en células de mieloma, con altas es citotóxico. La CLNA puede comportarse de diferentes formas de acuerdo al tipo de mutágeno con el que esté interactuando y se ha planteado que puede presentar un efecto protector ante los efectos cancerígenos y mutagénicos de diversos agentes, tanto de acción directa como indirecta (Zimmering *et al.*, 1990). En base a estas consideraciones nuestros datos con el AA y la CLNA permiten establecer que aunque los dos agentes se comportaron como antimutágenos ante el daño inducido por neutrones, su funcionamiento fue diferente en nuestras condiciones experimentales. Mientras que el comportamiento del AA fue independiente tanto de la concentración como del tipo de cruza, el mecanismo de la CLNA fue dependiente de la concentración y del tipo de cruza, es decir, la antimutagénesis fue mayor a concentración alta y en la cruza BE, con metabolismo elevado, que con la cruza ET. Parecería como si la función antimutagénica del AA fuera pasivo, como simple atrapador de iones. Por supuesto que dicha función podría aumentar o disminuir al modificar su estructura, haciéndola mas o menos eficiente por cambios oxidantes y/o reductores (**figura 1**) (Odin, 1997), independientemente de la cantidad presente y de su modificación metabólica o no. Por el contrario, el papel de la CLNA sería activo, esta sería más eficiente en la captura de iones, originados por la radiación con neutrones, al modificar su estructura por causa del metabolismo elevado.

8.4 Sinergismo entre el B y los neutrones

Nuestros resultados muestran que las concentraciones de 0.25 y 1mM de ácido bórico (AB) no son tóxicas para el desarrollo de *D. melanogaster*, permitiendo el crecimiento normal de las larvas. Por otra parte, las frecuencias de mutación y de recombinación en células somáticas fueron semejantes en los individuos pretratados con una dosis baja, de 0.25 mM y una alta de 1 mM de AB, y el testigo negativo, sin pretratamiento y sin irradiación con neutrones.

Por el contrario de los resultados obtenidos con AA y CLNA, mostraron un efecto sinérgico entre los neutrones y el B, encontrándose un aumento en las frecuencias de mutación y de recombinación en la cruce ET, en los individuos alimentados con AB. Este comportamiento es directamente proporcional a la concentración de AB que está en su alimento y como el daño es mayor en aquellos individuos que fueron irradiados posteriormente a la alimentación con AB, es de suponerse que el boro estuvo presente durante la irradiación y precisamente en aquellos que se alimentan con AB en mayor cantidad, el daño es mayor. De hecho se encuentra 15% más en las muestras con pretratamiento con AB a concentración baja, en comparación con el testigo positivo irradiado pero sin pretratamiento. Para la concentración alta el porcentaje de incremento es de 45%, que confirma lo que se mencionó anteriormente.

Hill *et al.* (1992, 1995) encontraron que la permanencia de porfirinas boradas en mitocondrias de células de ratón alcanzaba un máximo a las 2 h cuando se administraban por vía intravenosa y a las 24 h por vía intraperitoneal, disminuyendo gradualmente, llegando a niveles basales después de 80 h. Kobayashi y Kanda (1983) hallaron que el máximo de una solución de ^{10}B -liposomas tenía una concentración máxima a las 3 h en hígado de ratones y disminuía gradualmente con el curso del tiempo. Cuando se administraba una porfirina borada a células de criceto dorado y después se lavaban, las células eran más resistentes al daño con neutrones que cuando no se les daba este tratamiento debido a la eliminación del boro, que ya no estaba presente en el momento de la irradiación (Laster *et al.*, 1989).

Para la cruz BE se encuentran valores de sinergismo, es decir, porcentajes mayores que en el testigo positivo, de 0.7% para la concentración baja y de 0.3% para la alta. En este caso no se observa un daño mayor que aquel producido por neutrones, por lo que se supone, que el boro no estuvo presente durante la irradiación y tal vez es eliminado más rápidamente que en la cruz ET, debido a su alta capacidad metabólica.

En el caso de la subpoblación con balanceador heterocigoto y alas tipo serratia, el aumento observado en la recombinación hace suponer que este mecanismo se encuentra involucrado de una manera importante en la captura de neutrones por B (BNC) (**figura 21**).

La influencia del metabolismo en el grado de la BNC tiene relación con aquellos pacientes, que por su metabolismo acelerado, requieren de ciertos estudios, para determinar la concentración de B presente en los tumores cuando se realiza la irradiación (Burmeister *et al.*, 1999). De estos datos se puede establecer que el sistema SMART es lo suficientemente sensible para aportar datos que permitan hacer más efectivos los tratamientos con radiación que involucra al boro en pacientes con tumores.

9.

CONCLUSIONES

9.1 Respuesta del sistema SMART al daño inducido por neutrones

- El sistema SMART es sensible al daño inducido por neutrones térmicos y rápidos de reactor, pudiéndose detectar gran cantidad de manchas originadas por mutación, recombinación ó ambas en células somáticas.
- La cantidad de manchas es proporcional a la dosis de neutrones.
- El SMART es dependiente de la razón de dosis de los neutrones de reactor.
- Existe una relación dosis-respuesta directamente proporcional a la razón de dosis.

9.2 Influencia de la edad larvaria en la frecuencia de manchas

- Las larvas de 96 h son más sensibles a la radiación que las de 72 h.
- El número y tamaño de las manchas depende de la cantidad de células blanco (células imagales), en el momento de la irradiación.
- La cantidad de manchas entre el testigo irradiado y el no irradiado es mayor en larvas de 96 h que de 72 h.

9.3 Efecto de los moduladores químicos en el daño inducido por neutrones

- No existen diferencias significativas entre las cruas ET y BE para las frecuencias de mutación espontánea en los tres moduladores.

- En todos los casos la frecuencia de mutación espontánea es ligeramente mayor en la cruza BE que en la ET, quizás por la diferencia metabólica que existe entre las dos.
- Las concentraciones de AA de 71 y 285 mM, de CLNA de 45.5 y 182 mM y de AB 0.25 y 1 mM, no son tóxicas para el desarrollo de *Drosophila*, dichas concentraciones dieron frecuencias de manchas muy semejantes al testigo negativo, cuando se usaron en el pretratamiento.
- Estas frecuencias aumentaron de 9 X a 12 X cuando se irradiaron las muestras con neutrones, en comparación con el testigo negativo.

9.3.1 Efecto del ácido ascórbico ante el daño inducido con neutrones

- El AA ejerce un efecto antígenotóxico ante los daños inducidos por neutrones térmicos de reactor.
- El efecto antimutagénico del AA es independiente de la concentración y del tipo de cruza.
- La recombinación en células somáticas es dependiente de la concentración y del tipo de cruza.
- Es probable que las concentraciones de AA empleadas saturaron el sistema antígenotóxico.

9.3.2 Efecto de la clorofilina ante el daño inducido con neutrones

- La CLNA se comporta como un antimutágeno de los daños inducidos por neutrones de reactor.

- El efecto antigenotóxico de la CLNA es dependiente de la concentración y del tipo de cruza.
- El efecto antimutagénico en células somáticas es mayor en la cruza BE, con activación metabólica elevada que en la cruza ET.

9.3.3 Efecto del ácido bórico en la captura de neutrones por Boro

- Existe un efecto sinérgico entre los neutrones y el boro, debido al fenómeno de captura neutrónica por este elemento.
- Este efecto es aparente en la cruza ET, pero no en la BE, posiblemente por la presencia del boro durante la irradiación en la cruza ET y a su ausencia en la BE, que por su metabolismo acelerado lo eliminó rápidamente.
- La frecuencia de recombinación en células somáticas es semejante en ambas cruzas.

10.**REFERENCIAS**

-
- Alam F, Soloway AH, Bapat BV, Barth RF y Adams DM. (1989). Boron compounds for neutron capture therapy. En: *Clinical Aspects of Neutron Capture Therapy*. (R.G. Fairchild, V.P. Bond y A.D. Woodhead, Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 107-111.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. (1989). Molecular biology of the gene. 2nd Ed. Garland Publishing. Nueva York, pp 37-213.
- Ames BN y Gold LS. (1991). Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutation Res.* **250**: 3-16.
- Arimoto S, Fukuoka S, Itome Chiho A y Nakano H. (1993). Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutation Res.* **287**: 293-305.
- Arroyo CM, Carmichael AJ, Swenberg CE y Myers LS. (1986). Neutron-induced free radicals in oriented DNA. *Int. J. Radiation Biol.* **50,5**: 789-793.
- Attix FH. (1986). *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, pp. 266-274.
- Ayaki T, Fujikawa K, Ryo H, Itoh T y Kondo S. (1990). Induced rates of mitotic crossing over and possible mitotic gene conversion per wing anlage cell in *Drosophila melanogaster* by X rays and fission neutrons. *Genetics* **126**: 157-166.

Azorín NJ. (1992). Protección radiológica III. Efectos biológicos. Cuadernos del ININ. Serie divulgación Técnico Científica. ININ. México, 42p.

Azorín N J. (1997). Introducción a la física nuclear. Ediciones Científicas AZVEG. México, 240p.

Baars AJ, Blijleven WGH, Monh GR, Natarajan AT y Breimer DD. (1980). Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* **72**: 257-264.

Balcer-Kubiczek EK, Harrison GH, Hill CK y Blakely WF. (1993). Effects of WR-1065 and WR-151326 on survival and neoplastic transformation in CH/10T½ cells exposed to TRIGA or JANUS fission neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**:37-46.

Barale R, Zucconi D, Romano M y Loprieno N. (1983a). The intra-gastric host-mediated assay for the assessment of the formation of direct mutagens *in vivo*. *Mutation Res.* **113**: 21-32.

Barale R, Zucconi D, Bertani R y Loprieno N. (1983b). Vegetables inhibit *in vivo* the mutagenicity of nitrite combined with nitrosable compounds. *Mutation Res.* **120**: 145-150.

Barquinero JF, Barrios L, Caballín MR, Miró R, Ribas M, Subias A y Egozcue J. (1995). Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* **67**: 187-191.

Bhattacharya, RK, Francis AR y Shetty TK. (1987). Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B1. *In vitro* effects of vitamins. *Mutation Res.* **188**: 121-128.

Bielski BHJ, Allen O y Schwarz HA. (1981). Mechanism of disproportionation of ascorbic radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 3516-3518.

- Bielski BHJ. (1982). Chemistry of ascorbic acid radicals. En: *Ascorbic Acid: Chemistry Metabolism and Uses*. Am. Chem. Soc. (P.A. Seib y B.M. Tolbert, Eds.). Washington, D.C., pp. 81-100.
- Bleuel DL, Donahue RJ, Ludewigt BA y Vujic J. (1998). Designing accelerator-based epithermal neutron beams for boron neutron capture therapy. *Med. Physics*. **25**: 1725-1734.
- Boiteaux S, Villani G, Spadari S, Zambrano F y Radman M. (1978). Making and correcting errors in DNA synthesis: *in vitro* studies of mutagenesis. En: *DNA repair mechanisms*. (P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg y C.F. Fox, Eds.). Academic Press, Nueva York, pp.73-84.
- Breinholt V, Arbogast D, Loveland P y Pereira C. (1999). Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B₁ bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability vs. target organ protective mechanisms. *Toxicol. Pharmacol*. **158**: 141-151.
- Broerse JJ, Hollander CF y Van Zwieten J. (1981). Tumor induction in *Rhesus* monkeys after total body irradiation with X-rays and fission neutrons. *Int. J. Radiat. Biol*. **40**: 671-676.
- Buergi E. (1943). Porphyrins in the healing of wounds. *J.A.M.A*. **121**: 1237-1943.
- Burmeister J, Kota C y Maughan RL. (1999). Dosimetry of the boron neutron capture reaction. *Strahlentherapie-und-Onkologie* **175**: 115-118.
- Cabelli DE y Bielski BHJ. (1983). Kinetics and mechanism for the oxidant of ascorbic acid/ascorbate by HO₂/O₂ radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study. *J. Phys. Chem*. **87**: 1809-1812.
- Campeato VR, Graf U, Reguly ML y Rodríguez de Andrade HH. (1997). Recombinogenic activity of integerrimina, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio*

- brasiliensis*, in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Environ. Molec. Mutagen. **29**: 91-97.
- Cebulska-Wasilewska A, Leenhouts HP y Chadwick KH. (1981). Synergism between EMS and X-rays for the induction of somatic mutations in *Tradescantia*. Int. J. Radiat. Biol. **40**: 163-173.
- Charlton DE y Allen BJ. (1993). Monte Carlo calculations of ion passages through brain endothelial nuclei during boron neutron capture therapy. Int. J. Radiat. Biol. **64**: 739-747.
- Chernomor'sky S, Rancourt R, Viridi K y Segelman A. (1997). Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. Cancer Lett. **120**: 141-147.
- Chorvatovicova D, Ginter E, Kosinova A y Zloch Z. (1991). Effect of vitamin C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat and guinea pig. Mutation Res. **262**: 41-46.
- Chung WY, Lee JM, Park MY, Yook JI, Kim J, Chung AS, Surh YJ y Park KK. (1999). Inhibitory effects of chlorophyllin on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis. Cancer Lett. **145**: 57-64.
- Clark AM. (1982). The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. Mutation Res. **2**: 89-97.
- Conklin ME y Smith HH. (1969). Effects of fast neutron versus X-irradiation on development, differentiation and peroxidase isozymes in a genetically tumors *Nicotiana* amphiploid and its parents. Int. J. Radiat. Biol. **16**: 311-321.
- Cox R. (1994). Molecular mechanisms of radiation oncogenesis. Int. J. Radiat. Biol. **65**,1: 57-64.
- Cruces MP. (1999). Estudio de la recombinación somática inducida por diferentes agentes en *Drosophila*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 92 p.

- Dashwood R, Negishi T, Hayatsu H y Breinholt V. (1998). Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutation Res.* **399**: 245-253.
- Davronov ID y Zakharov IA. (1986). Induction of mitotic crossingover and somatic mutations in soybean by neutrons. *Genetika* **21**: 1864-1868.
- Delfin A, Guzmán J, Paredes L y Zambrano F. (1997). Uso de la prueba SMART para evaluar genotoxicidad inducida con neutrones de reactor en *Drosophila melanogaster*. Inf. Téc. GANS-97-19. ININ. México.
- Delfin A, Paredes L, Zambrano F y Guzmán J. (1998a). Determinación de la dosis equivalente por neutrones en *Drosophila melanogaster*. Memorias IX Congreso de la Soc. Nucl. Mex. Oaxaca de Juárez, Oax. México. 155-162.
- Delfin A, Paredes L, Guzmán J y Zambrano F. (1998b). Cuantificación de dosis equivalente originada por neutrones en *D. melanogaster*. *Genet. Mol. Biol. Suppl.* **21**: 60.
- Delfin-Loya A, Paredes-Gutiérrez L, Zambrano-Achirica F, Guzmán-Rincón J y Ureña-Núñez F. (2001). Genetic effects induced by neutrons in *Drosophila melanogaster*. I. Determination of equivalent dose. *Appl. Radiat. Isot.* Enviado para su publicación.
- Delgado-Rodríguez A, Ortiz-Martelo R, Graf U, Villalobos-Pietrini R y Gómez Arroyo. (1994). Genotoxicity produced by airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **10** (Supl. 1): 25 - 26.
- Dapkus J y Merrell DJ. (1977). Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **87**: 685-697.
- Demerec M y Kaufmann BP. (1975). Introducción a la genética y citología de *Drosophila melanogaster*. México, 56 p.
- Dong D y Mo D. (1998). Research of application of shielding experiment reactor on boron neutron capture therapy. *Atomic Energy Sci. Technol.* **32**: 84-89.

- Ecochard R y Oosterheert WF. (1966). On the role of boron in the thermal neutron sensitivity of plants. *Int. J. Radiat. Biol.* **11**: 385-387.
- Edgar JA. (1974). Ascorbic acid and biological alkylating agents. *Nature.* **248**: 136-137.
- Fairchild RG, Bond VP y Woodhead AD. (1989). Clinical aspects of neutron capture therapy. Plenum Press, New York, pp. 21-309.
- Figuroa HH, Palomino GF, Gómez SL y Villalobos-Pietrini R. (1972). Efectividad biológica relativa (RBE) de rayos X y γ en *Vicia faba*. *An. Inst. Biol. Univ. Nat. Autón. México, Ser. Biol. Exp.* **43**:1-16.
- Frei B, Stocker R y Ames BN. (1988). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**: 9748-9752.
- Frei H y Würigler FE. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.* **203**: 297-308
- Frei H, Clements J, Howe D y Würigler FE. (1992). The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **279**: 21-33.
- Frei H. (1994). Statistical analysis of data from somatic mutation and recombination tests. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **10** (Supl. 1): 9-14.
- Frei H y Würigler FE. (1994). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Res.* **308**: 57-63.
- Gajewska J, Szczyпка M, Tudek B y Szymczyk T. (1990). Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. *Mutation Res.* **232**: 191-197.

- Galindo S y Ureña-Nuñez F. (1993). EPR Signal enhancement of alanine irradiated with thermal neutrons. *Radiation Res.* **133**: 387-389.
- Gandhi R, Varak E y Goldberg M. (1992). Molecular analysis of a cytochrome *P*-450 gene of family on the *Drosophila* X chromosome. *DNA and Cell Biology* **11**: 397-404.
- García, B A. (2000). Evaluación del efecto antimutagénico de la clorofilina sobre el daño inducido por neutrones de reactor en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, UNAM, México, 74 p.
- García A, Guzmán J, Zambrano F, Paredes L y Delfín A. (1999). Evaluación del efecto antimutagénico de la clorofilina ante el daño inducido por neutrones de reactor en *Drosophila melanogaster*. Reunión Internacional de la American Nuclear Society. Acapulco, Gro. México. 61-67.
- García-Bellido A y Merriam JR. (1971). Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Bio.* **24**: 61-87.
- García-Bellido A y Dapena J. (1974). Induction detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Molec. Gen. Genet.* **128**: 117-130.
- Gebhart E. (1984). The action of antimutagens on chemically induced SCE. *Basic Life Sci.* **29A**: 319-322.
- Gebhart E, Wagner H, Grziwok K y Behnsen H. (1985). The action of anticlastogens in human lymphocyte cultures and their modification by rat-liver S mix. II. Studies with vitamins. *Mutation Res.* **149**: 83-94.
- Ghaskadbi S y Vaidya VG. (1989). *In vivo* antimutagenic effect of ascorbic acid against mutagenicity of the common antiamebic drug diiodohydroxyquinoline. *Mutation. Res.* **222**: 219-222.

- Gichner T, Veleminsky J, Rapoport IA y Vasilieva SV. (1987). Antimutagenic effect of *p*-aminobenzoic acid on the mutagenicity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* **192**: 95-98.
- Ginter E, Chorvatovicova D y Kosinova A. (1989). Vitamin C lowers mutagenic and toxic effects of hexavalent chromium in ginea pigs. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **59**: 161-166.
- Graf U, Würigler FE, Katz A J, Frei H, Juon H, Hall CB y Kale PG. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* **6**: 153-188.
- Graf U, Hep O y Olvera O. (1992). The genotoxicity of chromium VI oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Res.* **266**: 197-203.
- Graf U y Singer D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **8**: 15-27.
- Graf U y van Schaick N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **271**: 59-67.
- Graf U. (1994). The actual situation of SMART (somatic mutation and recombination test) in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **10** (Supl. 1): 5-7.
- Graf U, Alonso Moraga A, Castro R y Díaz Carrillo E. (1994). Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Food Chem. Toxic.* **32**: 423-430.
- Graf U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* **51**: 168-173.

- Graf U, Spanó A, Guzmán-Rincón J, Abraham SK y de Andrade HH. (1996). The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afr. Newslett. Occup. Safety*, **6** (Supl 1): 9-3.
- Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J y Würgler FE. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **402**: 203-209.
- Grahn D, Lombard LS y Carnes BA. (1992). The comparative tumorigenic effects of fission neutrons and cobalt-60 γ rays in the B6CC₁ mouse. *Radiation Res.* **129**: 19-36.
- Gruskin B. (1940). Chlorophyll, its therapeutic place in acute and suppurative disease. *Am. J. Surg.* **49**: 49.
- Guengerich FP. (1988). Roles of cytochrome *P*-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **48**: 2946-2954.
- Guttenplan JB, Hutterer F y Garro AJ. (1976). Effects of cytochrome *P*-448 and *P*-450 inducers on microsomal dimethylnitrosamine demethylase activity and the capacity of isolated microsomes to activate dimethylnitrosamine to a mutagen. *Mutation Res.* **35**: 415-422.
- Guttenplan JB. (1977). Inhibition by L-ascorbate of bacterial mutagenesis induced by N-nitroso compounds. *Nature* **268**: 368-370.
- Guzmán RJ, Würgler FE y Vogel EW. (1990). Training course on *Drosophila* somatic genotoxicity assays in Mexico. *Mutation Res.* **234**: 107-109.
- Guzmán-Rincón J, Graf U, Espinosa J y Madrigal-Bujaidar E. (1994a). *Drosophila melanogaster*, A model for nitrosation *in vivo*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **10** (Supl. 1): 27-28.

- Guzmán-Rincón J, Graf U, Varela A, Policroniades R y Delfín A. (1994b). Somatic mutation and recombination induced by fast neutrons in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient. **10** (Supl. 1):29-30.
- Guzmán-Rincón J y Graf U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. (F. Butterworth et al., Eds.). Plenum Press, Nueva York, **12**: 169-181.
- Guzmán J, Zambrano F, Paredes L y Delfín A. (1998a). Inducción de mutación y recombinación somáticas por neutrones de reactor en *Drosophila melanogaster*. V Congreso Conjunto de la Soc. Mex. Gen. y Soc. Mex. Tox. Gen. Acapulco, Gro. México, p. 21.
- Guzmán J, Zambrano F, Paredes L, Delfín A y Quiroz C. (1998b). Análisis de la relación entre las frecuencias de mutación y recombinación somáticas inducidas por neutrones y la edad de las larvas en *D. melanogaster*. Memorias del VIII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN. Salazar, Edo. de México. México. 239-244.
- Guzmán J, Zambrano F, García A, Paredes L y Delfín A. (1999). Efecto antigenotóxico del ácido ascórbico sobre el daño inducido por neutrones de reactor en *Drosophila melanogaster*. VI Congreso Conjunto de la Soc. Mex. Gen. y Soc. Mex. Tox. Gen. Guadalajara, Jal. México. p. 21.
- Hadnagy W y Seemayer N (1988). Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. Mutation Res. **205**: 205-206.
- Hällström I y Blank A. (1985). Genetic variation in cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. 1Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. Chem. Biol Interactions. **56**: 157-171.
- Harling OK, Bernard JA y Zamenhof RG. (1990). Neutron beam design, development, and performance for neutron capture therapy. Plenum Press. Nueva York, pp. 3-129.

- Hartman PE y Shankel DM. (1992). Antimutagens and carcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ Mol. Mutagen.* **15**: 145-182.
- Harttig U y Bailey G. (1998). Chemoprotection by natural chlorophylls in vivo: inhibition of dibenzo[a,*l*] pyrene-DNA adducts in rainbow trout liver. *Carcinogenesis* **19**: 1323-1326.
- Hayashi T, Schimerlik M y Bailey G. (1999). Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis: dose-responsive inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. *Toxicol. App. Pharmacol.* **158**: 132-140.
- Hayatsu H, Negishi T, Arimoto S y Hayatsu T. (1993). Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutation Res.* **290**: 79-85.
- Helm WG. (1994). DNA: The basics. *Appl. Cytogen.* **20**: 181-185.
- Henson DE, Block G y Levine M. (1991). Ascorbic acid: biologic functions and relation to cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 547-550.
- Hideghety K, Sauerwein W, Haselsberger K, Grochulla F, Frankhauser H, Moss R, Huiskamp R, Gabel D y de Vries M. (1999). Postoperative treatment of glioblastoma with BNCT at the Petten irradiation facility. *Strahlentherapie-und-Onkologie* **175**: 111-114.
- Hill JS, Kahl SB, Kaye AH, Stylli SS, Koo MS, Gonzales MF, Vardaxis NJ y Johnson CI. (1992). Selective tumor uptake of a boronated porphyrin in an animal model of cerebral glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 1785-1789.
- Hill JS, Kahl SB, Stylli SS, Nakamura Y, Koo MS y Kaye AH. (1995). Selective tumor kill of cerebral glioma by photodynamic therapy using a boronated porphyrin photosensitizer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 12126-12130.

- Hodgson E y Randy R. (1991). Insect cytochrome *P*-450 En: *Molecular aspect of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds*. (E. Arinc, J.B. Shenkman y E. Hodgson, Eds.). Plenum Press Nato Series. **202**: 75-91.
- Hoyes KP, Sharma HL, Morris ID y Hendry H. (1995). Effect of dietary vitamin C on radiation-induced damage to the testis. *Int. J. Radiat. Biol.* **68**: 341-356.
- Imai K, Aimoto T, Sato M, Watanabe K, Kimura R y Murata T. (1986). Effects of sodium metallochlorophyllins on the activity and components of the microsomal drug metabolizing enzyme system in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 4287-4293.
- Iwawaki H, Ito M, Kogiso S y Yoshitake A. (1988). Effects of L-ascorbic acid on the clatogenicity of catecholamines. *Mutation Res.* **203**: 374.
- Kahl SB, Joel DD, Nawrocky MM, Micca PL, Tran KP, Finkel GC y Slatkin DN. (1990). Uptake of a *nido*-carboranylporphyrin by human glioma xenografts in athymic nude mice and by syngenic ovarian carcinomas in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 7265-7269.
- Kallistratos G y Fasseke E. (1980). Inhibition of benzo [a] pyrene carcinogenesis in rats with vitamin C. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **97**: 91-96.
- Kappas A, Sparrow AH y Nawrocky MM. (1972). Relative biological effectiveness (RBE) of 0.43-MeV neutrons and 250-kVp X-rays for somatic aberrations in *Tradescantia subacaulis* Bush. *Radiation Botany*, **12**: 271-281.
- Khudoley V, Malaveille C y Bartsch H. (1981). Mutagenicity studies in *Salmonella typhimurium* on some carcinogenic N-nitramines *in vitro* and in the host mediated assay in rats. *Cancer Res.* **41**: 3205-3210.
- Kobayashi H y Kanda K. (1983). Microanalysis system of ppm-order ¹⁰B concentrations in tissue for neutron capture therapy by prompt gamma-ray spectrometry. *Nucl. Instr. Methods* **204**: 525-531.

- Kojima H, Konishi H y Kuroda Y. (1992). Effects of L-ascorbic acid on the mutagenicity of ethyl methanesulfonate in cultured mammalian cells. *Mutation Res.* **266**: 85-89.
- Kola I, Vogel R y Spielmann H. (1989). Co-administration of ascorbic acid with cyclophosphamide (CPA) to pregnant mice inhibits the clastogenic activity of CPA in preimplantation murine blastocysts. *Mutagenesis.* **4**: 297-301.
- Krishna G, Nath J y Ong T.(1986). Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Res.* **46**: 2670-2674.
- Krüger U, Eggert A, Lawaczek R, Hess A, Schmidt R, Thom M, Auberger T y Kneschaurek P. (1992). Dosimetric studies on neutron capture with ¹⁵⁷Gadolinium. 24th Ann. Meet. of the European Soc. Radiat. Biol. p. 83.
- Kumar S, Chaubey R, Devasagayam T y Priyadarsini K. (1999). Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. *Mutation Res.* **425**: 71-79.
- Kuroda Y. (1990). Antimutagenic activity of vitamins in cultured mammalian cells. En: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II.* (Y. Kuroda, D.M. Shankel y M.D. Waters, Eds.). Plenum Press. Nueva York, pp. 1-22.
- Lai CN, Dabney BJ y Shaw CR. (1978). Inhibition of *in vitro* metabolic activation of carcinogens by wheat sprout extracts. *Nutrit. Cancer*, **1**: 27-30.
- Laster BH, Kahl SB, Popenoe EA, Gordon C, Kalef-Ezra, J y Fairchild RG. (1989). Survival assays with a boronated porphyrin as measured with hamster V-79 cells in culture. En: *Clinical Aspects of Neutron Capture Therapy.* (R.G. Fairchild, V.P. Bond y A.D. Woodhead, Eds.). Plenum Press. Nueva York. pp. 213-218.
- Law MP, Morris CC y Field SB. (1984). The response of mouse skin to hyperthermia combined with fast neutrons or X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* **46**,1: 17-24.

- Lee WR, Abrahamson S, Valencia R, von Halle ES, Würigler FE y Zimmering S. (1983). The sex linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. **123**: 183-279.
- Levin SH. (1989). Radiation carcinogenesis. Radiat. Ther. Oncol. **23**: 408-416.
- Lindsley DL y Zimm GG. (1990). The genome of *Drosophila melanogaster*. Dros. Inform. Serv. **68**: Part 1.
- Ma R, Capala J, Chanana AD, Coderre JA y Díaz AZ. (1999). An update on the clinical trial of BNCT at the BMRR. Transactions of the Am. Nucl. Soc. **80**: 75-76.
- MacRae WD y Stich HF. (1979). Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by the reducing agents bisulfite and ascorbic acid. Toxicology, **13**: 167-174.
- Marquardt H, Rufino F y Weisburger JH. (1977). Mutagenic activity of nitrite-treated foods: human stomach cancer may be related to dietary factors. Science **196**: 1000-1001.
- Masunaga S, Ono K, Sakurai Y, Kobayashi T, Takagaki M, Suzuki M, Kinashi Y, Alaboshi M y Hori H. (1998). Applicability of combination with tirapazamine in boron neutron capture therapy. Jap. J. Can. Res. **89**: 768-774.
- Mazar BB y Muñoz ER. (1980). Modification of radiation-induced genetic damage in *Drosophila melanogaster* male germ cells by butylated hydroxytoluene. Int. J. Radiat. Biol. **38**: 559 - 566.
- McNally NJ, de Ronde J y Hinchliffe M. (1985). Survival of V79 cells following simultaneous irradiation with X-rays and neutrons in air or hypoxia. Int. J. Radiat. Biol. **48**: 847-855.

- Meijne EIM, Ploemacher RE, Vos O y Huiskamp R. (1992). The effects of graded doses of 1 MeV fission neutrons of X rays on the murine hematopoietic stroma. *Radiation Res.* **131**: 302-308.
- Mendiola M. (1994). Efecto de la clorofilina sobre la inducción de intercambios en las cromátidas hermanas (ICH) por radiación gamma en espermatogonias de ratón *in vivo*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México, pp. 34-44.
- Mirzayans R, Andrais B y Paterson MC. (1992). Synergistic effect of aphidicolin and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine on the repair of γ -ray-induced DNA damage in normal human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* **62**: 417-425.
- Müller WU. (1992). Risks due to combined exposure to ionizing radiation and chemicals. 24th Ann. Meet. of the European Soc. Radiat. Biol. 83.
- Murakami A. (1973). A comparison of mutation induction by 14 MeV fast neutrons and ¹³⁷Cs γ -rays in meiotic spermatocytes in the silkworm. *Mutation Res.* **17**: 73-80.
- Muramatsu S, Nakamura W y Eto H. (1973). Relative biological effectiveness of X-rays and fast neutrons in inducing translocations in mouse spermatogonia. *Mutation Res.* **19**: 343-347.
- Murillo S. (1997). Efecto de la capacidad de inducción de la actividad metabólica del etanol y del cicloexanol frente al daño producido por la N,N-dimetilnitrosamina en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, pp. 5-16.
- Nagy AG, Kiss I y Molnar F. (1971). Production of isotopes by secondary nuclear reactions. Radioisotope production and quality control. Technical Reports. I.A.E.A. **128**: 565-574.

- Namiki M y Osawa T. (1986). Antioxidants/antimutagens in foods. En: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms*. (D.M. Shankel, P.E. Hartman, T. Kada y A. Hollaender, Eds.). Plenum Press. Nueva York, pp. 131-142.
- Nandi A y Chatterjee IB. (1987). Scavenging of superoxide radical by ascorbic acid. *J. Biosci.* **11**: 435-441.
- Nebert DW y González FJ. (1984). Cytochrome *P*-450 genes and their regulation. *Symp. Mol. Cell Biol.* **19**: 309-329.
- Nebert DW y González FJ. (1987). *P*-450 Genes. Structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 945-993.
- Nebert DW. (1991). Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutation Res.* **247**: 267-281.
- Negishi TS, Arimoto C, Nishizaki B y Hayatsu H. (1989). Inhibitory effect of chlorophyllin on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl 5H-pyrido: 4,3-b:indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis.* **10**: 145-149.
- Negishi T, Rai H y Hayatsu H. (1997). Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutation Res.* **376**: 97-100.
- Nigg DW, Randolph PD y Wheeler FJ. (1991). Demonstration of three dimensional deterministic radiation transport theory dose distribution analysis for boron neutron capture therapy. *Med. Phys.* **18**: 43-53.
- Norkus EP, Kuenzig W y Conney AH. (1983). Studies on the mutagenic activity of ascorbic acid *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Res.* **117**: 183-191.
- Norkus EP y Kuenzig WA. (1985). Studies on the mutagenic activity of ascorbic acid *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* **6**: 1593-1598.

- Nöthinger R. (1970). Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. *Dros. Inform. Serv.* **45**: 117.
- O'Connor HJ, Habibzedah N, Schorah CJ, Axon ATR, Riley SE y Garner RC. (1985). Effect of increased intake of vitamin C on the mutagenic activity of gastric juice and intragastric concentrations of ascorbic acid. *Carcinogenesis* **6**: 1675-1676.
- Odin AP. (1997). Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutation Res.* **386**: 39-67.
- Ohshima SS, Kiyamori H, Kawano T, Yamada T, Inamasu M, Ishizaea E y Ishinishi N. (1987). Ingestion of parsley inhibits the mutagenicity of male human urine following consumption of fried salmon, *Mutation Res.* **192**: 7-10.
- Olvera O, Zimmering S, Arceo C y Cruces M. (1993). The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium VI oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* **301**: 201-204.
- Olvera-Ramírez O, Arceo-Maldonado C, de la Rosa ME, Guzmán-Rincón J y Zimmering S. (1994). Effects of vitamin C on the genotoxicity of chromium trioxide (VI). *Rev. Int. Contam. Ambient.* **10** (Supl. 1): 21-22.
- Olvera O, Zimmering S, Arceo C, Guzmán J y de la Rosa ME. (1995). Evidence for the protective effect of ascorbic acid (vitamin C) in treatment with γ -rays and chromium (VI) oxide (CrO_3) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* **346**: 19-21.
- Olvera O, Zimmering S, Cruces MP, Pimentel E, Arceo C, Guzmán J y de la Rosa ME. (1997). Antimutagenesis in somatic cells of *Drosophila* as monitored in the wing spot test. En: *Food Factors for Cancer Prevention*. (H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe y T. Yoshikawa, Eds.). Springer-Verlag, pp. 567-571.

- Omura H, Shinohara K, Maeda H, Nomaka M y Murakami H. (1978). Mutagenic action of triose reductone and ascorbic acid on *Salmonella typhimurium* TA 100 strain. J. Nutr. Sci. Vitaminol. **24**: 185-194.
- Ono K, Kinashi Y, Masunaga S, Suzuki M y Takagaki M. (1998a). Effect of electroporation on cell killing by boron neutron capture therapy using bororeceptor sodium (^{10}B -Bsh). Jap. J. Cancer Res. **89**: 1352-1357.
- Ono K, Masunaga S, Kinashi Y, Takagaki M, Akaboshi M, Suzuki M y Baba H. (1998b). Effects of boron neutron capture therapy using borocaptate sodium in combination with a tumor-selective vasoactive agent in mice. Jap. J. Cancer Res. **89**,3: 334-340.
- Ortiz-Marttelo R, Delgado-Rodríguez A, Graf U, Villalobos-Pietrini R y Gómez-Arroyo S. (1994). Mutagenic activity of some polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitroderivatives in the somatic mutation and recombination test (SMART) in wings of *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient. **10** (Supl. 1): 19-20.
- Osawa T, Ishibashi H, Namiki M y Kada T. (1980). Desmutagens actions of ascorbic acid and cysteine on a new pyrrole mutagen formed by the reaction between food additives: sorbic acid and sodium nitrite. Biochem. Biophys. Res. Commun. **95**:835-841.
- Parke DV, Ioannodes C y Lewis DF. (1991). The role of the cytochromes *P*-450 in the detoxification and activation of drugs and other chemicals. Can. J. Physiol. Pharmacol. **69**: 537-549.
- Parrington JR, Knox HD, Breneman SL, Baum EM y Feiner F. (1996). Chart of the nuclides. General Electric Co. And KAPL, Inc. 63p.
- Peak MJ, Wang L, Hills CK y Peak JG. (1991). Comparison of repair of DNA double-strand breaks caused by neutron or gamma radiation in cultured human cells. Int. J. Radiat. Biol. **60**: 891 - 898.

- Pihet P, Gueulette J, Vynckier S, Gregoire V y Wambersie A. (1984). Somatic mutations induced in *Tradescantia* by small neutron doses. *Comptes Rendus des Sceances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*. **178**: 211-218.
- Porter TT y Coon MJ. (1991). Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **266**: 13469-13472.
- Potten CS. (1993). Hair medullary cell counts following low-dose-rate- γ and high-energy neutron irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**: 97-104.
- Powell JR, Ludewig H, Todosow M y Reich M. (1999). Target and filter concepts for accelerator-driven boron neutron capture therapy applications. *Nuclear Technology*. **125**,1: 104-114.
- Raina V y Gurtoo HL. (1985). Effects of vitamins A, C y E on aflatoxin B₁-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **5**: 29-40.
- Ramirez VP. (1999). Evaluación antigenotóxica del ácido ascórbico, clorofilina y ácido retinoico contra el condensado del humo de cigarro y dos de sus componentes en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 95p.
- Ramos MP, Abundis HM, Gaytán JC, Ordaz MG, Orozco PG, Maldonado J, Hernández J, González E, Reyes P, Galicia E y Muñoz JA. (1993). Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill, México, 131p.
- Ransom R. (1982). A handbook of *Drosophila* development. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- Reddy AP, Harttig U, Barth M y Baird W. (1999). Inhibition of dibenzo[*a,l*] pyrene-induced multi-organ carcinogenesis by dietary chlorophyllin in rainbow trout. *Carcinogenesis* **20**: 1919-1926.

- Renan MJ. (1992). Point mutations, deletions, and radiation carcinogenesis. *Radiation Res.* **131**: 227-228.
- Rodríguez-Arnaiz R y Ramos MP. (1992). *Drosophila* como sistema de prueba para detectar agentes genotóxicos. Serie de Genética: los pequeños manuales. Facultad de Ciencias. UNAM, México, 50p.
- Rossman TG, Klein CB y Naslund M. (1986). Ascorbate enhances uv mutagenesis in *E. coli* but inhibits it in Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* **7**: 727-732.
- Salceda SVM y Gallo AJ. (1998). Genética de *Drosophila*. Técnicas de laboratorio. Limusa. México, 99p.
- Sánchez-Reyes A, Farrús B, Rovirosa A y Biete A. (1996). Modelización de las curvas de supervivencia celular a las radiaciones. *Oncología* **19**: 173-180.
- Saner C, Weibel B, Würigler FE y Sengstag C. (1996). Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Molec. Mutagen.* **27**: 46-58.
- Sankaranarayanan K y Ferro W. (1985). Studies on mutagen-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*. VIII. Further data on differences between Canton-S and ebony strains with respect to maternal effects for the X-ray induction of autosomal translocations and ring-X chromosome losses in mature spermatozoa. *Mutation Res.* **150**: 225-234.
- Sato M, Imai K, Kimura R y Murata T. (1984). Effects of sodium copper chlorophyllin lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 716-722.
- Sauerwein W, Rassow J, Hideghety K, Sack H, Moss R, Stecher-Rasmussen F y Wolbers JG. (1999). Organisation and management of the first clinical trial of BNCT in Europe. *Strahlentherapie und Onkologie* **175**: 108-111.

- Shamberger RJ, Baughman FF, Kalchert SL, Willis CE y Hoffman GC. (1973). Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **70**: 1461-1463.
- Shamberger RJ, Corlett CL, Beaman KD y Kasten BL. (1979). Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and β -propiolactone. Part IX. Antioxidants and cancer. Mutation Res. **66**: 349-355.
- Shellabarger CJ, Brown HH, Kellerer AM, Rossi HH, Goodman IJ y Mills RE. (1974). Rat mammary carcinogenesis following neutron or X-radiation. IAEA-SM-179/26: 391-401.
- Smith L y Sano M. (1944). Chlorophyll: an experimental study of its water-soluble derivatives. IV. The effect of water-soluble chlorophyll derivatives and other agents upon the growth of fibroblast in tissue culture. J. Lab. Clin. Med. **29**: 241-246.
- Soriano JD. (1984). Mutagenic response of peanut (*Arachis hypogaea* L.) to fast neutrons. Trans. Natl. Acad. Sci. Technol. **6**: 21-27.
- Spanó MA, Graf U y Würzler FE. (1994). Quantitative determination of recombinagenic activity in two different crosses of the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient. **10** (Supl. 1): 17.
- Speit G, Wolf M y Vogel W. (1980). The SCE-inducing capacity of vitamin C: investigations *in vitro* and *in vivo*. Mutation Res. **78**: 273-278.
- Sram RJ, Cerna M y Hola N. (1986). Effect of ascorbic acid and prophylaxis in groups occupationally exposed to mutagens. En: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals. Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*. (C. Ramel, B. Lambert, y J. Magnusson, Eds.). Liss. Nueva York, pp. 327-335.
- Stankus AA, Xapsos MA, Kolanko CJ, Gerstenberg HM y Blakely WF. (1995). Energy deposition events produced by fission neutrons in aqueous solutions of plasmid DNA. Int. J. Radiat. Biol. **68**:1-9.

- Stich HF, Karim J, Koropatnick J y Lo L. (1976). Mutagenic action of ascorbic acid. *Nature*. **260**: 722-724.
- Storer JB y Ullrich RL. (1983). Life shortening in BALB/c mice following brief, protracted, or fractionated exposures to neutrons. *Radiation Res.* **96**: 335-347.
- Takahashi T, Watanabe H, Dohi K e Ito A. (1992). ^{252}Cf relative biological effectiveness and inheritable effect of fission neutrons in mouse liver tumorigenesis. *Cancer Res.* **52**: 1948-1953.
- Terzaghi-Howe M. (1989). Induction of preneoplastic alterations by X rays and neutrons in exposed rat tracheas and isolated tracheal epithelial cells. *Radiation Res.* **120**: 352-363.
- Tsunemoto H, Ando K, Koike S y Urano M. (1994). Repopulation of tumour cells following irradiation with X-rays or low energy neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 255-261.
- Ullrich RL. (1983). Tumor induction in BALB/c female mice after fission neutron or γ irradiation. (1983). *Radiation Res.* **93**: 506-515.
- Ullrich RL, Allen B, Lee W, Satterfield LC y Jernigan MC. (1992). Induction of phenotypically altered mammary epithelial cells by neutrons and γ rays. *Radiation Res.* **129**: 102-106.
- Underbrink AG, Huczowski J, Woch B, Gedlek E, Cebulska-Wasilewska A, Litwiniszyn M y Kasper E. (1978). The relationship of different somatic mutations induced by neutrons and X rays to loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. *Inst. Nucl. Phys. Krakow, Polonia* p. 48
- Venhuizen JR, Nigg DW, Wheeler FJ y Wemple CA. (1999). Epithermal neutron beam for BNCT research at Washington State University. *Transactions of the Am. Nucl. Soc.* **80**: 73-74.

- Verrijk R, Huiskamp R, Begg AC, Wheeler FJ y Watkins PRD. (1994). A comprehensive PC-based computer model for microdosimetry of BNCT. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 241-253.
- Vogel EW y Zijlstra JA. (1987). Mechanistic and methodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **182**: 243-264.
- von Sonntag C. (1987). *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor & Francis. Londres, 515p.
- Vrana O y Brabec V. (1986). The effect of combined treatment with platinum complexes and ionizing radiation on DNA *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **50**: 995-1007.
- Walker FW, Miller DG y Feiner F. (1983). *Chart of nuclides*: General Electric. 60p.
- Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt EE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, Owens G, Ransohoff J, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR, Wilson CB y Strike TA. (1980). Boron neutron capture therapy for tumors. *N. Engl. J. Med.* **303**: 1323-1329.
- Warner JR, Nath J y Ong TM. (1991). Antimutagenic studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose-resistant assay system. *Mutation Res.* **262**: 25-30.
- Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA y Weiner AM. (1987). *Molecular biology of the gene*. Benjamin/Cummings Publishing Co. California, pp.37-213.
- Wayner DDM, Burton GW e Ingold KU. (1986). The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent. *Biochim. Biophys. Acta* **884**: 119-123.
- Weissfloch L, Bremer M, Molls M, Lemmen P, Probst T, Wagner M, Peller M, Auberger T, Senekowitsch-Schmidtke R y Tempel K. (1999). New drugs for BNCT: an experimental approach. *Strahlentherapie und Onkologie.* **175**: 118-120.

- Weitberg AB, Weitzman SA, Clark EP y Stossel TP. (1985). Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J. Clin. Invest.* **75**: 1835-1841.
- Wheeler FJ, Nigg DW, Capala J, Watkins PR, Seppaelae T y Bleuel D. (1999). Boron neutron capture therapy (BNCT): implications of neutron beam and boron compound characteristics. *Medical Phys.* **26**: 1237-1244.
- Wheldon TE. (1994). Targeting radiation to tumours. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 109-116.
- Wielopolski L, Ludewig H, Powell JR, Raparia D, Alessi JG y Lowenstein B. (1999). Analysis of accelerator based neutron spectra for BNCT using proton recoil spectroscopy. *Int. Symp. on Neutron Capture Therapy for Cancer*. P.12.
- Würgler FE y Vogel E W. (1986). *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En: *Principles and Methods for Their Detection: Chemical Mutagens*. F.J. de Serres, Ed.). Plenum Press. Nueva York, Vol 10, pp.1-72.
- Würgler FE y Graf U. (1990). Genotoxicity assays with somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Latinoamer. Genet*, Vol. extraord. 181-196.
- Young R y Beregi J. (1980). Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. *J. Am. Geriatrics Soc.* **28**: 46-47.
- Yun Ch, Jeong H, Jhoun J y Guengerich F. (1995). Non-specific inhibition of cytochrome P-450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, **16**: 1437-1440.
- Zambrano AF y Mouton RF. (1975). Inhibition of gamma-repair by quinacrine in *Tetrahymena pyriformis*. *An. Inst. Biol. Ser. Biol. Exp. UNAM*, **46**: 45-51.
- Zambrano AF. (1980). Utilización de la inducción del profago lambda de *E. coli* K-12, para la detección de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales. En: *Manual de métodos para la identificación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales*. (C. Cortinas

de Nava y P. Ostrosky de Wegman, Eds.). Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, pp. 19-30.

Zambrano AF. (1982). Reparación del ADN dañado por agentes físicos y químicos. An. Inst. Biol. Exp. UNAM, **48**: 163 - 175.

Zambrano AF y Santiago M. (1985). Reparación enzimática del genoma dañado. Ciencia y Desarrollo. CONACYT **60**: 71 - 79.

Zambrano F y Guzmán J. (1997). Bioensayos en beneficio del hombre: seres vivos para la detección de mutaciones y cáncer. Contacto Nuclear, ININ, México, **1**: 4-5.

Zambrano F, Guzmán J, Paredes L y Delfín A. (1997). Mutación y recombinación somáticas inducidas con neutrones térmicos de reactor en *Drosophila melanogaster*. Memorias VII Congreso Técnico-Científico ININ-SUTIN. Salazar, Edo. de México, pp. 473- 478.

Zambrano F, Guzmán J, Paredes L y Delfín L A. (1998a). Influencia de la edad larval en la inducción de la mutación y recombinación somáticas con neutrones de reactor en el sistema SMART de *Drosophila melanogaster*. Genet. Mol. Biol. Supl. **21**,3: 61.

Zambrano F, Guzmán J, Paredes L, Delfín A y García Barajas A. (1998b). Determinación de las frecuencias de mutación y recombinación somáticas inducidas por neutrones de reactor en *Drosophila melanogaster*. Memorias del VIII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN. Salazar, Edo. de México. 245-250.

Zambrano F, Guzmán J, Paredes L y A. Delfín. (1998c). Reporte de los resultados obtenidos sobre las frecuencias de mutación y recombinación somáticas inducidas con neutrones térmicos del reactor TRIGA Mark III en relación con la edad de las larvas en *Drosophila melanogaster*. Inf. Téc. GANS-98-14. ININ. México.

Zambrano A y Cejudo J. (1998). Efectos biológicos causados por la radiación ionizante. Cursos de protección radiológica para profesionistas. ININ. México, pp.72-80.

- Zambrano F, Guzmán J, García Barajas A, Paredes L y Delfín A. (1999a). Reducción de los daños inducidos por neutrones de reactor debido a la acción antimutagénica del ácido ascórbico o la clorofilina en *Drosophila melanogaster*. Inf. Téc. GANS-99-05. ININ. México.
- Zambrano F, Guzmán J, García A, Paredes L y Delfín A. (1999b). Antimutagénesis de moduladores químicos contra el daño inducido por neutrones térmicos de reactor. Memorias del IX Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN. Salazar, Edo. de México, pp. 229-233.
- Zambrano F, Guzmán J, García-Barajas A, Paredes L y Delfín A. (2000a). Antigenotoxic effect of ascorbic acid on neutron reactor damage in *Drosophila melanogaster*. Environ. Molec. Mutagen. **35**: 68.
- Zambrano F, García BA, Guzmán RJ, Paredes GL, Delfín LA y Ureña NF. (2000b). Uso del bioensayo SMART para el estudio de la captura de neutrones por Boro. Memorias XI Congreso de la Soc. Nucl. Mex. Morelia, Mich. México. CD.
- Zambrano-Achirica F, Guzmán-Rincón J, García-Barajas A, Paredes-Gutiérrez L y Delfín-Loya A. (2000c). Genetic effects induced by neutrons in *Drosophila melanogaster*. II. Antimutagenic effects of ascorbic acid and chlorophyllin to reactor thermal neutron damage in somatic cells. Mutation Res. Enviado para su publicación.
- Zimmering S y Deitemeyer N. (1981). A further note on the utility of the excision repair deficient mei-9a^a females of *Drosophila melanogaster* in detecting chromosome breakage induced by procarbazine in male germ cells. Environ. Mutagen. **3**: 293-295.
- Zimmering S, Mason JM, Valencia R y Woodruff RC. (1985). Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program. Environ. Mutagen. **7**: 87-100.
- Zimmering S, Olvera O, Hernández M, Cruces M, Arceo C y Pimentel E. (1990). Evidence for radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. Mutation Res. **245**: 47-49.