

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Teoría sobre la mutación somática en relación con el envejecimiento.  
Efecto de la irradiación ionizante y de algunos compuestos  
antioxidantes sobre la duración de la vida de  
*Drosophila Melanogaster*.

RODOLFO FELIX ESTRADA

Tesis presentada para optar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

México, 1972

Dr. Teófilo Herrera Suárez



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.

La presente tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Radiobiología de *Drosophila*, del Departamento de Radiobiología, gracias a las facilidades otorgadas por las Autoridades del Instituto Nacional de Energía Nuclear.

Se reconoce la colaboración de los investigadores Víctor M. Salceda, Olga Olvera Ramírez, Javier Ramírez Fuentes y del becario Alfonso de Garay Arellano.

El autor expresa su reconocimiento al Dr. Fernando Alba Andrade, Director General del Instituto Nacional de Energía Nuclear, al Fís. Marcos Mazari Menzer y al Dr. Armando López Martín del Campo, por su generosa cooperación que permitió el empleo de las facilidades técnicas y del equipo de la Unidad del Acelerador Van de Graaff de la Ciudad Universitaria.

A la memoria de mi Padre.

A mi Madre.

A Gloria.

"Qu'est ce que la vie?"  
"La vie, c'est la mort".

Comte de Buffon

# I N D I C E

	Pág.
I N T R O D U C C I O N.....	1
<u>CAPITULO I</u>	
POSIBLES MECANISMOS DEL ENVEJECIMIENTO Y SU RELACION CON EL ACORTAMIENTO DE LA VIDA EN - ORGANISMOS IRRADIADOS.....	8
<u>CAPITULO II</u>	
MORTALIDAD Y ACORTAMIENTO DE LA VIDA MEDIA - INDUCIDOS POR LA IRRADIACION CON DOSIS SUBLE TALES DE ELECTRONES ACELERADOS EN ADULTOS DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	36
RESUMEN.....	36
INTRODUCCION.....	37
MATERIALES Y METODOS.....	47
RESULTADOS.....	49
DISCUSION.....	55
<u>CAPITULO III</u>	
EFFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES: HI-- DROXITOLUENO BUTILADO, HIDROXIANISOL BUTILA- DO Y GALATO DE PROPILO SOBRE LA VIDA MEDIA - DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> .....	71
RESUMEN.....	71
INTRODUCCION.....	72
MATERIALES Y METODOS.....	80
RESULTADOS.....	82
DISCUSION.....	84
C O N C L U S I O N E S.....	91
R E S U M E N.....	99
A P E N D I C E S.....	102
CITAS BIBLIOGRAFICAS.....	114

## I N T R O D U C C I O N

En el presente estado del conocimiento, el progreso de las ciencias biológicas equivale al progreso de la medicina, ya que esta disciplina basada frecuentemente en las generalizaciones de la biología, recurre a la información biológica para fundamentar sus adelantos. Puesto que el objetivo de la ciencia hecha por el hombre es el hombre mismo, prácticamente cualquier conocimiento que se obtenga acerca de los seres vivos es relevante al entendimiento de la naturaleza humana y a la conservación de la salud.

El punto de partida lógico es la genética, como ciencia central de la biología y de la radiobiología, si se considera que el control genético del organismo y de cada una de sus células constituye un aspecto básico para las ciencias naturales, dado que en la actualidad es una generalización válida la que señala que los efectos biológicos de las radiaciones se deben principalmente a los disturbios inducidos en el mecanismo genético. No es un resultado casual, por consiguiente, que el florecimiento de la radiobiología coincide con la consolidación de la genética.

Quando se originó la genética de las radiaciones en 1927, con los experimentos de Muller, quien demostró que los rayos X pueden alterar al gene, se anticipó la utilidad de la aplicación de --

las radiaciones ionizantes a la biología, al disponerse de una herramienta que induce variabilidad genética en el grado que se desee y que además contribuye a la resolución de la estructura genética. No obstante, dicha herramienta se calificó como relativamente cruda, ya que la acumulación de iones con energía suficiente afecta a cualquier tipo de molécula en su trayectoria. A pesar de esta falta de especificidad, la genética de las radiaciones constituye un campo muy fructífero de investigación en el que colaboran genetistas, radiobiólogos y biofísicos.

Por su misma naturaleza, la genética de las radiaciones implica además de investigación básica, aplicaciones de sus propios principios. Por ejemplo, al considerar que grandes segmentos de la población humana están expuestos, ya sea a rayos X en estudios de diagnóstico, o bien a lluvia radiactiva, se ha puesto mucho interés sobre la investigación del riesgo genético de las poblaciones, resultante de exposición general a agentes mutagénicos tan activos como son las radiaciones ionizantes. Por consiguiente, se justifica el gran esfuerzo realizado para la obtención de datos sobre la tasa de mutación de mamíferos, con la esperanza de extrapolar los resultados a la tasa de mutación correspondiente a *Homo sapiens*.

Una de las especialidades más relevantes de los radiobiólogos, es la exploración de los problemas involucrados en el envejecimiento. El daño derivado de la modificación de la información genética contenida en las células somáticas, se resuelve gradualmente utilizando diversos agentes controlables en experimentos, tales co-

mo los efectos mutagénicos de la radiación, en concordancia con los efectos a largo plazo que ocurren en los organismos irradiados, en relación con el envejecimiento.

Existen muchas teorías propuestas para explicar el fenómeno conocido como envejecimiento. Dichas teorías difieren en sus proposiciones básicas referibles principalmente a defectos genéticos intrínsecos o bien a la acumulación al azar de mutaciones somáticas. Es claro que el envejecimiento tiene un componente genético y un componente ambiental según Comfort (1968): "La mayoría de los gerontólogos defienden una hipótesis general sobre el envejecimiento, como la pérdida de información celular probablemente en células fijas y originalmente a nivel molecular". Esta pérdida de información celular que es esencialmente irreversible, es dependiente del tiempo, de tal modo que se alcanza una etapa en la que el individuo no puede responder eficientemente a las variaciones ambientales.

Aunque el envejecimiento tiene su expresión a nivel celular, los eventos iniciales que conducen al deterioro de un organismo con el paso del tiempo, ocurren indudablemente al nivel molecular. Por consiguiente, es de primera importancia investigar los mecanismos por medio de los que la célula regula la síntesis y la actividad de sus enzimas, incluyendo el examen de los mecanismos de control de la transcripción y de la translación de la síntesis proteica, de la represión y de la desrepresión, así como el control hormonal.

Cada especie muestra un período de vida medio y máximo -

(Lansing, 1959) lo que implica claramente factores genéticos. Se ha sugerido que la explicación para este fenómeno reside en los genomas, ya sea que tengan programas genéticos diferentes o bien, diversos grados específicos de mutabilidad. Estos conceptos son posibilidades interesantes que han contribuido moderadamente a la interpretación en términos moleculares.

En el hombre, la longevidad tiene una base genética (Lansing, 1959; Kallmann y Jarvik, 1959). Existe una correlación positiva entre el período de vida de los progenitores y la de sus descendientes; los gemelos monocigóticos tienen un período de vida más similar entre sí que el de los gemelos dicigóticos, quienes a su vez tienen un período de vida más semejante que el de los dos individuos tomados al azar en una población. Las causas de la muerte en gemelos monocigóticos son similares en una proporción dos veces mayor que en los gemelos dicigóticos, aunque se desarrollen en condiciones ambientales diferentes (Kallmann y Jarvik, 1959). Las mujeres viven más tiempo que los hombres, aunque no parecen estar involucrados genes ligados al sexo en la determinación de la longevidad.

Se requiere una discusión más científica y más amplia, sobre los prospectos y directivas para la investigación sobre el envejecimiento, porque en la actualidad este problema no es, en general, del conocimiento de los investigadores que no son especialistas en dicho campo, por lo que las decisiones que se planeen pueden ser fácilmente influenciadas por el tono optimista o pesimista de los investigadores especialistas. Los organizadores de investigación re

quieren estar enterados de la existencia de prospectos razonables, - sobre la identificación de un proceso principal en el envejecimiento de los mamíferos, que podría ser sometido a interferencias que - alargaran el período de vida.

Aunque la posibilidad de una influencia sencilla en gran escala sobre la duración de la vida humana no se puede excluir en base a lo que se conoce en la actualidad, la mayor parte de los investigadores considera a la senectud de los mamíferos como un proceso tan complejo como las alteraciones inductoras de malignidad tisular, mientras otros investigadores con base en estudios evolutivos o en principios de genética, señalan que el proceso es esencialmente no modificable debido a razones de diversidad (Medawar, 1945; Strehler, 1962). Junto con la pérdida de programación que descompensa progresivamente la homeostasis en función de la edad, se reporta la acumulación de defectos genéticos inaccesibles a la selección, por lo -- que este pesimismo podría estar justificado.

A juzgar por los congresos y publicaciones recientes, la mayoría de los investigadores en gerontología, tienen una hipótesis general principal sobre el envejecimiento que se expresa como la -- pérdida de información celular a nivel molecular probablemente en - células fijas, siendo secundarias la dishomeostasis de otros tipos por la pérdida de información neuronal, endocrina e inmunológica. - Dicha hipótesis está basada en la historia natural del envejecimiento en los organismos en general, o sea, en la biología de la radiación, así como en las matemáticas estocásticas aplicadas a las ta--

blas de supervivencia. El contenido de información de ADN en las células postmitóticas en edades sucesivas, no se ha medido, lo que podría sugerir que la hipótesis está equivocada.

La teoría general no excluye una identidad útil entre -- las causas del envejecimiento entre organismos diferentes, por ejemplo, entre los imagos de insectos y los cultivos de células de mamíferos, lo que aumenta las posibilidades experimentales de prueba.

En *Drosophila* se puede inducir acortamiento de la vida -- por irradiación o bien por adición al alimento de análogos de aminoácidos (Von Hahn y Verzar, 1963; Harrison y Holliday, 1967) antes -- de que el estado postmitótico se establezca, o sea, durante la vida larvaria.

Se dispone actualmente de técnicas experimentales para -- el examen directo del funcionamiento del ADN en células fijas mediante la detección de materiales sin sentido (Orgel, 1963), así como de evidencias sobre síntesis compensatorias para restaurar la -- pérdida de precisión en la síntesis protéica (Clarke, 1966; Wulff, 1962) siguiendo los experimentos propuestos originalmente por Maynard-Smith (1959, 1962, 1966).

Entre los experimentos conclusivos sobre el problema, se tiene a los que demuestran que la información celular puede ser protegida mediante substancias que prolongan la vida de células fijas. Los reportes de Harman (1961) sobre el efecto de agentes antioxidantes como prolongadores del período de vida en ratones y los datos -- presentados en esta tesis constituyen, probablemente, contribucio--

nes válidas en favor de la protección de la información genética.

La interpretación de los datos experimentales reseñados en el presente trabajo, parece ser compatible con algunos de los -- postulados de la teoría de la mutación somática del envejecimiento, dentro de los límites impuestos por las consideraciones que se analizan. Estos datos, que no constituyen una prueba de la teoría, tam poco la refutan. En general, las teorías concernientes a los mecanismos del proceso normal de envejecimiento, son extremadamente difíciles de probar en el terreno experimental, por lo que cualquier resultado experimental relevante al problema, ya sea inconclusivo, o bien, que tenga una correlación definitiva con las hipótesis de - trabajo, posibilita otros mecanismos factibles de ataque, para la - resolución ulterior del problema.

## C A P I T U L O I

### POSIBLES MECANISMOS DEL ENVEJECIMIENTO Y SU RELACION CON EL ACORTAMIENTO DE LA VIDA EN ORGANISMOS IRRADIADOS

Los argumentos relativos a los procesos generales involucrados en el envejecimiento natural de los mamíferos, y a los factores analizables que los aceleran o retardan, pueden explicar asimismo, algunos de los aspectos comparativos de la senectud. Los datos incluidos dentro de este contexto fueron extraídos, a juicio del autor, de la literatura tan abundante de que se dispone sobre las investigaciones y acerca de las teorías explicativas del envejecimiento en una multitud de especies. El propósito principal, no es la --elaboración de un sumario comprensivo de los procesos que intervienen en el envejecimiento, sino la evaluación de algunas de las teorías más generalizables que se han formulado, así como de la evidencia que las apoya o las contradice.

Es notable la atención de que ha sido objeto la biología de la senectud y su modificación por factores externos durante la --última década, como lo indica la abundante literatura sobre los variados aspectos del problema, discutida en numerosas reuniones de --investigadores (Shock, 1960; Handler, 1961; Harris, 1962; Krohn, --

1966; Lindop y Sacher, 1966). Los experimentos realizados en el ratón, en *Drosophila* y en otros insectos, son particularmente relevantes en ese orden de importancia, considerando las escasas conclusiones aceptadas para la formulación de una hipótesis tendiente a la generalización.

Los investigadores que han dedicado un período valioso de su vida al estudio de los procesos del envejecimiento, comprometen su opinión entre los aspectos del problema que juzgan significativos y las nociones que a su criterio son aparentemente triviales. Por otra parte, la evaluación de los postulados está en función de los resultados experimentales, y su defensa no se funda necesariamente en las secuencias del tipo causa y efecto, ya que los mecanismos propuestos se derivan en algunos casos, a los procesos observables que son consistentes con la información aceptada. En la disponibilidad de varias hipótesis que cumplan con el criterio anterior, se favorecen aquéllas que requieran el componente más reducido de suposiciones.

Previamente a la discusión, es conveniente recordar, que los postulados que tienden a la generalización de los conceptos biológicos, como ocurre con las teorías sobre el envejecimiento, deben confrontar, tanto los hechos pertinentes, como las observaciones experimentales. Las teorías enunciadas que incluyen, por ejemplo, la alteración de la colágena en relación con la edad, ciertos parámetros bioquímicos, el comportamiento celular en los cultivos de tejidos, etc., deben ser concordantes con las observaciones procedentes

de otras líneas de investigación, ya que la literatura biológica es tan basta, que mediante una selección apropiada (si bien inconscientemente predispuesta) de hechos, se puede sustentar cualquier teoría a condición de que se formule razonablemente.

Las observaciones numerosas y los resultados experimentales en el campo de la gerontología se pueden dividir, en aquellas - que son pertinentes, y que por consiguiente contribuyen a la validez de lo que se considera admitido, y las que en relación con los postulados teóricos constituyen únicamente observaciones neutrales. Por ejemplo, la desnutrición durante las primeras etapas del desarrollo que prolonga significativamente la vida de algunos animales (Mc Cay, 1952; Fanestil y Barrow, 1965), y las dosis relativamente bajas de irradiación que retardan el envejecimiento en el ratón y - en *Drosophila*, son observaciones que pueden clasificarse en relación con el problema, como descubrimientos neutrales.

En el estudio del envejecimiento es necesario distinguir claramente las modificaciones tisulares y la debilitación producida por los procesos básicos que caracterizan a la senectud, de los --- eventos patológicos que tienen una relación escasa con el envejecimiento. En el hombre y en varios animales de laboratorio se puede - aminorar la interferencia del componente patológico gracias a lo -- que se conoce acerca de la incidencia natural de numerosas enfermedades al aumentar la edad, así como del debilitamiento observable - en las poblaciones que se desarrollan en condiciones óptimas. En este respecto es necesario evaluar con cierto rigor las conclusiones

obtenidas exclusivamente a partir de tablas de supervivencia de diferentes líneas de la misma especie con diversos períodos de vida.- Por ejemplo, una línea de ratones cuyos individuos mueren de leucemia alrededor de los doce meses de edad, no puede considerarse como un ejemplo de la aceleración del envejecimiento al compararla con otra línea cuyos individuos tienen un período de vida cercano a dos años y medio. En forma similar, cuando el período de vida se acorta mediante algún procedimiento experimental, las conclusiones sobre la posibilidad del envejecimiento precoz o del envejecimiento acelerado no se justifican si no se tiene un control sobre los factores patológicos que puedan modificar el proceso. El problema se simplifica en los estudios en *Drosophila*, mediante una población testigo constituida por numerosos individuos, que desarrollándose en condiciones óptimas tienen una supervivencia media reproducible en cada experimento, que en ausencia de los factores externos que se analizan, representa el período de vida media óptima para la línea que se investiga.

En la imposibilidad para obtener mejor información sobre las alteraciones bioquímicas, fisiológicas y patológicas que preceden al punto final de la vida, Kohn (1966) señala que son más significativos los experimentos que prolongan la vida más allá del período óptimo, que los tratamientos que acortan dicho período. En otros trabajos (Félix *et al.* 1970a, 1970b y la presente tesis), se discuten los resultados obtenidos por el autor sobre el alargamiento de la vida media de *D. melanogaster* mediante la adición de compuestos

antioxidantes al medio de cultivo, así como por dosis bajas de irradiación aplicadas a los adultos. Ambos efectos son explicables mediante las hipótesis congruentes que se discuten en los capítulos correspondientes.

Teorías sobre los mecanismos fundamentales que intervienen en el envejecimiento e interpretación de los factores modificantes de la velocidad del proceso.

El envejecimiento es un proceso gradual de deterioro, -- que es acompañado en general por modificaciones estructurales y fisiológicas en la mayor parte de los sistemas de órganos (Korenchevsky, 1961; Brues y Sacher, 1962; Strehler, 1960; Shock, 1962). Algunos investigadores acentúan la distinción entre el "envejecimiento fisiológico" y el "envejecimiento patológico" implicando que la susceptibilidad aumentada a varias enfermedades, puede ser un componente significativo del proceso de envejecimiento, ya que a medida que pasa el tiempo se manifiestan diferencias en el grado de deterioro de los tejidos. En general, la muerte se debe al fracaso funcional de uno o de varios órganos en los que hay poca división celular, de lo que se deduce que las células defectuosas son seleccionadas en algunas poblaciones celulares en proliferación. Desde este punto de vista es razonable la opinión de Comfort (1956), que define al envejecimiento como el proceso biológico que aumenta la susceptibilidad

a la enfermedad. Aunque son obvias las excepciones a esta definición, la generalización obedece a un criterio razonablemente bueno. Aún el cáncer y la arterioesclerosis se clasifican como procesos separables del envejecimiento, aunque los tejidos longevos ofrecen un medio favorable para el desarrollo de ambos padecimientos, soportan por otra parte, los efectos indirectos de otras enfermedades en una forma menos efectiva que los tejidos jóvenes.

La definición de Maynard Smith (1966) implica el concepto de Comfort, pues incluye a todos los procesos que condicionan en el individuo una mayor probabilidad para morir en un intervalo de tiempo dado a medida que envejece, por lo que durante el proceso de envejecimiento tiene lugar un aumento en la fuerza de mortalidad en función de la edad.

Existen dos maneras de demostrar que el envejecimiento ocurre en una especie dada. Una es la medida de un aspecto fisiológico en individuos de diferentes edades, o en el mismo individuo a edades diferentes. Por ejemplo, si se mide cada año la velocidad de una persona para recorrer la distancia de 100 metros, a partir de la edad de 30 años, se registra una disminución gradual al principio, que se hace más pronunciada con el paso del tiempo. El segundo método mide el incremento de la fuerza de mortalidad en una población. Si la fuerza de mortalidad aumenta con la edad, tiene lugar, efectivamente, el envejecimiento, en vista de que no hay razones para asumir que los individuos longevos están expuestos a condiciones más severas que los jóvenes.

La primera conclusión que se puede obtener en relación con los dos procedimientos, es la imposibilidad para deducir de la forma de una gráfica derivada de los datos en una tabla de supervivencia, algún postulado en relación con otra gráfica que represente la modificación de algún aspecto fisiológico contra la edad. Por ejemplo, si se grafica la tabla de supervivencia, ya sea como el logaritmo de la supervivencia contra el tiempo, en cuyo caso una población con una fuerza constante de mortalidad daría una línea recta, o como el logaritmo de la fuerza de mortalidad contra la edad (función de Gompertz), que da una línea aproximadamente recta en algunas poblaciones, se obtiene únicamente información acerca del porcentaje de mortalidad en los individuos que constituyen una población en relación con su edad. Tales diferencias se deben a la diversidad genética entre los miembros de la población, a diferencias entre las circunstancias ambientales que confrontan, o a la incidencia de eventos al azar que influyen sobre el proceso durante la vida de cada individuo. Por consiguiente, la forma de las gráficas derivadas de tablas de supervivencia indican algún parámetro relativo al grado de variabilidad genética de la población, el efecto de la diversidad de las circunstancias ambientales, o bien la incidencia de eventos que ocurren al azar, sin valorar el grado de desarrollo de los procesos de envejecimiento en individuos de diferente edad. Aunque los dos métodos señalados demuestran que los procesos de envejecimiento tienen lugar, no toman en consideración los eventos in trínsecos causativos de tales procesos. Las tablas de supervivencia

dan una medida aproximada de la suma total de todos los procesos de envejecimiento que están ocurriendo, mientras que los datos fisiológicos ilustran con precisión algún aspecto específico del envejecimiento.

Resulta de interés, por consiguiente, la investigación - sobre las características del tejido senil, así como de las causas intrínsecas que pueden explicar su origen. Las numerosas teorías al respecto son reunidas a continuación en tres categorías generales.

### I. Acumulación de productos dañinos del metabolismo

Ciertos productos como la colágena, se acumulan en algunos tejidos dando a los órganos la apariencia característica de órganos envejecidos. Mientras la acumulación ocurre en forma notable en algunos tejidos, en otros no tiene lugar; el envejecimiento de la piel constituye el ejemplo más ilustrativo. Casarett (1964) señala que durante el envejecimiento normal de los mamíferos, tiene lugar un proceso dañino progresivo al nivel histopatológico definible como el incremento de la "barrera histohemática", cuyo principal constituyente es el tejido conectivo que separa a la sangre de las células del parénquima. A través de dicha barrera se efectúa el intercambio de oxígeno, de bióxido de carbono, de nutrimentos y de productos metabólicos. El espesamiento de la barrera histohemática in-

volucra un aumento de la densidad fibrilar y de la colágena, con el descenso correspondiente en el componente básico del tejido conectivo, lo que origina la fibrosis arteriolocapilar.

Los investigadores en el campo de la biología celular reconocen que los procesos biológicos pueden ser modificados por el material no viviente que rodea a las células, aunque por otra parte, es frecuente que los gerontólogos no consideren el papel que desempeñan las sustancias extracelulares que intervienen en el envejecimiento, a pesar de que se ha demostrado repetidamente que las alteraciones que ocurren en las proteínas fibrosas del tejido conectivo pueden explicar una buena proporción de las manifestaciones del envejecimiento en los mamíferos.

Las principales proteínas fibrosas del tejido conectivo, que son la colágena, la elastina y la reticulina presentan alteraciones similares que contribuyen a las debilidades relacionadas con el envejecimiento. La colágena ha sido estudiada extensivamente, -- considerándosele como un modelo del envejecimiento de las proteínas fibrosas estables. Dada su alta proporción y distribución en el organismo de los vertebrados en general, las alteraciones tan notables en su composición y en sus propiedades, deben producir efectos observables en el organismo.

El papel biológico de la colágena depende de la distribución de la fuerza y de la elasticidad de las fibras maduras que la constituyen, ya que su distribución alrededor y a través de los órganos y de los vasos sanguíneos le permite soportar las tensiones y

mantener la forma de los órganos (Oderr, 1964). Las células musculares, cuya sarcolema contiene colágena, se contraen dentro de un armazón de colágena (Kono *et al.*, 1964). Varios investigadores han --propuesto que la fuerza es transmitida de las células del músculo --liso a otras células por medio de redes de colágena (Mullins y Guntheroth, 1965; Wiederhielm, 1965). Finalmente, se acepta que en las relaciones tisulares, cualquier substancia que pase entre las células y los vasos sanguíneos, debe hacerlo a través de la colágena.

Entre las causas principales de la muerte de los individuos de una población humana que envejece, se han propuesto secuencias de causa a efecto entre un tejido conectivo que se hace rígido y las lesiones patológicas inherentes. En resumen, la incidencia de hipertensión y arterioesclerosis pueden ser explicados, por el incremento en la rigidez de los vasos más delgados, por la difusión --disminuída de nutrimentos y de otros materiales a través de las paredes de los vasos, con la inflamación consecuente y por las complicaciones resultantes de la acumulación de sales minerales y de lípidos. Es probable que el descenso de la resistencia a la infección --tenga su origen en la imposibilidad resultante para que las hormonas, nutrientes y anticuerpos lleguen a los sitios críticos en las concentraciones necesarias, así como en la insuficiente eliminación de substancias dañinas (Kohn, 1966).

En la actualidad parece evidente que la radiación no acelera la iniciación o el progreso del envejecimiento natural en todas sus manifestaciones. En efecto, en el hombre y en los mamíferos

La radiación no abrevia el período de latencia de todas las enfermedades que caracterizan a la senectud, como sería de esperarse si todos los procesos de envejecimiento fueran acelerados (Alexander y -Connell, 1963).

No obstante, es un argumento importante en contra de la teoría que se discute, que las dosis de irradiación que acortan el período de vida no aceleran la agregación de la colágena, que aparentemente no muestra modificaciones en los animales irradiados --- (Connell y Alexander, 1959; Darden *et al.*, 1963; Verzar, 1957). Además, los órganos, como el músculo esquelético, que no acumulan los productos dañinos del metabolismo mencionados, se alteran notablemente con la edad, constituyendo, de hecho, uno de los síntomas más característicos del envejecimiento.

Una de las alteraciones celulares más generales que se pueden relacionar con el envejecimiento consiste en la acumulación progresiva de gránulos de lipofucsina en ciertas células del organismo (De Robertis y Saez, 1960; Bondareff, 1959; Bourne, 1957; Wilcox, 1959). Los gránulos de lipofucsina, que constituyen el llamado "pigmento del envejecimiento" se derivan de los procesos de desecho en el citoplasma (Boyd, 1953).

Uno de los ejemplos más conocidos consiste en la llamada "atrofia parda del corazón", que es una característica visible de la vejez localizada en el miocardio. En las preparaciones histológicas, el pigmento se observa como resultado de una aglomeración de gránulos de color pardo en el músculo cardíaco y en otros tejidos

como en las células nerviosas, en el *corpus luteum*, en la glándula prostática y en las células intersticiales de los testículos.

Sin embargo, se conoce relativamente poco acerca del significado del "pigmento del envejecimiento", cuya presencia debe ser especialmente significativa en las células de órganos vitales, tales como el corazón y el sistema nervioso central. Los estudios más recientes, con aplicación de técnicas histoquímicas al nivel de resolución del microscopio electrónico, posibilitan una visión más directa de la significación funcional de estos gránulos pigmentados.

Se ha reunido evidencia en favor de que el pigmento del envejecimiento se relaciona con la estructura celular conocida como lisosoma. Según la opinión de De Duve (1959a) los lisosomas contienen la mayor parte de las enzimas celulares que pueden fragmentar -- prácticamente cualquier sustancia presente en la célula. En circunstancias normales, las enzimas de los lisosomas tienen relación con los procesos de degradación orgánica necesarios para proveer a la célula con los nuevos materiales que se requieren para la reconstrucción de los componentes estructurales necesarios para el mantenimiento de procesos metabólicos básicos (De Duve 1959b). Los lisosomas se observan como bolsitas limitadas por su propia membrana, -- que contienen la mayor parte de las enzimas que al ser liberadas -- pueden causar la degradación fisiológica de los compuestos contenidos en la célula. La membrana que envuelve cada lisosoma evita que las enzimas actúen sobre las estructuras celulares, lo que daría lugar a alteraciones profundas, incluyendo a la muerte celular, ya --

que se tiene evidencia substancial sobre la posibilidad de que los lisosomas se activen bajo la influencia de una variedad de condiciones fisiológicas o patológicas y sobre la destrucción parcial o total de la célula bajo tales condiciones.

La activación de las enzimas digestivas de los lisosomas pueden dar origen a los lisosomas secundarios o derivados, uno de estos, denominado vacuola autófaga, es de especial interés para el estudio del envejecimiento. Las vacuolas autófagas se han observado en una gran variedad de células en el transcurso de eventos metabólicos desfavorables que ocurren durante el ciclo celular, incluyendo a las condiciones patológicas resultantes del bloqueo o interferencia en las rutas metabólicas normales, por agentes como los rayos X y los compuestos alquilantes (Brandes y Anton, 1966). La mayor parte del material contenido en las vacuolas autófagas es digerido por las enzimas lisosomales, con excepción de algunos complejos lipoprotéicos. En este estado, las enzimas hidrolíticas tienden a desaparecer y parte del cuerpo celular queda ocupado por las vacuolas que contienen material indigerible. A estas estructuras se les denomina "cuerpos residuales" que no se pueden distinguir del pigmento del envejecimiento, por lo que De Duve (1964) ha sugerido que la acumulación de residuos de lípidos que tiene lugar durante el envejecimiento resulta de la actividad lipolítica limitada de los lisosomas.

Strehler *et al.* (1959) demostraron que el pigmento del envejecimiento (lipofucsina) se acumula siguiendo una relación cuanti

tativa con la edad. Dichos autores postulan que "dada su ausencia - en los individuos muy jóvenes, su presencia casi sin excepción en - los corazones envejecidos, la falta de correlación con alguna enfermedad cardíaca y su acumulación en el miocardio del hombre, cumple con los requerimientos que definen a un proceso básico de envejecimiento".

Como se señaló antes, es posible inducir rápidamente la formación de cuerpos intracelulares similares al pigmento del envejecimiento en individuos jóvenes, por agentes o procedimientos que bloqueen las rutas metabólicas normales. La irradiación produce el mismo efecto, por lo que el proceso puede considerarse como una manifestación del envejecimiento prematuro posterior a la irradiación en varios tipos de organismos.

## II. El Uso y el desgaste orgánico

La observación de que todos los objetos inanimados muestran un desgaste gradual, hizo pensar que el envejecimiento podría interpretarse en términos similares. Los efectos de la tensión orgánica ("stress") sobre la salud fueron extensivamente analizados por Selye, quien propuso una relación entre el envejecimiento y los síndromes adaptativos que se desarrollan durante la tensión orgánica - (Selye y Prioreshi, 1960).

El concepto de que una enfermedad pueda causar el acorta miento de la vida, aunque tenga lugar una recuperación completa, es muy antiguo, aunque no se ha podido demostrar. Jones (1956) y Com-- fort (1956) reunieron datos actuariales en favor de que el aumento en la incidencia de enfermedades en una población humana reduce la supervivencia que es de esperarse y que por consiguiente, tiene alguna relación tanto con el envejecimiento como con la muerte pre-- matura. No obstante, al definir dichos autores el envejecimiento como el aumento en la mortalidad a una edad especffica, no implican que la tensión orgánica acelere el envejecimiento, sino que, la vida me dia de los individuos decrece cuando la probabilidad de un evento - fatal aumenta.

En resumen, mientras es obvio que la vejez disminuye la capacidad para soportar la tensión orgánica, no se ha demostrado -- que la misma constituya *per se* una causa significativa del envejeci miento.

Curtis (1961) y Stevenson y Curtis (1961) desarrollaron una serie de experimentos para la evaluación de la teoría del uso y desgaste orgánico y del grado en que la radiación puede considerarse como un tipo de tensión orgánica único, según los efectos genera les que tiene en el ratón. En un experimento sometieron colonias de ratones a los efectos de algunos compuestos tóxicos como la mostaza de nitrógeno y el toxoide de la tifoidea, en dosis tan concentradas que aproximadamente la mitad de los animales murieron durante el -- primer día del tratamiento. Al comparar las curvas de supervivencia

de los sobrevivientes con las de animales que recibieron una dosis semiletal de rayos X, y con las del grupo testigo, encontraron que los animales inyectados con los compuestos tóxicos mostraron una expectativa de vida semejante a la del grupo testigo, mientras que en los animales irradiados se observó una reducción en el período de vida proporcional a la dosis administrada. El experimento demostró en esta aproximación original al problema, que la tensión orgánica no es un elemento causativo importante que acelere el envejecimiento. Posteriormente, se hicieron otros experimentos para generalizar la conclusión anterior, administrando sustancias tóxicas durante períodos prolongados comparables algunas veces al de la vida del -- animal, estudiándose el efecto acumulativo de las tensiones repetidas durante la vida del ratón. Se aplicaron varios agentes químicos no específicos, incluyendo a la mostaza nitrogenada administrada -- por vía intravenosa e intraperitoneal, el toxoide del tétano, la toxina del tétano y el toxoide de la tifoidea, así como trementina -- por inyección subcutánea, que condicionó el desarrollo de grandes -- úlceras. Los agentes mencionados se aplicaron en la frecuencia mayor permisible que no matase a los ratones. En algunos casos se administró una dosis casi letal tres días por semana durante un período equivalente a las dos terceras partes de la vida de la población testigo, encontrándose en todos los casos, que a pesar de la severidad de los tratamientos, el período de vida no se modificó significativamente.

### III. Teoría de la mutación somática en relación con el envejecimiento

La manifestación más general de la desorganización orgánica que tiene lugar espontáneamente se define como envejecimiento, que es un proceso irreversible en el tiempo, a su vez acelerado proporcionalmente por la irradiación. El descenso gradual de la eficiencia de los tejidos conduce al fracaso fisiológico de alguno de los órganos vitales, lo que en el terreno de la radiobiología se interpreta como una reparación insuficiente del daño inducido por una -- dosis de irradiación que culmina con la pérdida de la vida, que es una consecuencia eventual que tiene lugar después de muchas generaciones celulares posteriores a la alteración original. La relación entre los dos eventos: daño inicial y fracaso funcional es objeto de abundante trabajo experimental, ya que el efecto dañino debido a la irradiación, se mantiene latente durante un período que comprende varios años en algunos mamíferos de vida larga, manifestándose finalmente en el acortamiento del período de vida y en la inducción del cáncer, a pesar de que en el lapso transcurrido tienen lugar -- una proliferación celular ininterrumpida, así como el mantenimiento de una continuidad fisiológica. Con fundamento en estas premisas se postula repetidamente, que el sitio donde se almacena el daño latente es el material genético, causante de la disminución en la eficiencia de las células irradiadas (Ford *et al.*, 1957; Kelly, 1959).

Una de las teorías más discutidas sobre el envejecimiento es la de la mutación somática, que propone al evento mutacional como la causa principal de la senectud (Szilard, 1959; Failla, 1960; Curtis, 1963). El concepto enunciado como mutación somática incluye a todas las alteraciones del material genético contenido en los cromosomas de las células somáticas, que al ocurrir en la línea germinal son identificables como mutaciones génicas o como aberraciones cromosómicas. Mientras Curtis (1963) hace explícito el concepto de que las mutaciones implicadas en el envejecimiento son las que se acumulan en las células que no se dividen, la misma asunción está implícita en las teorías de Failla (1960) y de Szilard (1959).

La vida de los animales se acorta cuando son expuestos a la irradiación, obteniéndose curvas sigmoides al graficar la supervivencia en función del tiempo transcurrido después del tratamiento. La supervivencia media disminuye al aumentar la dosis de exposición. Por otra parte, se ha demostrado una diferencia en la sensibilidad entre líneas diferentes de ratones (Grahn y Hamilton, 1957), que -- puede referirse a la heterogeneidad de su composición genética.

Aunque se ha demostrado una relación lineal, dentro de ciertos límites, entre la dosis de radiación gamma y el acortamiento de la vida, La  $DL_{50}$  aumenta con el fraccionamiento de la dosis - (Paterson *et al.*, 1952). Con apoyo en los datos anteriores y en --- otras observaciones complementarias, Blair (1958) formuló una teo--oría sobre el acortamiento de la vida, debida a la irradiación según los conceptos siguientes: El daño total causado por la irradiación

es proporcional a la dosis. Mientras el daño inducido es en parte -reparable, el daño irreparable se acumula en razón de la dosis total. Como ambos tipos de daño son aditivos, la muerte ocurre cuando la suma de ambos componentes alcanzan un nivel crítico determinado, que tiene a su vez, un efecto inversamente proporcional con respecto a la edad de los animales irradiados.

Los demógrafos han reconocido desde hace tiempo que el -logaritmo de la mortalidad específica en función de la edad en una población (fuerza de mortalidad) graficado contra la edad en que -- ocurre la muerte, es aproximadamente lineal después de los primeros años de la infancia. Esta relación, conocida como función de Gom---pertz se aplica también a las poblaciones irradiadas (Sacher, 1956).

Las observaciones anteriores promovieron el interés para investigar la naturaleza de la relación existente entre el daño pro-ducido por la irradiación y el envejecimiento. Es conveniente recor-dar que aunque el envejecimiento es un proceso universal, su defini-ción implica ciertas dificultades, puesto que lo que se observa estadísticamente en las poblaciones no es el envejecimiento, sino la mortalidad, que es un parámetro que está en una relación directa -- con el envejecimiento. Las teorías sobre el acortamiento de la vida por la irradiación, han recibido apoyo en numerosos datos experimen-tales demostrativos de la similitud entre el daño histológico poste-rior a la irradiación y las lesiones debidas a la senectud.

Dada la ignorancia que se tiene sobre las lesiones bási-cas que acortan la vida en los animales multicelulares, el efecto -

conocido de la radiación como un agente mutagénico promovió la especulación sobre la importancia de la mutación somática como un evento biológico fundamental determinante del envejecimiento. La idea - implícita en este concepto es antigua en la biología, aunque la formulación de una teoría en términos definidos, es reciente. Failla - (1960), Curtis (1958) y Szilard (1959) han señalado los efectos de- letéreos posibles, resultantes de la mutación espontánea, que se -- acumulan tanto en las células somáticas en multiplicación, como en las que no se dividen. Por otra parte, está demostrado, a partir de abundante evidencia directa, que la gran mayoría de las mutaciones son dañinas, por lo que es explicable que los órganos de animales - seniles, que han acumulado un número apreciable de células portado- ras de mutaciones, manifiesten una menor eficiencia funcional, a la que comparativamente tendrían en otras condiciones. A pesar de que la teoría es muy sugestiva, la evidencia en su favor fue únicamente fragmentaria antes de la última década.

Szilard (1959) señala a la mutación somática como la causa fundamental del envejecimiento, asumiendo que la muerte celular ocurre cuando dos genes homólogos que intervienen en una función -- esencial, son modificados por la mutación. Cada mutación que hereda el individuo es designada por Szilard como una "falta", que difiere en su momento de ocurrencia de la mutación espontánea o "impacto" - que tiene lugar en las células somáticas del adulto.

Szilard calculó, tanto el promedio de faltas acumuladas como los impactos inducidos por la radiación ionizante, determinan-

do el acortamiento de la vida humana en función de ambos eventos. - No obstante, sus resultados no son comprobables, debido al presente estado de ignorancia sobre el complejo conjunto de interacciones -- biológicas que conduce al acortamiento de la vida en la población - humana. En su estado actual, la teoría no predice la correlación es perada entre la duración de la vida de los progenitores y la de su descendencia, si así lo hiciera, se facilitaría considerablemente - su verificación experimental.

Failla (1958) también interpretó al envejecimiento como un efecto de la mutación, demostrando que es posible la aplicación de la función de Gompertz, utilizando los datos derivados de poblaciones de células en cultivos artificiales, si se asume que el cambio en el grado de mortalidad en relación al transcurso del tiempo, es un proceso resultante de eventos producidos por un impacto.

Otro componente importante, a saber, los mecanismos posi**bl**es de reparación de las mutaciones, se desconoce en su mayor parte. Al respecto, es significativo que los intentos para acortar el período de vida mediante mutágenos que no tuvieron éxito en un prin**ci**pio (Curtis, 1958), dieron resultados positivos en experimentos - posteriores (Alexander y Connell, 1960). En estos experimentos se - examinaron los efectos radiomiméticos manifiestos en el acortamiento de la vida que producen los mutágenos químicos cuando son adm**in**istrados al ratón.

Las técnicas desarrolladas durante la última década para la observación de los cromosomas humanos proporcionan otro enfoque

aplicable a la resolución del mismo problema. Bender y Gooch (1962) demostraron que las células de la sangre procedente de individuos - expuestos accidentalmente a dosis muy moderadas de irradiación, con tienen cromosomas anormales aún varios años después de la exposi--- ción. Por otra parte, Jacobs *et al.* (1961) descubrieron que en la - sangre del hombre, las células con números anormales de cromosomas aumentan con la edad. En observaciones posteriores con el mismo pro pósito, Jacobs *et al.* (1964) encontraron un incremento en la frecuen- cia de leucocitos con anomalías cromosómicas en individuos a -- partir de los 65 años de edad.

Las observaciones anteriores son también relevantes a la selección celular que debe ocurrir en la médula ósea (Bender y ---- Gooch, 1962). Desde este punto de vista las aberraciones cromosómi- cas observadas por Jacobs *et al.*, (1961 y 1964) deben corresponder a una pequeña proporción de las que tienen lugar espontáneamente, a no ser que las células con aberraciones tengan un valor adaptativo neutral o mayor al que exhibe el resto de la población, por lo que el efecto que tengan sobre el envejecimiento, según la teoría de la mutación somática, debe ser mínimo. Los órganos con proliferación - celular activa como la médula ósea no envejecen, según dicho crite- rio.

En las células de los órganos con actividad mitótica muy reducida, como el hígado de los mamíferos, las aberraciones cromosó- micas se acumulan en función de la edad (Crowley y Curtis, 1963), - por lo que se afirma legítimamente que el envejecimiento celular --

así considerado, tiene lugar en los órganos con división celular -- muy reducida, o nula como el hígado y el sistema nervioso, respectivamente.

La investigación en cultivo de tejidos proporciona otra evidencia favorable a la teoría del envejecimiento de las células individuales. Hayflick (1965) descubrió que las células procedentes de varios órganos en cultivo de tejidos, pueden dividirse aproximadamente 50 veces antes de fragmentarse y morir, exceptuando la posibilidad de que tenga lugar una alteración no definida en el cultivo, que por su naturaleza, lo transforma en un cáncer. Además, si las células con que se inicia el cultivo proceden de un animal longevo, pasan por un número menor de divisiones, que las que proceden de un animal joven. Los experimentos de Hayflick, constituyen una de las evidencias más firmes en favor de la teoría sobre la muerte celular causada por la acumulación de mutaciones.

En una serie de experimentos, Krohn (1963) injertó varias veces un fragmento de piel procedente de un ratón joven en ratones de la misma edad, dejando pasar cierto tiempo entre cada injerto, que envejeció, a pesar de que los huéspedes sucesivos eran jóvenes. La pieza de piel reinjertada vivió durante un tiempo un poco mayor comparado con el período normal de la vida del ratón de cuya piel obtuvo el injerto, por lo que es permisible postular en ausencia de otro evento analizable, que la acumulación creciente de mutaciones, es la causa de la muerte de las células del injerto. -- Los experimentos anteriores demuestran el incremento de mutaciones

en función del tiempo, en células somáticas que no se dividen, por lo que también dan cierta justificación al postulado del envejecimiento celular.

En la imposibilidad de medir la frecuencia de mutaciones en células que no se dividen y que constituyen la mayor parte de algunos tejidos somáticos, se han ideado varios procedimientos para la estimación de la frecuencia con que tiene lugar la mutación somática. La conocida técnica de adición de colchicina a los tejidos o células en cultivo para la visualización de las aberraciones cromosómicas durante la metafase es aplicable también a las células que no se multiplican en condiciones normales, ya que la división celular suspendida se reanuda en algunos casos, por el efecto de factores externos. Por ejemplo, en el hígado se puede inducir actividad mitótica mediante la hepatectomía parcial o por inyección subcutánea de tetracloruro de carbono, que destruye aproximadamente el 65 por ciento del tejido hepático (Albert, 1958). Durante la regeneración, el índice mitótico alcanza su valor máximo a las 72 horas después del tratamiento, determinándose mediante el examen microscópico la frecuencia de las aberraciones cromosómicas acumuladas en las células somáticas en su período de vida previo a la actividad mitótica inducida artificialmente (Stevenson y Curtis, 1961).

Si se asume que, como ocurre en vegetales (Galdecott, -- 1961), la frecuencia de aberraciones es un índice de la frecuencia de mutaciones puntuales, el procedimiento citológico citado puede extrapolarse para la estimación indirecta de la frecuencia de muta-

ciones puntuales en el hígado de los mamíferos (Curtis, 1963).

Otro experimento que demuestra la relación causal entre las mutaciones y el envejecimiento, se refiere a la comparación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas entre las células hepáticas de una línea de ratones de vida corta, y el mismo parámetro en otra línea que tiene una vida relativamente larga (Crowley y Curtis, 1963). Los resultados, demuestran que en los individuos de la primera línea las aberraciones cromosómicas tienen mayor incidencia que en los individuos cuyo período de vida es más prolongado. En las dos poblaciones la muerte se debe a una serie de causas diversas, por lo que se tiene confianza en que las diferencias entre los períodos de vida respectivos resultan de la diversidad en los procesos causativos del envejecimiento fisiológico y no de un defecto o padecimiento específicos.

En otro experimento, cuyos resultados están en favor del mismo concepto, se compara la velocidad con que aumenta el porcentaje de aberraciones cromosómicas en el perro y en el ratón (Curtis *et al.*, 1966). Desde un punto de vista fisiológico es permisible adelantar que las células hepáticas del perro son muy semejantes y realizan las mismas funciones que las células hepáticas del ratón, y que, por lo tanto en las dos especies deben originarse aberraciones cromosómicas con una frecuencia similar en relación al tiempo. Por otra parte, el ratón envejece con una velocidad aproximadamente seis veces mayor que el perro, por lo que las aberraciones cromosómicas deben estar en una proporción seis veces mayor en las células

del hígado del ratón. La contradicción aparente se resolvió mediante la observación citológica que demostró la validez de la segunda hipótesis. Cuando menos en estas dos especies, los hepatocitos envejecen a la misma velocidad que el animal de que son parte, si se -- considera válida la correlación entre el envejecimiento y la acumulación de eventos de tipo cromosómico.

Cuando se mide el efecto de la irradiación con rayos X -- según el porcentaje de aberraciones cromosómicas inducidas en el hígado del ratón, se encuentra, asimismo, una correspondencia notable, ya que las aberraciones aumentan por el tratamiento, decreciendo -- lentamente durante un período que puede comprender varios meses --- (Stevenson y Curtis, 1961). El porcentaje de aberraciones cromosómicas inducidas por la irradiación es proporcional a la dosis, lo mismo que el acortamiento de la vida.

El fraccionamiento de la dosis de irradiación o la reducción de la razón de dosis se traduce en un efecto biológico reducido, si se compara con el efecto de la aplicación de la misma dosis en un solo tratamiento cuando el parámetro que se mide, es la frecuencia de las aberraciones cromosómicas inducidas. Por ejemplo, una dosis de rayos X o de rayos gamma administrada durante un período largo, tiene una efectividad aproximadamente igual al 25 por --- ciento de la misma dosis, administrada en una sola aplicación aguda. Si se irradia una población de ratones con 2,000 rads en una razón de dosis baja, que requiere el transcurso de varios meses, se obtiene un efecto equivalente al de una dosis de 500 rads aplicada en --

unos cuantos segundos. Al investigar el daño producido, según el -- porcentaje de aberraciones cromosómicas, se demuestra la misma relación (Curtis y Crowley, 1963). Por otra parte, en los experimentos de irradiación con neutrones, no se observa el efecto biológico anterior, que es en este caso, independiente de la razón de dosis, obteniéndose los mismos resultados para las aberraciones inducidas, - cuya frecuencia depende únicamente de la dosis administrada (Curtis *et al.*, 1964).

Según los resultados anteriores, es permisible afirmar, - que tanto para los diferentes tipos de radiación como para las di-- versas razones de dosis, existe una correspondencia entre la inducción de aberraciones y el acortamiento de la vida, por lo que sería sorprendente que no existieran una relación causal entre los dos efectos biológicos observados.

Los experimentos con fraccionamiento de la dosis, demuestran que existe una reparación activa del daño cromosómico, que debe operar tanto en las mutaciones espontáneas como en las inducidas, lo que se ha comprobado principalmente en la investigación de los - procesos de reparación en bacterias. Por consiguiente, la imagen que se tiene en la actualidad del cromosoma, es la de una estructura lábil que continuamente se rompe y se repara. Algunas de las rupturas son de tal dimensión o de tal naturaleza, que resultan irreparables; la acumulación de las aberraciones cromosómicas derivadas de estas rupturas puede constituir la causa del envejecimiento celular y orgánico, según la abundante evidencia experimental descrita brevemen

te en los párrafos anteriores. Las células mitóticas del organismo son probablemente tan susceptibles a la mutación como las células somáticas que no se dividen, aunque aquellas dispongan de un período reducido para la reparación durante la interfase, por lo que, en estos tejidos el proceso de selección demostrado en las poblaciones celulares en proliferación, elimina a la mayor parte de las células portadoras de aberraciones, lo que no sucede en los tejidos en los que la actividad mitótica no tiene lugar.

La evidencia aportada principalmente por las investigaciones de Failla (1960), Curtis (1958) y Szilard (1959), contenida en la literatura resumida en este reporte, constituye una hipótesis de trabajo que por sus implicaciones relativas a la biología general, merece ser investigada extensivamente.

## C A P I T U L O   I I

### MORTALIDAD Y ACORTAMIENTO DE LA VIDA MEDIA INDUCIDOS POR LA IRRADIA CION CON DOSIS SUBLETALES DE ELECTRONES ACELERADOS EN ADULTOS DE --

#### DROSOPHILA MELANOGASTER

### R E S U M E N

El soma del adulto de *Drosophila*, a excepción de los hematocitos y de algunas células del tubo digestivo es esencialmente un sistema sin multiplicación celular. Se irradiaron adultos de 14 y de 43 días de edad con las dosis de electrones de 1 Mev, de 7.32 a 43.92 kR y de 7.32 a 29.28 kR respectivamente. El acortamiento de la vida fue proporcional a la dosis, lo que puede interpretarse como la pérdida celular debida a alteraciones genéticas. Los machos - envejecieron con mayor rapidez que las hembras. La vida media aumentó en las hembras irradiadas con 7.32 y con 14.64 kR a los catorce días de edad, o con 7.32 kR a los 43 días de edad.

El porcentaje de supervivencia media, expresado como la relación entre la supervivencia media de los grupos irradiados y la supervivencia media de los testigos, no mostró diferencias signifi-

cativas entre las poblaciones irradiadas a los 14 o a los 43 días - de edad. Los resultados favorecen a la hipótesis de la "aceleración" del envejecimiento producida por la irradiación.

## I N T R O D U C C I O N

La aceleración del envejecimiento natural por exposición a la radiación ionizante, constituye uno de los aspectos de la radiobiología investigados con la mayor amplitud durante la última década. Como introducción al presente capítulo sobre la modificación de la mortalidad en adultos irradiados de *D. melanogaster*, se discuten las generalidades del problema que se ha investigado en varios tipos de organismos.

En los mamíferos, la irradiación parcial o total del cuerpo acorta el período de vida. El efecto, que es variable según el tipo de tejidos irradiado y según la dosis aplicada, comprende los siguientes aspectos: (a) daño a tejidos específicos (por ejemplo, dermatitis y cáncer de la piel); (b) inducción de una enfermedad específica (ej. leucemia); (c) producción de alteraciones más generalizadas (ej. reducción de la inmunidad, daño a los tejidos vascular y conectivo y envejecimiento prematuro).

Los animales irradiados desarrollan algunas de las enfermedades características de su especie con anterioridad a la eta-

pa de la vida en que ocurren normalmente, haciéndose aparentes las modificaciones fisiológicas e histopatológicas características del envejecimiento prematuro. El acortamiento del período de vida está condicionado por varios factores. Algunas especies muestran efectos más tempranos que otras; asimismo, es frecuente encontrar diferencias en la reducción del período de vida entre líneas de la misma especie que difieren en su constitución genética. Por otra parte, es evidente que el envejecimiento es una propiedad característica separable de los síntomas que lo caracterizan, como el cáncer y las denominadas enfermedades degenerativas cuya frecuencia aumenta con la edad cronológica y que son resultantes del envejecimiento, más bien que las causas que lo producen.

Bergonnie y Tribondeau (1906), señalaron que la radiosensibilidad de un tejido está directamente relacionado con su capacidad de proliferación. La susceptibilidad de un organismo a la radiación depende precisamente de dos de los tejidos en proliferación -- más intensa: el epitelio intestinal y el sistema hematopoyético.

Envejecimiento programado. - Los tejidos de los mamíferos siguen normalmente un programa de crecimiento. Durante la embriogénesis todos los organismos aumentan en tamaño por división celular. En la adolescencia, el crecimiento de los órganos ha cesado virtualmente, alcanzándose la proporción somática del adulto. Durante la vida adulta se requiere en general una actividad mitótica mucho menor para mantener el estado de equilibrio. Las células de los mamíferos pueden ser clasificadas en tres grupos según su capacidad mi-

tótica en los adultos (Hoffman, 1968): células con mitosis continua, células con mitosis intermitente y células no mitóticas.

Células con mitosis continua.- Las células del tracto -- gastrointestinal y las células hematopoyéticas se dividen continuamente durante toda la vida. La eritropoyesis no da signos de insuficiencia en personas longevas, aunque el volumen total de células activas de la médula roja se reducen (Henschen, 1968). En el ratón -- después de alcanzada la mitad de su período de vida, el número de células y el número de unidades que forman colonias por fémur decrece (Yuhás y Storer, 1967); además, la habilidad de las células de la médula ósea para formar colonias disminuye cuando son trasplantadas en serie a ratones irradiados (Siminovitch *et al.*, 1964). Estas observaciones sugieren una capacidad proliferativa limitada, aunque se requiere aún mucho trabajo para aclarar la cinética de la hemato poyesis durante la senectud.

Células con mitosis intermitente.- Este grupo comprende a células, tales como las hepáticas, las de los túbulos renales y las células óseas. Las células hepáticas son reemplazadas lentamente en condiciones normales, aunque después de la hepatectomía parcial tiene lugar una respuesta regenerativa. Al medir el grado de síntesis de ADN en células parenquimatosas, la regeneración es más rápida en animales jóvenes que en animales viejos (Bucher, 1967).

Células no mitóticas.- Durante la juventud o al iniciarse el estado adulto, el tejido nervioso pierde virtualmente toda capacidad mitótica. Dicha pérdida se refleja clínicamente como una re

paración incompleta posterior al daño. Es igualmente conocida la limitada reparación del músculo cardíaco y la del músculo esquelético.

Células in vitro.- La habilidad para iniciar crecimiento de explantos tisulares decrece con la edad del donador (Soukupová *et al.*, 1970), por lo que existe una reducción en función del tiempo, en el potencial de crecimiento, que es una propiedad inherente y específica de las células diferenciadas.

El daño producido por la irradiación de los sistemas vivos, incluyendo al hombre, comprende dos tipos de efectos: los efectos inmediatos agudos y los efectos retardados. La magnitud de ambos depende de la dosis; no obstante, el daño inducido aún por dosis muy pequeñas es analizable. Los efectos inmediatos incluyen el daño en varios sistemas orgánicos, como los tejidos hematopoyéticos, las gonadas y el tubo digestivo, que cuando son muy severos causan la muerte del individuo en los días o semanas posteriores a la irradiación. Los efectos retardados se caracterizan por el desarrollo del cáncer después de un período largo que puede comprender muchos años, y por la aceleración de los procesos normales de envejecimiento, que conducen a un acortamiento de la vida que no puede atribuirse a ninguna enfermedad específica. Es de interés especial, que la irradiación total del organismo, con dosis relativamente bajas, que no causan muerte prematura, aunque producen efectos inmediatos insignificantes, acortan la vida del individuo en forma apreciable.

En varios sistemas biológicos se ha demostrado la relación entre los efectos inmediatos y la pérdida de material genético

en las células individuales irradiadas, debido a las rupturas producidas en los cromosomas por la irradiación. Por otra parte, los experimentos de Oster (1958, 1959a, 1959b, 1961), de Muller (1960) y de Ostertag y Muller (1959) han demostrado que el aumento en la mortalidad del adulto de *Drosophila* cuando se irradian estados de desarrollo anteriores al imago, obedece a factores genéticos similares.

Muller (1963) señaló que la pérdida de células debida a las alteraciones genéticas producidas en etapas anteriores a la emergencia del imago, son la causa de su muerte prematura; la mayor parte de los cambios dependen de mutaciones puntuales, y de las deficiencias o de la pérdida total de cromosomas, como lo demuestran los experimentos en *Drosophila* y en *Habrobracon*. Los experimentos en los que se irradian individuos con cromosomas de diferente constitución estructural, señalan que los mecanismos efectivos principales incluyen la pérdida de cromosomas resultante de rupturas previas. Las modificaciones señaladas se perpetúan en el adulto manifestándose en una etapa posterior a su origen, al quedar contenidas en las células en interfase permanente del imago. No obstante, aunque estas modificaciones persisten hasta la muerte del adulto, en éste opera una dinámica cromosómica diferente, puesto que las rupturas cromosómicas probablemente no conducen a la pérdida de material genético. Los procesos que tienen lugar al irradiar estas células fijas (postmitóticas) deben diferir de los conocidos esquemas de daño y de reparación durante el ciclo celular normal de las células mitóticas.

En la imposibilidad experimental para el examen de los - eventos producidos por la irradiación que ocurren *de novo* en las células en interfase permanente del adulto de *Drosophila*, tampoco es posible la extrapolación de los datos escasos que se tienen sobre - la mortalidad que tiene lugar durante la interfase de células mitóticas y de algunas células postmitóticas como los linfocitos. En -- efecto, los mecanismos que conducen a la muerte celular de las células en división, son diferentes a los que producen la muerte en interfase; ambos serán mejor interpretados cuando se conozcan los procesos de reparación en las células postmitóticas irradiadas, ya que la expresión del daño depende no sólo de las lesiones iniciales, si no de la habilidad de la célula para reparar el daño (Kelly, 1961). Se debe hacer una distinción clara entre los eventos bioquímicos -- que producen una muerte retardada en las células en multiplicación y los que causan la muerte en interfase. En el primer caso, la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos continúa (Whitfield y Rixon, 1959), mientras que, la muerte inducida por irradiación en interfase es inmediata y se caracteriza por la interrupción de los -- procesos metabólicos en células que, por otra parte, difieren notablemente en su comportamiento bioquímico, tales como las células -- que normalmente no se multiplican, como los linfocitos, las células con interfase prolongada, como los ovocitos y las células en divi-- sión activa, como las espermatogonias.

En la actualidad no se tiene un esquema coherente sobre las bases bioquímicas de la mortalidad celular. Se ha analizado el

papel de la síntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas, pero se requiere una información extensiva sobre las alteraciones citológicas de las estructuras subcelulares que tienen lugar inmediatamente después de la irradiación. No se deben ignorar otros factores como las modificaciones de la permeabilidad celular (Lessler, - 1959; Brinkman y Lamberts, 1960), el mantenimiento del balance iónico (Curran *et al.*, 1960; Barber *et al.*, 1957) y la destrucción de las membranas citoplásmica y nuclear (Bacq y Alexander, 1961).

Algunos aspectos básicos de la controversia sobre las -- causas del envejecimiento al nivel celular están resueltos, mediante la investigación realizada en varios tipos de células, cuya conclusión principal implica que el único evento capaz de producir una modificación permanente en la célula, es la alteración del ADN o de la estructura cromosómica. Otros tipos de daño celular que se han - investigado son reparables. La importancia de la mutación se puede ilustrar por el efecto letal que produce la modificación de un gene que controla la síntesis de una enzima esencial para la célula; el cambio conduce evidentemente a la muerte celular.

Es bien conocido que existe una recuperación activa del daño cromosómico posterior a la irradiación con rayos X o con rayos gamma, lo que explica el efecto del fraccionamiento de la dosis sobre la duración del período de vida en el ratón y en *Drosophila*. El proceso de recuperación opera tanto en las mutaciones espontáneas - como en las inducidas, como lo postula la investigación de los procesos de reparación del daño genético en las bacterias. Los rompi--

mientos que no son reparables son los que probablemente persisten - causando el envejecimiento en los mamíferos.

Los experimentos antes citados en favor de la teoría del envejecimiento en función de las mutaciones presentan varias limitaciones. En primer lugar, no permiten la interpretación del período tan prolongado que puede transcurrir entre la producción de las alteraciones cromosómicas y su manifestación como un aumento de la -- mortalidad prematura, observable después de varios días o semanas - en *Drosophila* y entre el primero y el segundo mes posteriores a la irradiación en el ratón. Se puede asumir que las células siguen viviendo con su ARN y proteínas presentes en la célula antes del tratamiento, lo que requeriría atribuirle al ARN una vida mucho más -- larga que la que se ha demostrado experimentalmente en mamíferos. - No obstante, los experimentos en huevos de *Arbacia*, en bacterias, - en células en cultivo, etc., constituyen ejemplos de células que -- continúan su vida y se dividen durante períodos largos, después de la destrucción total o parcial de su ADN, lo que ofrece ciertas posibilidades para la interpretación de la retardación observada, aun que los mecanismos son discutibles.

La mutación letal es una de las alteraciones más probables entre la multitud de cambios que ocurren espontáneamente o entre las modificaciones inducidas por irradiación, en el material genético. Si por ejemplo, ocurre una mutación letal en la médula ósea de los mamíferos, la célula muere y es reemplazada por otra célula no dañada. Por otra parte, si dicha mutación tiene lugar en un teji

do cuyas células no se dividen, como en los tejidos cerebrales, la célula que muere no es sustituible. En la actualidad se reconoce - que la pérdida de células en tales órganos acompaña al envejecimiento constituyendo una de las causas principales de los múltiples síntomas observables característicos de la senectud.

Szilard (1959) postula a la mutación somática como la -- causa del envejecimiento celular e individual. Cuando los dos genes homólogos necesarios para una función celular son alterados, se produce la muerte celular. La hipótesis de Szilard no implica necesa-- riamente la inactivación de los dos genes homólogos, ya que los resultados obtenidos en *Drosophila* (Stern y Novitsky, 1948; Muller y Campbell, 1950; Crow y Temin, 1964) indican que las mutaciones es-- pontáneas en *Drosophila* no son, en general, completamente recesivas, sino que muestran una expresión fenotípica variable en los heterócigigos, entre la dominancia y la recesividad completas.

Por varias razones, los insectos constituyen un material biológico especialmente adecuado para el examen de la teoría de la mutación somática. En el adulto de *Drosophila* virtualmente no existe duplicación celular, a excepción de las gonadas y de los hematocitos, por lo que, algunos de los procesos importantes que pueden - intervenir en el acortamiento de la vida de los mamíferos, como la malignidad tisular y la autoinmunidad, no son relevantes en *D. melanogaster*. La mosca de la fruta constituye un sistema simple muy -- adecuado para el trabajo de laboratorio, con un período de vida lo suficientemente corto para que el trabajo sea tolerable; como es un

organismo poiquilotermo, propicia el estudio de la velocidad del envejecimiento en relación con la temperatura; su alta fecundidad proporciona poblaciones numerosas en un lapso razonablemente adecuado para propósitos experimentales, y finalmente, lo que complementa su importancia al respecto, es el conocimiento tan amplio de su genética, que posibilita la comparación entre individuos genéticamente homogéneos, que no obstante, difieren considerablemente en su contenido cromosómico, puesto que, por ejemplo, puede estar ausente una -- parte considerable del genoma en condición diploide, que es precisamente lo que establece la diferencia entre los machos y las hembras. Generalmente se trabaja con líneas mantenidas durante muchas generaciones por entrecruzamiento que tiene lugar principalmente entre individuos de la misma generación, disponiéndose de la homogeneidad genética que requieren los estudios sobre la modificación de la longevidad por el efecto de varios agentes externos.

Si se considera que la mayor parte de las investigaciones en mamíferos se refieren a células en proceso de multiplicación, se tienen dos sistemas esencialmente diversos con diferencias extremas en su radiosensibilidad en relación con los procesos de envejecimiento. Así se dispone de una diversidad excepcional para la comparación de resultados de experimentos similares, a los niveles celular e individual.

En este capítulo se describen los resultados posteriores a la irradiación, obtenidos en adultos de *D. melanogaster*, con electrones acelerados. Se aplicaron varias dosis a las edades de 14 y -

de 43 días a varios grupos de imagos, determinándose, a partir de las gráficas de supervivencia: la vida media, la supervivencia media y el porcentaje de supervivencia.

Con los datos numéricos así derivados, se intentó la interpretación cualitativa y cuantitativa en función de las dosis y de las edades en que se aplicaron, discutiéndose los componentes biológicos y genéticos que pueden intervenir en el acortamiento de la vida por exposición a dosis subletales de radiación ionizante en el adulto de *D. melanogaster*.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Se empleó la línea *y/sc*<sup>8</sup> Y, de *D. melanogaster*, mantenida durante 71 generaciones en un lapso de cinco años en el laboratorio. Los marcadores *yellow* y *scute*<sup>8</sup> facilitan la identificación del sexo, para el registro de la mortalidad. Las poblaciones fueron obtenidas aislando a adultos emergidos de la pupa durante un lapso de 10 horas, por lo que la determinación de la edad tiene un error de  $\pm 5$  horas. Los adultos se alimentaron *ad libitum* con un medio de cultivo de composición constante cuyos ingredientes principales son: harina de maíz, agar y levadura de cerveza, con adición de tegosept y de ácido propiónico para evitar contaminaciones. Debido a la esterilidad de los adultos irradiados, se favorece la contaminación del

medio de cultivo, por lo que fue necesario agregar a todos los grupos, incluyendo al medio del grupo testigo, el antibiótico penicilina (Beecham) en la concentración de 0.065 mg/ml (Félix, 1969), que alargó ligeramente la vida media de los adultos del grupo testigo, en comparación con el valor obtenido en los experimentos con adición de antioxidantes, reseñados en el siguiente capítulo. Los cultivos fueron mantenidos a la temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante el experimento. Para evitar aglomeración se aislaron únicamente 50 hembras y 50 machos en cada cultivo en frascos lecheros de 1/4 de litro. En el grupo testigo se registró la mortalidad de 600 individuos, mientras que la mortalidad de los grupos irradiados se determinó en poblaciones de 300 a 500 adultos. Considerando la importancia que tienen para los estudios de mortalidad las condiciones óptimas del medio de cultivo, se hicieron los transvases de cada población sin anestesarlas, cada 48 horas, registrándose la mortalidad al contar los adultos muertos que quedan adheridos a la superficie del medio después de cada transvase. El registro se continuó hasta la muerte del último adulto en cada cultivo.

Se utilizó el acelerador Van de Graaff del Instituto de Física de la U.N.A.M., en la Ciudad Universitaria, produciendo un haz de electrones acelerados de 1 Mev en la razón de dosis de ----- 7.3212kR/seg con una corriente de 10  $\mu\text{A}$ , aplicándose el método de Fricke para las determinaciones dosimétricas. Las poblaciones se irradiaron dentro de bolsas tubulares de polietileno iguales a las empleadas en la dosimetría, para evitar errores en la estimación de

las dosis aplicadas a cada grupo. Se irradiaron dos grupos de adultos, a los 14 días y a los 43 días de edad respectivamente, en un gradiente de dosis de 7.32 a 43.92kR en el primer grupo y de 7.32 a 29.28kR en el segundo grupo.

Con los datos de mortalidad se obtuvieron gráficas sigmoides que indican el descenso del porcentaje de supervivencia en relación con la edad (Figs. 1, 2 y 3). A partir de los mismos datos se derivó la ecuación de la recta para la misma relación mediante la transformación Probit o el logaritmo natural del porcentaje de supervivencia y el método de mínimos cuadrados (Figs. 4 y 5).

## R E S U L T A D O S

### Acortamiento del período de vida en relación con las dosis

La vida media normal de los machos y de las hembras a los 14 días de edad es de 44.55 y 43.12 días respectivamente. Las cifras correspondientes a los adultos sobrevivientes a los 43 días de edad son 53.95 y 50.53 días (Tablas I y II). Existe una relación lineal entre la dosis y la vida media posterior a la irradiación dentro del rango de 7.32 a 43.92kR del grupo irradiado a los 14 días de edad y de 7.32 a 29.28kR en el grupo irradiado a los 43 días, en el que no se incluyen los resultados producidos por dosis

mayores, debido al alto porcentaje de mortalidad inmediata (en las 48 horas siguientes a la irradiación).

Los machos envejecieron más aprisa que las hembras en ambos grupos. En el primer grupo el efecto es más notable; la mortalidad inducida en los machos por 14.64kR es comparable a la mortalidad producida en las hembras por 43.92kR (Tablas I y II, Figs. 1 a 5).

T A B L A I

Vida media en días de los adultos irradiados a los 14 días de edad.

Kilorads	Testigo	7.32	14.64	21.96	29.28	36.60	43.92
machos	44.55	47.04	40.53	36.05	35.04	32.02	29.48
hembras	43.12	47.13	45.04	42.89	42.55	40.89	39.43

T A B L A II

Vida media en días de los adultos irradiados a los 43 días de edad.

Kilorads	Testigo	7.32	14.64	21.96	29.28
machos	53.95	53.91	52.67	50.29	50.06
hembras	50.53	51.22	50.53	49.65	49.26

## Acortamiento de la vida en relación con la edad

El porcentaje de supervivencia media, que es la relación entre la supervivencia media de los individuos irradiados y la supervivencia media del grupo testigo, indica que la misma dosis produce el mismo efecto a las dos edades (machos:  $\chi^2 = 1.5103$ ,  $P > 0.50$ ; hembras:  $\chi^2 = 4.6486$ ,  $P > 0.10$ ). (Tablas III y IV, Figs. 6 y 7). La relación resulta interesante si se considera que en el grupo testigo de los grupos irradiados a los 14 días, la mortalidad acumulada de hembras hasta los 14 días de edad equivale al 3% de la población, en comparación con la mortalidad en el período comprendido entre los 37 y los 51 días de edad del mismo grupo, que es equivalente al 43% de la población. La mortalidad entre los dos períodos difiere por un factor aproximadamente igual a 14 (Tabla V). En la misma tabla se muestra la supervivencia de las hembras del grupo testigo, - del grupo irradiado a los 43 días de edad.

T A B L A III

Supervivencia media y porcentaje de supervivencia media de los adultos irradiados a los 14 días de edad

Kilorads	Testigo	7.32	14.64	21.96	29.28	36.60	43.92
machos							
s.m.	30.55	33.04	26.53	22.05	21.04	18.02	15.48
p.s.m.		108.15	86.84	72.18	68.87	58.99	50.67
hembras							
s.m.	29.12	33.13	31.04	28.89	28.55	26.89	25.43
p.s.m.		113.77	106.59	99.21	98.04	92.34	87.33

La supervivencia media, s.m., se obtiene restando a la vida media - (TABLA I) 14 días. El porcentaje de supervivencia media, p.s.m., es la relación entre la supervivencia media del grupo irradiado y la supervivencia media del grupo testigo.

T A B L A IV

Supervivencia media y porcentaje de supervivencia media de los adultos irradiados a los 43 días de edad

Kilorads	Testigo	7.32	14.64	21.96	29.28
machos					
s.m.	10.95	10.91	9.67	7.29	7.07
p.s.m.		99.63	88.31	66.58	64.57
hembras					
s.m.	7.53	8.22	7.53	6.65	6.26
p.s.m.		109.16	100.00	88.31	83.13

La supervivencia media, s.m., se obtiene restando a la vida media - (TABLA II) 43 días. El porcentaje de supervivencia media p.s.m., es la relación entre la supervivencia media del grupo irradiado y la supervivencia media del grupo testigo.

## Incremento de la vida media en relación con la dosis

En las hembras del grupo irradiado a los 14 días con las dos dosis más bajas, se tiene un porcentaje de supervivencia media igual a 113.77 y 106.59, respectivamente. En los machos del mismo grupo el porcentaje de supervivencia media es de 108.15 para la dosis de 7.32kR. Asimismo, en el grupo irradiado a los 43 días con la dosis más baja se tiene un valor de 109.16 para la supervivencia media de las hembras (Tablas III y IV).

T A B L A V

Supervivencia normal de las hembras

Edad en días	Porcentaje	Edad en días	Porcentaje
1	100.00	43	100.00
9	98.28	44	88.27
16	96.73	46	67.66
23	94.15	48	60.34
30	88.11	50	54.19
37	67.43	52	44.69
44	43.29	58	24.51
51	24.76	60	20.12
58	13.99	64	11.18
65	5.37	68	6.08
72	1.92	72	2.16
79	1.06	76	1.60
86	0.00	88	0.00

## Diferencias interespecíficas

Siguiendo el mismo diseño experimental se irradiaron --- adultos de cuatro especies de *Drosophila* en un gradiente de dosis - de 8.32 a 91.52kR, con intervalos de 8.32kR entre cada grupo (Félix y Ramírez, 1967, 1969). De la ecuación resultante de la relación en tre el Probit del porcentaje de supervivencia con la dosis, se obtu vo la dosis letal media. (Tabla VI).

T A B L A VI

Valores de la DL<sub>50</sub> en kilorads

---

<i>D. pseudoobscura</i>	33.779 + 0.855
<i>D. virilis</i>	37.725 + 1.650
<i>D. simulans</i>	39.171 + 1.179
<i>D. melanogaster</i>	40.115 + 1.449

---

Al aplicar la distribución t de Student se encontraron - diferencias significativas en el valor de la dosis letal media en-- tre las cuatro especies, a excepción de *D. melanogaster* y *D. simu-- lans*, que son dos especies muy semejantes que producen descendencia en cruza interespecíficas.

## D I S C U S I O N

Se ha sugerido que el acortamiento del período de vida posterior a la irradiación, puede interpretarse como una aceleración de los procesos que conducen al envejecimiento, o bien, como la inducción de un envejecimiento precoz. La aceleración del envejecimiento se expresaría como una disminución del período de vida dependiente de la edad en que se aplica la irradiación. El envejecimiento precoz tendría lugar si el organismo envejeciera rápidamente, en el período consecutivo a la irradiación, sin alterarse la velocidad natural del envejecimiento posterior a dicho período.

La teoría del envejecimiento acelerado está favorecido por los experimentos que demuestran una reducción proporcional en el período de vida, por la misma dosis aplicada en diferentes edades. Si la irradiación produjera un envejecimiento precoz no se podría explicar la relación anterior, ya que el acortamiento dependería únicamente de la dosis y no de la edad, a no ser que se produjera una reducción del efecto precoz en relación con la edad.

El presente experimento contribuye a la teoría de la aceleración del envejecimiento por la irradiación, ya que la disminución que es de esperarse, expresada como el porcentaje de supervivencia media, que relaciona la supervivencia media del individuo irradiado con la supervivencia media del testigo, es independiente de la edad, dentro de los límites de dosis y edad que se investiga-

ron.

Kohn y Guttman (1963) irradiaron ratones de la línea --- LAF<sub>1</sub> de varias edades, determinando el período que transcurrió antes de la muerte de los individuos tratados con diferentes dosis de rayos X.

Los resultados son diferentes a los obtenidos en los experimentos con *Drosophila*: la DL<sub>50</sub> (30) es menor en los animales jóvenes que en los animales maduros y viejos (Kohn *et al.*, 1956; Sacher, 1957; Lindop y Rotblat, 1962). Se concluye que la sensibilidad a la inducción de ciertos efectos tardíos es **mas** notable en anima les jóvenes.

Lindop y Rotblat en su reporte preliminar (1962), concluyeron que cuando el acortamiento de la vida en el ratón se considera como porcentaje de la expectativa de vida a partir del momento de la irradiación (porcentaje de supervivencia media), este porcentaje tiende a ser el mismo, para la misma dosis independientemente de la edad de la exposición. No obstante, otros autores a partir de datos de supervivencia, señalan que el animal joven es más sensible que el de mayor edad (Kallman y Kohn, 1958; Lindop y Rotblat, 1961; Upton *et al.*, 1960).

Aunque el acortamiento de la vida por exposición del organismo completo a los rayos X en roedores (Curtis y Healey, 1957; Curtis y Gebhard, 1958, 1960; Upton, 1960), ha sido explorado ampliamente, se tienen reportes muy escasos (Curtis y Healey, 1957; Curtis y Gebhard, 1960; Alexander y Connell, 1960) concernientes a

los efectos de agentes radiomiméticos sobre el período de vida. No obstante que Curtis y Gebhard (1960) reportaron que la mostaza de nitrógeno no causa acortamiento de la vida en los ratones, Alexander y Connell (1960), observaron un efecto muy notable del acortamiento de la vida por el clorambucil y por mileran, en la misma especie. Aunque estos dos compuestos son mutágenos, sería prematuro concluir que el acortamiento de la vida es debido a la acumulación de mutaciones somáticas en las células. El mileran es más efectivo que el clorambucil en las dosis empleadas en este experimento, lo que no da apoyo a la hipótesis, puesto que en condiciones comparables, el clorambucil es más mutagénico que el mileran (Fahmy y Fahmy, 1956).

Es más probable que el acortamiento de vida por los agentes químicos en roedores sea el resultado de la muerte celular durante el tratamiento. Se requiere la prueba del efecto de sustancias que sean mutagénicas y que a la vez no tengan efectos citotóxicos, para determinar si las mutaciones somáticas tienen un papel significativo en la determinación del período de supervivencia en el ratón.

El acortamiento de la vida por irradiación a la edad de 14 días es más notable en este experimento que en el de Baxter y Blair (1967), ya que estos autores no encontraron efecto de acortamiento después de la aplicación de dosis de 1 a 15kR, así como una pequeña disminución con la dosis de 25kR (Rayos X de 100 kvp en la razón de dosis de 1,400R/min) en machos de la línea Swedish-R de --

*D. melanogaster*. Como la vida media del testigo en el experimento - de Baxter y Blair es muy cercana a la vida media del testigo del -- presente experimento (43 y 44.5 días respectivamente), se puede comparar la reducción que tiene un valor igual al 6.9% (Baxter y Blair, 1967) con la reducción de 19.1% encontrada en este trabajo, producidos por dosis comparables de 25 y 22kR. Según estos datos, se produjo un efecto tres veces mayor por una dosis ligeramente menor, lo - que puede indicar diferencias considerables en la radiosensibilidad del material biológico estudiado. Asimismo, se encontraron diferen- cias significativas en la supervivencia de los machos irradiados en edad temprana comparados con el control, aplicando una dosis tan pequeña como 14.64kR.

Baxter y Tuttle (1957) obtuvieron resultados similares a los del presente trabajo, con respecto al porcentaje de superviven- cia media en adultos irradiados en edades comprendidas entre 1 y 25 días. Los datos contenidos en el presente experimento extienden el valor constante del porcentaje de supervivencia media hasta los 43 días, período que está cercano a la vida media del testigo.

Se ha sugerido (O'Brien y Wolfe, 1964), que la naturale- za de la relación entre el envejecimiento y el acortamiento de la - vida inducido por irradiación, puede ser estudiada mediante los --- efectos sobre el acortamiento de la vida dependientes de la edad en que se aplica irradiación. Los experimentos de este tipo realizados por Baxter y Tuttle (1957) demuestran un acortamiento de la vida inducido por irradiación que es constante, si se expresa como el por-

centaje de la expectativa de vida, posterior a la irradiación. Estos resultados contradicen la conclusión adelantada por Baxter y Blair (1967) a partir de otros datos, a saber, que una sola dosis de radiación mata a los imagos después de un período constante, cualquiera que sea la edad en que se aplicó la irradiación. Por otra parte, Lamb (1966) reportó datos en favor de un porcentaje constante de acortamiento de la vida en función de la edad, similar al encontrado por Baxter y Tuttle (1957). Esta contradicción en la literatura sobre los efectos de la irradiación en el acortamiento de la vida, está resuelta (a juicio del autor), por la discusión ex puesta en los párrafos precedentes.

Atlan *et al.* (1969) examinaron el efecto de la radiación gamma procedente de Cobalto-60, en machos de la línea Oregon-R de *D. melanogaster*, cuya curva de supervivencia difiere de la determinada en otros experimentos. En las poblaciones estudiadas por Atlan la mortalidad natural se inicia después de una larga meseta que se extiende hasta los 50 días de edad del adulto, en comparación con la curva sigmoide de supervivencia obtenida por otros autores. Como resultado de la mortalidad casi nula en la meseta, los adultos entre las edades de 1 a 20 días muestran la misma supervivencia que tiene un valor de 30 a 31 días, después de la aplicación de 50kR. Al iniciarse el descenso de la curva de supervivencia natural, los efectos de la irradiación son aditivos al daño acumulado por el envejecimiento. Los resultados obtenidos por Atlan son congruentes con los de este trabajo, al tomar en consideración las diferencias

en las curvas de mortalidad natural.

La constancia del valor de supervivencia media a diferentes edades, las diferencias entre la radiosensibilidad de los machos y de las hembras, así como la relación lineal entre la reducción de la vida media y la dosis, dentro de ciertos límites, están en favor de la hipótesis del envejecimiento en función del daño genético espontáneo y del daño genético inducido por irradiación.

El alargamiento del período de vida de las hembras después de la aplicación de pequeñas dosis de irradiación, se correlaciona con la esterilización correspondiente a las mismas dosis (Nothel, 1963; Wood, 1964; Sonnenblick y Gartner, 1967).

Los experimentos de Ward y Bird (1962) y de Strømnaes (1959) sobre el efecto de la irradiación en la producción de letales recesivos ligados al sexo, cuando se irradian machos de diferentes edades, indican diferencias en radiosensibilidad entre líneas de *D. melanogaster*, sugiriendo la intervención de diferentes genes que controlan la radiosensibilidad, que depende a su vez de la edad del macho en el momento de la irradiación. Dicha sensibilidad aumenta con la edad del macho tratado, encontrándose un efecto similar cuando los huevecillos se irradiaron en diferentes edades (Patterson *et al.*, 1932).

Bonnier y Luning (1950) observaron también un decrecimiento en la proporción de huevecillos que eclosionan, al aumentar el tiempo que transcurre entre la irradiación y la fertilización.

Probablemente todas las células llevan en su núcleo por

separado, los determinantes de su período de vida, aunque no está bien definido si la muerte del organismo es resultante de las muertes aisladas de un número crítico de ciertos tipos de células, o bien, del deterioro de todas o de muchas células hasta un nivel en el que no pueden llevar a cabo las acciones integradas necesarias para que prosiga la vida del organismo. Por otra parte, es claro que la dependencia entre la edad en que mueren los individuos de *Drosophila* y la edad en que tuvo lugar la exposición a la radiación ionizante, afirma que el daño resultante del tratamiento acelera el proceso de envejecimiento. Por consiguiente, el daño inducido en la célula incrementa la velocidad normal del envejecimiento, acelerando el fracaso de los procesos involucrados en la actividad integral.

No se puede proponer ninguna explicación que no sea genética sobre el resultado esperado en el acortamiento de la vida de las hembras comparado con el acortamiento de vida de los machos por la misma dosis; en estos, la expectativa de vida es acortada en grado mayor que en las hembras. La haploidía de una quinta parte del genoma del macho es congruente con esta relación, si se considera que la probabilidad de expresión de los genes letales recesivos o detrimentales es mayor en los machos que en las hembras.

Se han presentado argumentos para apoyar a la hipótesis de que el envejecimiento espontáneo, como parte del desarrollo normal, se debe, cuando menos en parte, a alteraciones genéticas en células somáticas. Dichos razonamientos concuerdan con la dependencia entre el envejecimiento y la ploidía. Los cambios genéticos son en

su mayor parte recesivos y dependientes de mutaciones puntuales, de deficiencias o pérdida de cromosomas, según lo demuestran los resultados obtenidos en *Drosophila*, *Habrobracon* y en materiales vegetales, al comparar los efectos de la irradiación en individuos de diferente ploidía.

Cuando una especie diploide de un organismo multicelular ha sido expuesto a irradiación del cuerpo entero, es difícil determinar en qué grado está involucrado el daño genético. Aunque algunas de las células somáticas pueden mostrar rupturas cromosómicas y distribución anormal de material cromosómico durante la división, puede existir compensación por las células no dañadas. Por otra parte, en las células más especializadas que ya no se dividen y que son, en general, más resistentes a la radiación, no se puede demostrar el daño cromosómico.

Una aproximación al estudio del daño genético y no genético en células somáticas *in vivo*, consiste en comparar la sensibilidad a la radiación de aquellas especies en las que existe una diferencia en el número de juegos de cromosomas. Se ha desarrollado este tipo de investigación en cereales diploides y poliploides ---- (Froier *et al.*, 1941), en levaduras haploides y diploides (Tobias, 1952) y en individuos haploides y diploides de la avispa *Habrobracon juglandis* (Clark *et al.*, 1950; Clark, 1957). Estos estudios han demostrado una diferencia en la sensibilidad a la radiación entre organismos que difieren en su número de juegos de cromosomas. Por ejemplo, en *Habrobracon*, las pupas diploides de machos y hembras --

tienen la misma sensibilidad a la radiación, pero ambas son más resistentes que las pupas de machos haploides (Clark y Rubin, 1961).

Las dosis de irradiación empleadas fueron tan pequeñas - que no afectaron el desarrollo de las pupas, que se transformaron - en adultos estructuralmente normales. No obstante, dichos adultos - mostraron un decrecimiento en su período de vida. Este parámetro, - por lo tanto, constituye una prueba muy sensitiva para observar el daño resultante de la exposición a los rayos X. Los experimentos en los que se irradian organismos durante su desarrollo, no deben concluir con el examen del aspecto de los adultos, puesto que se puede obtener información útil al continuar las observaciones hasta la -- muerte del organismo, ya que es posible que, aunque no se observen anomalías estructurales externas, el decrecimiento en el período de vida indique la inducción de un daño fisiológico controlado - genéticamente.

La duración más prolongada de la vida de los machos di-- ploidés comparados con la de los machos haploides de *Habrobracon* -- después de la irradiación del estado adulto, indica el daño genético producido en las células postmitóticas, ya que en los adultos de los insectos la división de células somáticas no tiene lugar. Por - consiguiente, la mutación génica y la ruptura cromosómica en las cé lulas somáticas, pueden ser eventos causativos de una disminución - en la habilidad funcional a partir del nivel celular. En este caso no están involucradas la distribución anormal de cromosomas ni la - pérdida subsecuente de material genético, sino la disminución de la eficiencia del material genético en las células especializadas.

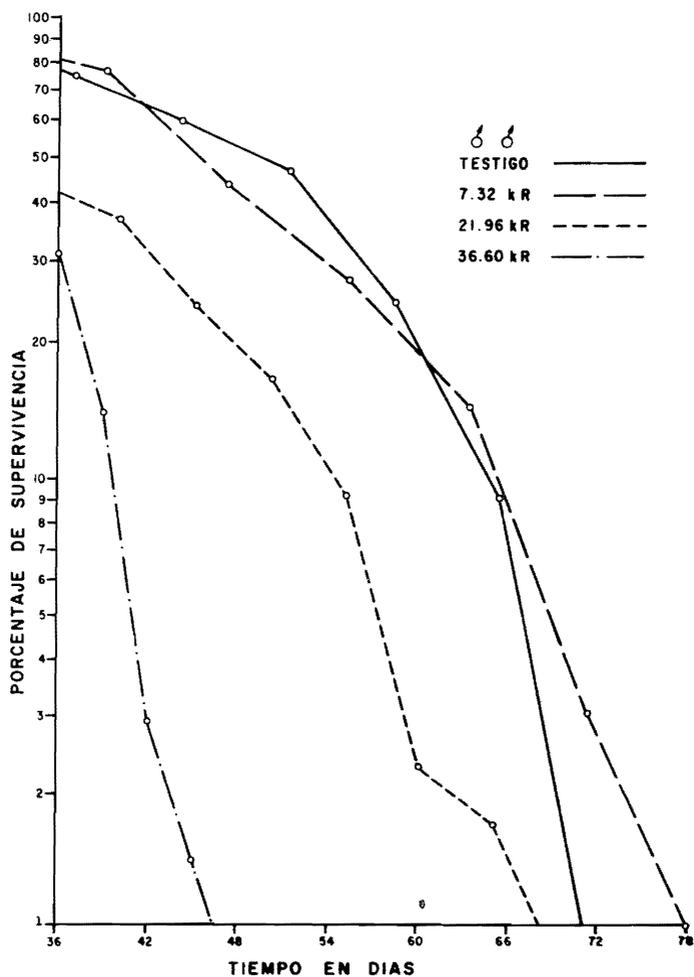


Fig. 1. Mortalidad de machos de Drosophila melanogaster de la línea y/sc<sup>8</sup>Y. Efecto de la irradiación con electrones de 1 Mev a los 14 días de edad.

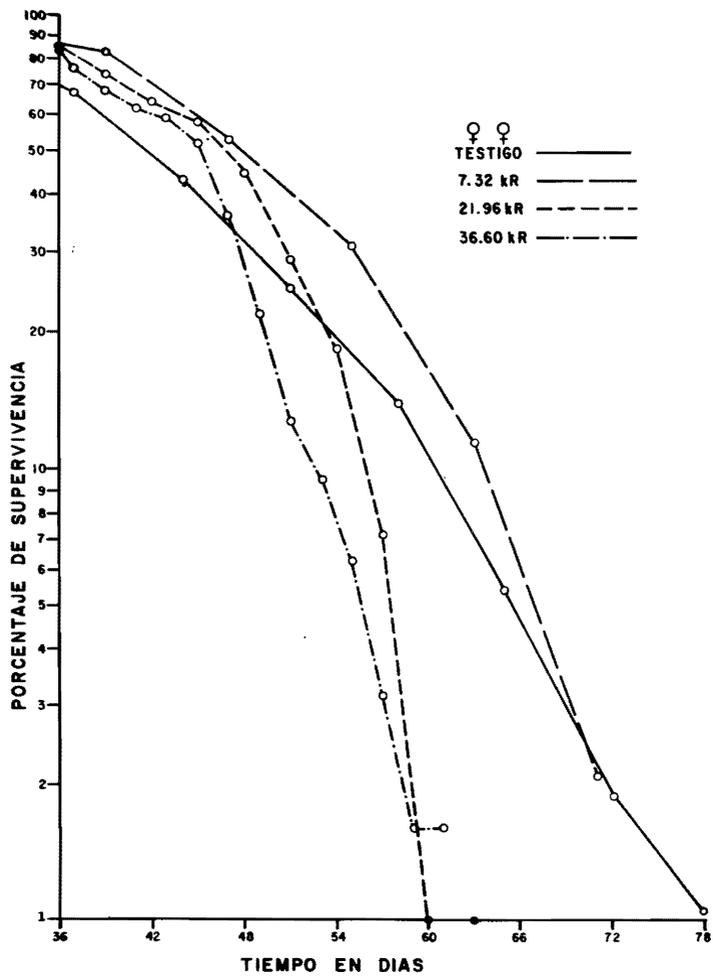


Fig. 2. Mortalidad de hembras de Drosophila melanogaster de la línea y/sc<sup>8</sup>Y. Efecto de la irradiación con electrones de 1 Mev a los 14 días de edad.

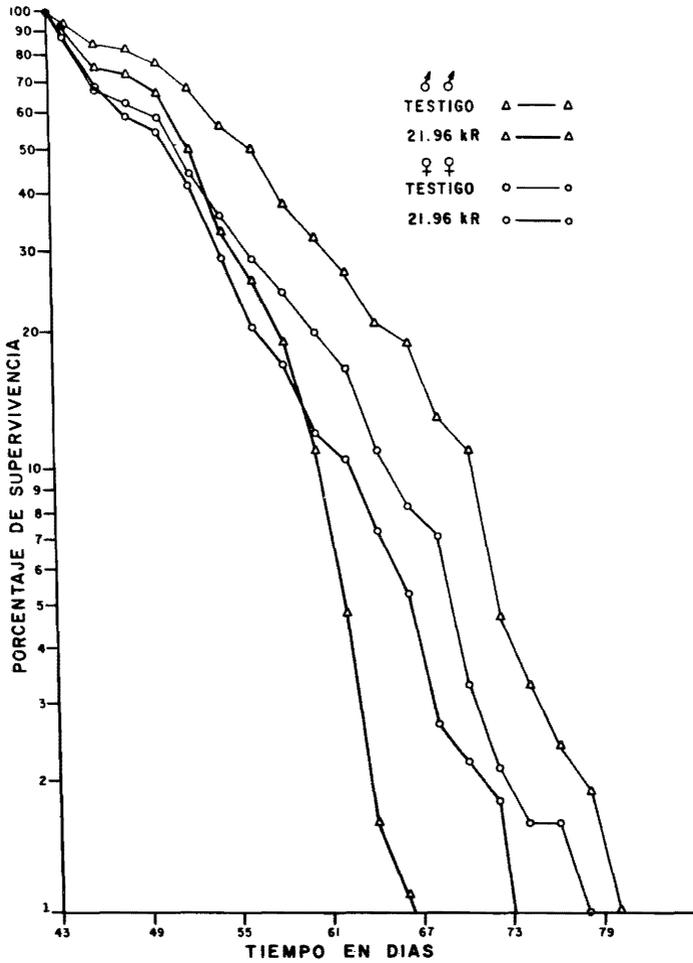


Fig. 3. Mortalidad de machos y de hembras de Drosophila melanogaster ( $\gamma/sc^{8}Y$ ). Efecto de la irradiación con electrones 1 Mev a los 43 días de edad.

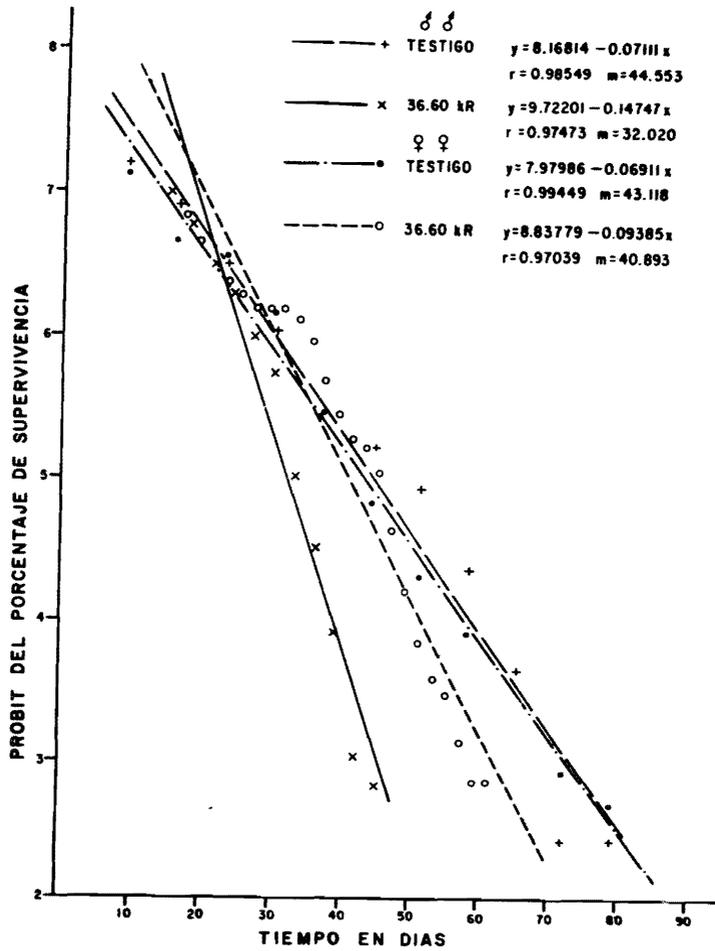


Fig. 4. Transformación Probit de la curva de mortalidad de machos y de hembras de Drosophila melanogaster ---- (y/sc<sup>8</sup>Y) irradiados a los 14 días de edad con electrones de 1 MeV.

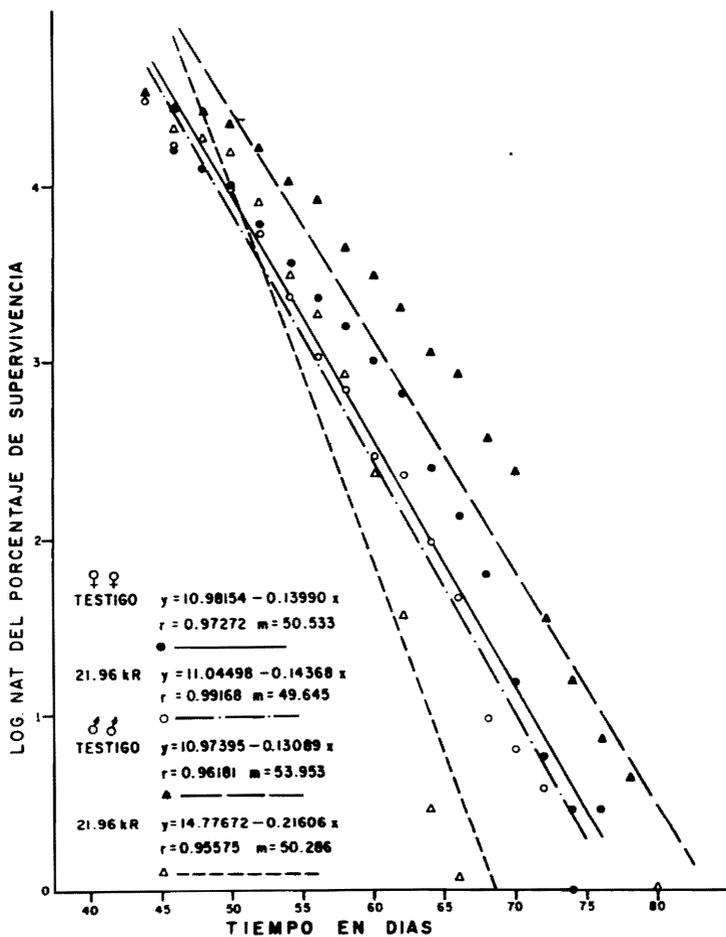


Fig. 5. Logaritmo natural del porcentaje de supervivencia de machos y de hembras de Drosophila melanogaster ( $y/sc^B Y$ ), - irradiados a los 43 días de edad con electrones de 1 Mev, en relación con el tiempo transcurrido después del tratamiento.

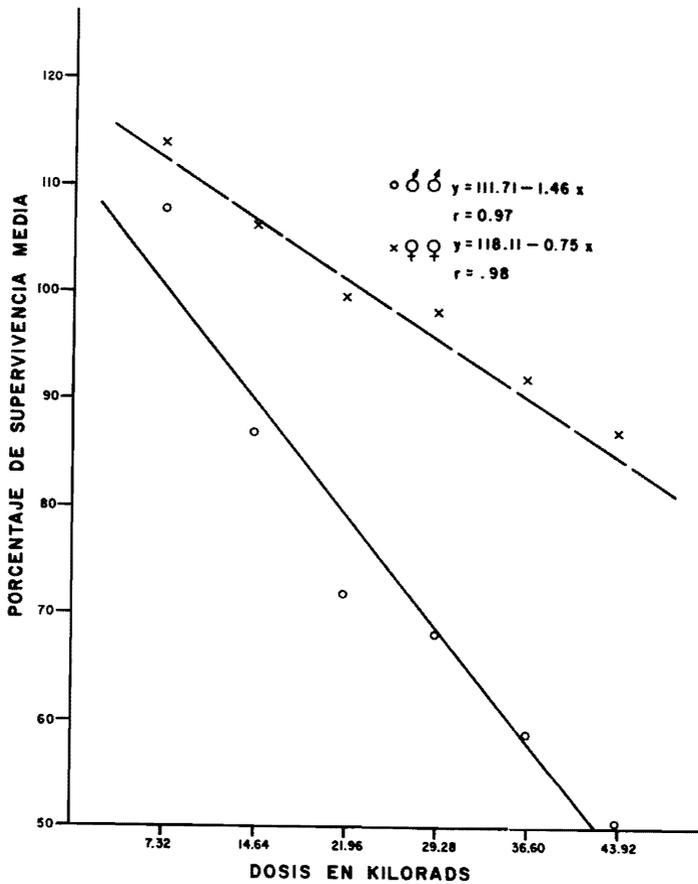


Fig. 6. Porcentaje de supervivencia media (supervivencia media posterior a la irradiación/supervivencia media del testigo) de machos y de hembras de Drosophila melanogaster (y/sc<sup>8</sup>Y) en función de las dosis aplicadas a los 14 días de edad.

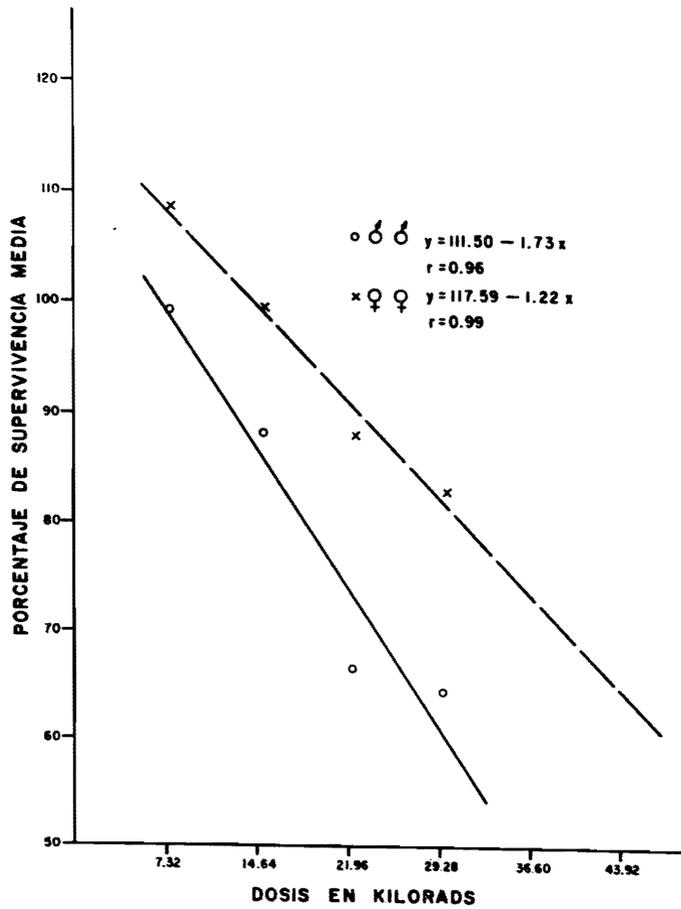


Fig. 7. Porcentaje de supervivencia media (supervivencia media posterior a la irradiación/supervivencia media del testigo) de machos y de hembras de Drosophila melanogaster (y/sc<sup>8</sup>Y) en función de las dosis aplicadas a los 43 días de edad.

### C A P I T U L O   I I I

#### EFFECTO DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES; HIDROXITOLUENO BUTILADO, HI DROXIANISOL BUTILADO Y GALATO DE PROPILO SOBRE LA VIDA MEDIA DE *DRO*

SOPHILA MELANOGASTER

#### R E S U M E N

Los radicales libres, que se originan espontáneamente -- acumulándose en función del tiempo en los sistemas vivientes, pueden originar daño en las estructuras biológicas, en proporción a su propia concentración. La acumulación espontánea de los radicales li bres, procedentes de los procesos de autooxidación en grasas orgánica s, aceites y otros compuestos que se oxidan con facilidad, son -- ejemplos conocidos de la acumulación de radicales. Es de esperarse que dichos radicales originados en reacciones enzimáticas, produz-- can múltiples efectos dañinos en los sistemas biológicos.

Harman (1968) ha demostrado que el hidroxitolueno butilado alarga significativamente la vida media de los ratones de la línea LAF<sub>1</sub>, cuando se agrega diariamente a la dieta de los mismos. Tales datos favorecen a la hipótesis de que las reacciones de los ra--

dicales libres de origen endógeno contribuyen significativamente al envejecimiento.

En el presente estudio se demuestra que los compuestos - antioxidantes: hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado y el galato de propilo, tienen un efecto sobre el alargamiento de la vida media de *Drosophila*, similar al observado en ratones. El efecto fue más notable en los machos que en las hembras, lo que sugiere -- una protección contra el daño genético permanente inducido por los radicales libres en células postmitóticas.

## I N T R O D U C C I O N

Los procesos de envejecimiento, caracterizados por su -- universalidad en las poblaciones de la misma especie y por su iniciación y aceleración que tienen lugar durante etapas determinadas de la vida, son además, progresivos y no reversibles en condiciones naturales. La definición incluye un gran número de modificaciones - orgánicas que satisfacen a dicho criterio. Es de esperarse que exis -- t<sub>an</sub> mecanismos básicos similares de envejecimiento entre especies - emparentadas y aún entre grupos filogenéticos distantes, con patrones metabólicos y de desarrollo diversos.

Las dosis aún pequeñas de irradiación ionizante superiores a cierto límite, aceleran algunos de los procesos de envejeci--

miento, por lo que se busca una interpretación a los fenómenos cuya influencia sobre el envejecimiento esté demostrada en los organismos irradiados, e intentar la descripción de cualquier aspecto relacionado con la senectud, que a su vez sea acelerado por la irradiación.

Varios autores han sugerido que las consecuencias del envejecimiento se deben a la pérdida o inactivación espontánea de las células en función del tiempo (Handler, 1961). Esta noción es promovida por los notables progresos de la biología molecular, que relacionan a la muerte celular con las alteraciones en los sistemas de codificación y de la síntesis de las proteínas. Otras hipótesis no implican necesariamente la pérdida celular en el organismo que envejece, sino el daño inducido en las mismas, por el evento principal que se considera como responsable del daño citado, que es la mutación somática (Curtis, 1963; Curtis y Crowley, 1963). El valor de estas hipótesis depende de la medida en que se extiende su demostración experimental, por lo que la resolución del problema requiere del desarrollo futuro de líneas de investigación en organismos diversos, anticipándose que no parece remoto el hallazgo de procesos similares causantes tanto del envejecimiento, como de los efectos de la irradiación en sistemas biológicos diferentes.

El esquema de los mecanismos implicados en el daño inducido por irradiación al nivel molecular es evidentemente incompleto, sin embargo, se asume que dicho daño es debido en su mayor parte a la formación y a las reacciones secundarias consecutivas de los ra-

dicales libres, que son los intermediarios entre los productos de vida corta, a saber los iones y las moléculas excitadas, y los productos radioquímicos finales. Los radicales libres tienen una gran reactividad porque contienen un electrón impar, por lo que es evidente la probabilidad de modificación de la estructura química de las moléculas normales, al interactuar con dichos radicales.

La irradiación de los mamíferos puede producir mutaciones, cáncer y envejecimiento prematuro (Hempelmann y Hoffman, 1953; Upton, 1957). Como estos procesos tienen un origen espontáneo en la naturaleza, se investiga si los eventos originales son similares.

El mayor efecto biológico producido por la irradiación tiene su origen en la disociación del agua, con la consecuente formación de los radicales libres de gran actividad química  $\text{HO}\cdot$  y  $\text{HO}_2\cdot$ , que también se originan espontáneamente en los organismos, en condiciones normales. En efecto, los estudios in vivo sobre la resonancia paramagnética del electrón han demostrado la presencia de los radicales libres en los sistemas vivientes (Commoner *et al.*, 1954, 1957; Ingram, 1958), cuya concentración aumenta con la actividad metabólica debido a su producción en las reacciones biológicas de oxidación y de reducción (Michealis, 1951; Waters, 1946). Como las reacciones en las que intervienen los radicales libres no son específicas, se anticipa que pueden producir efectos laterales al reaccionar con los componentes celulares.

Otra evidencia en favor de que los radicales  $\text{HO}\cdot$  y  $\text{HO}_2\cdot$  se producen en la célula, procede del estudio de animales con defi-

ciencia de la vitamina E, donde las mitocondrias y los microsomas - contienen productos de la peroxidación de lípidos (Zalkin y Tapel, 1960; Pritchard y Singh, 1960), proceso en el que interviene probablemente el radical  $\text{HO}^\cdot$ . La fragmentación de dichos productos da origen a su vez a radicales libres activos incluyendo al  $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$  y  $\text{RO}_2^\cdot$ , que se acumulan en cantidades potencialmente significativas desde el punto de vista biológico. Otras investigaciones sugieren la producción de radicales libres dentro de la célula durante la acción de la xantina oxidasa, varios sistemas de deshidrogenasas (Commoner *et al.*, 1957), y de la peroxidasa (Yamazaki *et al.*, 1960). De esta y de otras evidencias experimentales se deduce el origen espontáneo de los radicales libres de la naturaleza del  $\text{HO}^\cdot$  y  $\text{HO}_2^\cdot$  durante el metabolismo normal. Por consiguiente, es posible que una parte de los procesos causativos de la mutación espontánea, del cáncer y del envejecimiento sean similares a los inducidos por irradiación, originándose en el primer caso los radicales  $\text{HO}^\cdot$  y  $\text{HO}_2^\cdot$  en los procesos metabólicos, y en el segundo caso en la disociación del agua (Harman, 1962).

Los radicales libres deben reaccionar, hasta cierto punto con otros constituyentes celulares, incluyendo a los ácidos nucleicos, cuyas modificaciones son especialmente significativas en relación con el envejecimiento. Los radicales orgánicos que tienen origen en el ADN por la pérdida de un átomo de hidrógeno, dañan lugar a otras reacciones como la adición de oxígeno con formación de peróxidos y compuestos oxigenados, degradación en unidades más

pequeñas y dimerización, tal como se ha demostrado en sistemas sencillos de polímeros y radicales libres (D'Alelio, 1952; Tappel, --- 1955).

El curso de eventos a partir de la absorción inicial de la energía de la radiación y su manifestación final en forma de daño genético, ya sea ruptura de cromosomas o inducción de mutaciones es una larga cadena que puede ser modificada por varios factores ambiales. El daño inicial por exposición a radiación ionizante dispersa, como los rayos X y los rayos gamma, es modificado en varios grados, por factores como el contenido de humedad, proporción de -- oxígeno, temperatura y otras condiciones (Konsak *et al.*, 1961). La detección de radicales libres con vida relativamente larga ha proporcionado una nueva orientación al estudio y al entendimiento de -- los mecanismos del daño inducido por irradiación. La naturaleza, -- producción, vida y forma de decaimiento de los radicales tiene re--percusión sobre la amplitud del daño resultante de la exposición a la radiación (Zimmer *et al.*, 1957; Ehrenberg y Ehrenberg, 1958; Conger y Randolph, 1959; Kirby-Smith y Randolph, 1960; Randolph y Ha--ber, 1961; Ehrenberg, 1961). Los radicales libres producidos por radaciones ionizantes interactúan con el oxígeno para formar radicales peroxilos altamente reactivos, los que, al aumentar el número -- de radicales libres, producen daño biológico ulterior. Al decaer, -- ya sea por interacción entre radical y radical, o por interacción -- con compuestos sulfhidrilos, causan un daño menor.

La relación entre los radicales libres y los efectos bio

lógicos, ha sido demostrada por la adición de compuestos que capturan radicales como el óxido nítrico (Sparman *et al.*, 1959) y por aplicación de métodos para la detección de la resonancia del spin del electrón (Ehrenberg y Ehrenberg, 1958; Conger y Randolph, 1959; Conger, 1961).

La intervención biológicamente significativa de los radicales se debe a que generalmente intervienen en procesos en cadena, puesto que por su reactividad extrema, existen únicamente en concentraciones muy reducidas. Solamente en los procesos en cadena en las que intervienen repetidamente especies químicas portadoras, se obtienen productos finales en cantidades significativas. No obstante, se debe señalar cierta reserva con respecto a este principio general: en los sistemas vivientes, la amplificación biológica puede hacer importantes a reacciones raras que no se realizan en cadena. -- Por ejemplo, los rayos cósmicos u otras fuentes externas, y los elementos radiactivos en el organismo humano, lo sujetan a una razón de dosis igual a 0.1 rad por año. Esta razón de dosis tan pequeña produce alrededor de  $10^{-7}$  moles de radicales libres por cuerpo humano, por año. Claramente, esta es una cantidad extraordinariamente pequeña de radicales iniciadores, que son en parte responsables del nivel tan bajo de mutaciones naturales.

La amplificación biológica es de importancia primordial, dada la enorme sensibilidad de la célula a las modificaciones en su aparato hereditario, constituido por ADN. Debido a la sensibilidad tan notable del ADN, la alteración por radiación de únicamente una

molécula entre  $10^6$  a  $10^7$  moléculas en la célula puede ser letal para la misma.

Las alteraciones en el ADN en las células de un organismo multicelular, influyen individualmente sobre su habilidad funcional y colectivamente sobre las interrelaciones armónicas necesarias para la supervivencia de los conjuntos celulares y del individuo. Como ejemplo, las alteraciones en las propiedades de los tejidos conectivos recientemente formados, (Boucek *et al.*, 1958) pueden resultar de las mutaciones acumuladas en función del tiempo en las células que dan origen a los fibroblastos. Ya que las células del organismo dependen del tejido conectivo, los cambios que ocurren en el mismo, debido a las mutaciones en las células responsables de su mantenimiento, deben manifestar efectos nocivos en el organismo. En el caso de las células de vida larga como las del músculo esquelético y las del sistema nervioso, las alteraciones acumuladas en el ADN se traducen en un deterioro gradual de su habilidad funcional.

Los radicales libres producidos en el agua tienen gran reactividad e interactúan con una gran variedad de moléculas. Si se agregan otras sustancias a la solución, competirán en la captura de dichos radicales con las moléculas presentes, por ejemplo, con las enzimas, reduciendo la inactivación de las mismas. Esta protección fue descubierta por Dale (1952) quien encontró que algunas sustancias, principalmente los compuestos que contienen SH, protegen a las soluciones diluídas de enzimas.

En las reacciones de radicales libres con intervención -

del oxígeno molecular se manifiesta una acción inhibitoria por adición de sustancias antioxidantes, como el hidroxitolueno butilado (BHT) que captura a los radicales libres intermediarios. Ya que la efectividad de los compuestos como el BHT es independiente en su mayor parte de la composición química de los radicales  $R^{\cdot}$  o  $RO_2^{\cdot}$ , estos compuestos deben reducir extensivamente los efectos deletéreos originados en las reacciones con radicales libres en un organismo, cuando están involucrados compuestos como ácidos nucleicos, mucopolisacáridos, lípidos o proteínas.

Harman (1962, 1968, 1969) y Harman *et al.* (1966) demostraron la acción protectora de varias sustancias antioxidantes inhibitorias de las reacciones con radicales libres, cuyo efecto se manifiesta en un alargamiento de la vida, cuando dichas sustancias se agregan al alimento normal de ratones machos. La vida media del ratón aumentó en la proporción del 45% cuando se añadió BHT en la proporción de 0.50% en peso a la dieta semisintética de los machos de la línea LAF<sub>1</sub> (Harman, 1968).

Dada la universalidad de algunos de los aspectos metabólicos mencionados, modificables por la intervención de radicales libres, en el presente experimento se investigó el efecto de tres compuestos antioxidantes similares en su estructura química sobre la vida media de *D. melanogaster*.

El hidroxitolueno butilado, 2,6 di-terbutilo p-cresol -- (BHT); el hidroxianisol butilado, mezcla de 2 terbutilo-4-metoxifenol y 3 terbutilo-4-metoxifenol (BHA), y el galato de propilo, éster

propílico del ácido gálico (GP), son tres compuestos antioxidantes fenólicos, cuyos efectos sobre la duración de la vida de *D. melanogaster* se describen a continuación.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Se empleó la línea  $y/sc^8Y$ , mantenida durante 75 generaciones en un lapso de cinco años en el laboratorio. El fenotipo de los machos y de las hembras facilita el llevar por separado el registro de la mortalidad, ya que las hembras son de color amarillo, contrastando con los machos de color pardo, por el alelomorfo normal de yellow que llevan en el fragmento  $sc^8$  del cosoma X adherido al cromosoma Y. Las poblaciones fueron obtenidas mediante el aislamiento de adultos emergidos de la pupa, dentro de un lapso de 10 horas posterior a la eclosión, por lo que la determinación de la edad tiene un error de  $\pm 5$  horas. Los cultivos se mantuvieron a la temperatura de  $25 \pm 1^\circ C$  durante todo el experimento. Dada la influencia que tiene la composición del alimento sobre la vida media de *Drosophila*, así como las condiciones asépticas (Strehler, 1962; Lamb, 1966), se señala a continuación la proporción en porcentaje de los constituyentes empleados en la elaboración del medio de cultivo para el experimento: agua bidestilada (85.47), agar en fibra (1.10), harina de maíz (5.16), sacarosa (2.90), dextrosa (2.07), le

vadura de cerveza en polvo (2.48), ácido propiónico (0.41), tegosépt disuelto al 12.5% en alcohol etílico (0.41). Los antioxidantes se disolvieron en alcohol etílico en una proporción que no afecta a la viabilidad de los adultos de *Drosophila*, agregándolos durante la etapa de agitación del medio, para su homogenización a una temperatura menor a 40°C.

La aglomeración de los adultos en los cultivos es otro factor que debe considerarse (Strehler, 1962) por su influencia sobre la mortalidad, por lo que se aislaron únicamente 50 hembras y 50 machos en cada cultivo, en frascos lecheros de 1/4 de litro. El registro del efecto de los antioxidantes empleados, sobre la mortalidad de los imagos se hizo a partir de 6 cultivos para cada concentración, registrándose, por consiguiente, la duración de la vida de 600 individuos en cada grupo. Con el propósito de mantener condiciones óptimas en los cultivos, se hicieron transvases de adultos sin anestésarlos, a nuevos cultivos cada 48 horas, registrándose la mortalidad al contar los muertos que quedan adheridos a la superficie del medio, después del transvase. El registro de mortalidad se continuó hasta la muerte del último imago en todos los cultivos.

Después de la prueba de toxicidad previa al experimento, se añadieron los antioxidantes al medio de cultivo en las siguientes concentraciones en peso: hidroxitolueno butilado (0.100, 0.010 y 0.001%), hidroxianisol butilado (0.100, 0.010 y 0.001%), galato de propilo (1.000, 0.100 y 0.010%). Los antioxidantes se agregaron al medio de cultivo durante la duración total del estado adulto.

Con los datos de mortalidad, se obtuvieron gráficas sigmoides que indican el descenso del porcentaje de supervivencia en relación con la edad (Figs. 8 y 9). Se emplearon escalas semilogarítmicas, con el propósito de ilustrar claramente el efecto de la edad sobre la mortalidad cerca de la terminación del período de vida. Con los mismos datos, y mediante la transformación Probit y el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta para la relación: Probit del porcentaje de supervivencia/tiempo en días (Figs. 10 y 11).

## RESULTADOS

La vida media normal de machos y hembras es de 40.42 y 41.36 días respectivamente. En la Tabla VII están contenidos los datos sobre la vida media de cada grupo tratado, así como el porcentaje de supervivencia obtenido de la relación entre la vida media del grupo tratado y la vida media del grupo testigo.

T A B L A      V I I

Efecto de los compuestos antioxidantes: hidroxitolueno butilado --- (B.H.T), hidroxianisol butilado (B.H.A) y galato de propilo (G.P), -añadidos al medio de cultivo durante el estado adulto, sobre la vida media de los imagos de *Drosophila melanogaster* (y/sc<sup>8y</sup>).

compuesto	% conc.	m a c h o s		h e m b r a s	
		v.m.en d.	p.de s.	v.m.en d.	p.de s.
testigo		40.42		41.36	
B.H.T.	0.100	44.55	110.22	43.12	104.22
B.H.T.	0.010	46.97	116.20	43.33	104.76
B.H.T.	0.001	52.12	128.95	47.42	114.65
B.H.A.	0.100	30.06	74.36	34.63	83.73
B.H.A.	0.010	41.13	101.76	43.01	103.99
B.H.A.	0.001	45.18	111.78	41.08	99.32
G.P.	1.000	37.44	92.63	28.46	68.81
G.P.	0.100	42.64	105.49	40.74	98.50
G.P.	0.010	44.60	110.34	37.85	91.51

La vida media en días (v.m. en d.), comprende el período que transcurre entre la emergencia de los imagos y la muerte del 50% de la población. El porcentaje de supervivencia (p. de s.), se obtiene dividiendo la vida media del grupo tratado entre la vida media del grupo testigo. (% conc.), porcentaje de concentración en peso.

De los datos contenidos en la Tabla VII se deduce que el compuesto que resultó más efectivo para producir un alargamiento de la vida media fue el B.H.T., a la concentración de 0.001%. El porcentaje de supervivencia es mayor a 100 en las tres concentraciones empleadas en los dos sexos. El B.H.A. produjo un efecto menos notable, mientras que el G.P. solamente alargó el período de vida media de los machos alimentados con las dos concentraciones menores de este compuesto.

Los machos mostraron mayor sensibilidad que las hembras al compuesto B.H.T. en las tres concentraciones empleadas. El mayor porcentaje de supervivencia en todo el experimento es el de los machos que se alimentaron con B.H.T. a la concentración de 0.001%, -- produciéndose un alargamiento de la vida media equivalente al 28.95% de la vida media del testigo.

La vida media de los machos aumentó en 7 de los 9 grupos, mientras que, la vida media de las hembras aumentó únicamente en 4 de los 9 grupos tratados con los compuestos antioxidantes.

Al hacer la comparación entre 11 de los puntos sobre las curvas de supervivencia del grupo testigo con los correspondientes de los grupos tratados, se encontraron diferencias significativas - mediante la distribución de  $\chi^2$  en los machos de los grupos: G.P. a la concentración de 0.100% ( $\chi^2 = 132.592$ ,  $P < 0.001$ ), G.P. a la concentración de 0.010% ( $\chi^2 = 80.316$ ,  $P < 0.001$ ), B.H.T. a la concentración de 0.010% ( $\chi^2 = 93.285$ ,  $P < 0.001$ ), B.H.T. a la concentración de 0.001% ( $\chi^2 = 178.975$ ,  $P < 0.001$ ), y B.H.A. a la concentración de 0.001% ( $\chi^2 = 199.068$ ,  $P < 0.001$ ). En las poblaciones de hembras no se encontró ninguna diferencia significativa al aplicar la distribución de  $\chi^2$ , al nivel de significación de 0.05.

## D I S C U S I O N

Los compuestos antioxidantes del tipo fenólico como el hi

droxitolueno butilado producen un alargamiento de la vida media en *D. melanogaster*, según los resultados del presente experimento.

Harman *et al.* (1966) y Harman (1968) demostraron un efecto más notable al agregar B.H.T. en varias concentraciones a la dieta semisintética en ratones de la línea LAF<sub>1</sub>. Las diferencias entre los resultados obtenidos, se deben probablemente al diverso grado de toxicidad que tiene dicho compuesto en las dos especies, ya que la concentración menor (0.001%) es la que produjo un efecto mayor en los machos adultos de *D. melanogaster*.

El daño genético inducido por la irradiación se debe --- principalmente a la formación y reacciones de los radicales libres a partir de las moléculas del agua. Como la radiación ionizante acelera los procesos que conducen al envejecimiento, se postula el significado de los radicales libres de origen endógeno sobre las células del organismo.

Los compuestos antioxidantes con estructura química similar al B.H.T. tienen una acción inhibitoria en las reacciones de radicales libres con intervención del oxígeno. La efectividad de es--tos compuestos es independiente en su mayor parte de la composición de los radicales R' ó RO<sub>2</sub><sup>•</sup>, por lo que protegen a varios tipos de moléculas. Se pretende relacionar dicha propiedad protectora con -- los efectos dañinos que pueden tener los radicales libres que son - producidos espontáneamente en los sistemas vivientes. Si el enveje--cimiento involucra procesos resultantes del ataque de los radicales libres a los componentes celulares, principalmente al ADN, la acción

protectora al nivel molecular mediante la captura de dichos radicales puede manifestarse como una disminución en la velocidad característica del envejecimiento al nivel individual, y por consiguiente, en un alargamiento de la vida.

La diferencia en la radiosensibilidad entre los machos y las hembras de *D. melanogaster* está relacionada con la haploidía -- del cromosoma X en los machos, dada la proporción considerable de -- la totalidad del genoma contenido en dicho cromosoma. Asimismo, el daño genético producido por los radicales libres de origen endocelular tiene mayor expresión en los machos, en los que los compuestos antioxidantes descritos muestran un efecto protector mayor sobre -- los procesos celulares de degradación, acelerados por los radicales libres. Si el envejecimiento natural está incluido en tal esquema, -- la teoría del alargamiento de la vida en función de la captura de -- radicales libres mediante los compuestos antioxidantes introducidos con la alimentación al organismo, es congruente con los resultados del presente experimento.

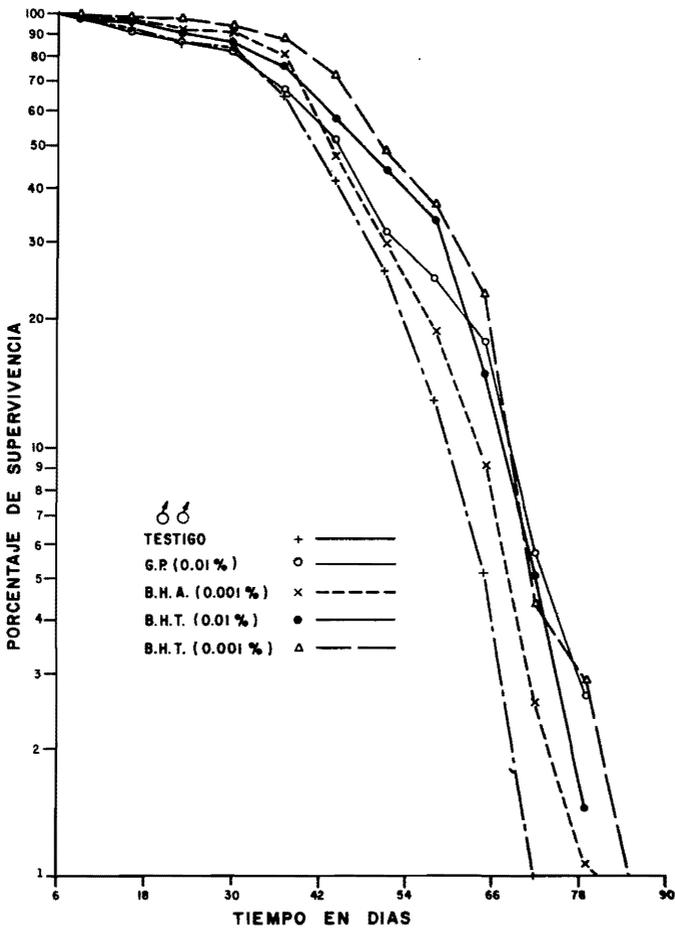


Fig. 8. Mortalidad de machos de *Drosophila melanogaster* de la línea y/sc<sup>8</sup>Y. Efecto del galato de propilo (G.P.), del hidroxianisol butilado (B.H.A.) y del hidroxitolueno butilado (B.H.T.), agregados al medio de cultivo durante el estado adulto.

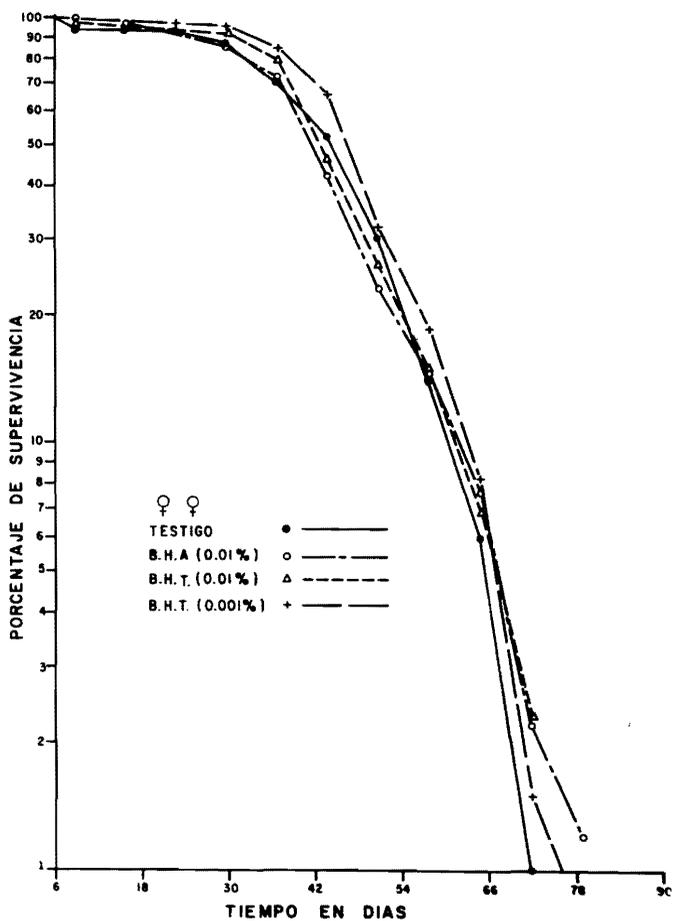


Fig. 9. Mortalidad de hembras de *Drosophila melanogaster* de la línea  $y/sc^{B}Y$ . Efecto del hidroxianisol butilado (B.H.A.) y del hidroxitolueno butilado (B.H.T.), agregados al medio de cultivo durante el estado adulto.

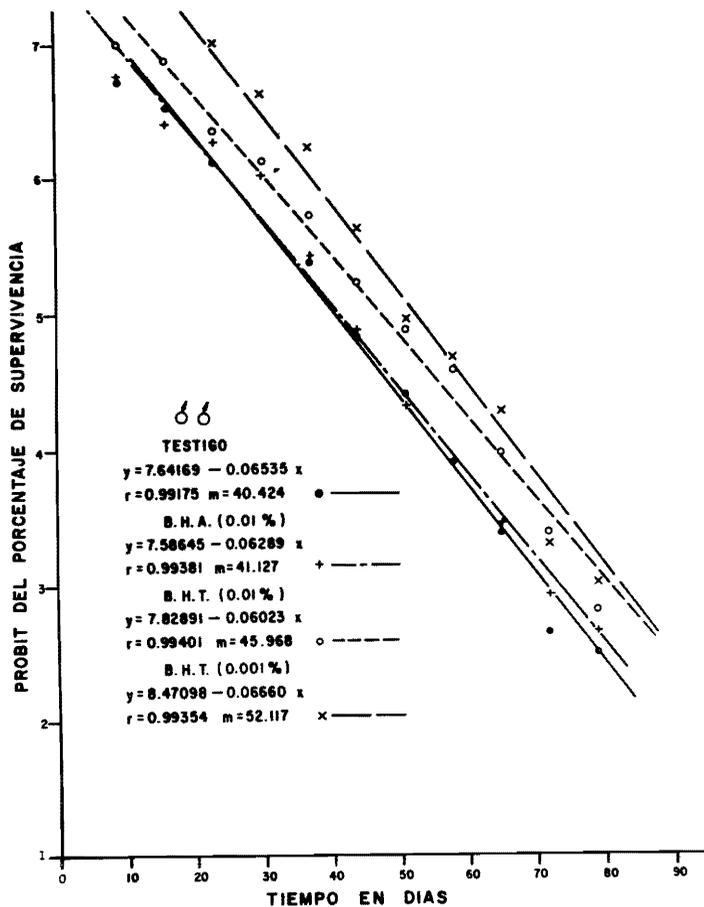


Fig. 10. Transformación Probit de la curva de mortalidad de machos de Drosophila melanogaster ( $y/sc^{8Y}$ ). Efecto del hidroxianisol butilado (B.H.A.) y del hidroxitolueno butilado (B.H.T.), agregados al medio de cultivo durante el estado adulto.

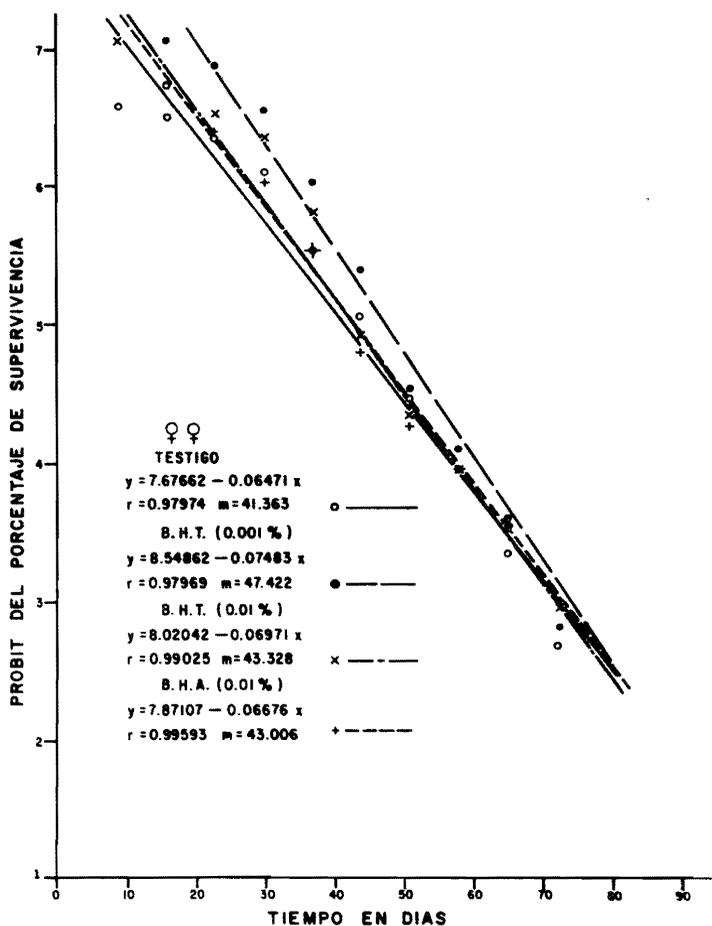


Fig. 11. Transformación Probit de la curva de mortalidad de las hembras de la línea y/sc<sup>B</sup>Y de Drosophila melanogaster. Efecto del hidroxitolueno butilado (B.H.T.) y del hidroxianisol butilado (B.H.A.), agregados al medio de cultivo durante el estado adulto.

## CONCLUSIONES

Desde la iniciación de la radiobiología, se demostró que las mutaciones ocurren espontáneamente, que su frecuencia aumenta con el incremento de la temperatura, por la adición de ciertos compuestos químicos y por la exposición a las radiaciones ionizantes. El espectro de las mutaciones inducidas varía según el tipo y concentración o la dosis de cada agente mutagénico. Las mutaciones son eventos esencialmente irreversibles, variando su grado de expresión desde la letalidad completa, hasta la heterosis. Dado que se acumulan gradualmente en función del tiempo, es de interés intrínseco conocer el grado de acumulación de las mutaciones en varios tipos celulares, así como el efecto que pueden tener sobre la célula afectada en sí misma y sobre el organismo considerado como una unidad --- constituida por sistemas interdependientes.

Hasta la década pasada, se careció de datos cuantitativos sobre la frecuencia de mutaciones espontáneas en varias especies en condiciones ambientales normales, disponiéndose de determinaciones muy escasas, a pesar de que la mutabilidad espontánea constituye el evento primario del que se derivan los cambios evolutivos.

El interés general sobre la mutagénesis química y sobre la radiogenética ha producido recientemente un aporte considerable

de determinaciones exactas del incremento de la mutación espontánea resultante de la exposición a radiaciones ionizantes.

La teoría de la mutación somática del envejecimiento postula que en las células postmitóticas tiene lugar una acumulación - de mutaciones espontáneas en relación con el incremento de la edad, lo que causa un decrecimiento progresivo en la capacidad funcional de las células afectadas. La tasa de mutación por generación (o durante una fracción equivalente del período de vida) es aproximadamente igual en los individuos de la misma especie bajo ciertas condiciones experimentales, tales como la temperatura en animales poiquiloterms.

La mayoría de las teorías que tratan de explicar los mecanismos básicos de los procesos de envejecimiento, son de carácter genético. (Failla (1958, 1960) y Failla *et al.* (1957, 1960) propusieron que según el comportamiento estadístico de la mortalidad, ésta es resultante de la acumulación de mutaciones en células somáticas en función del tiempo. Si la mutación es un factor causativo -- del envejecimiento, es de esperarse una correlación positiva entre el grado de mutación y el grado de envejecimiento, sobre lo que se ha reunido evidencia considerable. Sin embargo, también podría encontrarse una correlación positiva causada por otros procesos que -- tuvieran efecto sobre ambos parámetros. Por ejemplo, el aumento en la temperatura, dentro de ciertos límites, incrementa la velocidad de las reacciones químicas y de varios procesos físicos que a su -- vez pueden producir un incremento en la frecuencia de la mutación y

una aceleración del envejecimiento, según el grado en que ambos fenómenos dependan de eventos fisicoquímicos.

El incremento de la temperatura produce un aumento correspondiente en la frecuencia de mutaciones (Muller, 1928; Timofeeff-Ressovsky, 1939; Plough, 1942; Byers y Muller, 1952), así como una aceleración del envejecimiento en poblaciones experimentales de *Drosophila* (Pearl, 1928; Comfort, 1956; Strehler, 1959, 1960).

El grado de mutagénesis está relacionado en alguna forma con la edad del organismo y por analogía, con la edad de la célula en la que tiene lugar la mutación. Muller (1945) y Muller *et al.* (1961) descubrieron que la frecuencia de mutaciones varía marcadamente con la edad del espermatozoide en *Drosophila*, demostrando que las mutaciones espontáneas se acumulan en el espermatozoide maduro almacenado en la hembra, y que también se acumulan las mutaciones espontáneas letales recesivas ligadas al sexo en los espermatozoides almacenados en el macho.

Muller *et al.* (1961) interpretaron estos datos como una evidencia experimental en favor de su teoría acerca de que la mayoría de las mutaciones (espontáneas e inducidas) son el resultado de alteraciones en el gene "preexistente", esto es, que no se requiere la duplicación del gene para que se fije el evento mutagénico, por lo que no se tiene ninguna razón para afirmar que la mutagénesis en las células fijas, postmitóticas, sea resultante de procesos esencialmente diferentes a los que concurren en la mutagénesis de las células que se replican.

Por otra parte, que las mutaciones ocurren tanto en células somáticas como en células germinales, es una deducción lógica - del hecho bien establecido sobre la calidad del ADN, que es idéntica en las células somáticas y en las células germinales. Solamente la frecuencia y la expresión de las mutaciones, así como la supervivencia de las células que las contienen, pueden variar en tipos celulares diversos.

El valor absoluto de la frecuencia de mutación en células somáticas puede diferir tanto de un tejido a otro, como con respecto a la tasa de mutación de las células germinales, debido a la interacción diferencial entre el genotipo y el medio ambiente en cada caso. Muller (1954) reunió evidencia en favor de que la frecuencia de las mutaciones visibles en las células somáticas en los embriones de *Drosophila*, es del mismo orden de magnitud que la frecuencia del mismo evento en las células germinales.

Algunos experimentos recientes (Johnson, 1963) indican - que la frecuencia de errores en el ARN y en las proteínas puede ser de 10 a 100 veces mayor que el mismo parámetro en el ADN. La teoría de Failla (1958) predijo tal relación. Por otra parte, existen varios mecanismos de corrección de errores en la línea germinal, tales como la fecundación o la conjugación. Las células germinales, - por consiguiente, tienen una capacidad de recuperación que se expresa en un grado mayor al que es de esperarse en el soma. Según este principio, los efectos de las mutaciones en las células somáticas - son más significativas que en las células germinales.

La senectud es un proceso universal en los organismos vivientes (Comfort, 1956; Bourliere, 1958; Dobzhansky, 1958; Strehler, 1960). El hecho de que la mayoría de las especies tienen períodos - de vida bien definidos, parece ser relevante a la constancia de la información codificada en el ADN en cada especie. Williams (1957) - ha propuesto que la senectud es un carácter evolutivo característi- co del soma de "individuos fisiológicamente definidos", siendo las mutaciones la fuente del cambio evolutivo. La información genética de la célula está almacenada dentro de la secuencia precisa de ba- ses púricas y pirimídicas en la molécula del ADN. Los cambios, adi- ciones o deficiencias en esta secuencia de bases, ya sea por la --- reorganización espacial o por la substitución de formas tautoméri- cas, introducen errores en el contenido de información del genoma.- Por ejemplo, el ácido nitroso es causante de la diaminación oxidati- va de la citosina convirtiéndola en uracilo; el bromouracilo, que - se aparea con la guanina, puede ser incorporado al ADN en lugar de la timina, transformando al par adenina-timina en el par guanina-ci- tosina; y los colorantes de acridina pueden intercalarse entre las bases, incorporando bases adicionales al ADN durante la replicación. Dichas alteraciones en la molécula de ADN constituyen lo que se de- fine como mutaciones puntuales. Es razonable, dada la evidencia ex- perimental tan abundante que se ha mencionado, adelantar la posibi- lidad de un desarreglo progresivo del soma con el aumento de la --- edad cronológica, como resultado de la eficiencia decreciente del - ADN, que es necesaria para la regulación de la síntesis protéica y

enzimática y para la supervisión de la actividad conjunta de las células, como consecuencia directa de la acumulación de las mutaciones en el tiempo.

Orgel (1963) señaló que el fracaso para mantener la precisión requerida en la síntesis de proteínas, podría causar envejecimiento celular. Aunque el material genético proporciona la información precisa para la síntesis de proteínas, es de esperarse que puedan ocurrir errores ocasionales en la transcripción y en la translación de esta información (Lotfield, 1963). La presencia de unas cuantas moléculas defectuosas, resultaría únicamente en un descenso pequeño en la eficiencia metabólica, pero la misma situación no sería trivial para el grupo de enzimas que se requieren para la transcripción o para la translación de la clave genética, (polimerasa -- del ARN, sintetasa-aminoacil-ARNt y probablemente las enzimas que intervienen en las síntesis del ARNt). En este caso, una molécula defectuosa con especificidad disminuida, causaría la producción de moléculas defectuosas en proporción considerable. Orgel indicó que si bien la frecuencia inicial de errores en una célula, puede ser pequeña, en la ausencia de división celular y de selección en favor de las células que crecen con mayor rapidez, tendría lugar un aumento exponencial en la frecuencia de errores que conduciría a una "catástrofe de errores" y a la muerte celular. En organismos diferenciados en los que el grado de renovación celular se reduce al aumentar la edad, es de esperarse que aumente con el tiempo la proporción de células afectadas en esta forma. El mismo autor sugirió una

prueba experimental para la validez de esta hipótesis, que consiste en aumentar artificialmente la frecuencia de errores en las síntesis de proteínas, mediante el tratamiento de células con cantidades no tóxicas de análogos de aminoácidos o de bases del ARN. Un solo tratamiento iniciaría una catástrofe de errores incipientes, cuyos efectos serían manifiestos en la célula o en el organismo, tiempo después de la adición de los análogos. Orgel llevó a cabo el experimento con resultados positivos en *D. melanogaster*, que es un organismo particularmente adecuado para este tipo de experimento. Las larvas en crecimiento activo se alimentaron con los suplementos agregados al medio. Después de la metamorfosis hay una división celular muy reducida en el adulto, aparte de las células germinales, de manera que no hay probabilidad de selección de células saludables para substituir a las células que mueren debido a la síntesis de proteínas alteradas. Se emplearon análogos de aminoácidos en vez de análogos de bases, porque estos podrían incorporarse al ADN causando mutaciones somáticas, por lo que, el efecto en la longevidad por el tratamiento con análogos de bases podría atribuirse a mutaciones más bien que a un efecto en la síntesis de proteínas, ya que es remotamente probable que se puedan inducir mutaciones por adición de análogos de aminoácidos. Aunque no existe evidencia directa de que los análogos de aminoácidos se incorporan a las proteínas de *Drosophila*, es probable que ocurra dicho fenómeno, según los datos positivos obtenidos en otras células animales y en microorganismos (Richmond, 1962). Los análogos de aminoácidos pueden dismi-

nuir la especificidad de las enzimas al ser incorporados en lugar - de los aminoácidos naturales. El tratamiento redujo efectivamente - la vida media de *Drosophila*.

Este descubrimiento no prueba necesariamente que la hipótesis de Orgel sea correcta, pero confirma una de sus predicciones principales, esto es, que el aumento en la frecuencia normal de --- errores en la síntesis de proteínas acorta el período de vida.

Otro experimento relevante es el de Clarke y Maynard --- Smith (1966), quienes demostraron que el grado de restitución de algunas de las proteínas en individuos longevos de *Drosophila* es 2 veces mayor que en los adultos jóvenes, resultado que puede ser explicado con base en la hipótesis de Orgel. Si alguna de las proteínas que se sintetizan en animales longevos son defectuosas, es muy probable que existan mecanismos de control compensatorios de la actividad enzimática reducida, estimulando la síntesis de la misma proteína anormal que en su mayor parte es desnaturalizada y degradada.

En contraste con otras teorías sobre el envejecimiento, - la de Orgel tiene la virtud de definir claramente, en términos bioquímicos, una causa posible del envejecimiento celular.

## RESUMEN

Aunque se desconoce en qué grado los procesos básicos -- causantes del envejecimiento de *Drosophila* son relevantes a los procesos similares que tienen lugar en los mamíferos, la similitud entre los resultados de experimentos análogos en insectos y en ratones justifica a la esperanza en favor de que la investigación en *Drosophila* contribuya a la resolución de algunos de los aspectos fundamentales involucrados en el envejecimiento natural del hombre.

El soma del imago de los insectos es un sistema postmitótico que constituye un material biológico especialmente adecuado para el estudio de los factores intrínsecos y extrínsecos determinantes de la duración de la vida, según los postulados adelantados por la teoría de la mutación somática en relación con el envejecimiento.

Los datos experimentales reseñados no son suficientes para apoyar definitivamente a la teoría de la mutación somática. No obstante, no niegan la intervención de las mutaciones somáticas como uno de los mecanismos causativos probablemente más significativos del síndrome del envejecimiento en *D. melanogaster*.

Al aplicar dosis subletales de electrones acelerados a imagos de *D. melanogaster* se derivaron gráficas de supervivencia, cuyo análisis favorece a la hipótesis de la aceleración del enveje-

cimiento causada por la irradiación, ya que el porcentaje de supervivencia media es independiente de la edad en la que se irradiaron los adultos.

La expectativa de vida posterior a la irradiación es --- acortada en grado mayor en los machos que en las hembras, resultado que es congruente con la pérdida o inactivación celular diferencial debida a la haploidía de una quinta parte del genoma en el macho, - que posibilita la expresión de los genes recesivos letales o detrimentales contenidos en el cromosoma X.

Al aplicar las dosis menores de irradiación se alargó en algunos casos la expectativa de vida, lo que, en las hembras se ha atribuído a la esterilidad producida por el tratamiento.

Con el propósito de investigar la relación entre el parentesco genético y la dosis letal media en cuatro especies de *Drosophila*, se irradiaron imagos en un gradiente de dosis de electrones acelerados entre los límites de 8.32 a 91.52kR. Unicamente entre *D. melanogaster* y *D. simulans* no se encontró una diferencia significativa en el valor de la  $DL_{50}$ . Ambas son especies muy emparentadas, del grupo melanogaster, que tienen la misma constitución cromosómica y que pueden producir descendencia interespecífica.

La adición de los compuestos antioxidantes, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado y galato de propilo, al medio de cultivo, alargó significativamente el período de vida media de algunos de los grupos de adultos así tratados. El efecto es más notable en los machos que en las hembras, lo que sugiere una protec--

ción contra algún tipo de daño genético inducido por los radicales libres que se generan espontáneamente en las células postmitóticas.

Los datos obtenidos en la presente investigación posibilitan algunas conclusiones pertinentes a la intervención de las mutaciones somáticas en el proceso natural del envejecimiento. Aunque se tienen muchos factores por considerar al evaluar en qué extensión las mutaciones son elementos causativos de la senectud, se han reunido aportaciones significativas de postulados teóricos y de experimentos que apoyan a la hipótesis de que las alteraciones que -- conducen al envejecimiento son de carácter esencialmente genético.

## APENDICE I

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de machos de D. melanogaster irradiados con electrones de 1 Mev, a los 14 días de edad. E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

%			%			%		
E.d.	superv.	Probit	E.d.	superv.	Probit	E.d.	superv.	Probit
9	98.65	7.2115	15	99.24	7.4276	15	99.16	7.3911
16	97.30	6.9268	23	91.62	6.3800	20	97.50	6.9600
23	93.70	6.5301	31	87.04	6.1283	25	93.28	6.4969
30	85.56	6.0607	39	77.12	5.7428	30	89.92	6.2775
37	75.61	5.6938	47	44.32	4.8571	35	81.52	5.8972
44	59.77	5.2474	55	27.51	4.4025	40	66.40	5.4234
51	47.10	4.9272	63	14.52	3.9428	45	36.16	4.6458
58	24.47	4.3087	71	3.06	3.1275	50	15.16	3.9704
65	9.10	3.6654	79	0.77	2.5766	55	4.24	3.2809
72	0.51	2.4306	87	0.77	2.5766	60	0.88	2.6257
79	0.51	2.4306				65	0.88	2.6257

Grupo testigo  
 $y=8.16814-0.07111 \times$   
 $r=0.98549$   
 $m=44.553$

Dosis=7.32kR  
 $y=8.20715-0.06818 \times$   
 $r=0.99185$   
 $m=47.039$

Dosis=14.64kR  
 $y=9.17605-0.10305 \times$   
 $r=0.98995$   
 $m=40.525$

%			%			%		
E.d.	superv.	Probit	E.d.	superv.	Probit	E.d.	superv.	Probit
15	98.27	7.1130	15	99.28	7.4471	15	97.76	7.0066
20	90.18	6.2918	18	97.14	6.9018	18	96.26	6.7817
25	75.73	5.6977	21	94.98	6.6430	21	94.76	6.6222
30	53.76	5.0944	24	94.26	6.5769	24	94.01	6.5557
35	42.19	4.8029	27	85.62	6.0634	27	84.30	6.0069
40	37.00	4.6681	30	72.67	5.6029	30	77.58	5.7581
45	23.71	4.2843	33	60.43	5.2645	33	57.43	5.1874
50	16.76	4.0363	36	53.95	5.0992	36	31.30	4.5126
55	9.25	3.6745	39	35.95	4.6402	39	14.13	3.9255
60	2.31	3.0064	42	23.01	4.2615	42	2.93	3.1088
65	1.73	2.8869	45	11.49	3.7991	45	1.43	2.8109
70	0.57	2.4688	48	3.57	3.1971			
			51	1.41	2.8054			

Dosis=21.96kR  
 $y=7.78177-0.07717 \times$   
 $r=0.98714$   
 $m=36.047$

Dosis=29.28kR  
 $y=9.36663-0.12463 \times$   
 $r=0.99474$   
 $m=35.037$

Dosis=36.60kR  
 $y=9.72201-0.14747 \times$   
 $r=0.97473$   
 $m=32.020$

APENDICE I (continuación)

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de machos de D. melanogaster irradiados con electrones de 1 Mev, a los 14 días de edad. E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

E.d.	% superv.	Probit
15	98.55	7.1835
17	95.65	6.7114
19	91.30	6.3595
21	88.40	6.1952
23	86.95	6.1240
25	84.05	5.9966
27	76.80	5.7323
29	68.10	5.4705
31	53.61	5.0907
33	33.32	4.5689
35	21.72	4.2183
37	8.67	3.6386
39	1.42	2.8081

Dosis=43.92kR  
 $y=9.66855-0.15839 x$   
 $r=0.96896$   
 $m=29.475$

APENDICE II

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de hembras de D. melanogaster irradiados con electrones de 1 Mev, a los 14 días de edad. E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

<u>%</u>			<u>%</u>			<u>%</u>		
<u>E.d.</u>	<u>superv.</u>	<u>Probit</u>	<u>E.d.</u>	<u>superv.</u>	<u>Probit</u>	<u>E.d.</u>	<u>superv.</u>	<u>Probit</u>
9	98.28	7.1154	15	97.84	7.0219	15	100.00	
16	96.73	6.8425	23	94.24	6.5754	18	98.53	7.1781
23	94.15	6.5677	31	91.36	6.3632	21	98.53	7.1781
30	88.11	6.1805	39	83.44	5.9717	24	97.79	7.0122
37	67.43	5.4518	47	50.32	5.0080	27	95.58	6.7079
44	43.29	4.8310	55	30.16	4.4801	30	93.32	6.5039
51	24.76	4.3179	63	11.44	3.7966	33	85.28	6.0485
58	13.99	3.9193	71	2.08	2.9625	36	79.39	5.8200
65	5.37	3.3901				39	73.50	5.6280
72	1.92	2.9293	<u>Dosis=7.32kR</u>			42	63.20	5.3372
79	1.06	2.6952	<u>y=8.36780-0.07146 x</u>			45	57.31	5.1843
			<u>r=0.98510</u>			48	48.49	4.9621
			<u>m=47.128</u>			51	41.87	4.7947
						54	31.57	4.5203
						57	12.45	3.8472
						60	3.63	3.2046
						63	2.89	3.1028
						66	1.42	2.8081

Grupo testigo  
 $y=7.97986-0.06911 x$   
 $r=0.99449$   
 $m=43.118$

<u>%</u>		
<u>E.d.</u>	<u>superv.</u>	<u>Probit</u>
15	99.19	7.4044
18	98.38	7.1394
21	96.76	6.8467
24	95.95	6.7450
27	92.72	6.4552
30	90.30	6.2988
33	87.87	6.1685
36	84.64	6.0211
39	74.15	5.6480
42	64.47	5.3711
45	58.02	5.2024
48	45.11	4.8772
51	28.98	4.4460
54	18.50	4.1035
57	7.21	3.5396
60	0.76	2.5717
63	0.76	2.5717

Dosis=14.64kR.  
 $y=9.21318-0.09354 x$   
 $r=0.98846$   
 $m=45.041$

Dosis=21.96kR  
 $y=9.15501-0.09687 x$   
 $r=0.97484$   
 $m=42.893$



APENDICE III

Logaritmos naturales de los porcentajes de supervivencia de los grupos de machos de D. melanogaster irradiados con electrones de 1 Mev, a los 43 días de edad. E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia; log. n., logaritmo natural.

<hr/>			<hr/>			<hr/>		
%			%			%		
E.d.	superv.	log. n.	E.d.	superv.	log. n.	E.d.	superv.	log. n.
44	92.92	4.53174	44	92.86	4.50932	44	88.68	4.48503
46	85.38	4.44712	47	70.36	4.25318	46	80.19	4.38440
48	83.49	4.42473	50	66.66	4.19960	48	71.23	4.26591
50	76.88	4.34225	53	54.15	3.99175	50	66.52	4.19750
52	67.92	4.21834	56	52.95	3.96935	52	57.09	4.04463
54	56.60	4.03601	59	44.02	3.78464	54	46.24	3.83384
56	50.00	3.91202	62	36.27	3.59100	56	42.47	3.74879
58	38.68	3.65532	65	24.95	3.21691	58	33.98	3.52578
60	32.55	3.48278	68	16.02	2.77383	60	28.79	3.36003
62	27.36	3.30908	71	7.09	1.95869	62	25.02	3.21967
64	21.23	3.05540	74	3.51	1.25562	64	17.00	2.83321
66	18.87	2.93756	77	2.91	1.06815	66	12.28	2.50796
68	13.21	2.58098	80	1.12	0.11333	68	9.97	2.29958
70	10.85	2.38422	82	0.00		70	3.78	1.32972
72	4.72	1.55181				72	2.84	1.04380
74	3.31	1.19695				74	1.90	0.64185
76	2.37	0.86289	<u>Dosis=7.32kR</u>			76	0.49	-0.71335
78	1.90	0.64185	$y=10.14513-0.11563 x$			78	0.00	
80	0.96	-0.04082	$r=0.94629$					
82	0.49	-0.71335	$m=53.914$					
83	0.00					<u>Dosis=14.64kR</u>		

Grupo Testigo  
 $y=10.97395-0.13089 x$   
 $r=0.96181$   
 $m=53.953$

$y=11.30564-0.14038 x$   
 $r=0.93929$   
 $m=52.669$

APENDICE III (continuación)

Logaritmos naturales de los porcentajes de supervivencia de los grupos de machos de D. melanogaster irradiados con electrones de 1 Mev, a los 43 días de edad. E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia; log. n., logaritmo natural.

<hr/>			<hr/>		
E.d.	% superv.	log. n.	E.d.	% superv.	log. n.
<hr/>			<hr/>		
44	91.44	4.51569	44	82.25	4.40977
46	75.40	4.32281	46	69.27	4.23801
48	72.73	4.28675	48	64.08	4.16013
50	67.78	4.18616	50	60.61	4.10446
52	50.27	3.91742	52	46.75	3.84482
54	32.62	3.48493	54	32.03	3.46666
56	26.21	3.26614	56	27.27	3.30580
58	18.72	2.92959	58	18.18	2.90042
60	10.70	2.37024	60	12.55	2.52967
62	4.81	1.57070	62	7.79	2.05284
64	1.61	0.47623	64	3.46	1.24127
66	1.08	0.07696	66	3.46	1.24127
68	0.55	-0.59784	68	2.59	0.95166
70	0.00		70	1.29	0.25464
			72	0.86	-0.15082
			74	0.00	

Dosis=21.96kR  
 $y=14.77672-0.21606 x$   
 $r=0.95575$   
 $m=50.286$

Dosis=29.28kR  
 $y=12.38132-0.16916 x$   
 $r=0.98089$   
 $m=50.062$

APENDICE IV

Logaritmos naturales de los porcentajes de supervivencia de los grupos de hembras de D. melanogaster irradiados con electrones de 1 Mev, a los 43 días de edad. E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia; log. n., logaritmo natural.

<u>%</u>			<u>%</u>			<u>%</u>		
<u>E.d.</u>	<u>superv.</u>	<u>log. n.</u>	<u>E.d.</u>	<u>superv.</u>	<u>log. n.</u>	<u>E.d.</u>	<u>superv.</u>	<u>log.n.</u>
44	88.28	4.48040	44	91.26	4.51371	44	91.45	4.51580
46	67.60	4.21361	46	68.85	4.23193	47	69.23	4.23743
48	60.34	4.09999	48	59.00	4.07754	50	53.84	3.98602
50	54.19	3.99250	50	55.17	4.01042	53	39.31	3.67117
52	44.69	3.79975	52	46.98	3.84973	56	35.90	3.58074
54	35.76	3.57682	54	37.14	3.61469	59	23.94	3.17559
56	29.05	3.36900	56	33.86	3.52222	62	13.69	2.61667
58	24.51	3.19908	58	30.03	3.40219	65	2.58	0.94779
60	20.12	3.00170	60	22.38	3.10817	68	1.73	0.54812
62	16.77	2.81958	62	18.01	2.89093	71	0.00	
64	11.18	2.41412	64	11.46	2.43893			
66	8.32	2.11866	66	5.96	1.78507	<u>Dosis=14.64kR</u>		
68	6.08	1.80500	68	3.81	1.33763	$y=12.0448-0.16096 x$		
70	3.28	1.18784	70	2.17	0.77473	$r=0.93567$		
72	2.16	0.77011	72	1.08	0.07696	$m=50.5267$		
74	1.60	0.47000	74	0.53	-0.63488			
76	1.60	0.47000	76	0.00				
78	0.48	-0.73397						
80	0.00							
<u>Grupo testigo</u>			<u>Dosis=7.32kR</u>					
$y=10.98154-0.13990 x$			$y=11.97763-0.15746 x$					
$r=0.97272$			$r=0.95145$					
$m=50.533$			$m=51.223$					

APENDICE IV (continuación)

Logaritmos naturales de los porcentajes de supervivencia de los grupos de hembras de D. melanogaster irradiados con electrones de 1 Mev, a los 43 días de edad. E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia; log., n., logaritmo natural.

E.d.	% superv.	log. n.	E.d.	% superv.	log. n.
44	88.74	4.48571	44	86.11	4.45563
46	68.88	4.23237	46	70.83	4.26029
48	59.61	4.08783	48	56.94	4.04219
50	54.98	4.00715	50	51.38	3.93925
52	41.76	3.73194	52	34.72	3.54732
54	29.16	3.37281	54	24.30	3.19048
56	20.55	3.02286	56	22.22	3.10698
58	17.24	2.84724	58	15.27	2.72588
60	11.94	2.47996	60	5.55	1.71380
62	10.62	2.36272	62	3.47	1.24415
64	7.31	1.98924	64	1.39	0.32930
66	5.32	1.67147	66	0.70	-0.35668
68	2.67	0.98208	68	0.70	-0.35668
70	2.24	0.80648	70	0.00	
72	1.81	0.59333			
74	0.00				

Dosis=21.96kR

$$y=11.04498-0.14368 x$$

$$r=0.99168$$

$$m=49.645$$

Dosis=29.28kR

$$y=14.60651-0.21710 x$$

$$r=0.96889$$

$$m=49.261$$

APENDICE V

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de machos de D. melanogaster testigo y tratados con hidroxitolueno butilado (B.H.T.). E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

E.d.	% superv.	Probit
9	95.76	6.7235
16	93.64	6.5251
23	87.28	6.1397
30	85.69	6.0665
37	65.06	5.3869
44	42.29	4.8055
51	26.93	4.3851
58	13.17	3.8816
65	5.22	3.3760
72	0.92	2.6423
79	0.62	2.4989

Grupo testigo

$$y=7.64169-0.06535 x$$

$$r=0.99175$$

$$m=40.424$$

E.d.	% superv.	Probit
9	98.65	7.2115
16	97.30	6.9268
23	93.70	6.5301
30	85.56	6.0607
37	75.61	5.6938
44	59.77	5.2474
51	47.10	4.9272
58	24.47	4.3087
65	9.10	3.6654
72	0.51	2.4306
79	0.51	2.4306

B.H.T. (0.100%)

$$y=8.16814-0.07111 x$$

$$r=0.98549$$

$$m=44.553$$

E.d.	% superv.	Probit
9	98.15	7.0858
16	96.71	6.8481
23	91.22	6.3545
30	87.05	6.1288
37	76.87	5.7346
44	58.36	5.2111
51	44.47	4.8609
58	33.82	4.5826
65	15.30	3.9763
72	5.14	3.3684
79	1.44	2.8136

B.H.T. (0.010%)

$$y=7.82891-0.06023 x$$

$$r=0.99401$$

$$m=46.968$$

E.d.	% superv.	Probit
9	99.60	7.6521
16	98.80	7.2571
23	98.40	7.1444
30	94.77	6.6231
37	88.71	6.2112
44	73.39	5.6247
51	48.78	4.9694
58	37.50	4.6814
65	23.39	4.2740
72	4.44	3.3002
79	2.43	3.0278
86	0.82	2.5998
93	0.82	2.5998

B.H.T. (0.001%)

$$y=8.47098-0.06660 x$$

$$r=0.99354$$

$$m=52.117$$

APENDICE VI

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de hembras de D. melanogaster testigo y tratados con hidroxitolueno butilado (B.H.T.) E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

E.d.	% superv.	Probit	E.d.	% superv.	Probit
9	94.28	6.5782	9	98.28	7.1154
16	93.40	6.5063	16	96.73	6.8425
23	91.20	6.3532	23	94.15	6.5677
30	86.36	6.0967	30	88.11	6.1805
37	70.51	5.5391	37	67.43	5.4518
44	52.47	5.0619	44	43.29	4.8310
51	30.03	4.4765	51	24.76	4.3179
58	14.19	3.9282	58	13.99	3.9193
65	4.95	3.3503	65	5.37	3.3901
72	0.99	2.6698	72	1.92	2.9293
			79	1.06	2.6952

Grupo testigo

$$y=7.67662-0.06471 x$$

$$r=0.97974$$

$$m=41.363$$

B.H.T. (0.100%)

$$y=7.97986-0.06911 x$$

$$r=0.99449$$

$$m=43.118$$

E.d.	% superv.	Probit	E.d.	% superv.	Probit
9	97.99	7.0517	9	99.25	7.4324
16	95.57	6.7028	16	98.14	7.0836
23	93.56	6.5189	23	97.02	6.8838
30	91.14	6.3495	30	94.04	6.5584
37	79.04	5.8078	37	84.71	6.0241
44	45.98	4.8991	44	65.32	5.3939
51	26.22	4.3634	51	32.12	4.5357
58	14.94	3.9611	58	18.68	4.1102
65	6.88	3.5151	65	8.23	3.6102
72	2.03	2.9524	72	1.52	2.8350
79	0.42	2.3632	79	0.40	2.3479

B.H.T. (0.010%)

$$y=8.02042-0.06971 x$$

$$r=0.99025$$

$$m=43.328$$

B.H.T. (0.001%)

$$y=8.54862-0.07483 x$$

$$r=0.97969$$

$$m=47.422$$

APENDICE VII

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de machos de D. melanogaster, tratados con hidroxianisol butilado (B.H.A.), y con galato de propilo (G.P.). E.d., edad - en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

<u>%</u>			<u>%</u>			<u>%</u>		
<u>E.d. superv.</u>	<u>Probit</u>		<u>E.d. superv.</u>	<u>Probit</u>		<u>E.d. superv.</u>	<u>Probit</u>	
9	84.09	5.9982	9	96.27	6.7829	9	98.44	7.1545
16	69.07	5.4978	16	92.07	6.4097	16	96.88	6.8667
23	54.93	5.1239	23	89.74	6.2668	23	93.37	6.5039
30	48.74	4.9684	30	84.60	6.0194	30	90.64	6.3189
37	43.43	4.8344	37	66.83	5.4351	37	81.67	5.9029
44	27.52	4.4028	44	44.86	4.8708	44	48.19	4.9546
51	20.47	4.1750	51	24.76	4.3179	51	30.28	4.4833
58	14.29	3.9327	58	13.09	3.8778	58	19.77	4.1501
65	7.22	3.5402	65	6.09	3.4528	65	9.25	3.6745
			72	1.89	2.9229	72	2.63	3.0618
			79	0.95	2.6555	79	1.07	2.6988
						86	0.29	2.1088
						93	0.29	2.1088
<u>B.H.A. (0.100%)</u>			<u>B.H.A. (0.010%)</u>			<u>B.H.A. (0.001%)</u>		
$y=6.21606-0.04045 \times$			$y=7.58645-0.06289 \times$			$y=7.98971-0.06618 \times$		
$r=0.99233$			$r=0.99381$			$r=0.99408$		
$m=30.063$			$m=41.127$			$m=45.175$		

<u>%</u>			<u>%</u>			<u>%</u>		
<u>E.d. superv.</u>	<u>Probit</u>		<u>E.d. superv.</u>	<u>Probit</u>		<u>E.d. superv.</u>	<u>Probit</u>	
9	88.98	6.2254	9	95.70	6.7169	9	97.76	7.0066
16	83.76	5.9847	16	88.82	6.2170	16	90.16	6.2904
23	82.31	5.9273	23	83.23	5.9633	23	87.03	6.1278
30	77.09	5.7418	30	78.93	5.8040	30	83.02	5.9550
37	66.07	5.4144	37	68.18	5.4727	37	67.84	5.4632
44	36.22	4.6474	44	40.27	4.7536	44	51.77	5.0443
51	23.17	4.2667	51	31.67	4.5231	51	32.13	4.5359
58	10.70	3.7574	58	26.51	4.3723	58	25.44	4.3392
65	4.03	3.2528	65	20.06	4.1605	65	18.31	4.0964
			72	8.90	3.6531	72	5.79	3.4273
			79	2.45	3.0313	79	2.67	3.0683
			86	0.30	2.2522			
<u>G.P. (1.000%)</u>			<u>G.P. (0.100%)</u>			<u>G.P. (0.010%)</u>		
$y=7.04948-0.05474 \times$			$y=7.25129-0.05280 \times$			$y=7.39775-0.05376 \times$		
$r=0.97280$			$r=0.98671$			$r=0.99444$		
$m=37.440$			$m=42.638$			$m=44.601$		

APENDICE VIII

Transformación Probit de los porcentajes de supervivencia de los grupos de hembras de D. melanogaster, tratados con hidroxianisol butilado (B.H.A.) y con galato de propilo (G.P.). E.d., edad en días; % superv., porcentaje de supervivencia.

<u>%</u>			<u>%</u>			<u>%</u>		
<u>E.d. superv. Probit</u>			<u>E.d. superv. Probit</u>			<u>E.d. superv. Probit</u>		
9	88.60	6.2055	9	100.00		9	98.01	7.0558
16	78.46	5.7878	16	95.74	6.7213	16	95.62	6.7082
23	72.13	5.5867	23	91.47	6.3705	23	92.06	6.4090
30	59.47	5.2394	30	84.53	6.0165	30	90.46	6.3082
37	59.47	5.2394	37	71.71	5.5743	37	75.82	5.7005
44	39.22	4.7264	44	42.30	4.8058	44	30.37	4.4862
51	21.50	4.2108	51	23.06	4.2631	51	14.16	3.9268
58	7.57	3.5654	58	14.52	3.9428	58	8.73	3.6424
65	5.03	3.3578	65	7.59	3.5668	65	3.97	3.2458
			72	2.26	2.9971	72	1.97	2.9399
			79	1.20	2.7429			

B.H.A. (0.100%)

$$y=6.75833-0.05077 x$$

$$r=0.98216$$

$$m=34.633$$

B.H.A. (0.010%)

$$y=7.78107-0.06676 x$$

$$r=0.99593$$

$$m=43.006$$

B.H.A. (0.001%)

$$y=7.96917-0.07227 x$$

$$r=0.98202$$

$$m=41.084$$

<u>%</u>			<u>%</u>			<u>%</u>		
<u>E.d. superv. Probit</u>			<u>E.d. superv. Probit</u>			<u>E.d. superv. Probit</u>		
9	75.78	5.6993	9	99.40	7.5121	9	97.39	6.9415
16	67.50	5.4538	16	91.01	6.3414	16	89.54	6.2558
23	65.30	5.3934	23	83.22	5.9629	23	84.32	6.0077
30	59.22	5.2332	30	77.22	5.7461	30	79.09	5.8095
37	45.41	4.8847	37	72.42	5.5924	37	66.00	5.4125
44	23.32	4.2717	44	40.68	4.7642	44	31.44	4.5166
51	11.17	3.7824	51	16.12	4.0104	51	14.17	3.9273
58	5.11	3.3657	58	9.53	3.6914	58	6.84	3.5123
65	2.91	3.1058	65	7.13	3.5337	65	3.19	3.1464
			72	2.33	3.0100			

G.P. (1.000%)

$$y=6.41094-0.04958 x$$

$$r=0.97659$$

$$m=28.458$$

G.P. (0.100%)

$$y=7.73628-0.06716 x$$

$$r=0.98478$$

$$m=40.743$$

G.P. (0.010%)

$$y=7.60167-0.06873 x$$

$$r=0.98925$$

$$m=37.853$$

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- ALBERT, M.D., 1958. J. Natl. Cancer Inst. 20:321.
- ALEXANDER, P. y D.I. CONNELL, 1960. Shortening of the life span of mice by irradiation with X-rays and treatment with radiomimetic chemicals. Radiation Res. 12:38-48.
- ALEXANDER, P. y D.I. CONNELL, 1963. Differences between radiation-induced lifespan shortening in mice and normal aging as revealed by serial killing. In: Cellular Basis and Aetiology of Late Somatic Effects of Ionizing Radiation, R.J.C. Harris (Ed), Academic Press, Inc., New York:277-283.
- ATLAN, H., J. MIGUEL Y R. BINNARD, 1969. Differences between radiation-induced life shortening and natural aging in *Drosophila melanogaster*. Jour. of Gerontology, 24, 1:1-4.
- BACQ, Z.M. y P. ALEXANDER, 1961. The enzyme release hypothesis. In: Fundamentals of Radiobiology. Pergamon Press, New York, 2nd. ed.
- BARBER, D.A., G.J. NEARY y R.S. RUSSELL, 1957. Radiosensitivity of salt uptake in plants. Nature 180:556-557.
- BAXTER, R.C. y H.A. BLAIR, 1967. Kinetics of aging as revealed by X-ray-dose-lethality relations in *Drosophila*. Radiation Res. 30:48-70.
- BAXTER, R.C. y L.W. TUTTLE, 1957. Life span shortening in irradiated *Drosophila*. Radiation Res. 7:303 (Abstract).
- BENDER, M.A. y P.C. GOOCH, 1962. Persistent Chromosome Aberrations in Irradiated Human Subjects. Radiation Res. 16:44-53.
- BERGONNIE, J. y L. TRIBONDEAU, 1906. C.R. Soc. Biol. 143:983. Traducción al inglés por G. Fletcher, 1959. Radiation Res. 11:587.
- BLAIR, H.A., 1958. A formulation of the relation between radiation dose and shortening of lifespan. In: Proc. 2nd. Int. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Ginebra, 11:118-120.

- BONDAREFF, W., 1959. In: Handbook of Aging and the Individual, J.E. Birren (Ed.), Univ. of Chicago Press, Chicago:136-172.
- BONNIER, G. y K.G. LUNING, 1950. Hereditas 36:445.
- BOUCEK, R.J., N.L. NOBLE, K.T. KAO y H.R. ELDEN, 1958. The effects of age, sex, and race upon the acetic acid fractions of collagen (human biopsy-connective tissue). J. Gerontol. 13:2-9.
- BOURLIERE, F., 1958. The comparative biology of aging. J. Geront., 13 (Suppl. 1):16-24.
- BOURNE, G.H., 1957. In: Modern Trends in Geriatrics, W. Hobson (Ed.) Hoeben, New York:22-49.
- BOYD, W., 1953. In: A Textbook of Pathology, Lea and Febinger (Eds.) Philadelphia:35.
- BRANDES, D. y E. ANTON, 1966. Lab. Invest. 15:987-1006.
- BRINKMAN, R. y H.B. LAMBERTS, 1960. Examples of immediate low-level X-ray effects: their significance for the study of chemical protection. In: Immediate and Low Level Effects of Ionizing Radiation. A.A. Buzzati-Traverso (Ed.), Taylor and Francis, Ltd. London.
- BRUES, A.M., y G.A. SACHER, 1962. In: Aging and Levels of Biological Organization, Univ. of Chicago Press:353.
- BUCHER, N.L.R. 1967. Experimental aspects of hepatic regeneration. N. Engl. J. Med. 277:686-696, 738-746.
- BYERS, H.L. y H.J. MULLER, 1952. Influence of aging at two different temperatures on the spontaneous mutation rate in mature spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. Genetics. 37:570-571.
- CALDECOTT, R.S., 1961. In: Effects of Ionizing Radiation on Seeds, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- CASARETT, G.W., 1964. Similarities and contrasts between radiation and time pathology. In: Advances in Gerontological Research, Vol. 1. B.L. Strehler (Ed.), New York and London, Acad. Press:109-163.
- CLARK, A.M., 1957. The relation of genome number to radiosensitivity in *Habrobracon*. Am. Naturalist 41:111-119.
- CLARK, A.M. y E.M. KELLY, 1950. Differential radiosensitivity of haploid prepupae and pupae of *Habrobracon*. Cancer Research. 10: 348-352.

- CLARK, A.M. y M.A. RUBIN, 1961. The Modification by Irradiation of the Life Span of Haploids and Diploids of the Wasp, *Habrobracon* sp. Radiation Res. 15:244-253.
- CLARKE, J.M. y J. MAYNARD SMITH, 1966. Nature. 209:627.
- COMFORT, A., 1956. In: The Biology of Senescence. Routledge y Paul Kegan, London.
- COMFORT, A., 1968. Feasibility in Age Research. Nature. 217:320-322.
- COMMONER, B., J.J. HEISE, B.B. LIPPINCOT, R.E. NORBERG, J.V. PASSO-NEAU y J. TOWNSED, 1957. Biological activity of free radicals. Science. 126:57-63.
- COMMONER, B., J. TOWNSED Y G.E. PAKE, 1954. Free radicals in biological materials. Nature. 174:689-691.
- CONGER, A.D., 1961. In: Recovery of cells from injury, Oak Ridge National Laboratory. Symposium 27-32.
- CONGER, A.D. y M.L. RANDOLPH, 1959. Radiation Res. 11:54-66.
- CONNELL, D.I. y P. ALEXANDER, 1959. The incidence of hepatomas in irradiated and non-irradiated CBA male mice as a criterion of ageing. Gerontologia. 3:153-158.
- CROW, J.F. y R.G. TEMIN, 1964. Evidence for the partial dominance of recessive lethal genes in natural populations of *Drosophila.* Amer. Nat. 98:21-33.
- CROWLEY, C. y H.J. CURTIS, 1963. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 49: 626-628.
- CURRAN, P.F., E.W. WEBSTER y J.A. HOVSEPIAN, 1960. The effect of X-irradiation on sodium and water transport in rat ileum. Radiation Res. 13:369-380.
- CURTIS, H.J., 1958. Comparison of Life-Shortening Effects of Toxic and Radiation Stresses. Radiation Res. 9:104.
- CURTIS, H.J., 1961. In: Radiobiology, D.L.T. Ilbery (Ed.), Butterworth, London:193.
- CURTIS, H.J., 1963. Biological Mechanisms Underlying the Aging Process. Science. 141:686-694.

- CURTIS, H.J. y C. CROWLEY, 1963. Chromosoma aberrations in liver cells in relation to the somatic theory of aging. Radiation Res. 19:337-344.
- CURTIS, H.J. y K. GEBHARD, 1958. The relative biological effectiveness of fast neutrons and X-rays for life shortening in mice. Radiation Res. 9:278-284.
- CURTIS, H.J. y K. GEBHARD, 1960. Aging effect of toxic and radiation stresses. In: The Biology of Aging, B.L. Strehler (Ed.), Waverly Press, Baltimore:162-166.
- CURTIS, H.J. y R. HEALEY, 1957. Effects of radiation on aging. In: Advances in Radiobiology. G.C. de Hevesy, A.G. Forssberg y J.D. Abbatt (Eds.) Oliver and Boyd, Edinburgh:261-265.
- CURTIS, H.J., J. LEITH y J. TILLEY, 1966. J. Geront. 21:268-270.
- CURTIS, H.J., J. TILLEY y C. CROWLEY, 1964. In: Biological Effects of Neutron and Proton Irradiation, Vol. II. Vienna, IAEA:143-155.
- DALE, W.M., 1952. Disc. Farady Soc. 12:293.
- D'ALELIO, G.F., 1952. Fundamental Principles of Polymerization, John Wiley and Sons, New York.
- DARDEN, E.B., M. BRADLEY y C.A. UPTON, 1963. Influence of early sublethal whole body irradiation and of breeding status on thermal aging of collagen fibers in the mouse. Radiation Res. 19:190-191.
- DE DUVE, C., 1959a. In: Subcellular Particles, T. Hayashi (Ed.), Ronald, New York:128.
- DE DUVE, C., 1959b. Exp. Cell Res., Suppl. 7:169.
- DE DUVE, C., 1964. Fed. Proc. 23:5, 1045.
- DE ROBERTIS, N. y F.A. SAEZ, 1960. In: General Cytology, 3rd. Ed. Saunders, Philadelphia:555.
- DOBZHANSKY, TH., 1958. Genetics and homeostasis of senility. Ann., N.Y. Acad. Sci. 71:1234-1241.
- EHRENBERG, A., 1961. Free Radicals in Biological Systems, Academic Press, N.Y.:337-350.
- EHRENBERG, A. y L. EHRENBERG, 1958. Ark. Fys. 14:133-141.

- FAHMY, O.G. y MJ. FAHMY, 1956. Differential genetic response to the alkylating mutagens and X radiations. Genetics. 54:146-164.
- FAILLA, G., 1958. The aging process and cancerogenesis. Proc. N.Y. Acad. Sci. 71:1124-1140.
- FAILLA, G., 1960. In: The Biology of Aging, B.L. Strehler (Ed.), American Institute of Biological Sciences, Wash, D.C.:170-175.
- FAILLA, G. y P. Mc CLEMENT, 1957. The shortening of life by chronic whole-body irradiation. Am. J. Roent., Rad. Ther., and Nuc. Med. 78:946-954.
- FAILLA, G. y P. Mc CLEMENT, 1960. Long-term effects of radiation. In: Transactions of IXth Intern. Cong. Radiol. Munich:1195-1203.
- FANESTIL, D.D. y C.H. BARROW, 1965. J. Geront. 20:462-469.
- FELIX, R., 1969. Control of bacterial contamination in *Drosophila* food medium. Drosophila Information Service. 44:131.
- FELIX, R. y J. RAMIREZ, 1967. Differential life shortening induced by irradiation with electrons in species of *Drosophila*. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México 38, Ser. Biol. Exp. (1):5-10.
- FELIX, R. y J. RAMIREZ, 1969. A procedure for analyzing interspecific differences in the reduction of the life span of *Drosophila* species exposed as young adults to irradiation. Drosophila Information Service. 44:81-84.
- FELIX R., J. RAMIREZ, O. OLVERA y V.M. SALCEDA, 1970a. Mortalidad y acortamiento del período de vida media inducidos por la irradiación con dosis subletales de electrones acelerados en adultos de *Drosophila melanogaster*. In: I. Simp. Mex. Mut. Esc. Nac. Agr. (En prensa).
- FELIX, R., J. RAMIREZ, V.M. SALCEDA y A. DE GARAY A., 1970b. Efecto de los compuestos antioxidantes: hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado y galato de propilo sobre la vida media en *Drosophila melanogaster*. In: I. Simp. Mex. Mut. Esc. Nac. Agr. (En prensa).
- FORD, C.E., P.L.T. ILBERY y J.F. LOUTIT, 1957. Further cytological observations on radiation chimeras. J. Cellular Comp. Physiol. 50 Suppl. 1:109-121.
- FROIER, K., O. GELIN y A. GUSTAFSSON, 1941. The cytological responses of polyploidy to X ray damage. Botan. Notiser. 2:199-216.

- GRAHN, D. y K.F. HAMILTON, 1957. Genetic variation in the lethal response of four inbred mouse strains to whole body X-irradiation. Genetics. 42:189-198.
- HANDLER, P., 1961. Biochemical considerations of relationships between effects of time and of radiation on living systems. In: Radiation and Ageing, P. Handler (Ed.), Fed. Proc. 20 No. 2 Suppl. 8:8-13.
- HARMAN, D., 1961. J. Gerontol. 16:247.
- HARMAN, D., 1962. Role of Free Radicals in Mutation, Cancer, Aging and the Maintenance of Life. Radiation Res. 16:753-763.
- HARMAN, D., 1968. Free Radical Theory of Aging: Effect of Free Radical Reaction Inhibitors on the Mortality Rate of Male LAF<sub>1</sub> Mice. J. Gerontol. 23:476-482.
- HARMAN, D., 1969. Prolongation of Life: Role of Free Radical Reactions in Aging. J. Amer. Geriat. Soc. 17:721-735.
- HARMAN, D. y L.H. PIETTE, 1966. Free Radical Theory of Aging: Free Radical Reactions in Serum. J. Gerontol. 21:560-565.
- HARRIS, R.J.C. (Ed.), 1962. Cellular Basis and Aetiology of Late Somatic Effects of Ionizing Radiation, Academic Press, Inc., New York.
- HARRISON, B.J. y R. HOLLIDAY, 1967. Nature. 213:990.
- HAYFLICK, L., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cells strains. Exp. Cell. Res. 37:614-636.
- HEMPELMANN, L.H. y J.G. HOFFMAN, 1953. Practical aspects of radiation injury. Ann. Rev. Nuclear Sci. 3:369-389.
- HENSCHEN, F., 1968. Morphological aspects on the process of aging (Thule International Symposia). A. Engel y T. Larson (Eds.), Stockholm. Nordiska Bokhandels Forlag:61-82.
- HOFFMAN, J.J., 1968. Cell renewal patterns. N. Engl. J. Med. 279: 248-258.
- INGRAM, D.J.E., 1958. Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance, Academic Press, New York.
- JACOBS PATRICIA, A., M. BRUNTON y W.M. COURT BROWN, 1964. Cytogenetic Studies in leucocytes from the general population: subjects of 65 years or more. Ann. Hum. Genet. 27:353-365.

- JACOBS, PATRICIA A., W.M. COURT BROWN y R. DOLL, 1961. Nature. 191: 1178.
- JOHNSON, H.A., 1963. Redundancy and biological aging. Science. 141: 910-912.
- JONES, H.B., 1956. In: Advances in Biological and Medical Physics, J.H. Lawrence y C.A. Tobias (Eds.), Academic Press, New York, Vol. 4:281.
- KALLMANN, F.J. y L.F. JARVIK, 1959. Individual differences in constitution and genetic background. In: Handbook of Aging and the individual: Psychological and biological aspects. J.E. Birren (Ed.), Chicago. University of Chicago Press:216-263.
- KALLMAN, R.F. y H.I. KOHN, 1958. Life-shortening by whole and partial-body X-irradiation in mice. Science. 128:301-302.
- KELLY, L.S., 1959. In: Proceedings of a Conference on Radiobiology at the intracellular level, T.G. Hennesy y B.H. Levedhal (Eds.) Pergamon Press, London:150.
- KELLY, L.S., 1961. Radiosensitivity of biochemical processes. Brookhaven Symp. in Biology, Fundamental Aspects of Radiosensitivity. 14:32-52.
- KIRBY-SMITH, J.S. y M.L. RANDOLPH, 1960. In: Immediate and low level effects of ionizing radiation. A.A. Buzzati Traverso (Ed.), Taylor and Francisc Ltd., London:11-24.
- KOHN, H.I. y P.H. GUTTMAN, 1963. Age at Exposure and the Late Effect of X-Rays. Survival and Tumor Incidence in LAF<sub>1</sub> Mice Irradiated at 1 to 2 Years of Age. Radiation Res. 18:348-373.
- KOHN, H.I. y R.F. KALLMAN, 1956. Age, growth, and the LD50 of X-rays. Science. 124:1078.
- KOHN, R.R., 1966. A possible final common pathway for natural ageing and radiation induced life-shortening. Proc. Coll. Radiation and Ageing. P.J. Lindop y G.A. Sacher (Eds.), Taylor and Francis, - Ltd., London:373-392.
- KONO, T., F. KAKUMA, M. HOMMA y S. FUKUDA, 1964. The electron microscope structure and chemical composition of the isolated sarcolemma of the rat skeletal muscle cell. Biochim. Biophys. Acta. 88:155-174.
- KONZAK, C.F., R.A. NILAN, J.R. HARLE y R.E. HEINER, 1961. In: Fundamental aspects of radiosensitivity, Brookhaven Symposium in Biology. 14:128-157.

- KORENCHEVSKY, V., 1961. In: Physiological and Pathological Aging. Hafner Publishing Co. Inc., New York:514.
- KROHN, P.L., 1963. Proc. Roy Soc. B157:128-147.
- KROHN, P.L. (Ed.), 1966. Topics in the Biology of Aging. A Symposium Held at the Salk Institute for Biological Studies, John Wiley and Sons, New York.
- LAMB, M.J., 1966. The relationship between age at irradiation and life shortening in adult *Drosophila*. In: Radiation and Aging. P.J. Lindop y G.A. Sacher (Eds.), London: Taylor y Francis.
- LANSING, A.I., 1959. General Biology of senescence, In: Handbook of Aging and the Individual: Psychological and biological aspects. J.E. Birren (Ed.), Chicago, University of Chicago Press 119-135.
- LESSLER, M.A., 1959. Low-Level X-ray damage to amphibian erythrocytes. Science. 129:1551-1553.
- LINDOP, P.J. y J. ROTBLAT, 1961. Long-term effects of a single whole-body exposure of mice to ionizing radiation. I. Life shortening. Proc. Roy. Soc. B154:332-349.
- LINDOP, P.J. y J. ROTBLAT, 1962. The age factor in the susceptibility of man and animals to radiation. I. The age factor in radiation sensitivity in mice. Brit. J. Radiol. 35:23-31.
- LINDOP, P.J. y G.A. SACHER (Eds.), 1966. Radiation and Aging. Proceedings of a Colloquy Held in Semmering, Austria, Taylor and Francis Ltd., London.
- LOFTFIELD, R.B., 1963. Biochem. J. 89:82.
- MAYNARD SMITH, J., 1959. Nature. 184:956.
- MAYNARD SMITH, J., 1962. Proc. Roy. Soc. B157:115.
- MAYNARD SMITH, J., 1966. In: Topics in the Biology of Aging. A Symposium Held at the Salk Institute for Biological Studies, John Wiley and Sons, New York:9-36.
- MCCAY, C.M., 1952. In: Cowdry's Problems of Aging, 3rd ed., A.L. Langing (Ed.), Williams and Wilkins, New York: 139-202.
- MEDAWAR, P.B., 1945. Modern Q. 1:30.

- MICHEALIS, L., 1951. Theory of oxidation - reduction. In: The Enzymes. J.B. Sumner y K. Myrback (Eds.). 1st. ed., Vol. II, Parte I, Cap. 44, Academic Press, New York.
- MULLER, H.J., 1928. The measurement of gene mutation rate in *Drosophila*, its high variability, and its dependence upon temperature. Genetics. 13:279-357.
- MULLER, H.J., 1945. Age in relation to the frequency of spontaneous mutations. In: Drosophila Year Book of the American Philosophical Society:150-153.
- MULLER, H.J., 1954. The nature of the genetic effects produced by radiation. In: Radiation Biology, Vol. I: High Energy Radiation, A. Hollaender (Ed.), Mc Graw-Hill Co., Inc., New York:351-473.
- MULLER, H.J., 1960. The chromosomal basis of the mortality induced by X rays in *Drosophila*. In: Immediate and Low Level Effects of Ionizing Radiations. Buzzati-Traverso, A.A. (Ed.), London, England Taylor and Francis Ltd., Publishers:321-325.
- MULLER, H.J. y S.L. CAMPBELL, 1950. Further evidence that most "recessive" genes exert their main action as dominants. Quoted by H.J. Muller in Our Load of Mutations. Amer. J. Human Genet.2.
- MULLER, H.J., E. CARSON y A. SCHALET, 1961. Mutation by alteration of the already existing gene. Genetics. 46:213-226.
- MULLINS, G.L. y W.G. GUNTHEROTH, 1965. A collagen net hypothesis for transference of smooth muscle. Nature. 206:592-594.
- NOTHEL, H., 1963. Different types of mortality including prolongation of female lifetime after X-raying *Drosophila melanogaster* imagines. (Abstr.) Genetics Today. Proceedings of XI International Congress of Genetics, The Hague, September, Vol. I. Gerts - S.J. (Ed.), Oxford, Pergamon Press:72-73.
- O'BRIEN, R.D. y L.S. WOLFE, 1964. Radiation, radioactivity and insects. New York y London: Academic Press.
- ODERR, C., 1964. Architecture of the lung parenquima, studies with a specially designed X-ray machine. Amer. Rev. Resp. Dis. 90: 401-410.
- ORGEL, L.E., 1963. Proc. US Nat. Acad. Sci. 49:517.
- OSTER, I.I., 1959a. Genetic basis of X-ray induced somatic damage. In: Radiation Biology: Proceedings of the Second Australasian Conference on Radiation Biology. Martin, J.H. (Ed.), New York, N.Y. Academic Press Inc., Publishers:268-271.

- OSTER, I.I., 1959b. Evidence of genetic basis for X-ray induced life-shortening. Science. 120:1286-1287.
- OSTER, I.I., 1961. Radiation effects on genetic systems. Conference on Research on the Radiotherapy of Cancer, Proceedings published by the American Cancer Society:45-50.
- OSTER, I.I. y A. CIOAK, 1968. Mortality of irradiated pre-imaginal stages of *Drosophila*. Drosophila Information Service. 32:143-144.
- OSTERTAG, W. y H.J. MULLER, 1959. Genetic basis of somatic damage Produced by radiation. Science. 130:1422-1423.
- PATTERSON, E.C., W. GILBERT y J. MATTHEWS, 1952. Time intensity factors of whole-body irradiation. Brit. J. Radiol. 25:427-433.
- PATTERSON, J.T., W. BRESTER y A.M. WINCHESTER, 1932. J. Hered. 23: 325.
- PEARL, R., 1928. The rate of living. Knopf, New York.
- PLOUGH, H.H., 1942. Temperature and spontaneous mutation. In: Biological Symposia, Vol. VI, part I, Temperature and Evolution. J. Cattell (Ed.), Jacques Cattell Press, Lancaster, Pa.:9-20.
- PRITCHARD, E.T. y H. SINGH, 1960. Lipid peroxidation in tissues of vitamin E deficient rats. Biochem. Biophys. Research Commun. 2: 184-188.
- RANDOLPH, M.L. y A.A. HABER, 1961. In: Effects of ionizing radiation on seeds, IAEA, Vienna:57-65.
- RICHMOND, M.H., 1962. Bact. Rev. 26:398.
- SACHER, G.A., 1956. On the statistical nature of mortality with special reference to chronic irradiation mortality. Radiobiology. 67:250-257.
- SACHER, G.A., 1957. Dependence of acute radiosensitivity on age in adult female mouse. Science. 125:1039-1040.
- SELYE H. y P. PRIORESCHI, 1960. Stress Theory of Aging. In: Aging, Some Social and Biological Aspects. Symposia Presented at the Chicago Meeting. Pub. No. 65 of the Amer. Assoc. Adv. Sci., Wash. D.C.:261-272.
- SHOCK, N.W. (Ed.), 1960. Aging. Some Social and Biological Aspects. Symposia Presented at the Chicago Meeting, Pub. No. 65 of the Amerc. Assoc. Adv. Sci., Wash., D.C.

- SHOCK, N.W. (Ed.), 1962. Biological Aspects of Aging, Columbia University Press:391.
- SIMINOVITCH, L., J.E. TIL y E.A. McCULLOCH, 1964. Decline in colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice. J. Cell. Comp. Physiol. 64:23-32.
- SONNENBLICK, B.P. y L.P. GARTNER, 1967. Lifespan studies with strains of gamma-irradiated *Drosophila* adults. (Abstr. Ev-3). Radiation Res. 32:612.
- SOUKUPOVA, M., E. HOLECKOVA y P. HNEVKOVSKY, 1970. Changes of the latent period of explanted tissues during ontogenesis. In: Aging in Cell and Tissue Culture. E. Holechová, V.J. (Ed.), Cristofa-To. New York. Plenum Press:41-56.
- SPARRMAN, B., L. EHRENBERG y A. EHRENBERG, 1959. Acta chem. scand. 13:199-200.
- STERN, C. y E. NOVITSKI, 1948. The viability of individuals heterozygous for recessive lethals. Science. 108:538-539.
- STEVENSON, K.G. y H.J. CURTIS, 1961. Chromosomal Aberrations in Irradiated and Nitrogen Mustard Treated Mice. Radiation Res. 15:774-784.
- STREHLER, B.L., 1959. Origin and comparison of the effects of time and high-energy radiations on living systems. Quart. Rev. Biol. 34:117-142.
- STREHLER, B.L. (Ed.), 1960. The Biology of Aging, Pub. No. 6. Amer. Inst. Biol. Sci. Wash., D.C.:364.
- STREHLER, B.L., 1962. Further Studies on the Thermally Induced Aging of *Drosophila melanogaster*. J. Gerontol. 17:347-352.
- STREHLER, B.L., D.D. MARK, A.S. MILDVAN y M.V. GEE, 1959. J. Geront. 14:430-439.
- STRØMNAES, Ø., 1959. Hereditas. 45:221.
- SZILARD, L., 1959. On the nature of the aging process. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 45:30-45.
- TAPPEL, A.L., 1955. Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin-compunds. J. Biol. Chem. 217:721-733.

- TIMOFEEFF-RESSOVSKY, N.W., 1939. Uber die wirkung der temperatur and den Mutationsprozess bei *Drosophila melanogaster*. I. Versuche innerhalb normalen temperatur-grenzen. Z. Ind. Abst. Vererb. 70:125-126.
- TOBIAS, C.A., 1952. The dependence of some biological effects of radiation on the rate of energy loss. In: Symposium on Radiobiology. J.J. Nickson (Ed.), John Wiley & Sons, New York:357-383.
- UPTON, A.C., 1957. Ionizing radiation and the aging process. A review. J. Gerontol. 12:306-313.
- UPTON, A.C., 1960. Ionizing radiation and aging. Gerontologia. 4: 162-176.
- UPTON, A.C., A.W. KIMBALL, J. FURTH, K.W. CRISTENBERRY y W.H. BENEDICT, 1960. Some delayed effects of atom-bomb radiations in mice. Cancer Research. 20:1-62.
- VERZAR, F., 1957. Studies on adaptation as a method of gerontological research. In: Methodology of the Study of Aging, G.E.W. Wolsthenholme y M. O'Conner (Eds.), Little Brown, Boston, Mass. Vol. 3:60-72.
- VOL HAHN, H.P. y F. VERZAR, 1963. Gerontologia.
- WARD, C.L. y M.A. BIRD, 1962. Genetics. 47:99.
- WATERS, W.A., 1946. The Chemistry of Free Radicals, Oxford University Press, London.