



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

"Efecto de la Clorofilina Sobre las Frecuencias Radio-inducidas de Intercambios Entre Cromatidas Hermanas (ICH) y de Otros Eventos Citogenéticos en Células de la Médula Osea de Ratón In vivo"

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MA. DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ

Director de Tesis:
DR. PEDRO MORALES RAMIREZ

MEXICO, D. F.

1992





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 está 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.

INDICE

Pag

0.	RESUMEN	
00.	INTRODUCCION	
1.	DAÑO BIOLÓGICO INDUCIDO POR RADIACION.....	1
1.1)	Antecedentes.....	1
1.2)	Mecanismos de Acción de la Radiación Sobre la Materia Viva.....	2
1)	Acción Directa (Teoría del "Blanco").....	5
ii)	Acción Indirecta.....	5
1.3)	Efectos Tardíos de la Radiación.....	7
1.4)	Respuesta de Tejidos y Organos a la Radiación.....	7
1.5)	Respuesta Celular a la Radiación.....	9
i)	Citoplasma Celular.....	10
ii)	Núcleo Celular y Efectos Genéticos.....	10
2.	INDICADORES DE DAÑO GENÉTICO POR RADIACION.....	12
2.1)	Intercambio entre Cromatidas Hermanas (ICH).....	13
i)	Antecedentes.....	13
ii)	Significado Biológico.....	17
iii)	Mecanismos de Inducción de ICH.....	19
iv)	Los ICH como indicadores de daño.....	20
v)	Inducción de ICH por Agentes Químicos y Físicos.....	22
vi)	Inducción de ICH por Radiación.....	23
2.2)	Índice Mítico (IM).....	24
2.3)	Tiempo Generacional Promedio (TGP).....	28
3.	FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA CELULAR A LA RADIACION.....	28
3.1)	Radioprotección.....	30
3.2)	Tipos de Radioprotección.....	31
i)	Radioprotección Física.....	31
ii)	Radioprotección Química.....	31
iii)	Radioprotección Biológica.....	33
3.3)	Antimutagénesis.....	34
3.4)	Mecanismos de Antimutagénesis y Radioprotección.....	34

	Pag
4. CLOROFILINA.....	37
4.1) Propiedades Fisicoquimicas.....	37
4.2) Toxicidad.....	39
4.3) Antecedentes.....	39
4.4) Clorofilina como antimutageno.....	40
4.4) Clorofilina como Radioprotector.....	42
4.5) Mecanismos de Accion de la Clorofilina.....	43
III. OBJETIVOS.....	44
1. OBJETIVO GENERAL.....	44
2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	44
IV. MATERIAL Y METODOS.....	45
1. ANIMALES.....	45
2. INCORPORACION DE LA BROMODEOXIURIDINA.....	45
3. COSECIA Y OBTENCION DE PREPARACIONES CROMOSOMICAS.....	46
4. FUNCION DIFERENCIAL DE LAS CROMATIDAS HERMANAS.....	46
5. ADMINISTRACION DE LA CLOROFILINA.....	47
6. IRRADIACION.....	49
7. ANALISIS DE PREPARACIONES.....	49
7.1) ICH.....	49
7.2) IM.....	51
7.3) TGP.....	51
8. PROTOCOLOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES.....	51
9. ESTADISTICA.....	54
V. RESULTADOS.....	56
1. DETERMINACION DE LA CLOROFILINA.....	56
2. TIEMPO DE IRRADIACION.....	56
3. EFECTO DE LA CLOROFILINA.....	60
4. EFECTO DE LA CLOROFILINA VS RADIACION GAMMA.....	62
4.1) Induccion de ICH.....	62
4.2) Efecto sobre el IM.....	73
4.3) Efecto sobre el TGP.....	79
5. COMPARACION DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH Y LA MODIFICACION DEL IM POR RADIACION GAMMA Y EL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL TGP.....	82

	Pag
VI DISCUSION DE RESULTADOS.....	84
1. DETERMINACION DE LA CLOROFILINA.....	84
2. TIEMPO DE IRRADIACION.....	85
3. EFECTO DE LA CLOROFILINA.....	85
4. EFECTO DE LA CLOROFILINA VS RADIACION GAMMA.....	86
4.1) Induccion de ICH.....	86
4.2) Efecto sobre IM.....	89
4.3) Efecto sobre el TGP.....	89
5. COMPARACION DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH Y LA MODIFICACION DEL IM POR RADIACION GAMMA Y EL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL TGP.....	90
6. EFECTOS COLATERALES DE LA CLOROFILINA.....	90
VII CONCLUSIONES Y COMENTARIOS.....	92
VIII BIBLIOGRAFIA.....	93

I. RESUMEN

Se determinó el efecto de la clorofilina sobre la radioinducción de Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH) y de de otros eventos citogenéticos como el retraso en el Índice Mitótico (IM) y variación en el Tiempo Generacional Promedio (TGP), en células de la médula ósea de ratón *in vivo*.

Se observó que la clorofilina protege a las células de la inducción de ICH causados por la radiación en forma dosis-dependiente, que aún a una dosis de 10µg/g protege a las células de la disminución del IM causado por la radiación y que la dosis de radiación empleada no tuvo efecto significativo sobre TGP. Al ser diferentes las dosis mínimas de clorofilina que protege 100% la inducción de ICH y la reducción del IM, indica que no existe relación entre el daño inductor de ICH y el retardo mitótico. Por otra parte se encontró que la clorofilina *per se* acelera el TGP, pero no tiene efecto sobre la inducción de ICH, sobre el IM, ni tampoco mostró tener efecto tóxico notable en los organismos.

Debido a que la inducción de ICH y la disminución del IM causados por radiación son provocados muy probablemente via radicales libres, tal vez el mecanismo radioprotector de la clorofilina es mediante la captura de radicales libres.

II INTRODUCCION

1. DAÑO BIOLÓGICO INDUCIDO POR RADIACION

La vida se ha desarrollado en el mundo bajo fuentes esenciales de energía para los procesos biológicos, en forma de energía radiante o radiación. Existen fuentes naturales de radiación externas como los rayos cósmicos y las sustancias radioactivas del suelo, e internas resultantes de la inhalación o ingestión de sustancias radioactivas que se encuentran en forma natural en el aire y en la dieta. También existen fuentes de radiación artificiales producidas por el hombre para incrementar el desarrollo de la ciencia y la tecnología como los rayos X, aceleradores de partículas, radioisótopos y reactores nucleares. En cantidades extraordinarias las radiaciones producen efectos deletéreos en todas las formas de vida, desde los más simples, hasta los más complejos organismos; los efectos provocados pueden ser micro ó macroscópicos, letales o no letales, e inmediatos o a largo plazo (Casarett, 1968 y UNCEAR, 1982).

La Radiobiología se encarga de estudiar la interacción de la radiación ionizante con los sistemas de vida, siendo una parte importante la investigación de instrumentos y métodos encaminados a la radioprotección (Casarett, 1968).

1.1) Antecedentes

La era de las Radiaciones fué iniciada en 1885 con Wilhem Conrad Röntgen al descubrir los rayos X. Un año después Henri Becquerel, observa por primera vez la radiación emitida por el Uranio, y en 1898 Marie Curie descubre los elementos radioactivos Polonio y Radio (Casarett, 1968 y Selman, 1983).

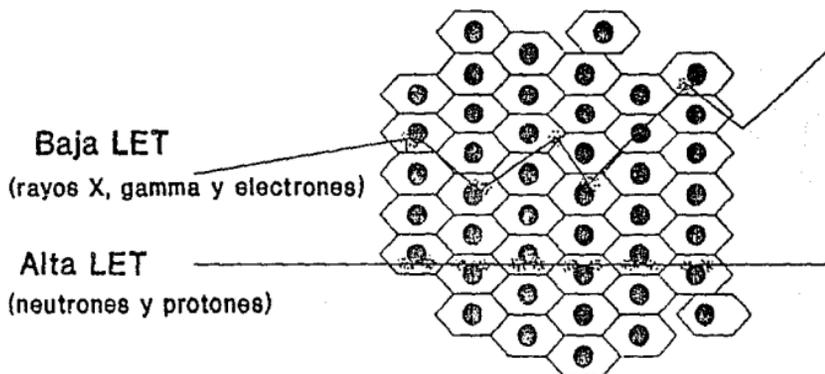
En 1896 aparecen los primeros trabajos que hablan de un posible daño de la radiación sobre las células. En 1899 el Dr. J. T. Stenbeck y T. A. Sjogren, aplican la radiación para remover tumores y controlar el crecimiento celular acelerado.

En 1904 Bergonié y Tribondeau, exponen conejos a radiación observando efectos en las células reproductivas del testículo. En 1905 H. Heinneke, reportó cambios patológicos observados en ratones, cerdos de Guinéa, conejos y perros producidos por radiación. Veinte años más tarde H. J. Muller, al trabajar con *Drosophyla* y L.J. Standler con maíz, confirman que la radiación provoca efectos de tipo genético, a través de mutaciones génicas. En 1956 Puck y asociados reportan el primer cultivo exitoso de células de mamífero bajo condiciones controladas de laboratorio, lo cual abre un nuevo campo de estudio importante para la radiobiología (Casarett, 1968).

1.2) Mecanismos de Acción de la Radiación Sobre la Materia Viva

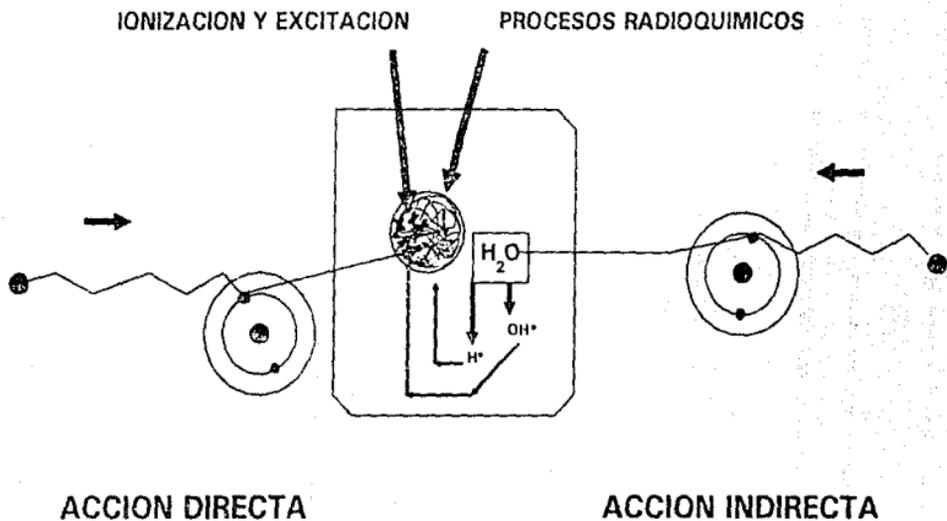
La severidad de los efectos biológicos generados por radiación ionizante dependen de factores físicos, químicos y biológicos. Los daños causados dependen a su vez del tipo de radiación (rayos γ , rayos X, rayos cósmicos, partículas α , partículas β , neutrones y protones), del tiempo de exposición, de la dosis absorbida (aguda o grave), de la transferencia lineal de energía (LET), y la efectividad biológica relativa (Fig.1). Los efectos de las radiaciones se manifiestan en diferentes niveles de organización, el daño causado a nivel molecular en las células se da a través de dos mecanismos de acción directa o indirecta (Fig.2), (Pizzarello, 1982 y Selman, 1983).

FIGURA 1 MECANISMOS DE ACCION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE RADIACION



Las partículas de baja LET liberan iones y excitan átomos en células apartadas. Las partículas de alta LET actúan sobre múltiples agrupamientos.

FIG.2 MODOS DE ACCION DE LA RADIACION.
(SELMAN, 1983)



i) Acción Directa (Teoría del "Blanco")

Esta teoría se refiere a la alta radiosensibilidad en blancos específicos de las células. El daño causado por la radiación es directamente sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN), rompiendo enlaces en la molécula, que provocan rearrreglos en la estructura (mutaciones y rupturas cromosómicas). Este efecto es causado principalmente por partículas cargadas positiva y negativamente como neutrones, protones y partículas alfa (Selman, 1983).

ii) Acción Indirecta

Este mecanismo se refiere a la producción de radicales libres (Átomos o moléculas que tienen un electrón no apareado), a través de cambios que ocurren en el agua intracelular (Radiolisis del agua) y productos del rompimiento de puentes químicos, durante el paso de la radiación ionizante. Los radicales libres pueden reaccionar de alguna forma con otras moléculas ya que son extremadamente reactivos, alterando la secuencia normal de las reacciones intracelulares y ocasionando daño. Los electrones en solución pueden transferir energía a la molécula de ADN.

Los radicales libres más importantes son; H^{\bullet} , OH^{\bullet} y los electrones acuosos ($e^{-}aq$), (Fig.3). Los radicales libres también pueden reaccionar de alguna forma entre ellos o con otras moléculas como se muestra en la fig.4 (Selman, 1983 y Pizzarello, 1982).

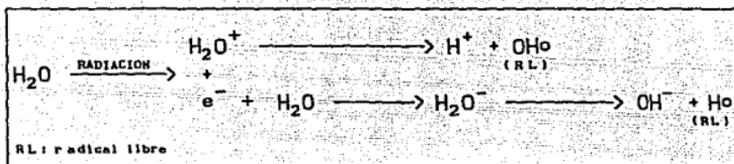


FIGURA NO.3. SECUENCIA DE LA PRODUCCION DE RADICALES LIBRES DEL AGUA, A TRAVES DE LA RADIACION IONIZANTE.

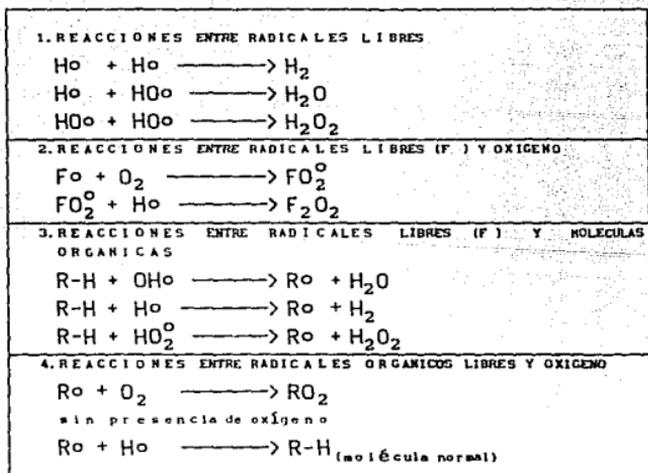


FIGURA NO.4. SECUENCIAS DE ALGUNAS DE LAS REACCIONES DE LOS RADICALES LIBRES, ENTRE ELLOS Y CON OTRAS MOLECULAS.

1.3 Efectos Tardíos de la Radiación

Dependiendo de como se manifiestan existen dos categorías de los efectos causados por la radiación:

A) Efectos estocásticos: se presentan en grupos expuestos a dosis bajas de radiación ionizante. En esta categoría no se puede predecir con certeza cual de los individuos presentará efectos, cuya frecuencia sólo puede ser detectada por métodos estadísticos, por ejemplo leucemia y cancer en mamas.

B) Efectos no estocásticos: se presentan en individuos expuestos a dosis altas de radiación ionizante. Los efectos somáticos se manifiestan con seguridad y son la carcinogénesis y el acortamiento de vida (Selman, 1983).

1.4 Respuesta de Tejidos y Organos a la Radiación

La exposición a la radiación ionizante es limitada por la tolerancia de los tejidos (capacidad del tejido normal a recuperarse de un efecto dañino). De acuerdo a su particular sistema de renovación (reemplazamiento de las células maduras por primordiales), las poblaciones celulares se clasifican en:

A) De renovación rápida o vertical: la sobrevivencia de el individuo depende de reemplazamientos rápidos de las últimas células maduras, por proliferación a partir de las células primordiales y su eventual diferenciación. Ejemplo; la médula ósea, los gametos masculinos, el epitelio intestinal, la vejiga y la piel.

B) De renovación lenta u horizontal: en este sistema las poblaciones de células primordiales no son disponibles. Cuando la pérdida de células maduras excede a un punto crítico las

células maduras vuelven a dividirse, repoblándose las subpoblaciones. Ejemplo; hígado, glándula tiroideas, vasos sanguíneos, glándula salival, riñón, pulmones y cartilago en crecimiento.

C) Poblaciones irrenovables: estas líneas celulares han perdido la habilidad para mantenerse ellas mismas ya que no tienen células primordiales en las subpoblaciones y las células maduras no pueden entrar en mitosis. Ejemplo; células nerviosas, células musculares del corazón, esqueleto y órganos de los sentidos (Casarett, 1968; Pizzarello, 1982 y Selman, 1983).

La prontitud con que se expresa la severidad del daño por la radiación depende del intervalo de tiempo entre la muerte de las células maduras y la llegada del reemplazamiento celular de las subpoblaciones. Las células primordiales en las poblaciones de renovación vertical, son las primeras afectadas ya que las células maduras tienen un intervalo de vida corta. En las poblaciones de renovación horizontal, los daños causados por la radiación no se manifiestan intensamente, ya que esta particularidad le confiere a las células menor sensibilidad; además de no tener un banco viable de células precursoras radiosensibles y que las células maduras tienen un intervalo largo de vida, (Selman, 1983).

Los efectos radiobiológicos en el individuo seguidos de una exposición con dosis casi-letal y letal de radiación ionizante se les llama síndromes de radiación aguda. Los tres efectos principales por los que atraviesa un organismo después de una larga exposición de radiación son:

A) Necrosis o muerte celular; los órganos más radiosensitivos sufren una destrucción como los nudos linfáticos, órganos hematopoyéticos, gónadas, epitelio gastrointestinal y piel.

El Hemorragia: se presenta un sangrado principalmente en la piel, órganos internos, tracto gastrointestinal y respiratorio por la supresión de la formación de plaquetas.

El Infección: sobreviene a causa del agotamiento de las defensas del cuerpo (supresión del mecanismo inmune), causando debilidad general.

El Síndrome Hematopoyético provocado por la radiación, se presenta principalmente en médula ósea, la incidencia de mortalidad es alta. La muerte es provocada ya que una proporción alta de células primordiales es efectivamente destruida. Se ha estimado que solo 150 Rads en ratones son necesarios o suficientes para disminuir el número de células primordiales y que la LD₅₀ es de 600 Rads, en la cual sólo de 2 a 3 células primordiales retienen su capacidad proliferativa.

Las células de grasa, los macrófagos, las células reticulares y tejido conectivo de médula ósea son relativamente resistentes a la irradiación. Muchas de las células que son precursoras de la red sanguínea, granulocitos, plaquetas son radiosensibles, siendo los eritroblastos los más sensibles. Los mielocitos y megacariocitos son poco radiosensibles. La edad juega un papel importante en la producción de este síndrome (ya que conforme aumenta la edad decrece la producción de células en la médula ósea), (Casarett, 1968; Pizzarello; 1982 y Selman, 1983).

1.5 Respuesta Celular a la Radiación

Al actuar la radiación ionizante sobre los sistemas biológicos, los cambios químicos iniciales son raramente detectados directamente, ya que son reparados casi inmediatamente. Los que no pueden ser reparados y ocurren dentro de importantes estructuras rompiendo y destruyendo

componentes moleculares, provocan alteraciones en las estructuras y mecanismos celulares, lo que conduce hasta la muerte. La transición entre los cambios químicos en un sistema y la manifestación biológica es compleja y aun no se a determinado. Estos cambios inducidos por la radiación se pueden dar a nivel citoplásmico o manifestarse en el núcleo por daño al ADN (Casarett;1968 y Selman;1983).

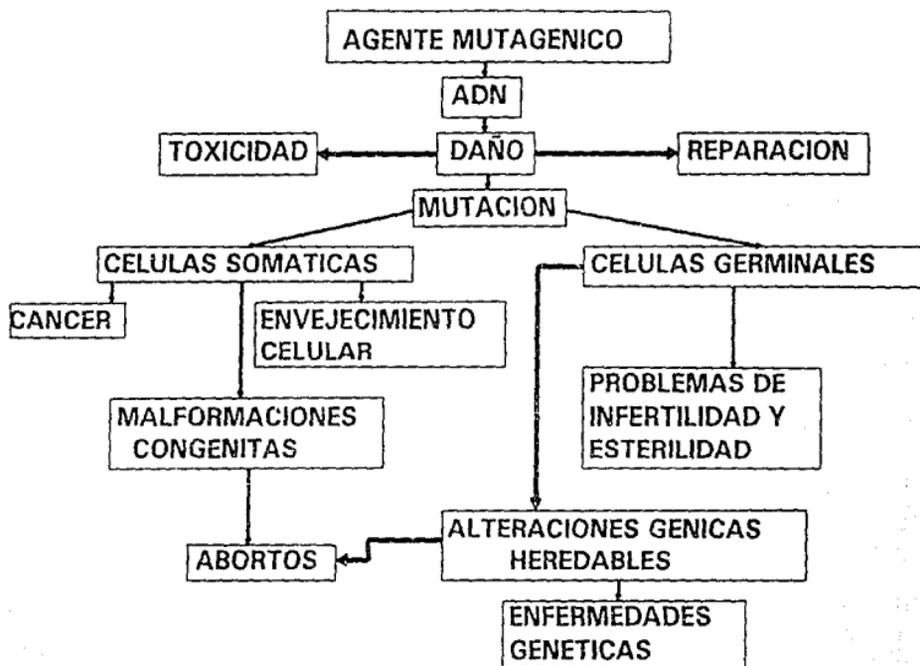
i) Citoplasma celular

Los primeros cambios citoplasmáticos apreciables son; vacuolización, aparición de protuberancias, reducción en el número de polisomas, desintegración de mitocondrias (a grandes dosis), daño en la transferencia de secreciones en la superficie del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, cambios en la permeabilidad de la membrana celular (a bajas dosis, hay cambios de sustancias del interior de la célula al medio y altas dosis se provoca lisis celular) (Selman;1983 y Pizzarello;1982).

ii) Núcleo Celular y Efectos Genéticos

El núcleo celular es el que contiene la información genética que se transfiere de generación en generación a través del ADN, cualquier daño causado puede ocasionar importantes consecuencias (Fig. 5). A nivel molecular los daños causados al ADN por la radiación son; rompimiento de puentes de hidrogeno y de cadenas, producción de enlaces cruzados, alteraciones en el esqueleto azúcar-fosfato y daño en las bases nitrogenadas, lo que trae como consecuencia alteraciones en el ADN para servir como templado en la replicación y la transcripción (Kedar;1984).

FIG.5 DAÑO OCASIONADO POR AGENTES MUTAGENOS
(ALTAMIRANO-LOZANO, 1989)



El daño ocasionado por la radiación se puede transformar en:

A) Mutación; definida como un cambio imprevisto heredable en un cromosoma o gen, no siempre las mutaciones aparecen inmediatamente, pero pueden aparecer en las siguientes generaciones en forma severa. Las mutaciones se pueden presentar:

a) A nivel de genes, ocasionadas por cambios en la secuencia de nucleótidos ya sea por eliminación, adición o sustitución. La radiación puede inducir mutaciones recesivas, las cuales se manifiestan en generaciones futuras sólo si los individuos se aparean con otros que presenten la misma mutación o si ésta se localiza en el cromosoma X de un hijo de la madre irradiada. Las mutaciones pueden ser letales si se manifiestan durante el desarrollo embrionario.

b) A nivel de cromosomas (llamadas aberraciones), caracterizadas por un cambio en el número o estructura física de los cromosomas, la forma en que aparecen depende del momento en el cual se irradie. Las aberraciones incluyen rompimientos que provocan pérdidas o rearrreglos de fragmentos cromosómicos (desde simples nucleótidos hasta fragmentos de cromosomas muy largos).

No se puede diferenciar en todos los casos entre una mutación génica y una cromosómica.

B) Alteraciones en la división celular: manifestadas como retraso o inhibición de mitosis, mitosis anormales, formación de células poliploides y lisis puntuales (Pizzarello;1982 y Selman;1983).

2. INDICADORES DE DAÑO GENETICO POR RADIACION

El daño genético causado por la radiación se puede medir por diferentes parámetros como: inducción de Intercambios

entre Cromátidas Hermanas (ICH) (Abramovsky et al., 1978; Fornace et al., 1980; Renault et al., 1982; Morales-Ramírez et al., 1983 y Morales-Ramírez et al., 1984b), disminución del Índice Mitótico (IM) (Morales-Ramírez et al., 1983), supervivencia y muerte celular (relacionado con la disminución del IM), aumento en el Tiempo Generacional Promedio (TGP) (Morales-Ramírez et al., 1983), reducción de síntesis de ADN, rompimientos de cadenas (sencillas y dobles) (Fornace et al., 1980 y Nagasawa y Little, 1981), frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas (Fornace et al., 1980, Nagasawa y Little, 1981 y Renault et al., 1982) y frecuencia de micronúcleos (Ashby y Brita, 1985).

2.1 Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH)

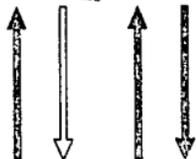
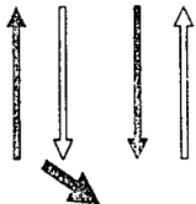
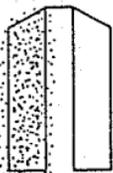
Los ICH son trasposiciones simétricas equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma y representan un intercambio de doble banda entre las moléculas de ADN (Morales, 1984).

i) Antecedentes

McClintock (1938), observó por primera vez en cromosomas en forma de anillo del maíz, la formación de cromosomas dicéntricos, que significaban el doble del tamaño inicial, esto en la actualidad se sabe que correspondía a un ICH. Posteriormente en 1957 se obtiene la primera evidencia directa de los ICH en células de *Bellevaria romana*, utilizando métodos autorradiográficos, que consistieron en la incorporación de la timidina tritiada (H^3), en la primera de dos divisiones, obteniendo al final una cromátida marcada y la otra no (Fig. 6), siendo esto evidencia de la duplicación semiconservativa y la presencia de una sola banda de ADN por

FIGURA 6 EXPERIMENTO DE TAYLOR UTILIZANDO METODOS AUTORRADIOGRAFICOS (Taylor, 1957).

14



Timidina (^3H)
radiactiva

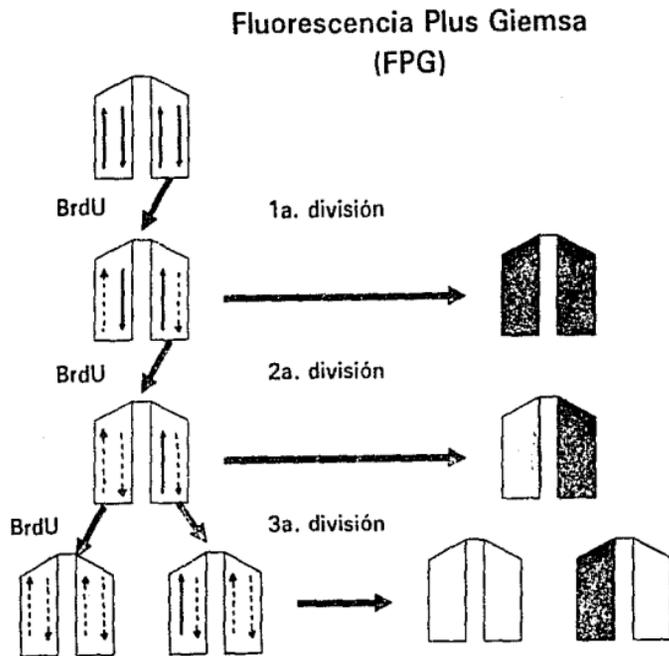
Timidina
no radiactiva

cromátida. En estos cromosomas se observó la presencia frecuente de intercambios de fragmentos de una cromátida a la otra del mismo cromosoma, a lo cual se le llamó ICH (Taylor, 1958).

El método autoradiográfico tenía poca resolución por lo cual se desarrolla otro método basado en la incorporación de un análogo de base de la timidina, la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), durante al menos el primero de dos ciclos replicativos del ADN y el uso de tinción fluorescente con bibenzimida 33258 Hoechst. La tinción diferencial de las cromátidas hermanas por fluorescencia se basa en que la BrdU reduce la fluorescencia del colorante, por lo que al analizarlas en el microscopio de fluorescencia, una cromátida se encuentra bifilarmente sustituida por la BrdU la cual se observa opaca y la otra unifilarmente sustituida se observa brillante. Aunque este método presentaba mayor resolución que el autoradiográfico, ya que los intercambios se detectaban más fácilmente, tenía la desventaja de que la fluorescencia se perdía fácilmente con el tiempo (Latt, 1973). Así surge el método llamado Fluorescencia Plus Giemsa (FPG), el cual se desarrolló haciendo algunas modificaciones, que consistieron en dejar a las células durante dos ciclos de replicación en presencia de BrdU, exponerlas a luz para producir una reacción de fotólisis del ADN bifilarmente sustituido y teñirlas con Giemsa. Con este método se obtiene una tinción pálida en la cromátida bifilarmente sustituida y la cromátida unifilarmente sustituida se tiñe más oscura (Fig.7). Con estas modificaciones las preparaciones además de mayor resolución son permanentes (Perry y Wolff, 1974).

Recientemente han sido desarrollados una serie de modelos *in vivo* basados en la incorporación de la BrdU; a través de inyecciones intraperitoneales múltiples (Allen y Latt, 1976), por infusiones subcutáneas (Pera y Mattias, 1976) o intravenosas (Schneider et al., 1976), por la implantación de tabletas con BrdU pura (Allen et al., 1977), cubierta de

FIG. 7 DIFERENCIACION DE CROMATIDAS HERMANAS POR EL METODO DE FPG (PERRY Y WOLF, 1974)



parafina (McFee et al., 1983) o con agar (King et al., 1982) y por una inyección intraperitoneal de la BrdU adsorbida a carbón activado (Morales-Ramírez et al., 1984a y b), este último se empleó en este trabajo.

ii) Significado Biológico

Actualmente existe gran cantidad de información e investigación acerca de los ICH, por ser un buen indicador de daño genético, aunque el significado biológico no ha sido claramente determinado. La inducción de ICH requiere del paso de las células por síntesis ("S") (Wolff et al., 1974a), ya que los ICH se producen durante o inmediatamente después de que se ha dado la bifurcación en la síntesis de ADN (Kato, 1980a), se ha encontrado que la frecuencia de ICH es mayor en "S" y decrece cuando la célula pasa a "G₂" (Schvartzman y Gutierrez, 1980).

Los mecanismos de formación de ICH aun no han sido determinados, se cree que pueden ser inducidos por diversas causas como son; el daño directo al ADN (Perry y Evans, 1975; Abe y Sasaki, 1977; Nakanishi y Schneider, 1979), por inhibición del proceso de síntesis del ADN (Ishii y Bender, 1980; Rainaldi y Mariani, 1982), por inhibición de las enzimas involucradas en dicho proceso (Ishii y Bender, 1980), por inhibición de enzimas involucradas en la reparación (Oikawa et al., 1980; Morgan y Cleaver, 1982) o por un agente promotor de cáncer no involucrado en la producción de lesiones sobre el ADN (Kinsella y Radman, 1978 y Schwarts et al., 1982).

El proceso de inducción parece producirse de manera espontánea en células que no han sido tratadas o cuando menos no de forma intencional por algún agente inductor de ICH (McClintock, 1938), esto ha sido demostrado *in vitro* (Kato, 1974) e *in vivo* (Tice et al., 1976), al observar que por debajo de determinadas dosis, la frecuencia permanece

constante, lo cual significa que estos valores son los espontáneos. Por otra parte a dosis más altas estos valores se incrementan en forma dependiente de la concentración de la dosis de BrdU administrada. Esto se debe a que la BrdU que no se incorpora al ADN, induce ICH alterando probablemente las pozas metabólicas de los nucleótidos (Davidson et al., 1980).

Se ha determinado mediante la técnica de tinción diferencial de cromátidas en tres tonos, que la frecuencia basal de ICH se incrementa en las tres divisiones sucesivas en la célula, lo que implica que la inyección de BrdU sí influye de manera importante en el valor basal de ICH, ya que ésta tinción implica la incorporación de cantidades crecientes de BrdU (Morales-Ramirez et al., 1987).

El valor basal de los ICH varía dependiendo de: a) el tipo celular, b) la forma de administración de la BrdU, c) las condiciones del medio (temperatura, oxígeno etc.) y d) la realización del experimento *in vitro* o *in vivo* (Kato y Sandberg, 1977; Morgan y Crossen, 1981; Kato, 1980b y Verly et al., 1973).

Morales-Ramirez (1980), detectan los siguientes valores basales de ICH en ratones de la cepa Balb-c *in vivo*, utilizando una inyección intraperitoneal de BrdU adsorbida al carbón activado:

- Espermatogonia 1.7 ICH/célula
- Médula ósea 3.5 ICH/célula
- Glándula salival 5.6 ICH/célula

Por otra parte se estimó que la frecuencia espontánea (la que es independiente de la manipulación experimental), de ICH en la médula ósea de los ratones *in vivo* es de 0.15 ICH/cel./ciclo celular. En este trabajo realizado con la tinción diferencial en tres tonos, la frecuencia de células sin ICH en la primera división es entre 65% y 75% después de tratar a los ratones con 0.25mg de BrdU por gramo de peso (Morales-Ramirez et al., 1987).

Los ICH basales en algunas enfermedades hereditarias y caracterizadas por la inestabilidad de los cromosomas, como el síndrome de Bloom es de 89 ICH/cel., lo cual llama mucho la atención, ya que es posible que en este síndrome se estaría llegando a la saturación o al límite de cuantificación de los ICH's. En otras enfermedades como la anemia de Fanconi y síndrome de Louis-Bar, la frecuencia basal de ICH es igual a la de las células normales (Latt, 1979 y Changati et al., 1974).

iii) Mecanismos de Inducción de ICH

Existen varios modelos propuestos para explicar la inducción de ICH; como el basado en la recombinación bacteriana propuesto por Holliday en 1964, que explica los intercambios con una alternativa de recombinación de doble banda (Morales-Ramírez, et al., 1990). Otro modelo es el propuesto por Painter en 1980, que explica la inducción de intercambios a través de daños que retardan la duplicación, que producen síntesis a diferentes tiempos y rompimientos a nivel de "cluster", para finalmente obtener asociaciones aleatorias entre bandas parentales e hijas, que corresponde a un intercambio entre doble banda. Finalmente Ishii y Bender en 1980, proponen que la inducción de ICH consiste en la desviación replicativa, donde los intercambios espontáneos son el resultado de una ruptura ocasional de las bandas parentales durante la síntesis y su reasociación con las bandas hijas de igual polaridad, por lo tanto los ICH causados son debidos a que el daño causado a una de las bandas, provoca su ruptura a nivel de la bifurcación durante la síntesis, lo cual trae como consecuencia un cambio de vía durante la duplicación que permite llenar el espacio opuesto al daño (citado por Morales, 1984 tesis doctoral).

Por medio del bandeo cromosómico se ha podido determinar que la inducción de ICH no es homogénea a lo largo del

cromosoma y que existen zonas preferenciales, siendo las uniones entre bandas positivas y negativas, las que presentan una mayor frecuencia de ICH (Latt,1974a). Por otra parte, la frecuencia de ICH en la heterocromatina constitutiva del cuello del cromosoma X, es menor que en la eucromatina, tanto para los ICH espontáneos como los inducidos (Carrano y Wolff,1975; Bostock y Christie,1976; Carrano y Johnston,1977 y Crossen,1983).

Se a encontrado que no existe una correlación entre la localización de ICH y los agrupamientos A-T, en los cuales se supone que existe una mayor incorporación de BrdU, por lo tanto la distribución de estos es más azarosa que selectiva (Thust y Ronne,1982).

iv) Los ICH como Indicadores de Daño

La inducción de ICH por agentes mutágenos-carcinógenos, ha sido ampliamente demostrada tanto en sistemas *in vivo* (Stetka y Wolff,1976a; Schreck et al.,1979; Scheider et al.,1976 y Morales-Ramírez et al.,1980), como *in vitro* (Perry y Evans,1975; Stetka y Wolff,1976b; Popescu et al.,1977 y Abe y Sasaki,1977), por agentes químicos de acción directa (Perry y Evans,1975; Nakanishi y Schneider,1979 y Morales-Ramírez et al.,1984b) como indirecta (Stetka y Wolff,1976a y b; Schreck et al.,1979 y Morales-Ramírez,1980), y por agentes físicos como el calor (Kato,1980b), luz Ultravioleta (Wolff et al.,1974a; Mac Rae et al.,1979), ultrasonido (Liebeskind et al.,1979) y Radiación ionizante (Abramovsky et al.,1978; Morales-Ramírez et al.,1983).

El grupo de ICH del programa GENE-TOX de los Estados Unidos de America (Latt et al.,1981), consideran el análisis de ICH como un método alternativo para detectar mutágenos químicos y físicos, además de presentar las siguientes ventajas:

- A) Es excelente para detectar agentes que producen aductos en el ADN.
- B) Es mucho más sensible para detectar mutágenos químicos que el método basado en el análisis de aberraciones cromosómicas.
- C) Hay ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* para detectar tanto mutágenos directos o indirectos, es decir que requieran o no activación metabólica.
- D) Es un método relativamente rápido.
- E) Los sistemas *in vivo* permiten el análisis en tejidos diversos incluyendo células germinales.
- F) Existen sistemas en organismos diversos incluyendo plantas y animales no mamíferos, los cuales pueden ser usados como monitores ambientales de agentes genotóxicos.
- G) Este ensayo puede ser usado en poblaciones humanas.
- H) Existen pocos falsos positivos.

Y como principales desventajas consideran unicamente:

- A) Poco sensible para mutágenos que inducen rupturas dobles.
- B) El desconocimiento de su significado biológico.
- C) El desconocimiento de la correlación de ICH con el número de lesiones.
- D) El efecto sinérgico o aditivo que puede tener la BrdUrd respecto al mutágeno.

El mismo grupo propone que el análisis de ICH, tiene tal reproducibilidad que basta el análisis de 25 células por dosis en los sistemas *in vitro* y para los sistemas *in vivo* se recomiendan tres dosis diferentes, con un mínimo de 3 animales por dosis y un análisis de 25 células por animal.

v) Inducción de ICH por Agentes Químicos y Físicos

Se ha demostrado que algunos agentes químicos alquilantes producen enlaces cruzados en el ADN, que inducen ICH, tal como la mitomicina C y la mostaza nitrogenada. Existen también los agentes monofuncionales que producen aductos, como la mostaza de quinacrina, la adriamicina, el fluorocromo 33258 Hoechst, el metilmetanosulfonato, el etilmetanosulfonato, y el 4-nitroquinoline 1-oxide. También existen agentes como la ciclofosfamida (agente antineoplásico), que requiere activación metabólica para convertirse en un agente alquilante bifuncional activo y causar inducción de ICH (Latt, 1974b; Perry y Evans, 1975).

La producción de monoadductos también puede inducir ICH y son producidos por agentes como la porfiromicina y la decarbamoil-mitomicina-C (derivado monofuncional de la mitomicina C) (Carrano et al., 1979).

Los inhibidores de la síntesis de ADN como la hidroxiaurea, la 1-Darabinofuronasil citosina y la aphidilcolina incrementan los ICH tanto basales como inducidos. Los agentes que bloquean la síntesis de la poly-(adenosina difosfato ribosa) polimerasa (enzima que sintetiza en respuesta a extremos de banda sencilla o doble causadas por duplicación, daño o reparación), producen incremento en la frecuencia de ICH basal (Oikawa et al., 1980; Natarajan et al., 1981) o inducidos (Morgan y Cleaver, 1982).

Se ha encontrado que agentes físicos como la temperatura, luz ultravioleta y el ultrasonido, son capaces de inducir ICH, durante la fase de síntesis, lo cual se asocia con un retraso en el curso de la replicación del ADN (Kato, 1980a; Wolff et al., 1974a; Mac Rae et al., 1979 y Liebeskind et al., 1979).

Existe controversia acerca de cuál es el daño responsable de inducir los ICH. Ishii (1981), propone que los enlaces ADN-proteína son los más probables en la inducción de ICH. Kano y Fujiwara (1981), en un trabajo similar proponen que los

enlaces cruzados son la lesión más eficiente en la producción de ICH. Finalmente Cassel y Latt (1980), sugieren que tanto los monoadductos como los enlaces cruzados son los responsables de la producción de ICH.

vi) Inducción de ICH por radiación

Existen varios trabajos donde se reporta que los ICH son una prueba sensible para la detección de daño causado por radiación a dosis bajas como 0.15 o 0.25 Gy (Abramovsky et al., 1978; Fornace et al., 1980; Renault y Chorounlinkov, 1982; Morales-Ramirez et al., 1983). Por otra parte existen otros trabajos donde se reporta que la radiación no induce ICH (Stenstrand, 1985; Littlefield, et al., 1979; Nakanishi y Schneider, 1979). Otros autores consideran que la radiación si induce ICH's, pero que no son el parámetro adecuado para la medición del daño causado, ya que la inducción es mínima comparada con otras lesiones provocadas como lo son las aberraciones cromosómicas (Perry y Evans, 1975).

Se ha demostrado que la radiación gamma puede inducir ICH tanto en células con su ADN sustituido y no sustituido con BrdU y que la presencia de la BrdU sensibiliza al ADN respecto a la inducción de ICH, por radiación gamma (Morales-Ramirez et al., 1983 y 1984a y b). La lesión inducida por rayos gamma que produce ICH antes de la incorporación de BrdU es estable y no fácilmente reparada persistiendo por lo menos por 8 ciclos celulares después de la irradiación (Morales-Ramirez, 1984). Incluso se ha obtenido evidencia de que las lesiones radioinducidas que dan lugar a los ICH son muy persistentes y llegan a causar ICH en el mismo sitio en divisiones sucesivas (Morales-Ramirez, et al., 1988).

Por otra parte se ha observado que la presencia de oxígeno incrementa más la inducción de aberraciones que de ICH, por radiación gamma. Partiendo de que el oxígeno daña más

a las bases del ADN, entonces los ICH son producidos por daños en las bases más que por rompimientos de cadenas sencillas, mientras que ambos tipos de daño producen aberraciones directa o indirectamente (Andersson, et al., 1981).

2.2) Índice Mitótico (IM)

El IM, indica la proporción de células que se encuentran en división considerando únicamente las células en metafase y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{NO. DE CÉLULAS EN METAFASE}}{1000} \times 100$$

La división celular puede ser alterada por diferentes agentes químicos o físicos y esto se manifiesta como inhibición, retraso o aceleración en la división celular, mitosis anormales, producción de células poliploides y lisis puntuales.

El retraso o inhibición de la mitosis, se presenta por un retraso al principio de la división (el cual se da en la interfase de síntesis), sin embargo las células en el estado posterior pueden continuar el ciclo mitótico. La causa real del retraso mitótico no ha sido encontrada, ya que hasta la siguiente división celular es cuando se pone en evidencia el daño. La inhibición mitótica puede ser completa y permanente, perdiendo la capacidad de reproducirse (muerte mitótica).

La producción de mitosis anormales por radiación se presenta por: a) anafases retrasadas; en la cual un cromosoma de un par homólogo retrasa su migración durante la anafase, como resultado una célula recibe ambos cromosomas normales y la otra célula hija finaliza con un cromosoma anormal o sin cromosoma y b) por la no disyunción; la cual produce algún

efecto debido a la avería del par de cromosomas al no separarse durante la metafase.

La producción de células poliploides por radiación, se debe a que las células continúan la síntesis de ADN, pero no bajo la presencia de mitosis. Estas células poliploides no contribuyen al crecimiento de la población celular.

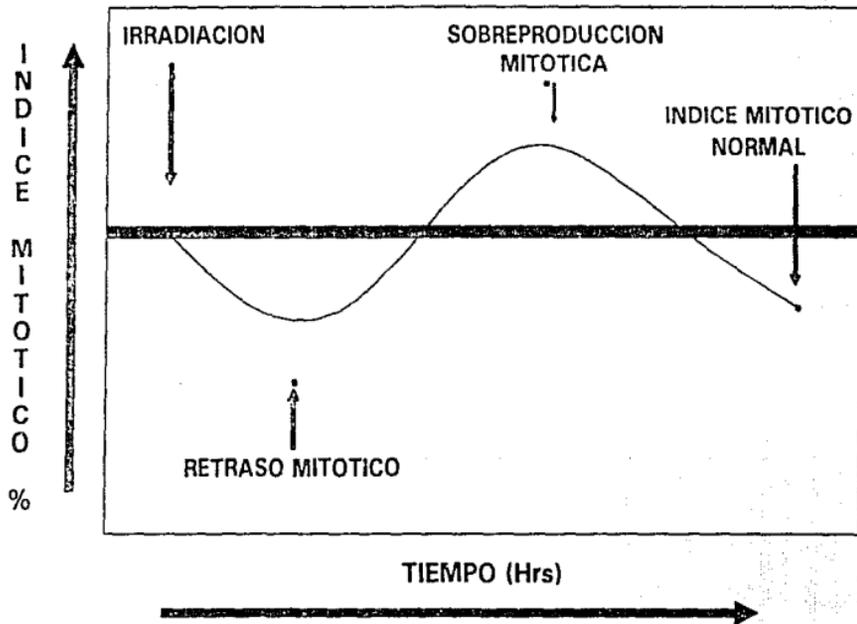
La producción de lisis puntuales por radiación, se debe a que muchas células radiosensibles mueren durante la mitosis inmediata a la exposición de dosis clínica de irradiación. Los linfocitos maduros mueren horas después de la exposición de pequeñas dosis de radiación, esta muerte por lo tanto debe de ocurrir en la interfase, a lo cual se le llama muerte en la interfase o lisis puntual (Selman, 1983).

En las poblaciones de células sincronizadas después de 4 hrs. (células en G₁), se causa el menor retraso mitótico, de 9 a 10 hrs. (células en fase S), se causa retraso intermedio de mitosis, y de 16 a 20 hrs., implica el más alto grado de retraso mitótico en respuesta a la irradiación, por ser administrada antes de la producción de proteínas necesarias para la mitosis (células en fase G₂), (Fig. 8).

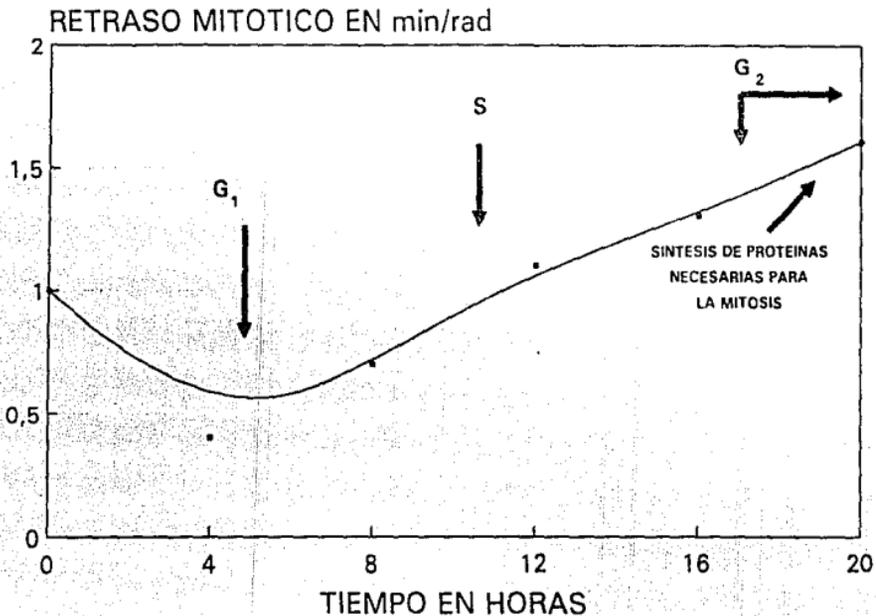
En las poblaciones de células asincrónicas (las células existen en varias fases del ciclo celular), el IM es casi constante. La irradiación causa máxima inhibición o retraso mitótico, en la interfase de profase. Las células afectadas se pueden recuperar y entrar en mitosis con las no afectadas en una frecuencia excesiva de divisiones o sobreproducción mitótica (Fig. 9).

Morales-Ramírez et al. (1983), reportan una disminución en el IM, en células de la médula ósea de ratones irradiados, de tipo dosis-dependiente.

FIG. 8 RECUPERACION DEL IM A TRAVES DEL TIEMPO DESPUES DE LA IRRADIACION



**FIG.9 EFECTO DE LA RADIACION SOBRE EL IM
EN LAS DISTINTAS FASES DE LA DIVISION.**



2.3) Tiempo Generacional Promedio (TGP)

El Tiempo Generacional Promedio (TGP), indica el promedio de tiempo que tardan las células en dividirse y se calcula con base al número de células que se encuentran en primera, segunda y tercera división para un tiempo determinado. Esto se logra por medio de la tinción diferencial de las cromátidas hermanas, donde los porcentajes obtenidos para cada una de las divisiones se aplican en la fórmula desarrollada por Ivett y Tice en 1982, la cual permite establecer la duración promedio del ciclo celular de la siguiente forma:

$$TGP = \frac{T}{(\% 1^{\text{a}} \text{ div.} \times 1) + (\% 2^{\text{a}} \text{ div.} \times 2) + (\% 3^{\text{a}} \text{ div.} \times 3)}$$

DONDE: T= TIEMPO DE ADMINISTRACION DE LA BrdU.

Con este parámetro se puede detectar el efecto causado por algún agente a través de retardo o aceleración en el ciclo celular. Se ha reportado que la irradiación alarga el ciclo de división celular en médula ósea de ratones *in vivo*, siendo una relación dosis-dependiente (Morales-Ramirez et al, 1983; Mendiola-Cruz y Morales-Ramirez, 1989).

3. FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA CELULAR A LA RADIACION

Existe un gran número de factores que pueden modificar la respuesta de las células a la irradiación y son:

A) Tipo y calidad de la radiación; los cuales influyen

directamente sobre la respuesta ya que no todos los tipos de radiación son iguales, por ejemplo en la radiación fotónica (X y gamma), la radiosensibilidad decrece con el incremento de la energía fotónica.

B) Dosificación y reparación; basada en el modelo del "blanco", donde la sobrevivencia celular depende de la fraccionación en la administración de la radiación.

C) Posición de las células en el ciclo reproductivo; la radiosensibilidad de la célula varía durante el ciclo celular, encontrándose que las células son más sensibles durante el proceso de síntesis y poco sensibles en la fase G₂.

D) Oxigenación; la radiosensibilidad de las células se incrementa cuando la presión de oxígeno es alta, alrededor de 30 mmHg.

E) Estado fisiológico; la edad, la condición de los animales de vida (corta o larga), estado endocrinológico y la temperatura del cuerpo, influyen en forma directa sobre la respuesta celular a la irradiación.

F) Modificadores químicos; son sustancias o procedimientos que modifican la respuesta celular a la radiación por dos rutas diferentes:

a) por medio de agentes radiosensibilizadores, los cuales intensifican el el daño causado por la radiación, dentro de estas se encuentran las que producen hipoxia o hiperoxia en las células y los agentes citotóxicos.

b) por medio de agentes radioprotectores, son sustancia o procedimientos que protegen o disminuyen el daño causado por la radiación en las células y por lo regular son aplicados antes de la radiación (Selman, 1983 y Pizzarello, 1982).

3.1) Radioprotección

El incremento en el uso de radiación ha propiciado el aumento en la investigación referente a la radioprotección, los propósitos principales de su estudio son proteger el tejido normal preferentemente durante terapias de irradiación a tejidos malignos (radioterapia) y obtener más información acerca de los mecanismos del daño radioinducido (Kedar, 1984). Con respecto al primer propósito, la investigación no ha sido muy fructífera ya que las dosis requeridas para la radioprotección son tan altas que resultan tóxicas y la administración del radioprotector protege tanto a las células normales como a las células del tumor (Harris y Phillips, 1971 y Yuhas, 1973). También se han empleado combinaciones de radiosensibilizadores para las células tumorales y radioprotectores para las células normales, pero aún no se ha logrado con éxito la aplicación de ambos. En cuanto al conocimiento de los mecanismos de radioprotección al daño radioinducido, se ha avanzado significativamente.

El efecto de un radioprotector va a depender de factores como; la toxicidad del agente, la elección de la dosis a irradiar, la elección de los animales experimentales, la ruta de administración de la droga, y el intervalo de tiempo entre la administración de la droga y la exposición a la radiación.

Es recomendado cuando se va a emplear una sustancia como radioprotector, que se utilice la LD₅₀ en los organismos a tratar, fijar la dosis de irradiación y hacer por lo menos tres dosis diferentes del radioprotector, tomar en cuenta la LET de la radiación empleada y determinar el parámetro indicador de daño a medir (Pizzarello, 1982).

3.2) Tipos de Radioprotección

Existen diferentes tipos de radioprotectores los cuales se pueden clasificar en físicos, químicos y biológicos. Se han estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*, encontrando a su vez que la respuesta entre ambas condiciones difiere muchas veces (Pizzarello, 1982).

i) Radioprotección Física

Dentro de la radioprotección física se encuentra la exposición parcial del cuerpo, que consiste en proteger con capas de plomo aquellos lugares donde se lleve proliferación de células como en médula ósea, de tal forma que al haber sido irradiadas otras zonas y no las células en proliferación estas sustituyan gradualmente las células dañadas evitando un daño más intenso. La temperatura también protege a las células por tener una relación directa con la anoxia, a bajas temperaturas disminuye el consumo de oxígeno hasta un 5%, lo que estimula en el organismo al sistema simpático, liberando una gran cantidad de noradrenalina y adrenalina, que poseen grupos aminos (efectivos radioprotectores químicos) esta es una radioprotección combinada física y química (Pizzarello, 1982)

ii) Radioprotección Química

Los radioprotectores químicos son los más investigados por ser muy eficientes en la inhibición y por su fácil aplicación en la práctica. Para su mayor manejo estos se han clasificado en:

Aminotóles (NH₂ y SH); las aminos sulfhidrílas son efectivos radioprotectores a temperaturas y pH fisiológicos, los

principales son la cisteína, 2-mercapto etilamina (cisteamina), cistamina, aminoetil isotiourea dihidrobromuro (AET) y 2-mercapto etil-guanidina (MEG).

Compuestos con azufre, dentro de estos se encuentran la tiourea, tiouracil, ditiocarbamato, ditiocamidas, tiazolinas, sulfoxidos, sulfones y el dimetilsulfóxido.

Agentes farmacológicos; dentro de estos se encuentran el alcohol (el mecanismo probablemente es por hipoxia), la morfina y la heroína, el salicilato de sodio, reserpina, acetilcolina, metacolina, carbaminoilcolina, epinefrina, metoxamina, dopamina, histamina, serotonina, colchicina y hormonas como estrógenos, testosterona, adrenales y tiroidales.

Agentes radioprotectores no identificados por un grupo especial; dentro de estos se encuentran el cianuro, uracilo, los derivados de ácidos nucleicos tales como el 5-amino-4-metiluracilo, y el 5-amino-4-metiluracilo, fluoroacetato de sodio, para-aminopropiofenona, melitin, endotoxinas, imidazol y 3'5'AMP cíclico (Pizzarello, 1982).

Se ha probado en especial el efecto radioprotector de la Cisteamina sobre la inducción de ICH por radiación, en células de la médula ósea de ratón *in vivo*, encontrando que bajo las condiciones empleadas en su estudio, los ICH son causados por radicales libres producidos por la acción indirecta de la radiación (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1989).

El estudio de radioprotectores químicos como se puede observar es amplio, pero desgraciadamente las cantidades que se necesitan son tóxicas y en muchas ocasiones pueden hasta causar muerte. Lo más importante de su uso experimental, es la información que se ha obtenido y se puede obtener acerca de los diferentes mecanismos de protección (Pizzarello, 1982).

iii) Radioprotección Biológica

Más que radioprotección se puede considerar radiorecuperación y dentro de los principales métodos o procedimientos biológicos a este respecto se encuentran:

La parabiosis; la cual consiste en unir dos organismos permitiendo una circulación cruzada a través de los capilares de la piel, a uno de los organismos se le irradia y al otro se le blinda con plomo, sobreviviendo ambos organismos a una dosis letal.

La implantación de bazo en la cavidad peritoneal de ratones irradiados o inyección de células del bazo; este procedimiento se lleva a cabo después de la irradiación y ayuda a la recuperación del organismo. Se ha encontrado que puede ser inyección intravenosa en lugar de intraperitoneal.

Transplante de médula ósea; este se lleva a cabo por medio de una inyección intravenosa de médula ósea inmediatamente después de la irradiación, se ha encontrado que la inyección intraperitoneal requiere 70 veces más células que la intravenosa.

Varias transfusiones de sangre periférica; este procedimiento también se lleva a cabo después de la irradiación.

Inyección de células no hematopoyéticas; consiste en inyecciones de una suspensión de células de embrión (Pizzarello, 1982).

3.3) Antimutagénesis

Es cada día creciente el número de compuestos químicos o agentes capaces de inducir cambios en el material hereditario con los que el desarrollo moderno ha complicado la existencia actual de la vida moderna, a estos agentes se les llama mutágenos (sustancias capaces de inducir un cambio súbito heredable que afecta el material genético). Para contrarrestar dicho efecto se ha incrementado el estudio de sustancias antimutágenas (sustancias capaces de evitar el daño causado por algún agente mutágeno), variando los mecanismos de protección dependiendo de los mecanismos de acción del mutágeno (Salamanca, 1988).

Existen cerca de 20 diferentes tipos de químicos antimutágenos y anticarcinógenos naturales y sintéticos que se investigan intensamente, pero al igual que los radioprotectores, muchas ocasiones las cantidades son tales que ocasionan citotoxicidad y otros efectos alternos por lo cual su aplicación no es conveniente, pero sí proporcionan las bases de la investigación.

3.4) Mecanismos de Antimutagénesis y Radioprotección.

Dentro de los mecanismos de acción antimutagénicos y carcinogénicos se encuentran:

Al Sustancias inhibidoras de mutágenos de acción extracelular; actúan por; a) inhibición o prevención de la formación en la incorporación del mutágeno o precursor impidiendo la penetración (en el organismo o en la célula) o favoreciendo su eliminación, b) por inhibición de la formación endógena del mutágeno (inhibiendo la reacción de nitrosación o modificando su estructura en la flora intestinal bacteriana) y c) desactivando el mutágeno, por reacciones físicas, químicas o

enzimáticas, de sustancias presentes en las células o en los fluidos que las rodean (en muchas ocasiones estos son metabolitos de bajo peso molecular).

B) Sustancias inhibidoras de mutágenos de acción intracelular; actúan por medio de; a) moduladores del metabolismo ya sea inhibiendo las células en replicación, favoreciendo la secuestro del mutágeno en acción indirecta, inhibiendo la activación de promutágenos o induciendo los mecanismos de detoxificación, b) por bloqueo de moléculas reactivas, reaccionando con electrolitos por reacción química o enzimática, capturando oxígenos reactivos o protegiendo sitios nucleofílicos del ADN. Así mismo por utilización de modulares de reparación y replicación de ADN, incrementando la replicación fiel del ADN, favoreciendo la reparación del daño al ADN o inhibiendo el error propenso reparando la secuencia del ADN, c) neutralizando el promutágeno o la lesión mutágena por varios mecanismos de reparación del ADN, removiendo o evitando lesiones, y d) por la utilización de nuevos mecanismos que aumentan la inducción de reparación libre del ADN por bloques, reparando por errores propensos del ADN o incrementando la activación metabólica de mutágenos.

C) Activación de inhibidores sobre el inicio de células neoplásicas; actúan por medio de; a) la modulación de la promoción del tumor a través de la inhibición de los efectos genotóxicos, captura de radicales libres, inhibición de células en proliferación, inducción de diferenciación celular o modulación de transducción señalada y b) por moduladores de la progresión del tumor por inhibición de efectos genotóxicos, la activación de hormonas de factores de crecimiento, activación del sistema inmune, agentes antineoplásicos físicos, químicos o biológicos y modulación de la transducción señalada (De Flora y Ramel, 1988 y Hartman y Shankel, 1990).

En general los agentes antioxidantes inhiben la mutagénesis y carcinogénesis a través de la captura de radicales libres.

En mutágenos físicos como la radiación ionizante se puede inhibir su efecto indirecto causado principalmente por la producción de radicales libres. Si un antimutágeno es efectivo a través de la captura de radicales libres, entonces también puede ser un efectivo radioprotector para determinados parámetros indicadores de daño producidos por acción indirecta como lo son los ICH.

Se han estudiado sustancias radioprotectoras encontrando que los grupos como los SH y las aminas actúan protegiendo a las células de diversas formas principalmente:

A) Captura de radicales libres; consiste en que el grupo activo del radioprotector inactiva los radicales libres, ya sea; por que reacciona con ellos, los engloba o transforma en compuestos menos tóxicos o inactivos para las estructuras celulares. Sin embargo existen radicales libres como el citrato de sodio y la norepinefrina que se pueden inactivar *in vitro* pero no *in vivo*.

B) Producción de hipoxia; como ya se mencionó la falta de oxígeno en los organismos provoca la secreción de noradrenalina y adrenalina, las cuales son aminas que protegen a las células.

C) Producción de mezclas de enlaces de disulfido; al unirse estos con proteínas, son reducidos por el glutationato reductasa y de esta forma evitan la interacción con los radicales libres, este mecanismo no es del todo aceptado ya que es efectivo solo para proteínas, y no para la molécula ADN.

D) Inhibición reversible del ADN; consiste en inhibir por un

lapso la síntesis del ADN, permitiendo la reparación de los daños causados.

El Competencia por los oxígenos producidos en la radiolisis del agua, con los radicales libres orgánicos; este mecanismo se basa en interferir la reacción que origina los superóxidos (los cuales son muy tóxicos RO_2), capturando los oxígenos y formando compuestos inactivos para las células.

El Transferencia de hidrógenos a la molécula del ADN; esto promueve la reparación de las rupturas o pérdidas de hidrógeno.

Se ha encontrado que en aquellas sustancias donde se combina hipoxia con alguno de los otros mecanismos radioprotectores son más efectivos los resultados (Selman, 1983 y Pizzarello, 1982).

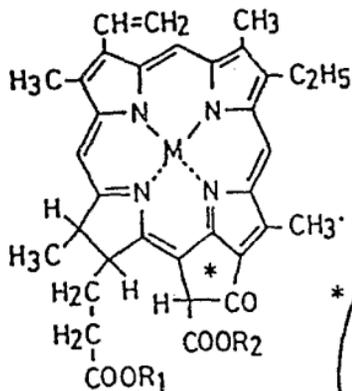
4. CLOROFILINA

4.1 Propiedades Físicoquímicas de la Clorofilina

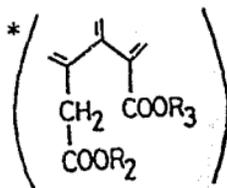
La clorofilina son sales de la clorofila, y se obtienen reemplazando el grupo fitil por algún metal, como puede ser potasio, sodio ó cobre-sodio.

De todas las sales de la clorofila la más empleada terapéuticamente y en la investigación biológica es la clorofilina cuprisódica, la cual se prepara por el método planteado por Schertz Y Toepfer. La clorofilina es una sustancia microcristalina azul oscura que produce el efecto Tyndall en solución acuosa, tiene una característica banda de adsorción de $630m\mu$, es soluble en agua y su fórmula química es; $C_{55}H_{72}Na_4CuO_6$ (Fig.10).

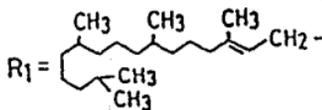
FIG.10 FORMA QUIMICA DE LA MOLECULA DE LA CLOROFILINA (C₃₄H₃₁Na₄CuO₆)



* Clorofilina (Cu Na₃) : M = Cu
R₁, R₂, R₃ = Na



Clorofila a : M = Mg



R₂ = -CH₃

Las sales cuprisódicas de la clorofila (clorofilina), son muy empleadas ya que tienen la ventaja de ser bastante estables solubles en agua y de fácil manejo (INDEX Merck, 1976).

4.2 Toxicidad

Se ha demostrado la nula o baja toxicidad de la clorofilina administrada oral, intraperitoneal, subcutánea e intravenosamente en conejos, perros y humanos (Kephart, 1955 y Young y Beregi, 1980).

Los únicos cambios apreciables que se han encontrado al ser administrada la clorofilina fueron; la coloración verde que presentaron algunos órganos (la cual desapareció después del tratamiento) y el leve incremento de evacuaciones intestinales (Kephart, 1955).

4.3 Antecedentes

Las primeras investigaciones realizadas con compuestos clorofilínicos, fueron encaminadas a su aplicación farmacológica en el tratamiento de la anemia, como agente bacteriostático, agente curativo de infecciones, en hipertensión, higiene oral, desodorante y en la coagulación de la sangre (Kephart, 1955), como medicamento fotosensibilizador y fotoprotector (Zubiri, 1946), en la proliferación del tejido epitelial (Krasnikova, 1974), en el cuidado de pacientes geriátricos (Young y Beregi, 1980), en la cristalización del oxalato de calcio en orina normal (Tawashi et al., 1982) y en la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas (Sato et al., 1984).

Los compuestos clorofilínicos tienen una propiedad sorprendente al concentrarse en los tumores, cuando se inyecta en animales que tienen trasplantes de carcinomas o sarcomas mamarios, permitiendo a los tejidos en crecimiento y las

partes que se están regenerando una afinidad por los compuestos del tipo de las cloroporfirinas, la clorofila se puede etiquetar con cobalto radioactivo para detectar tumores.

4.4) Clorofilina como Antimutágeno

Las primeras investigaciones realizadas en forma, encaminadas hacia el estudio antimutágeno se efectuaron hasta las últimas dos décadas. En los alimentos naturales que diariamente consumimos, se encuentran mutágenos y carcinogénos, así como antimutágenos y anticarcinogénos (Ames, 1983).

La actividad antimutágena de los vegetales en general ha sido demostrada en los principales mutágenos del triptofan pirrolisate (Trp-P-1 y Trp-P-2) en *Salmonella* (Kada et al., 1978; Morita et al., 1978 y Kada, 1984), con mutágenos como el benzo [a] pyreno en el consumo del cigarro en *Salmonella* (Terwel y Van der, 1985), en la inhibición de mutágenos de epóxidos policíclicos aromáticos en *Salmonella* (Wood et al., 1982), en la inhibición mutágena de antimutágenos bio-naturales en el te verde japonés, en *Bacillus subtilis* (Kada et al., 1985).

En vista del éxito antimutágeno de las plantas verdes, se aislaron sus componentes para determinar los grupos activos antimutágenos, encontrando inhibición mutágena en zanahorias causada principalmente por los β -carotenos (Darroudi et al., 1988; Rousseau et al., 1989; Packer et al., 1981; Renner, 1985 y Peto et al., 1981), en los ácidos tánicos (Shimoi et al., 1985), en la vainilla (Inouye et al., 1988), en el grupo protoanemonin (Minakata et al., 1983), en las β -propiolactonas (Shamberger et al., 1979), en los grupos oleicos y linoleicos (Hayatsu et al., 1981), en los grupos fenólicos (Stich et al., 1982), en fibras vegetales (Kada et al., 1984), en ácidos elágicos, en riboflavina, las clorofilas (a y b) y

especificamente en la clorofilina (Lai,1979; Terwel y Vander, 1985 y Ong et al.,1986).

De todos estos componentes antimutagénicos de las plantas verdes destaca la clorofila, por ser uno de los componentes más abundantes de las plantas verdes, por su gran estabilidad, por su poca o nula toxicidad y por efectividad antimutagénica (Kephart,1955 y Ong et al.,1986). Lai (1979), encontró que la clorofila contenida en los brotes de trigo inhibía la activación metabólica de carcinógenos *in vitro* en *Salmonella*. Posteriormente se encontró que el componente activo antimutágeno de la clorofila eran sus sales principalmente las de sodio y cobre (Clorofilina), al encontrar a la clorofilina como el mayor factor antimutágeno, detectado en extractos de brotes de trigo. Los tocoferoles y carotenos entre otros, contribuyeron escasamente en la actividad antimutágena, comparados con la clorofilina (Lai et al.,1980 y Matney,1986).

La investigación sobre las propiedades antimutágenas de la clorofilina se están desarrollando ampliamente y provando con varios mutágenos. Se ha demostrado que la clorofilina inhibe la activación del 3-metilclorantreno y la del benzo [a] pyreno en *Salmonella*, en respuesta dosis-dependiente (Lai et al.,1980). En este mismo año se encontró inhibición mutagénica de productos de pirrólisis (Seis mutágenos) y de otros carcinógenos, por la clorofilina en *Salmonella* (Arimoto et al.,1980a y b). Posteriormente Kato et al. (1983), encuentran inhibición mutagénica del benzo [a] pyreno, por la clorofilina pero en células de Hamster chino.

Terwel y Vander (1985), encontraron actividad antimutágena de la clorofilina, contra el consumo de cigarro y el benzo [a] pyreno en *Salmonella*. Posteriormente Ong et al. (1986) y Feng et al. (1989), reportan actividad antimutágena potente contra mutágenos ambientales y mezclas complejas mutágenas como carnes frías, jugos rojos, vinos rojos, fumar y masticar tabaco, partículas del aire, y emisiones de partículas de diesel en *Salmonella*, encontrando para algunas

hasta una inhibición del 100% y nula toxicidad. Robins (1986), encontró inhibición de la clorofilina a la actividad mutágena del aflatoxin en *Neurospora crassa*.

Hayatsu et al. (1988), encuentran inhibición de la clorofilina a sustancias mutágenas y carcinogénas, en *Salmonella* y Bronzetti et al., (1988), encuentran actividad antimutágena de la clorofilina pero en *Levaduras*.

También existen evidencias en la inhibición de la clorofilina, sobre la genotoxicidad del 3-amino-1-metil-5h-piropido[4,3-b]indole (TrpP-2) en *Drosophyla*, planteando que el mecanismo de antimutagénico es a través de la formación de moléculas complejas con el mutágeno, evitando así su acción (Negishi et al., 1989).

En otros trabajos la clorofilina suprimió con éxito la actividad mutágena del capsacian y el 2-aminoantraceno, junto con otros agentes antimutagénicos en *Capsicum annum*. También se ha encontrado actividad antimutágena de la clorofilina en *D. melanogaster*. Y recientemente se encontró que la clorofilina reduce mutaciones espontáneas en cepas de *E. coli* resistentes a la deoxygalactosa (Rodríguez-Arnaiz y Zimmering, 1989 y Clarke y Shankel, 1989).

Como se puede observar el estudio de la clorofilina como antimutágeno es amplio, ya que ofrece ventajas que otros antimutágenos no tenían, como lo es su nula toxicidad, abundancia en las plantas verdes y su fácil manejo. Aunque tales propiedades de la clorofilina aun no se puedan aplicar, esto establece bases sólidas de la investigación básica acerca de la antimutagénesis, faltando aun mucho por estudiar al respecto, como lo son los mecanismos antimutágenos de la clorofilina.

4.4 Clorofilina como radioprotector

En la actualidad el único trabajo realizado con

clorofilina para tratar de explicar el efecto radioprotector, es el desarrollado recientemente por Zimmering, et al. (1990), en el cual determinaron el efecto de la clorofilina sobre la inducción de mutaciones y recombinaciones en *Drosophyla*, por radiación gamma, encontrando un efecto radioprotector en mutaciones (manchas de tricomas simples en las alas), del 50% y en eventos recombinantes (manchas de tricomas dobles en las alas), del 100%. Ellos plantean la posibilidad de que la protección se deba a una inhibición en el crecimiento celular, lo cual no corresponde a radioprotección. Este planteamiento se contradice, ya que en este mismo trabajo no se encontró toxicidad de la clorofilina y en un reporte anterior de Ong, et al. (1986), tampoco se encontraron evidencias en la inhibición del crecimiento celular, por clorofilina.

4.5 Mecanismos de acción de la clorofilina

Los mecanismos de acción de la clorofilina no están aun determinados, ya que por una parte se piensa que la clorofilina actúa probablemente por bloqueo de activación de enzimas microsomiales de promutágenos a mutágenos, formando complejos inactivos, con los derivados mutagénicos. Al parecer la clorofilina captura los radicales libres, pero no la molécula que en ocasiones es la causante del efecto (ejemplo en el metilmetano sulfonato), (Bronzetti, et al., 1988). Por otra parte se cree que la clorofilina quizá actúa en reacciones con mutágenos aromáticos inactivos en el tracto gastrointestinal (Newmark, 1984).

Negishi et al. (1989), en su trabajo reportan un efecto inhibidor de la clorofilina sobre el Trp-p-2, en *Drosophyla* y *Salmonella*, proponiendo que el mecanismo inhibidor se debe a la formación de complejos de la clorofilina con los mutágenos.

III OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto de la clorofilina sobre la inducción de Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH), reducción del Índice Mitótico (IM) y retraso en el Tiempo Generacional Promedio (TGP) causado por la exposición a 1.0 Gy de radiación gamma. Así como establecer la dosis mínima de clorofilina capaz de proteger completamente a las células de la médula ósea de ratón *in vivo*.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Establecer las condiciones experimentales para administrar la clorofilina e irradiar, así como el planteamiento de protocolos.
- 2) Determinar el efecto de la clorofilina sobre las frecuencias de ICH, el IM y el TGP.
- 3) Determinar el efecto de diferentes dosis de clorofilina sobre la inducción de ICH, disminución del IM y retraso en el TGP inducidos por la exposición a radiación gamma.

IV MATERIAL Y METODOS

1. ANIMALES

Se emplearon ratones machos de la cepa Balb-C de uno a dos meses de edad, con un peso de entre 28 a 32 gramos. Los cuales fueron proporcionados por el bioterio del laboratorio de Radiobiología celular del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Los ratones fueron alimentados con comprimidos purina *ad libitum* y se mantubieron bajo condiciones controladas de temperatura, circulación del aire y período de luz y oscuridad.

2. INCORPORACION DE BROMODEOXIURIDINA

Se suministró a los organismos intraperitonealmente una suspensión acuosa de BrdU, (Sigma Chemicals), adsorbida a carbón activado a dosis de 1.5 mg/g de peso.

La adsorción de BrdU al carbón activado se llevó acabo mediante la agitación de una solución acuosa de BrdU (20mg/ml) con 100mg de carbón activado por ml de solución de BrdU, en la oscuridad durante 5 min. Mediante este procedimiento se observa que hay una adsorción de más de el 95% de BrdU (Morales-Ramírez; 1988). La adsorción se realiza bajo condiciones estériles, el carbón se esteriliza y se deseca en el mechero antes de preparar la suspensión. La solución acuosa de BrdUrd se esteriliza también antes de agregarla al carbón activado pasándola por un filtro millipore de 0.2 micrómetros.

3. COSECHA Y OBTENCION DE PREPARACIONES CROMOSOMICAS

Después de 22 horas de la inyección intraperitoneal de la suspensión de BrdU-Carbón activado, los animales se inyectan con una solución acuosa de colchicina (Sigma Chemical) a una dosis de 7.5mg/kg de peso. Dos horas más tarde los organismos fueron sacrificados por dislocación cervical para extraer ambos fémures, los cuales se cortaron por los extremos para obtener las células de la médula ósea por medio de una inyección de PBS (2ml por hueso). El contenido se recuperó en un tubo y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, el precipitado se resuspendió en 0.5 ml. del sobrenadante para después agregarle 6ml de solución hipotónica (cloruro de potasio 0.075 M), y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó nuevamente a 1200 rpm. durante 5 min., se resuspendió el precipitado en 0.5ml. del sobrenadante y se fijó en 6ml. de Carnoy (Acido acético:Metanol 1:3), durante 10 min., el proceso de fijación se repitió tres veces y en el último cambio se resuspende el precipitado en 0.5ml, para gotear la suspensión en laminillas limpias y frias (3 gotas por laminilla), las cuales se flamearon y se dejaron secar (Fig.11A).

4. TINCIÓN DIFERENCIAL DE LAS CROMATIDAS HERMANAS

Se utilizó la técnica de tinción diferencial de Wolff y Perry (1974b) modificada, usando bibenzimida 33258 Hoechst.

Se agregaron 6 gotas de una solución acuosa de 33258 Hoechst 10^{-4} M sobre las laminillas anteriormente preparadas, y se les colocó un cubreobjetos manteniendose en oscuridad durante 10 min., para después colocarlos en una caja de Petri que contenía buffer amortiguador de fosfatos de sodio, el cual llegaba al ras del portaobjetos, aquí se dejaron bajo una lampara de luz negra (25 Watts) a un centímetro de distancia

durante 1 hr. Transcurrido el tiempo se lavaron las laminillas y se incubaron a 60° C en una solución SSC durante 30 min., después se lavaron con agua caliente (60°C) y fría. Finalmente se tñieron en Giemsa al 5% de amortiguador de fosfatos (0.01M), durante 30 min. (Fig.11B).

5. ADMINISTRACION DE LA CLOROFILINA

La clorofilina (Sigma Chemicals), se administró 4.5 hrs. antes de la inyección de la BrdU, por vía intraperitoneal, a dosis de 100, 50, 10, 5 y 1µg/g de peso en solución acuosa, dependiendo del grupo experimental.

El tiempo fué determinado a través del estudio cualitativo de la absorción de la clorofilina, el cual se realizó debido a que al seguir protocolos establecidos (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1989), la tinción diferencial de las cromátidas hermanas no se obtenía. Se realizó una determinación de las concentraciones de clorofilina en sangre y cavidad peritoneal para evitar el efecto inhibitorio de la clorofilina sobre la absorción de la BrdU.

Los procedimientos que se realizaron consistieron primero en desarrollar una curva patrón por diluciones de distintas concentraciones de clorofilina, las cuales fueron leídas en un espectrofotómetro. La absorción de la clorofilina fué determinada por medio de lavados de la cavidad peritoneal después de la administración de la clorofilina a distintos tiempos. A la solución obtenida se le determinó la densidad óptica en el espectrofotómetro para obtener la concentración. Por otra parte se extrajo el plasma sanguíneo a través de punción cardiaca; centrifugándose la sangre a 1700 rpm. durante 5 min. Finalmente se leyó la densidad óptica del plasma, para extrapolar en la curva patrón realizada y obtener la concentración de clorofilina en sangre.

FIG. 11A. COSECHA Y OBTENCION DE PREPARACIONES CROMOSOMICAS.

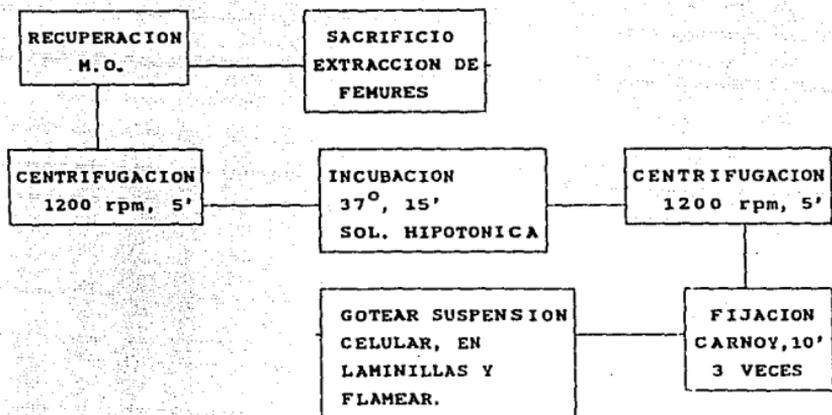
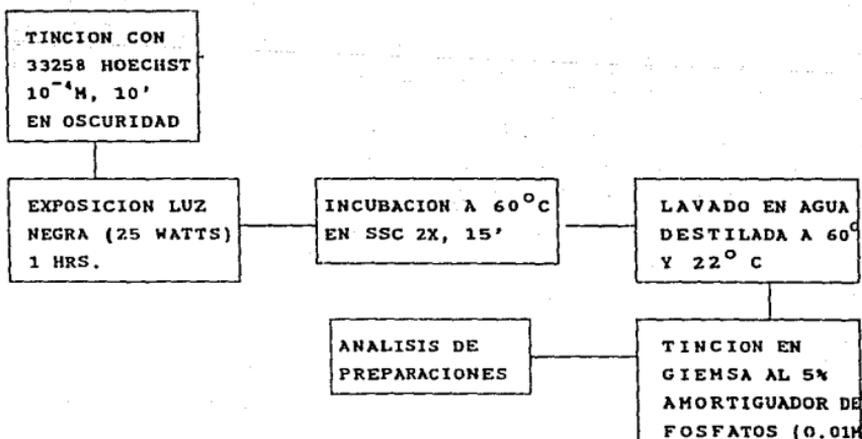


FIG. 11B. TINCION DIFERENCIAL DE LAS CROMATIDAS HERMANAS



6. IRRADIACION

La irradiación se efectuó en el Vick-Rad ^{60}Co , de exposición geométrica (Lapices de Co), la cual presentaba una razón de dosis de 261.4 rad/min. aproximadamente. La irradiación se realizó durante 25 seg. en forma individual, encerrando a los ratones en un envase de plástico y colocándoles en ambos muslos dosímetros termoluminiscentes (TL). Las dosis de exposición individual en cada experimento fueron determinadas en el laboratorio de dosimetría del ININ, a través de los dosímetros TL colocados a los ratones. La dosis estimada fué de 1 Gy aproximadamente.

El tiempo de exposición fué calculado por medio de un experimento preliminar que consistió en irradiar 5 ratones durante 23 seg. (tiempo teórico estimado) y 5 ratones durante 32 seg. (tiempo aleatorio "X"), de las cuales se estableció la relación para obtener la dosimetría y el tiempo real de exposición de los ratones, para obtener 1 Gy de radiación gamma (γ).

7. ANALISIS DE PREPARACIONES

7.1) Análisis de ICH

El análisis de los ICH, se realizó en 30 células en metafase, que tuvieran las cromátidas claramente diferenciadas y con el número cromosómico completo (40 cromosomas), (Fig.12). Cuando había duda sobre algún conteo, este se realizó por más de un observador y si persistía la duda, no se tomaba en cuenta.

FIG. 12 METAFASES EN 2a. DIVISION. A)BAJA INDUCCION DE ICH Y B)ALTA INDUCCION DE ICH.

B)

100X



A)

100X



7.2) Análisis de IM

El análisis del IM se realizó, haciendo tres conteos independientes de 1000 células por ratón, en los cuales se consideró en división únicamente aquellas células en metafase (Fig.13), los resultados obtenidos se aplicaron en la fórmula que se muestra en la pag.24 .

7.3) Análisis del TGP

Para el análisis del TGP, se revisaron 300 células por ratón, de las que se contaron las que se encontraban en 1^a, 2^a, y 3^a división (Fig.14), los datos obtenidos se manejaron de acuerdo a la fórmula desarrollada por Ivett y Tice (1982), Pag.28 .

8. PROTOCOLOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Se emplearon 4 grupos experimentales, utilizando los protocolos siguientes para cada uno de ellos (Fig.15):

I) Grupo Control (Control).

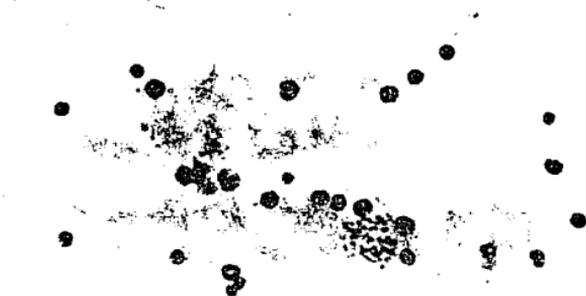
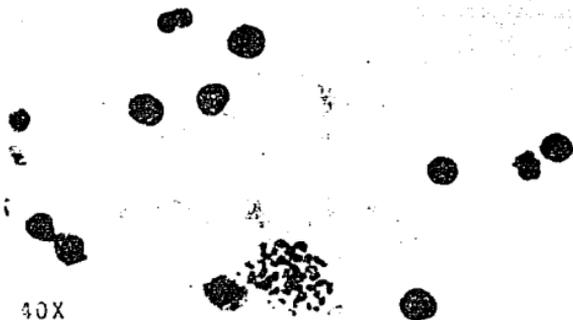
La BrdU se administra intraperitonealmente al inicio del experimento y se permite su incorporación durante 22 hrs. Transcurrido el tiempo se aplica una inyección intraperitoneal de colchicina y 2 hrs. después se realiza la cosecha y obtención de las preparaciones cromosómicas.

Se usaron ratones sin irradiar y sin clorofilina.

II) Grupo Clorofilina (Clorofi.).

La administración de la clorofilina se lleva a cabo 4.5 hrs. antes de la inyección de BrdU, se permite la incorporación durante 22 hrs. Se aplica la inyección

FIG. 13 NUCLEOS DE MEDULA OSEA EN DIVISION Y SIN DIVISION.





100X

A)

FIG. 14 METAFASES DIFERENCIADAS
A) EN PRIMERA, B) EN SEGUNDA Y C)
TERCERA DIVISION CELULAR.



100X

B)



100X

C)

intraperitoneal de la colchicina y 2 hrs. más tarde se realiza la cosecha y obtención de preparaciones cromosómicas.

Se usaron ratones sin irradiar, para determinar el efecto de la clorofilina *per se*.

III) Grupo Irradiado (Irradia.)

La irradiación se lleva a cabo 0.5 hrs. antes de la administración intraperitoneal de la BrdU, se permite la incorporación durante 22 hrs. y 2 hrs. después se realiza la cosecha y obtención de preparaciones cromosómicas.

No se administró clorofilina a los ratones con el objeto de determinar el efecto de la radiación.

IV) Grupo Clorofilina-Irradiado (Clo-Irrad.)

La administración de la clorofilina se lleva a cabo 4.5 hrs. antes de la inyección intraperitoneal de BrdU. La irradiación se efectuó 0.5 hrs. antes de la inyección intraperitoneal de la BrdU. La inyección de colchicina se realiza 22 hrs. después de la incorporación de la BrdU, para finalmente sacrificar a los organismos 2 hrs. después.

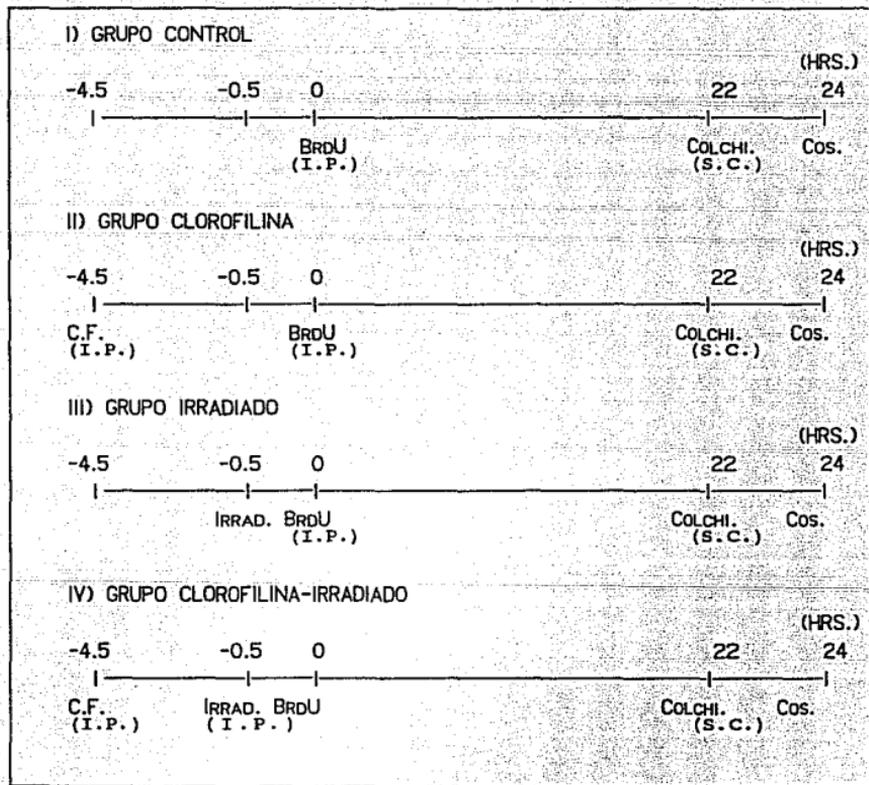
Los ratones fueron irradiados y tratados con clorofilina, el objetivo fué determinar el efecto del pretratamiento de la clorofilina sobre el daño causado por la radiación.

9. ESTADISTICA

Los datos se expresan como el promedio (\bar{x}) más o menos la desviación estandar (s) según el caso, se hace mención en las tablas o gráficas.

Para el análisis de la significatividad se uso un análisis de varianza, donde $p < 0.05$, seguida de la prueba de Tukey, el ajuste de Poisson y la prueba de χ^2 , para comparar proporciones. Para los cuales se uso el programa Systat versión 5.03.

FIG 15 PROTOCOLOS EMPLEADOS DURANTE EL TRABAJO.



C.F.: CLOROFILINA

BrdU: Bromodeoxiuridina

I.P.: Intraperitoneal

S.C.: Subcutanea

Cos: Cosecha

Colchi: Colchicina

Irrad.: Irradiación

V. RESULTADOS

1. DETERMINACION DE LA CLOROFILINA

Los resultados de la determinación de la clorofilina se muestran en la figura 17A, la cual corresponde a la curva patrón de las distintas concentraciones de clorofilina y sus respectivas densidades ópticas.

2. ABSORCION DE LA CLOROFILINA

En la figura 17B, se muestra la concentración de la clorofilina en cavidad peritoneal y sangre en función del tiempo, observándose el pico para la máxima concentración en sangre a las 4.5 hrs., así como una disminución significativa de la clorofilina en la cavidad peritoneal a la misma hora.

La tabla 1, muestra la calidad de tinción diferencial con la administración de la clorofilina 0.5 hrs. antes de la BrdU (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1989), y el obtenido en estos experimentos 4.5 hrs., para reducir las interferencias entre la clorofilina y la BrdU, observándose que al administrar 0.5 hrs. la clorofilina antes de la BrdU no se obtiene buena tinción diferencial y al administrar 4.5 hrs. la clorofilina antes de la BrdU se obtiene una buena tinción diferencial similar a la del grupo control.

2. TIEMPO DE IRRADIACION

La tabla 2, muestra la dosimetría obtenida para el tiempo teórico estimado y para otro aleatorio, donde apartir de ambos tiempos se obtuvo el tiempo real de irradiación para lograr 1 Gy de irradiación, el cual correspondio a 25 seg.

FIG.16 CURVA PATRON DE LA CONCENTRACION DE LA CLOROFILINA VS DENSIDAD OPTICA

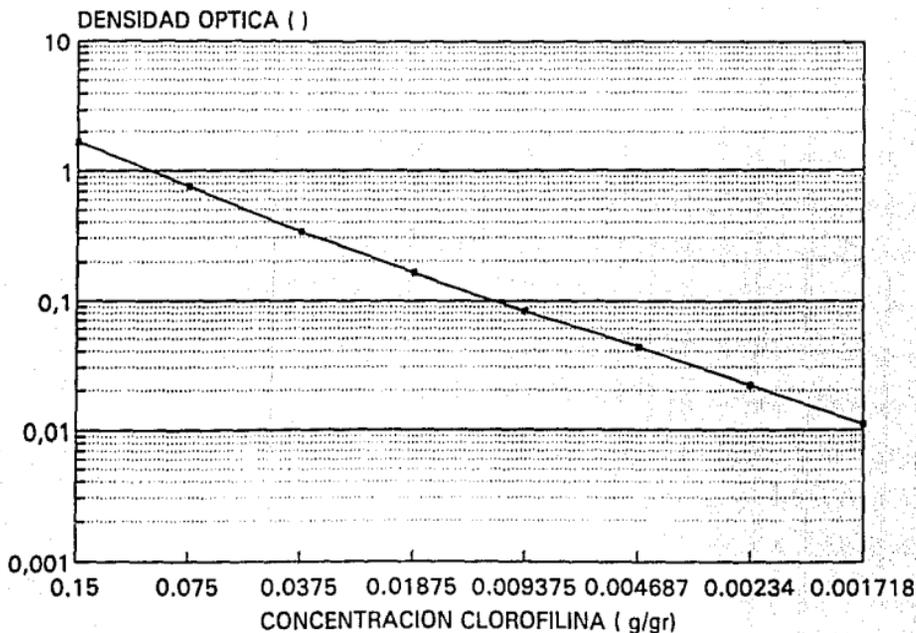
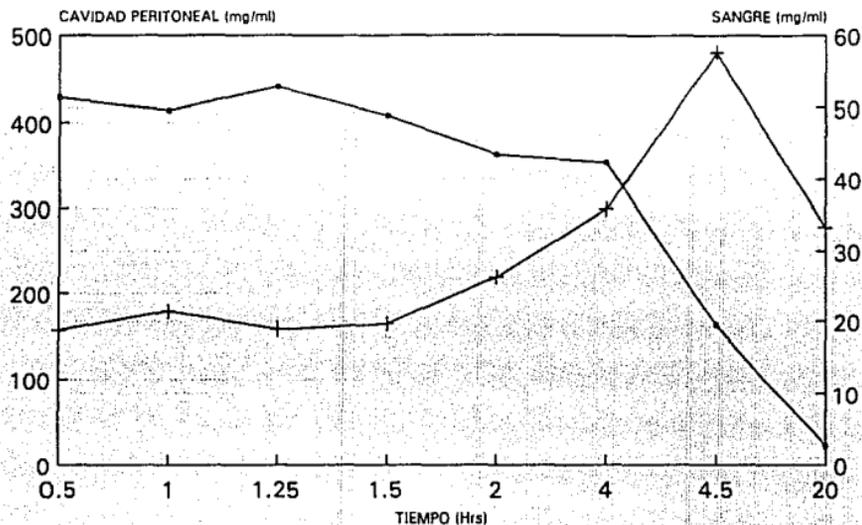


FIG.17 CONCENTRACION DE LA CLOROFILINA EN CP Y SANGRE A TRAVES DEL TIEMPO



—●— CAVIDAD PERITONEAL —+— SANGRE

CP:CAVIDAD PERITONEAL

TABLA 1 CALIDAD DE TINCION DIFERENCIAL DE LAMINILLAS OBTENIDAS A 0.5 Y 4.5 HRS PREINYECCION DE CLOROFILINA.

CLOROFI.	TIEMPO (Hrs)	BUENA \bar{x}	REGULAR \bar{x}	MALA \bar{x}
+	0.5	0.0	10.0	90.0
+	4.5	57.0	22.0	21.0
-	---	58.0	28.0	14.0

TABLA 2 TIEMPO DE EXPOSICION EN EL VICK-RAD Y LECTURAS DE DOSIMETROS TERMULUMINISCENTES.

TIEMPO (Seg)	DOSIS/GRUPO ($\bar{x} \pm s$ Gys)
0	0.0
23	0.90 \pm 0.05
25	1.07 \pm 0.11
32	1.28 \pm 0.11

N=5 RATONES POR GRUPO.

3. EFECTO DE LA CLOROFILINA

La tabla 3 muestra el efecto que tiene la clorofilina sobre la inducción de ICH, donde se puede observar que la clorofilina administrada a dosis de 100, 50 y 10 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal, no indujo ICH comparados con los controles, ya que no se encontró significatividad.

La figura 18 muestra el efecto de las diferentes dosis de clorofilina sobre la inducción de ICH, donde se puede observar más claramente que la clorofilina no tiene efecto significativo sobre la inducción de ICH, comparados con el control.

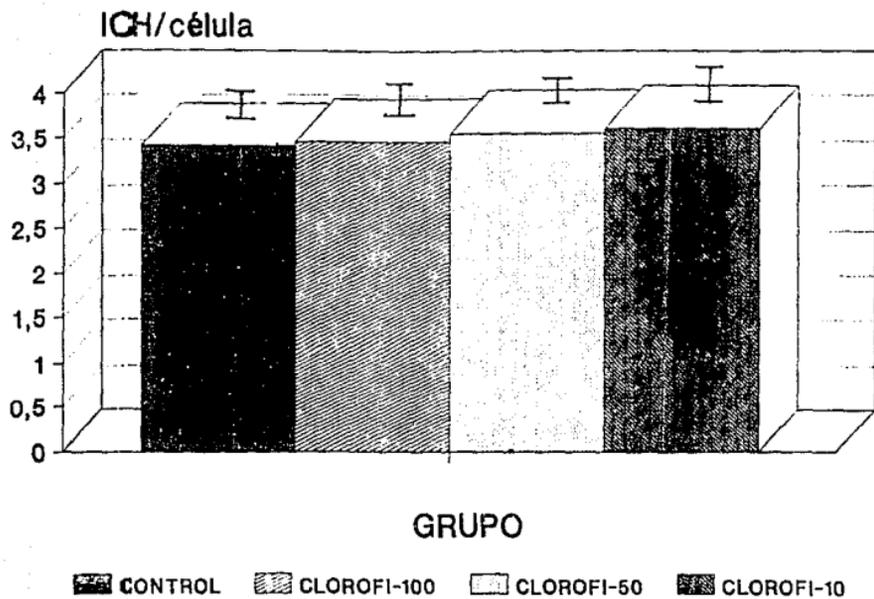
TABLA 3 EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH, VARIACION EN EL IM Y TGP.

EXP	GRUPO	DOSIS CLOROFI ($\mu\text{g/g}$)	ICH/CEL, $\bar{x} \pm s$	IM $\bar{x} \pm s$	TGP $\bar{x} \pm s$
1	CONTROL	0.0	3.21 \pm 0.26	39.23 \pm 3.29	12.08 \pm 0.21
	CLOROFI	100.0	3.63 \pm 0.14	38.00 \pm 2.64	*10.95 \pm 0.56
2	CONTROL	0.0	3.53 \pm 0.12	41.08 \pm 1.99	12.11 \pm 0.18
	CLOROFI	100.0	3.29 \pm 0.22	42.66 \pm 3.38	* 9.53 \pm 0.25
1	CONTROL	0.0	3.44 \pm 0.13	44.63 \pm 3.09	12.09 \pm 0.18
	CLOROFI	50.0	3.39 \pm 0.09	44.08 \pm 6.29	* 9.37 \pm 0.62
2	CONTROL	0.0	3.40 \pm 0.17	36.63 \pm 2.55	12.27 \pm 0.03
	CLOROFI	50.0	3.74 \pm 0.11	36.09 \pm 2.27	*10.06 \pm 0.25
1	CONTROL	0.0	3.44 \pm 0.13	44.63 \pm 3.09	12.09 \pm 0.18
	CLOROFI	10.0	3.45 \pm 0.23	41.40 \pm 3.49	*10.43 \pm 0.12
2	CONTROL	0.0	3.40 \pm 0.17	36.63 \pm 2.55	12.27 \pm 0.03
	CLOROFI	10.0	3.77 \pm 0.26	38.24 \pm 1.97	*10.12 \pm 0.14

N: 4 RATONES POR GRUPO

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

FIG.18 MEDIAS DE ICH/CEL CON SU DESVIACION STANDAR



En la misma tabla 3, se muestra el efecto de la clorofilina sobre el IM para las dosis de 100, 50, y 10 μ g/g, observándose que ninguna de las dosis presentó efecto sobre el IM, ya que los valores obtenidos no son significativos comparados con el control.

Finalmente esta misma tabla 3, muestra el efecto de la clorofilina sobre el TGP, donde se observa que las dosis de 100, 50 y 10 μ g/g de clorofilina sí presentan un efecto significativo comparados con los controles, acelerando el tiempo de división celular aproximadamente 2 hrs.

4. EFECTO DE LA CLOROFILINA VS. RADIACION GAMMA

4.1) Inducción de ICH

La tabla 4 muestra los datos individuales del efecto de la clorofilina sobre la inducción de ICH, causado por 1 Gy de radiación gamma para las tres dosis empleadas con su respectiva repetición, observándose poca variabilidad entre ratones del mismo grupo y entre experimentos la cual no fue significativa.

Estas tablas únicamente se anexan para observar el comportamiento individual por grupo, ya que los datos que se toman en cuenta para nuestros objetivos son los promedios por grupo, siendo las comparaciones de significatividad más representativas, por ser una mayor N (número de ratones).

La figura 19 muestra la dosis-respuesta de la clorofilina al ser administrada antes de la irradiación y sin irradiación, observándose que la dosis baja de clorofilina (10 μ g/g), con irradiación, presentan una mayor inducción de ICH y conforme se aumenta la dosis de clorofilina (hasta 100 μ g/g), la respuesta se asemeja más a la de la clorofilina sola, lo cual nos indica un comportamiento radioprotector de la clorofilina sobre la inducción de ICH, dosis-dependiente.

FIGURA 19 CURVA DOSIS RESPUESTA DE ICH
PARA LOS GRUPOS CLO. Y CLO-IRRAD.

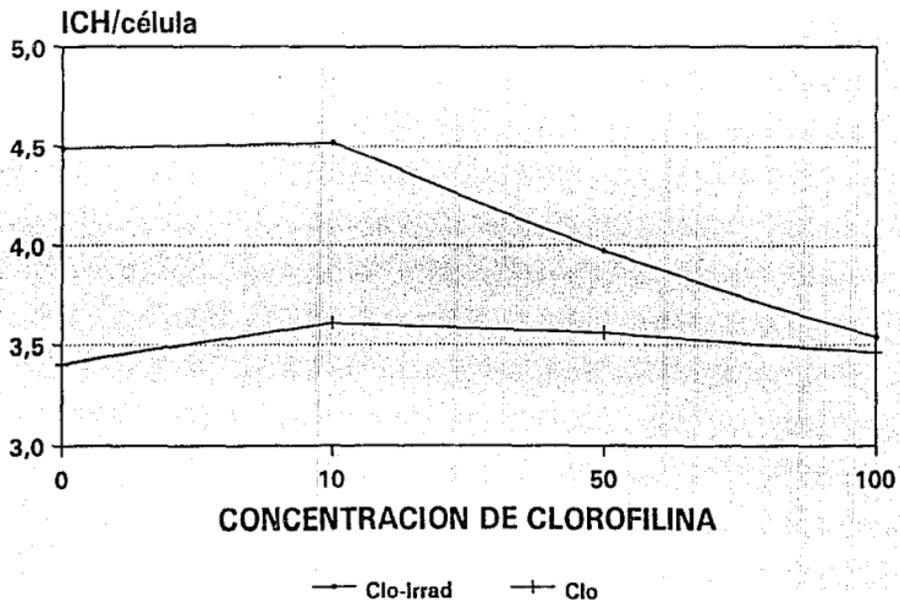


TABLA 4 DATOS INDIVIDUALES DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA PARA LAS TRES DOSIS EMPLEADAS (100, 50 Y 10 $\mu\text{g/g}$) SOBRE LA INDUCCION DE ICH, POR 1.0 Gy DE RADIACION GAMMA.

DOSIS	100 $\mu\text{g/g}$		50 $\mu\text{g/g}$		10 $\mu\text{g/g}$	
GRUPO	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2
	ICH/CEL	ICH/CEL	ICH/CEL	ICH/CEL	ICH/CEL	ICH/CEL
CONTROL	3.46	3.47	3.56	3.56	3.56	3.56
	*2.93	3.40	3.56	3.16	3.56	3.16
	3.26	3.67	3.36	3.46	3.36	3.46
		3.60	3.30	3.43	3.30	3.43
CLOROFI.	3.43	3.03	3.30	3.70	3.13	3.50
	3.76	3.17	3.33	3.76	3.43	3.96
	3.66	3.50	3.46	3.63	3.63	4.03
	3.70	3.47	3.46	3.90	3.63	3.60
IRRADIA.	*4.10	*4.60	*4.43	*4.80	*4.43	*4.80
	*4.20	*4.37	*4.86	*4.93	*4.86	*4.93
	*4.20	*5.13	*4.03	*4.80	*4.03	*4.80
	*4.40	*4.13				
CLO-IRRA	3.40	3.87	3.86	*4.53	*4.73	*4.83
	3.30	3.46	3.43	3.80	*4.43	*4.60
	3.16	3.57	*4.20	*4.36	*4.03	*4.63
	3.50	*4.07	*4.16	3.46	*4.43	

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

La tabla 5 muestra el comportamiento de la clorofilina vs radiación para las tres diferentes dosis de clorofilina en promedios por grupo con su respectiva repetición, encontrando poca variabilidad entre experimentos (repeticiones), la cual no fue significativa, lo que indica que nuestros resultados son reproducibles.

La tabla 6 muestra los promedios globales por grupo, en donde se observa que el grupo control presentó 3.41 ± 0.18 ICH/cel, en el grupo irradiado se indujo un intercambio más 4.49 ± 0.34 ICH/cel. (el cual resultó ser significativo comparado con el control) y en el grupo que se le administró la clorofilina e irradiación se encontró 3.54 ± 0.27 ICH/cel, lo cual no fue significativo comparado con el control. Esto indica que la dosis de $100 \mu\text{g/g}$ de clorofilina administrada a los ratones, protegió a las células de la médula ósea de la inducción de ICH causados por 1.0 Gy de radiación gamma.

Para la dosis de $50 \mu\text{g/g}$ de clorofilina, se obtuvo para el grupo al que se le administró la clorofilina e irradiación de 3.97 ± 0.37 ICH/cel., los cuales comparados con el control no resultaron significativos, aunque se observa que se pierde el efecto radioprotector. Esto indica que la dosis de $50 \mu\text{g/g}$ de clorofilina aún protege a las células de la médula ósea de la inducción de ICH causados por 1.0 Gy de radiación gamma (Tabla 6).

Finalmente para la dosis de $10 \mu\text{g/g}$ de clorofilina, se encontró un valor para el grupo al que se le administró clorofilina e irradiación de 4.52 ± 0.24 ICH/cel., el cual resulto ser significativo comparado con el control. Esto indica que la dosis de $10 \mu\text{g/g}$ ya no protege a las células de la médula ósea de la inducción de ICH, causados por 1.0 Gy de radiación gamma (Tabla 6).

TABLA 5 EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HERMANAS (ICH), POR RADIACION GAMMA.

EXPERIMENTO	GRUPO	CLOROFILINA ($\mu\text{g/g}$)	RADIACION (Gy)	ICH/CEL $\bar{x} \pm s$
1	CONTROL	0.0	0.00	3.21 \pm 0.26
	CLOROFI.	100.0	0.00	3.63 \pm 0.14
	IRRADIA.	0.0	1.07	*4.22 \pm 0.12
	CLO-IRRAD.	100.0	1.07	3.34 \pm 0.14
2	CONTROL	0.0	0.00	3.53 \pm 0.12
	CLOROFI.	100.0	0.00	3.29 \pm 0.22
	IRRADIA.	0.0	1.07	*4.55 \pm 0.42
	CLO-IRRAD.	100.0	1.07	3.74 \pm 0.27
1	CONTROL	0.0	0.00	3.44 \pm 0.13
	CLOROFI.	50.0	0.00	3.39 \pm 0.08
	IRRADIA.	0.0	1.07	*4.44 \pm 0.41
	CLO-IRRAD.	50.0	1.07	3.91 \pm 0.35
2	CONTROL	0.0	0.00	3.40 \pm 0.17
	CLOROFI.	50.0	0.00	3.74 \pm 0.00
	IRRADIA.	0.0	1.07	*4.84 \pm 0.07
	CLO-IRRAD.	50.0	1.07	4.03 \pm 0.49
1	CONTROL	0.0	0.00	3.44 \pm 0.13
	CLOROFI.	10.0	0.00	3.45 \pm 0.23
	IRRADIA.	0.0	1.07	*4.44 \pm 0.41
	CLO-IRRAD.	10.0	1.07	*4.41 \pm 0.28
2	CONTROL	0.0	0.00	3.40 \pm 0.17
	CLOROFI.	10.0	0.00	3.77 \pm 0.26
	IRRADIA.	0.0	1.07	*4.84 \pm 0.07
	CLO-IRRAD.	10.0	1.07	*4.68 \pm 0.12

N= 4 RATONES PR GRUPO

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

TABLA 6 PROMEDIOS GLOBALES DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES DOSIS DE CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HERMANAS, CAUSADOS POR RADIACION GAMMA.

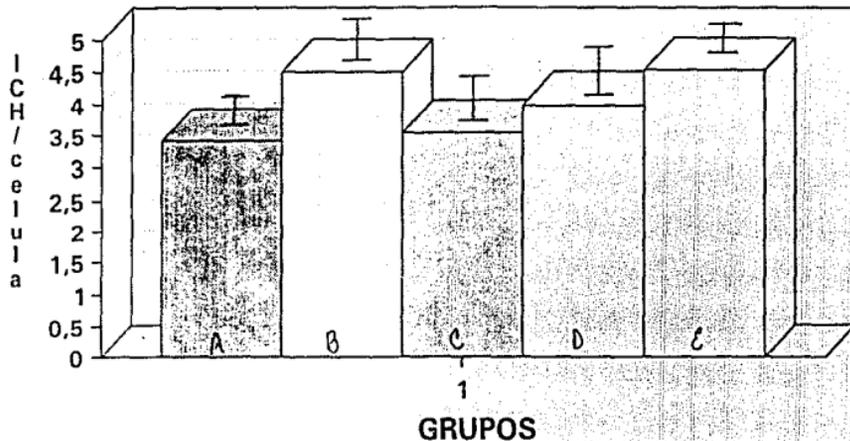
GRUPO	N	CLOROFILINA ($\mu\text{g/g}$)	RADIACION (Gy)	ICH/CEL $\bar{x} \pm s$
CONTROL	15	0.0	0.0	3.41 \pm 0.18
CLOROFI.	8	100.0	0.00	3.46 \pm 0.23
CLOROFI.	8	50.0	0.00	3.56 \pm 0.20
CLOROFI.	8	10.0	0.00	3.61 \pm 0.26
IRRADIA.	14	0.0	1.07	*4.49 \pm 0.34
CLO-IRRAD.	8	100.0	1.07	3.54 \pm 0.27
CLO-IRRAD.	8	50.0	1.07	3.97 \pm 0.37
CLO-IRRAD.	7	10.0	1.07	*4.52 \pm 0.24

* $P < 0.05$ PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

Estos resultados se pueden apreciar mejor en la Fig. 20, donde se observan los valores promedios de los ICH/cel., para cada grupo con su respectiva desviación estandar.

La Figura 21 muestra la frecuencia acumulativa de células con respecto al número de ICH/cel., donde se puede hacer un análisis más cuantitativo del efecto de la clorofilina y radiación *per se* sobre la inducción de ICH, ya que se aprecia claramente que la curva del grupo control y el tratado con clorofilina 100 $\mu\text{g/g}$ se comportan practicamente de la misma forma, en contraste con el irradiado la cual se desplaza hacia frecuencias más altas de ICH. De esta forma el 50% de las células del grupo control y tratado con clorofilina 100 $\mu\text{g/g}$, tienen una frecuencia de ICH de 2.75 ICH/cel o menos, mientras que para el irradiado corresponden 3.75 ICH/cel o menos, lo cual indica que la radiación γ aumenta la frecuencia de un ICH/cel. más del valor control.

FIG.20 MEDIAS DE ICH/CEL CON SU DESVIACION ESTANDAR



A CONTROL

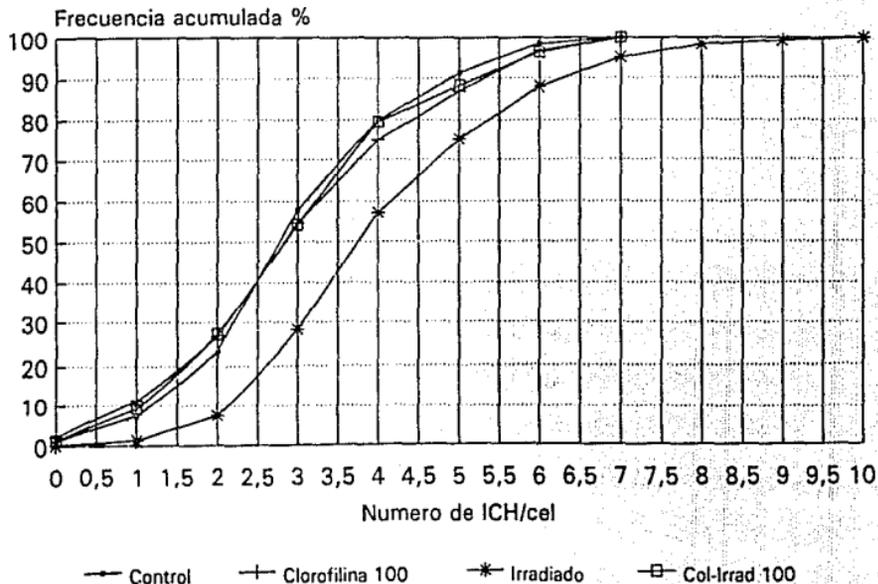
B IRRADIADO

C CLO-I-100

D CLO-I-50

E CLO-I-10

**FIG. 21 FRECUENCIA ACUMULADA DE ICH
VS. NO. ICH/CEL.**



De igual forma al grupo, que se le administró la dosis de 100µg/g de clorofilina más irradiación también el 50% de las células tienen 2.75 ICH/cel. o menos lo cual indica que esta dosis protege de la inducción de ICH, ya que presentó un comportamiento similar al del grupo control y clorofilina sola..

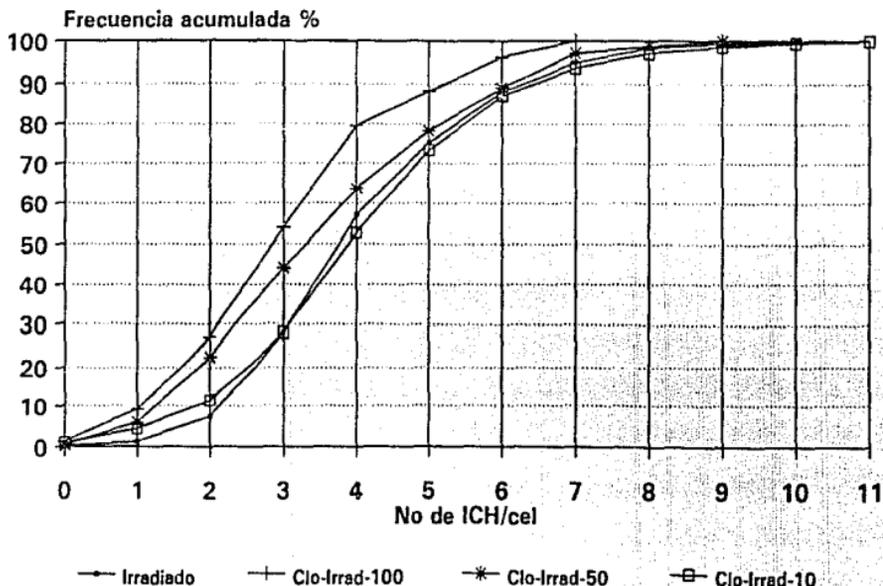
La Figura 22 muestra la diferencia gradual en la eficiencia de diferentes dosis de clorofilina para proteger a las células contra el daño radioinducido capaz de generar ICH, donde la curva del grupo tratado con 100µg/g de clorofilina sigue como ya se mencionó, el mismo comportamiento que el grupo control, es decir que también el 50% de la población tiene 2.75 ICH/cel. o menos.

Con el tratamiento de 50µg/g de clorofilina la curva muestra un comportamiento semejante a la del control, aunque ligeramente desplazada hacia valores más altos de ICH, es decir que el 50% de la población celular tiene una frecuencia de 3.25 ICH/cel o menos, esta diferencia no es significativa con respecto al control.

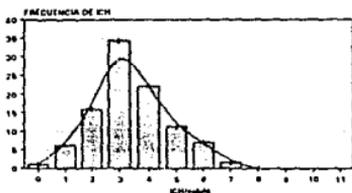
La curva del grupo tratado con 10µg/g de clorofilina muestra un comportamiento más parecido al del grupo irradiado, en esta se aprecia que el 50% de la población tiene 3.9 ICH/cel y que un 70% de las células de la población total presentaron más de 4 ICH/cel, la cual resulta muy diferente con respecto al control. Además, se observa que para este grupo menos del 25% de células tuvieron 2.75 ICH o menos, mientras que el grupo control lo presentó para el 50%. En este mismo grupo se encontraron células hasta con 11 ICH, al igual que en el irradiado, mientras que para el control el máximo fue de 7 ICH/cel.

Finalmente en base a los resultados antes descritos podemos decir que entre las dosis de 100 y 50µg/g se encuentra la dosis mínima que protege en un cien por ciento de eficiencia la inducción de ICH, y entre las dosis de 50 y 10µg/g la dosis mínima capaz de proteger a las células del efecto

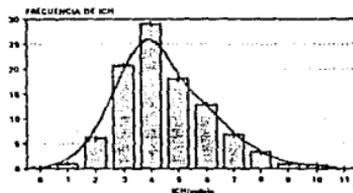
**FIG.22 FRECUENCIA ACUMULADA DE ICH
VS NUMERO DE ICH/cel.**



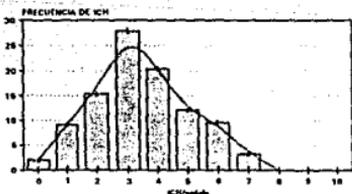
DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE ICH/CEL DE LAS POBLACIONES CELULARES



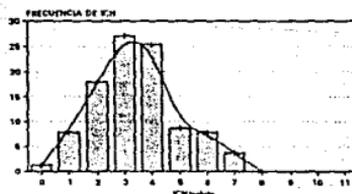
a) control



b) irradiado



c) clorofilina



d) clorofilina-irradiado

100 $\mu\text{g/g}$.

radioinducido sobre ICH.

La figura 23 muestra la distribución de las frecuencias de ICH/cel. de las poblaciones celulares de médula ósea para el grupo control, irradiado y clorofilina-irradiado, de 100, 50 y 10 μ g/g, la cual se comporta como una distribución del tipo Poisson.

4.2) Efecto Sobre el IM

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos por individuo del efecto sobre el IM de las tres dosis de clorofilina empleadas (100, 50 y 10 μ g/g), vs radiación, donde se puede observar poca variabilidad individual y entre experimentos, la cual no fué significativa.

La tabla 8 muestra también los datos individuales del efecto sobre el IM, de dos dosis de clorofilina empleadas adicionalmente (5 y 1 μ g/g), con las cuales se trabajaron otras condiciones (sin BrdU y con ratones mayores de 2 meses), observándose poca variabilidad entre individuos y entre experimentos, la cual no fué significativa. Cabe aclarar que este experimento únicamente se elaboró como complemento y para ver si aún persistía la protección para este parámetro.

Al igual que la tabla 4, los datos individuales solo se anexan para observar el comportamiento individual por grupo.

La tabla 9 muestra los promedios por grupo, del efecto de la clorofilina, para las dosis de 100, 50 y 10 μ g/g, con su respectiva repetición, donde se puede observar que nuestros resultados son reproducibles ya que no existió una variabilidad significativa entre experimentos.

TABLA 7 DATOS INDIVIDUALES DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA PARA LAS TRES DOSIS EMPLEADAS (100, 50 Y 10 $\mu\text{G}/\text{G}$) SOBRE LA DISMINUCION DEL IM CAUSADO POR 1.0 GY DE RADIACION GAMMA.

DOSIS	100 $\mu\text{g}/\text{g}$		50 $\mu\text{g}/\text{g}$		10 $\mu\text{g}/\text{g}$	
GRUPO	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2	EXP 1	EXP 2
	METAF A/ 1000 C.	METAF A/ 1000 C.	METAF A/ 1000 C.	METAF A/ 1000 C.	METAF A/ 1000 C.	METAF A/ 1000 C.
CONTROL	42.37	38.44	47.15	38.84	47.15	38.84
	36.07	41.03	43.86	37.73	43.86	37.73
	36.73	43.22	46.93	37.00	46.93	37.00
	41.76	41.62	40.58	32.97	40.58	32.97
CLOROF I	39.80	44.01	42.69	34.63	41.25	39.26
	36.90	44.52	49.27	36.05	45.63	37.78
	34.80	43.54	48.62	39.31	*37.08	40.24
	40.50	37.66	*35.75	34.37	41.65	35.70
IRRADIA	*29.76	*28.48	*37.50	*28.94	*37.50	*28.94
	*25.30	*28.98	*34.73	*28.80	*34.73	*28.80
	*27.26	*31.52	*38.17	*24.88	*38.17	*24.88
	*27.30	*32.04		*25.51		*25.51
CLO-IRR.	41.66	40.19	40.84	37.81	49.75	40.77
	41.00	40.67	47.57	35.09	44.01	41.58
	39.90	43.00	45.23	41.78	*50.66	43.71
	37.60	*36.99	40.80	39.36	42.30	41.98

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

TABLA B DATOS INDIVIDUALES DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA PARA LAS DOSIS DE 5 Y 1 $\mu\text{G/g}$, SOBRE LA DISMINUCION DEL IM CAUSADO POR 1.0 Gy DE RADIACION GAMMA.

DOSIS	5 $\mu\text{g/g}$	1 $\mu\text{g/g}$
GRUPO	EXP 1 IM (MET/1000 CEL)	EXP 1 (MET/1000 CEL)
CONTROL	34.86	34.86
	30.64	30.64
	33.89	33.89
	33.07	33.07
CLOROFI.	34.32	33.01
	31.85	37.37
	34.70	30.35
	35.48	34.99
IRRADIA.	* 24.56	* 24.56
	* 27.06	* 27.06
	* 27.19	* 27.19
	* 28.03	* 28.03
CLO-IRRAD.	* 27.47	* 28.91
	* 26.70	* 28.28
	30.81	* 29.96
	* 23.21	* 28.19

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

TABLA 9 EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA DISMINUCION DEL INDICE MITOTICO (IM), POR RADIACION GAMMA.

EXPERIMENTO	GRUPO	CLOROFILINA ($\mu\text{g/g}$)	RADIACION (Gy)	IM MET/1000CEL $\bar{x} \pm s$
1	CONTROL	0.0	0.0	39.23 \pm 3.29
	CLOROFI.	100.0	0.0	38.00 \pm 2.64
	IRRADIA.	0.0	1.0	*27.40 \pm 1.82
	CLO-IRRAD.	100.0	1.0	39.81 \pm 1.86
2	CONTROL	0.0	0.0	41.08 \pm 1.99
	CLOROFI.	100.0	0.0	42.66 \pm 3.38
	IRRADIA.	0.0	1.0	*30.25 \pm 1.78
	CLO-IRRAD.	100.0	1.0	40.21 \pm 2.47
1	CONTROL	0.0	0.0	44.63 \pm 3.09
	CLOROFI.	50.0	0.0	44.08 \pm 6.29
	IRRADIA.	0.0	1.0	*36.80 \pm 1.82
	CLO-IRRAD.	50.0	1.0	43.61 \pm 3.36
2	CONTROL	0.0	0.0	36.63 \pm 2.55
	CLOROFI.	50.0	0.0	36.09 \pm 2.27
	IRRADIA.	0.0	1.0	*27.03 \pm 2.13
	CLO-IRRAD.	50.0	1.0	38.51 \pm 2.80
1	CONTROL	0.0	0.0	44.63 \pm 3.09
	CLOROFI.	10.0	0.0	41.40 \pm 3.49
	IRRADIA.	0.0	1.0	*36.80 \pm 1.82
	CLO-IRRAD.	10.0	1.0	46.68 \pm 4.14
2	CONTROL	0.0	0.0	36.63 \pm 2.55
	CLOROFI.	10.0	0.0	38.24 \pm 1.97
	IRRADIA.	0.0	1.0	*27.03 \pm 2.13
	CLO-IRRAD.	10.0	1.0	42.01 \pm 1.24

N=4 RATONES POR GRUPO

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA, SEGUIDA DE TUKEY.

La tabla 10 muestra los resultados globales obtenidos por grupos del efecto de la clorofilina sobre la disminución del IM, causado por la radiación, donde se observa que el IM para el grupo control fue de 40.39 ± 3.36 met/1000 cel. y para los irradiados de 30.37 ± 3.91 met./1000 cel., lo cual resultó significativo. A los grupos que se les administró clorofilina a dosis de 100, 50 y $10 \mu\text{g/g}$ e irradiación, se encontraron valores de 40.12 ± 1.86 , 41.06 ± 3.69 y 44.34 ± 3.53 met/1000 cel. respectivamente, los cuales no fueron significativos. Por lo tanto las dosis de 100, 50 y $10 \mu\text{g/g}$ de peso protegen a las células de la médula ósea de la disminución del IM causado por la radiación.

TABLA 10 PROMEDIOS GLOBALES DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL INDICE MITOTICO, POR 1.0 Gy DE RADIACION GAMMA.

GRUPO	N	CLOROFILINA ($\mu\text{g/g}$)	RADIACION (Gy)	IM $\bar{x} \pm s$
CONTROL	16	0.0	0.0	40.39 ± 3.36
CLOROFI.	8	100.0	0.0	40.32 ± 3.51
CLOROFI.	8	50.0	0.0	40.08 ± 5.72
CLOROFI.	8	10.0	0.0	39.82 ± 2.92
IRRADIA.	15	0.0	1.0	$*30.37 \pm 3.91$
CLO-IRRAD	8	100.0	1.0	40.12 ± 1.86
CLO-IRRAD	8	50.0	1.0	41.06 ± 3.69
CLO-IRRAD	8	10.0	1.0	44.34 ± 3.53

* $P < 0.05$ PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

La tabla 11 muestra los promedios globales del efecto de la clorofilina, para las dosis de 5 y 1 $\mu\text{g/g}$ sobre la disminución del IM, causado por la radiación, con ratones a los cuales no se les administró BrdU y mayores de dos meses, donde al igual que la tabla anterior los valores obtenidos para el grupo irradiado (26.71 \pm 1.29), resultaron significativos comparados con los controles (33.11 \pm 1.56). Por otra parte los valores para los grupos tratados con clorofilina 5 y 1 $\mu\text{g/g}$ e irradiación (27.05 \pm 2.70 y 28.83 \pm 0.71 respectivamente), resultaron significativos comparados con los controles. Por lo tanto las dosis de 5 y 1 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal de clorofilina, administrada a ratones sin BrdU y mayores de dos meses, no protege a las células de la médula ósea de ratón de la disminución del IM causado por la radiación, cabe aclarar que este experimento sólo se realizó una vez.

TABLA 11 PROMEDIOS GLOBALES DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL INDICE MITOTICO, POR 1.0 Gy DE RADIACION GAMMA.

GRUPO	N	CLOROFILINA ($\mu\text{g/g}$)	RADIACION (Gy)	IM $\bar{x} \pm s$
CONTROL	8	0.0	0.0	33.11 \pm 1.56
CLOROFI.	4	5.0	0.0	34.08 \pm 1.35
CLOROFI.	4	1.0	0.0	33.93 \pm 2.57
IRRADIA.	8	0.0	0.0	*26.71 \pm 1.29
CLO-IRRAD.	4	5.0	0.0	*27.05 \pm 2.70
CLO-IRRAD.	4	1.0	0.0	*28.83 \pm 0.71

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

4.3) Efecto Sobre el TGP

La tabla 12 muestra el comportamiento individual del efecto de la clorofilina, para las dosis de 100, 50 y 10 μ g/g, sobre el TGP, por 1.0 Gy de radiación gamma, observándose poca variabilidad individual y entre experimentos, la cual no fue significativa.

Estas tablas al igual que las 4, 7 y 8 únicamente se anexan para analizar el comportamiento individual por grupo.

La tabla 13 muestra los promedios por grupo obtenidos del efecto de la clorofilina para las dosis de 100, 50 y 10 μ g/g, sobre el TGP, por radiación gamma, donde se puede observar que los resultados son reproducibles ya que no existió variabilidad significativa entre experimentos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 12 DATOS INDIVIDUALES DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA PARA LAS TRES DOSIS EMPLEADAS (100, 50 Y 10µg/g), SOBRE EL TGP, CAUSADO POR 1.0 Gy DE RADIACION GAMMA.

DOSIS	100µg/g		50µg/g		10µg/g	
	EXP 1 TGP (Hrs)	EXP 2 TGP (Hrs)	EXP 1 TGP (Hrs)	EXP 2 TGP (Hrs)	EXP 1 TGP (Hrs)	EXP 2 TGP (Hrs)
CONTROL	12.06	12.02	11.94	12.24	11.94	12.24
	12.31	12.39	12.14	12.26	12.14	12.26
	11.88	12.03	11.96	12.24	11.96	12.24
		12.02	12.32	12.32	12.32	12.32
CLOROFI.	*10.93	* 9.27	* 9.73	*10.15	*10.39	* 9.94
	*11.04	* 9.85	* 9.14	* 9.95	*10.30	*10.27
	11.61	* 9.60	* 8.62	* 9.77	*10.58	*10.09
	*10.24	* 9.41	*10.01	*10.36	*10.48	*10.19
IRRADIA.	11.84	12.70	12.74	*12.99	12.74	*12.99
	12.08	12.81	12.58	12.58	12.58	12.58
	12.08	12.59	*10.86	*13.02	*10.86	*13.02
	12.18	12.77				
CLO-IRRAD	*10.68	*10.69	*10.69	*11.61	* 9.33	*10.97
	*11.41	*10.71	* 9.83	*11.72	*10.73	*10.76
	*10.96	*10.27	*10.01	*11.18	*10.97	*10.51
	*10.81	*10.79	*10.66	*11.65	*10.19	

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

TABLA 13 EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL TGP CAUSADO POR RADIACION GAMMA.

EXPERIMENTO	GRUPO	CLOROFILINA ($\mu\text{g/g}$)	RADIACION (Gy)	TGP $\bar{x} \pm s$
1	CONTROL	0.0	0.0	12.08 \pm 0.21
	CLOROFI.	100.0	0.0	*10.95 \pm 0.56
	IRRADIA.	0.0	1.0	12.04 \pm 0.14
	CLO-IRRAD	100.0	1.0	*10.96 \pm 0.31
2	CONTROL	0.0	0.0	12.11 \pm 0.18
	CLOROFI.	100.0	0.0	* 9.53 \pm 0.25
	IRRADIA.	0.0	1.0	12.71 \pm 0.09
	CLO-IRRAD	100.0	1.0	*10.61 \pm 0.23
1	CONTROL	0.0	0.0	12.09 \pm 0.18
	CLOROFI.	50.0	0.0	* 9.37 \pm 0.62
	IRRADIA.	0.0	1.0	12.06 \pm 1.04
	CLO-IRRAD	50.0	1.0	*10.30 \pm 0.44
2	CONTROL	0.0	0.0	12.27 \pm 0.03
	CLOROFI.	50.0	0.0	*10.06 \pm 0.25
	IRRADIA.	0.0	1.0	12.86 \pm 0.24
	CLO-IRRAD	50.0	1.0	*11.54 \pm 0.25
1	CONTROL	0.0	0.0	12.09 \pm 0.18
	CLOROFI.	10.0	0.0	*10.43 \pm 0.12
	IRRADIA.	0.0	1.0	12.06 \pm 1.04
	CLO-IRRAD	10.0	1.0	*10.31 \pm 0.72
2	CONTROL	0.0	0.0	12.27 \pm 0.03
	CLOROFI.	10.0	0.0	*10.12 \pm 0.14
	IRRADIA.	0.0	1.0	12.86 \pm 0.24
	CLO-IRRAD	10.0	1.0	*10.75 \pm 0.23

N=4 RATONES PO GRUPO

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

La tabla 14 muestra los promedios globales de los grupos, del efecto sobre el TGP para las dosis de 100, 50 y 10µg/g de clorofilina vs radiación, de donde no se pudo apreciar efecto radioprotector de la clorofilina ya que ésta acelera el tiempo de división celular significativamente comparado con los controles de 12.15±0.08 hrs. de los controles a alrededor de 10.07±0.25 hrs. en los tratados con clorofilina. Este parámetro no se tomó en cuenta, para determinar el efecto radioprotector, ya el efecto de la clorofilina encubriría el de la radiación. Además de que la radiación retardo el TGP pero no significativamente.

TABLA 14 PROMEDIOS GLOBALES DE EL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL TIEMPO GENERACIONAL PROMEDIO (TGP), POR RADIACION GAMMA.

GRUPO	N	CLOROFILINA (µg/g)	RADIACION (Gy)	T G P $\bar{x} \pm s$
CONTROL	15	0.0	0.0	12.15±0.08
CLOROFI.	8	100.0	0.0	*10.24±0.71
CLOROFI.	8	50.0	0.0	* 9.71±0.34
CLOROFI.	8	10.0	0.0	*10.27±0.15
IRRADIA.	14	0.0	1.0	12.69±0.19
CLO-IRRAD.	8	100.0	1.0	*10.78±0.17
CLO-IRRAD.	8	50.0	1.0	*10.92±0.62
CLO-IRRAD.	7	10.0	1.0	*10.53±0.22

* P<0.05 PRUEBA DE ANDEVA SEGUIDA DE TUKEY.

5) Comparación del efecto de la clorofilina sobre la inducción de ICH y la modificación del IM, por radiación gamma y el efecto de la clorofilina sobre el TGP.

La inducción de ICH después de la radiación, resultó ser significativa respecto al control, sin embargo, está inducción se protegió con el tratamiento de clorofilina (100µg/g), al administrarla 4.5 hrs. antes de irradiar, ya que se protegió el 100% a las células de la inducción de ICH. La dosis de 50µg/g aun protege a las células pero sólo un 51.86% y la dosis de 10µg/g ya no protege a las células.

Con respecto al IM, la radiación disminuyó la división celular significativamente. La administración de la clorofilina para las tres dosis empleadas (100, 50, y 10µg/g), protege hasta un 100% a las células de la disminución del IM, causado por la radiación. Y las dosis de 5 y 1 µg/g de clorofilina ya no protegieron a las células de la disminución del IM causada por la radiación.

Por lo que la clorofilina es capaz de proteger a las células del mecanismo o mecanismos de daño producidos por la radiación, que inducen ICH y disminuyen el IM.

Sin embargo la clorofilina acelera el TGP aproximadamente 2 hrs., por lo que no se puede determinar su efecto radioprotector.

VI DISCUSION DE RESULTADOS

1 DETERMINACIÓN DE LA CLOROFILINA.

Aplicando protocolos previamente establecidos para la determinación de ICH, por medio de la tinción diferencial de las cromátidas hermanas (Morales-Ramírez, 1980 y 1983), no se logró una buena tinción diferencial a los ratones que se les aplicó clorofilina 0.5 hrs. antes de la aplicación de BrdU (Tabla No.1), observándose también la presencia de algunas metafases con tres tonos. Por lo que basándonos en el principio de la tinción diferencial en tres tonos se supuso que existía un impedimento para que la BrdU se absorbiera normalmente cuando la concentración de clorofilina era alta causando el efecto de adsorción a bajas dosis de BrdU y después de que la clorofilina se absorbía casi totalmente, la BrdU se podía absorber más rápidamente, provocando el efecto de dosis alta, Lo que produjo metafases en tres tonos.

A partir de lo anteriormente expuesto, las posibles explicaciones a este suceso son: a) que tal vez existía una competencia en la cavidad peritoneal por los sitios de absorción entre BrdU y la clorofilina, b) que la competencia de absorción fuera a nivel celular.

Por lo que se determinó la cinética de absorción de la clorofilina para establecer el tiempo en el cual la interferencia entre la BrdU y clorofilina se redujera al máximo. La figura 2 muestra el comportamiento de la clorofilina en la cavidad peritoneal y en la sangre, encontrándose que a las 4.5 hrs., la clorofilina ya había sido absorbida casi totalmente de cavidad peritoneal y se encontraba la mayor concentración en sangre, por lo que este fué el tiempo seleccionado para modificar el protocolo. Los resultados obtenidos confirman que existía una competencia en la cavidad peritoneal por los sitios de absorción entre la BrdU y la clorofilina (tabla 1), al observar que el grupo al

cual se le inyectó la clorofilina 4.5 hrs. antes de la inyección de BrdU presentó una buena tinción diferencial.

2. TIEMPO DE IRRADIACION

El tiempo real de irradiación en el Vick-Rad ^{60}Co , empleadó, fué de 25 seg. Al realizar el promedio de la dosimetría proporcionada por el ININ se obtuvo 1.07 Gy, lo cual resultó ser lo esperado aproximadamente.

3. EFECTO DE LA CLOROFILINA

La clorofilina administrada a dosis de 100, 50 y 10 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal a los ratones, no indujo ICH, ya que no hubo efecto significativo comparado con el control, lo que concuerda con el hecho de que los ratones no presentaron signos de toxicidad. Ong et al. (1986) y Zimmering et al. (1990), tampoco han encontrado toxicidad de la clorofilina en *Salmonella* y *D. melanogaster*. Por otra parte La clorofilina tampoco presentó ningún efecto sobre el IM, lo cual concuerda con autores como Ong, et al. (1986), ya que no encontraron inhibición en el crecimiento celular por la clorofilina.

No se ha encontrado relación entre la inducción de ICH, el retardo mitótico y la variación del TGP, causados por radiación (Morales-Ramírez, 1984), esto concuerda con nuestros resultados ya que la respuesta a la radiación de estos tres parámetros fué independiente y distinta para cada uno de ellos, al igual que la respuesta de radioprotección cuando se les administró clorofilina. Por una parte la dosis alta de clorofilina (100 μg), fué la única que protegió en un 100% a las células de la inducción de ICH causados por radiación. Sin embargo las tres dosis empleadas de clorofilina (100, 50 y 10 $\mu\text{g/g}$), fueron capaces de proteger en un 100% la disminución

del IM causado por la radiación. Y finalmente las tres dosis de clorofilina empleadas (100, 50, y 10µg/g), aceleraron el tiempo de división celular. Estas tres respuestas distintas, confirman que no existe ninguna relación directa sobre el efecto de la radiación en los tres parámetros determinados.

Al haber acelerado la clorofilina el TGP, descarta la posibilidad de que el mecanismo antimutagénico de la clorofilina sea retrasando el tiempo de división celular, pero abre la posibilidad de que al acelerarlo, tal vez son más rápidamente sustituidas las células maduras por las primordiales, ya que se ha reportado que la aceleración del tiempo de división puede ser un factor importante en los mecanismos antimutágenos (Selman, 1983).

Por otra parte, tal vez el tiempo que se acelera la división celular, no tiene nada que ver con el mecanismo radioprotector de la clorofilina. Además de que es importante conocer el mecanismo por el cual la clorofilina acelera la división celular y el mecanismo por el cual radioprotege, para poder relacionarlos.

4. EFECTO DE LA CLOROFILINA VS RADIACION GAMMA

4.1 INDUCCION DE ICH

Se ha demostrado que la radiación gamma induce ICH, desde dosis muy bajas a dosis altas (Goto, et al., 1975; Abramovsky et al., 1978; Hafez y Elnabi, 1986 y Morales-Ramirez, et al., 1984). En este trabajo se observó que la radiación induce un ICH más por metafase, y aunque la inducción no fué tan alta (hasta 3 ICH), como en otros trabajos (Morales-Ramirez et al., 1984), pero sí fué constante, reproducible y significativa como lo muestran las tablas 5 y 6.

En los grupos control y clorofilina (100µg/gr) la distribución de frecuencias se ajusta a la de tipo Poisson,

para el grupo irradiado la curva se desplaza hacia frecuencias mayores hasta de 10 y 11 ICH/cel., resultando significativo al realizar la prueba de χ^2 (Fig. 23). Para el grupo clorofilina la distribución se ajusta a la de tipo Poisson similar a la del grupo control (no significativo), lo cual indica que la clorofilina no tiene efecto sobre la distribución de ICH. En el grupo clorofilina-irradiado (100 μ g/g), la distribución de frecuencias también se ajusta a la de tipo Poisson, pero no perfectamente, lo cual indica el efecto de la radiación que la clorofilina no pudo proteger (Fig. 23).

Se ha reportado la inhibición de sustancias formadoras de radicales libres; como la hidroxilamina, hidrazina e isoniazida, por la cisteína, lo que sugieren que la propiedad reductora de la cisteína inhibe la actividad de estos radicales libres y super-óxidos. El hecho de que la cisteína reduzca los ICH inducidos por estas sustancias, permite inferir que los radicales libres y peróxidos están involucrados directamente en la inducción de ICH (Speit, et al., 1980).

La clorofilina demostró ser capaz de proteger a las células hasta un 100% de los ICH radioinducidos con la dosis de 100 μ g/g (Tabla 6), lo cual indica que los ICH son causados por efecto indirecto de la radiación, tal vez por la producción de radicales libres. A partir de que la inducción de ICH se origine por la producción de radicales libres generados con la radiación, entonces tal vez el mecanismo de radioprotección de la clorofilina sea por la captura de estos radicales libres, lo cual concuerda con Bronzetti et al. (1988), que proponen la captura de radicales libres como el mecanismo antimutágeno de la clorofilina. Este mecanismo de protección ya ha sido propuesto para la cisteína en la inducción de ICH por radiación, encontrando una protección hasta del 100% (Mendiola-Cruz y Morales-Ramirez, 1989).

Si la clorofilina captura los radicales libres formados por la radiación, entonces ésta evita la formación de aductos

y en general lesiones en el ADN que producen ICH.

El efecto radioprotector de la clorofilina sobre la inducción de ICH resultó ser dosis-dependiente ya que la dosis de 100µg/g protegió el 100%, la dosis de 50µg/g, solamente el 51.86% y la dosis de 10 µg/g ya no protegió a las células de la inducción de ICH causados por la radiación (Figura 22).

4.2. EFECTO SOBRE EL IM

El IM mide la capacidad reproductora y constituye un índice confiable de la radiosensibilidad celular.

Al exponer a las células a 1 Gy de radiación, el IM se disminuyó significativamente comparado con los controles, lo cual sugiere que existe una disminución en el número de células en división de aproximadamente 75.19%, esto concuerda con Morales-Ramírez, et al. (1983), ya que también encontraron una disminución en el IM causada por la radiación.

En este trabajo encontramos que la clorofilina puede proteger a las células del efecto de la radiación sobre la proliferación celular, ya que las dosis empleadas de clorofilina (100, 50 y 10µg/g), presentaron un comportamiento similar a los controles en cuanto al IM (Tabla 10). Las dosis de 5 y 1µg/g ya no protegen a las células del efecto causado por la radiación sobre el IM, para ratones a los que no se les administro BrdU y mayores de 2 meses (Tabla 11).

Con respecto a este parámetro existe controversia ya que por un lado Piatra et al. (1987) y Vergroesen et al. (1962), encontraron en células de Hamsters chino y en humanos respectivamente, que se puede proteger a las células de la muerte celular inducida por radiación. Sin embargo, Eker y Phil (1964), reportaron que no se puede evitar el daño celular radioinducido que provoca muerte celular. Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez (1987), reportan que la disminución del IM causado por radiación *in vivo* es un efecto directo y que por

lo tanto no puede haber radioprotección.

Se puede inferir en nuestros resultados que la muerte celular ocurrida por efecto de la radiación no se manifestó severamente, lo que puede estar relacionado con la baja inducción de ICH y el no significativo aumento en el TGP. Otros autores (Morales-Ramírez, 1984), han encontrado con la misma dosis de radiación una inducción de hasta tres intercambios más por célula, una mayor disminución en el IM y un aumento significativo del TGP. Esto probablemente se debe a las condiciones de experimentación, específicamente de irradiación.

A pesar de que los tres parámetros aquí determinados son eventos citogenéticos y pueden estar relacionados, cada uno de ellos indica diferentes aspectos celulares y no se puede establecer una comparación directa.

4.3 EFECTO SOBRE EL TGP

El efecto radioprotector de la clorofilina para el TGP no se pudo determinar ya que la clorofilina acelera el tiempo de división celular aproximadamente 2 hrs., lo cual resultó significativo comparado con el control, y por otra parte aunque la radiación retardó el tiempo de división celular, este no fue significativo (0.54 hrs.), respecto al control. Si nosotros midieramos esto, no estaríamos hablando de protección sino de una compensación.

La discusión sobre las posibles causas y efectos de este parámetro se llevo a cabo anteriormente.

5. COMPARACION DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA INDUCCION DE ICH Y LA MODIFICACION DEL IM, POR RADIACION GAMMA, ADEMAS DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL TGP.

Respecto a la comparación del efecto de la radiación gamma para los tres parámetros, es evidente que cada uno de ellos sufre modificaciones, ya que se observó inducción de ICH, disminución del IM y poco retraso del TGP (no significativo).

Analizando el efecto de la clorofilina sobre estos eventos se encontró que la inducción de ICH y la disminución del IM, fueron inhibidos en un 100% por la clorofilina, al ser administrada 4.5 hrs. antes de irradiarse y que el mecanismo probablemente fué por captura de radicales libres. Que la clorofilina acelera 2 hrs. la división celular, mientras que la radiación retarda únicamente 0.54 hrs. la división celular, por lo que no se puede determinar una radioprotección.

Dado que la única dosis de clorofilina que protegió el 100% la inducción de los ICH fue la de $100\mu\text{g/g}$, que las tres dosis de clorofilina (100 , 50 y $10\mu\text{g/g}$), protegieron la disminución del IM en un 100%, y que las tres dosis de clorofilina (100 , 50 y $10\mu\text{g/g}$), aceleraron el tiempo de división celular, sugiere que dichos eventos ocurren de manera independiente y que no hay correlación entre la modificación de los tres parámetros.

La inducción de ICH y la disminución del IM, constituyeron una respuesta clara del efecto de la radiación gamma, a diferencia de la respuesta de la radiación sobre el TGP.

6. EFECTOS COLATERALES DE LA CLOROFILINA

La clorofilina no presentó efectos tóxicos, ya que los organismos a los que se les administró tuvieron una apariencia semejante a la de los controles.

Respecto a la respuesta citotóxica, la clorofilina aceleró el tiempo de división celular de la médula ósea en los ratones. Otros Autores como Ong et al. (1986), Zimmering, et al. (1990), han reportado nulo efecto citotóxico de la clorofilina. Pero cabe resaltar que las condiciones experimentales son determinantes para poder comparar resultados, ya que el tipo celular, el tipo de organismos, las concentraciones empleadas, la temperatura, el pK, el pH, la concentración de oxígeno, la realización del experimento *in vivo* o *in vitro* etc., influyen directamente sobre el tipo de respuesta.

El único trabajo que precede a este es el realizado por Zimmering et al. (1990), en el cual observaron radioprotección de la clorofilina sobre la inducción de mutaciones en las alas de *D. melanogaster* (prueba de SMART), resultando ser la primera evidencia del efecto radioprotector de la clorofilina.

Nuestro trabajo representa la primera evidencia del efecto radioprotector probado en mamíferos *in vivo* (células de médula ósea de ratón), sobre la inducción de ICH y reducción del IM causado por la radiación. Las aportaciones al estudio de la clorofilina de este trabajo son:

- Le confiere además de antimutágeno, la propiedad de radioprotector a la clorofilina.
- Reafirma la radioprotección de la clorofilina.
- Se encuentra radioprotección también en mamíferos, no solo en moscas.
- Aporta evidencias más directas sobre el posible mecanismo de radioprotección de la clorofilina.

VII CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

Por lo tanto se puede considerar bajo nuestras condiciones de trabajo las siguientes conclusiones:

1. La clorofilina protege a las células de la inducción de ICH causados por radiación gamma, en forma dosis-dependiente.
2. La inducción de ICH y la disminución del IM, causados por radiación es provocado por vía indirecta.
3. El mecanismo de formación de ICH y disminución del IM es probablemente vía radicales libres, por lo que el mecanismo de acción de la radioprotección de la clorofilina es probablemente por captura de radicales libres.
4. La clorofilina per se acelera el TGP, pero no tiene efecto sobre la inducción de ICH, ni sobre el IM.
5. Dado que la dosis de clorofilina que protege la inducción de ICH y el IM, son diferentes, indica que no existe relación entre el daño inductor de ICH y el retardo mitótico.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abe, S. y Sasaki, M., (1977), Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster cells exposed to various chemicals. J. Natl. Cancer Inst. 58:1635-1641.
- Abramovsky, I., Vorsanger, G. y Hirschorn, K., (1978), Sister chromatid exchange induced by X ray of human lymphocytes and the effect of L-cysteine. Mutation Res. 50:93-100.
- Altamirano, L. M., (1989), Contaminación ambiental, Genética y enfermedad, topicos de investigación y posgrado, ENEP-Zaragoza. Genet.. 18:231-237.
- Allen, J. W. y Latt, S.A., (1976), Analysis of sister chromatid exchange formation *in vivo* in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. Nature. 260:449-451.
- Allen, J. W., Shuler, C.F., Mendes, R. W. y Latt, S.A., (1977), A simplified technique for *in vivo* analysis of sister-chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. Cytogen. Cell. Genet. 18:231-237.
- Ames, B. N., (1983), Dietary Carcinogens and anticarcinogens. Science. 221:1256-1254.
- Andersson, A.; Khilman, B. y Palitti, F; (1981), Production of sister chromatid exchanges by X-rays under aerobic conditions. Hereditas. 94:41-44.
- Arimoto, S., Negishi T. y Hayatsu H., (1980a), Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens, Cancer Lett. 11:29-33.
- Arimoto, S., Ohara Y., Namba, T., Negishi, T. y Hayatsu, H., (1980b), Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 92(2)662-668.

- Ashby, J. y Brita, B., (1985), Concomitant observations of UDS in the liver and micronucleic in the bone marrow of rats exposed to cyclophosphamide or 2-acetylaminofluorene. *Mutation Research*, 150:383-392.
- Bostock, C. J. y Christie, S., (1976), Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different regions of chromosome of the kangaroo rat (*Dipodomys ordii*). *Chromosoma*. 56:275-287.
- Bronzetti, G., Gall, A. y Della, C., (1988), The role of short term test in antimutagenic investigation. Studies of the chlorophyllin a cobalt. En Kuroda Shankel, D.M. y Shirasu, Y. (eds). 73.
- Carrano, A. V. y Wolff, S., (1975), Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian Muntjac. *Chromosoma*. 53:361-369.
- Carrano, A. V. y Johnston, G. R., (1977), The distribution of Mitomicin C induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian Muntjac. *Chromosoma*. 64:97-107.
- Carrano, A. V., Thompson, L. H., Stetka, D. G., Minkler, J. L., Mazrimas, J. A. y Fong, S. (1979), DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific-locus mutations. *Mutation Res.* 63:175-188.
- Casarett, P. A., (1968), Radiation Biology. Prentice-Hall, Inc. New. Jersey Unites Estates, Atomic Energy Commission, Washington D. C. pp.368.
- Cassel, D. M. y Latt, S. A., (1980), Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by 8-methoxy-psoralen in Chinese hamster ovary cells. *Exptl. Cell Res.* 128:15-22.
- Changati, S.; Schoungerg, S. y German, J., (1974), A many fold increase in sister chromatid exchange in Blooms syndrome lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*

77(11):4508-4512.

- Crossen, P. E., (1983), DNA replication and sister chromatid exchange in 9 qh⁺. *Cytogenet. Cell. Genet.* 35:152-155.
- Darroudi, F., Targa, H. y Natarajan, A. T., (1988), Influence of dietary carrot on cytostatic drug activity of cyclophosphamide and its main directly acting metabolite: Induction of sister-chromatids exchanges in normal human lymphocytes, Chinese hamster ovary cell, and their DNA repair-deficient cell lines. *Mutation Res.* 198:327-335.
- Davidson, R. L., Kaufman, E. R., Dougherty, G. P., Ovellette, A. M., Difolca, C. M. y Latt, S. A., (1980), Induction of sister chromatid exchanges by BudR is largely independent of the BudR content of DNA. *Nature* 284:74-76.
- De Flora, S. y Ramel, C., (1988), Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Clasification and overview. *Mutation Res.* 202:285-306.
- Eker, P. y Phil, A., (1964), Studies on the growth inhibiting and radioprotective effect of cysteamine and AET on mammalian cells in tissue culture. *Radiation Res.* 21:165-179.
- Feng, P-C., Chang, Y-Y., Chu, J-X., Chang, X-P. y Fang, L-S, (1989), Antimutagenic activities of chlorophyllin. *Environ. Mol. Mutagen.* 14(suppl.15):60.
- Fornace, A.J., Nagasawa, H. y Little, J.B., (1980), Relationship of DNA repair to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and survival during liquid holding recovery in X-irradiated mammalian cells. *Mutation Res.* 70:323-336.
- Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H y Sugiyama, (1975), To simple diferrential Giemsa staining of sister chromatids after treatement with photosensitive dyes and exposure to light and mechanism of stating.

Chromosoma. 53:223-230.

- Hafez, M. y El-nabi, A., (1986), Enhanced response to the induction of sister chromatid exchange by gamma radiation in neurofibromatosis. Cancer. 10:1937-1940.
- Harris, W. y Phillips, L., (1971), Radiobiological and biochemical studies of thiophosphate radioprotective compound related to cysteamine. Radiation Res. 46:362-379.
- Hartman, E.P. y Shankel, D.M., (1990), Antimutagens and Anticarcinogens: A Survey of putative interceptor Molecules. Environ. Mol. Mutagen. 15:145-182.
- Hayatsu, H., Arimoto, S., Togawa, K. y Makita, M., (1981), Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: inhibition by oleic and linoleic acids. Mutation Res. 81:287-293.
- Hayatsu, H. y Arimoto, S. y Negishi, T., (1988), Dietary inhibitors of mutagenesis y carcinogenesis. Mutation Res. 202:429-446.
- INDEX, (1976), The Index Merck, an encyclopedia of chemicals and drugs, 9 ed., Merck and Co. USA. 274-275.
- Inouye, T., Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Watanebe, M., Ohta, T. y Shirasu, Y., (1988), Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mouse bone marrow cells by post-treatment with vanillin. Mutation Res. 202:93-95.
- Ishii, Y. y Bender, M.A., (1980), Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister-chromatid exchanges in chinese hamster cells. Mutation Res. 79:19-32.
- Ishii, Y., (1981), Nature of the mitomycin c induced lesion causing sister chromatid exchange. Mutation Res. 91:51-55.
- Ivett, J.L. y Tice, R.R., (1982), Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular

- proliferation kinetics. Environ. Mutagen., 4:358.
- Kada, T., Morita, K. y Inoue, T., (1978), Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrrolysate. Mutation Res. 53:351-353.
- Kada, T., Kato, M., Aikawa, K. y Kiriyaama, S., (1984), Adsorption of pyrrolysate mutagens by vegetable fibers. Mutation Res. 141:149-152.
- Kada, T., Kaneko, K., Matsuzaki, S., Matsuzaki, T. y Hara, Y., (1985), Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens a case of the green tea factor. Mutation Res. 150:127-132.
- Kano, Y. y Fujiwara, Y., (1981), Roles of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister chromatid exchange and a higher induction in Fanconi's anemia cells. Mutation Res. 81:35-375.
- Kato, H., (1974), Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a Brud-labelling method. Nature. 251:70-72.
- Kato, H. y Sandberg, A. A., (1977), The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro. Exptl. Cell. Res. 109:445-448.
- Kato, H., (1980a), Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. Cencer Genet. Cytogenet. 2:69-77.
- Kato, H., (1980b), Temperature-dependence of sister chromatid exchange: An implication for its mechanism. Cancer Genet. and Cytogenet. 2:61-67.
- Kato, Y., Nemoto, N., Tanaka, M. y Takayama, Shozo, (1983), Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. Mutation Res. 121:153-157.
- Kedar, N. P., (1984), Handbook of Radiobiology. CRC. Press Inc. Boca Raton, Florida. 296 pp.
- Kephart, J.C., (1955), Chorophyll derivates their chemistry.

- Commercial Preparation and Uses. Econ. Bot. 9:3-38.
- King, M.T., Wild, D., Gocke, E. y Eckhardt, K., (1982), 5-Bromodeoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis *in vivo* of sister chromatid exchange in bone-marrow and spermatogonial cells. Mutation Res. 97:117-129.
- Kinsella, A.R. y Radman, M., (1978), Tumor promoter induces sister chromatid exchanges: Relevance to mechanism of carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3544-3547.
- Krasnikova, A. N., (1974), Proliferation of epithelium surrounding a skin wound in hairless mice treated with sodium. Eksperimental noi Biologii Meditsing. 76(10):99-102
- Lai, C-N., (1979), Chorophyll: The active factor in wheat sprout extrac inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. Nutr. Cancer. 1:19-21.
- Lai, C-N., Butler, A.M. y Matney, T.S., (1980), Antimutagenic activities of common vegetables and their chorophyll content. Mutation Res. 77:245-250.
- Latt, A., (1973), Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. 70(12):3395-3399.
- Latt, S. A., (1974a), Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. Science. 185:75-76.
- Latt, S. A., (1974b), Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomicin-C. Proc. Natl. Acad. Sci. 71:3162-3166.
- Latt, S., (1979), Sister chromatid exchanges. Genetics. 92:83-85.
- Latt, S. A., Allen, J., Bloom, S. E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E. Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B. y Wolff, S., (1981), Sister chromatid exchanges: a report of the Gene-Tox program.

Mutation Res. 87:17-62.

- Liebeskind, D., Bases, R., Mendez, F., Elequin, F. y Koenigsberg, M., (1979), Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Science* 205:1273-1275.
- Littlefield, L.G., Colyer, S.P., Jower, E.C. y Dufraim, R.J., (1979), Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to ionizing radiation during G₀. *Radiat. Res.* 78:514-521.
- Mac Rae, W. D., Machinnon, E. A. y Stich, H. F., (1979), The fate of U. V. induced lesions affecting SCEs, chromosome aberrations and survival of CHO cells arrested by deprivation of arginine. *Chromosome.* 72:15-22.
- Matney, T.S., (1986), Introduction: Natural environmental antimutagens. In Shankel D.M., Harman, P.E., Kada, T. y Hollander, A. (eds) (1986). 129-130.
- McClintock, B., (1938), The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics.* 23:315-376.
- McFee, A.F., Lowe, K.W. y San Sebastian, J.R., (1983), Improved sister-chromatid differentiation using paraffin-coated bromo-deoxyuridine tablets in mice. *Mutation Res.* 119:83-88.
- Mendiola-Cruz, M.T. y Morales-Ramírez, (1989), Effect of pretreatment with Cysteamine on γ -radiation-induced Sister Chromatid Exchanges in mouse bone marrow cell *in vivo*. *Radiat. Res.*, 118:131-138.
- Minakata, H., Komura, H., Nakanishi, K., y Kada, T., (1983), Protoanemonin, an antimutagen isolated from plants. *Mutation Res.* 116:317-322.
- Morales-Ramírez, P., (1980), Analysis *in vivo* of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutation Res.* 74:61-69.

- Morales, R. P., Vallarino, K.T. y Rodríguez, R. R., (1983), Effect of BrdUrd and low doses of gamma radiation on sister chromatid exchange, chromosome breaks, and mitotic delay in mouse bone marrow cells *in vivo*. Environ. Mut. 5:589-602.
- Morales Ramírez, P., Efecto de los rayos gamma sobre la inducción y persistencia de intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) y otros eventos citogenéticos en células de médula ósea de ratón *in vivo*. Tesis Doctoral, UNAM, 143pp. (1984).
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly y Rodríguez-Reyes, R., (1984a), Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. Sister Chromatid Exchange, 566-611.
- Morales-Ramírez, P.; Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R., (1984b), *In vivo* Persistence of sister chromatid exchanges (SCE), induced by gamma rays in mouse bone marrow cells. Environ. Mut. 6:529-537.
- Morales-Ramírez, P., Rodríguez-Reyes, R. y Vallarino-Kelly, T., (1987), Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges *in vivo* by three-way differentiation. Mutation Res. 60:329-337.
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R., (1988), Occurrence *in vivo* of sister chromatid exchanges at the same locus in successive cell divisions caused by non-repairable lesion induced by gamma rays. Environ Mol. Mutagen. 11:183-193.
- Morales-Ramírez, P., Rodríguez-Reyes, R. y Vallarino-Kelly, T., (1990), Fate of DNA lesions that elicit SCE. Mutation Res. 232:77-88.
- Morgan, W. F. y Cleaver, J. E., (1982), 3-Amino benzamide synergistically increases sister-chromatid exchanges in cells exposed to methane sulfonate but not to ultraviolet light. Mutation Res. 104:361-366.
- Morgan, W. F. y Crossen, P. E., (1981), Factors influencing

- sister chromatid exchange rate in culture human lymphocytes. *Mutation Res.* 81:395-402.
- Morita, K., Hara, M. y Kada T., (1978), Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 42(6):1235-1238.
- Nagasawa, H. y Little, J., (1981), Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by x-rays in density inhibited cultures of mouse 10T 1/2 cells. *Radiation Res.* 87:538-551.
- Nakanishi, Y. y Schneider, E. L., (1979), *In vivo* sister chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutation Res.* 60:329-337.
- Natarajan, A. T., Csukas, I. y Van Zeeland, A. A., (1981), Contribution of incorporated 5-bromodeoxyuridine in DNA to the frequencies of sister-chromatid exchanges induced by inhibitors of poly-(ADP-ribose) polymerase. *Mutation Res.* 84:125-132.
- Negishi, T., Arimoto, S., Nishizaki, C. y Hayatsu, H., (1989), Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5h-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis.* 10 (1):145-149.
- Oikawa, A., Thoda, H., Kanai, M., Miwa, M. y Sugimura, T., (1980), Inhibitors of poli, (adenosine diphosphate ribose), polimerase induce sister chromatid exchanges. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 97:1311-1316.
- Ong, T-M., Whong, W-Z., Stewart, J. y Brockman. H.E., (1986), Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutation Res.* 173:111-115.
- Packer, J.E., Mahood, J.S., Mora-Arellano, V.O., Slater, T.F., Willson, R.L. y Wolfenden, B.S., (1981), Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of

- a peroxy-radical with β -carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane. Biochem. Biophys. Res. Comm. 98(4):901-906.
- Pera, F. y Mattias, P., (1976), Labelling of DNA and differential sister chromatid staining after BrdUrd treatment in vivo. Chromosoma. 57:13-18.
- Perry, P. y Wolff, S., (1974), New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature. 251:156-158.
- Perry, P. y Evans, H. J., (1975), Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature. 258:121-125.
- Peto, R., Doll, R. Buckley, J.D. y Sporn, M.B., (1981), Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?. Nature 290:201-208.
- Pitra, C.; Hartwing, M. y Korner, J., (1977), Radioprotective action of cysteamine: primary DNA lesions, cell survival and mutation frequency. Stud. Biophys. 62:31-43
- Pizzarello D.J., (1982), Radiation Biology. CRC. Press. Inc. Boca Raton, Florida. 298 pp.
- Popescu, N. C., Amsbaugh, S.C. y DiPaolo, J. A., (1977), Sister chromatid exchange and chromosome aberration analysis with the use of several carcinogens and non carcinogens. J. Natl. Cancer Inst. 59:289-293.
- Rainaldi, R. y Mariani, T., (1982), The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA. Mutation Res. 103:333-337.
- Renault, G., Gentil, A. y Chrounlinkou, I., (1982), Kinetics of induction of sister-chromatid exchanges by X-rays through two cell cycles. Mutation Res. 94:359-368.
- Renner, H.W., (1985), Anticlastogenic effect of β -carotene in Chinese hamsters time and dose response studies with different mutagens. Mutation Res. 144:251-256.

- Robins, E. (1986): Inhibition of aflatoxin mutagenicity by chlorophyllin in *Neurospora crassa*. In Shankel, D.M., Hartman, P.E., Kada, T. y Hollander, A. (eds) (1986). 575-576.
- Rodríguez-Arnaiz, R. y Zimmering, S., (1989), Chlorophyllin is an antimutagen in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen 14 (Suppl.15):165.
- Rousseau, E.J., Davison, A.J. y Rosin, M.P., (1989), Beta-carotene in aqueous dispersion as a scavenger of H_2O_2/CU^{2+} /ascorbate generated free radicals: effects of partial pressure of oxygen. Environ Mol. Mutagen. 14(Suppl. 115):167.
- Salamanca, G.F., (1988), Citogenética humana. Ed. panamericana. Méx. D.F., p. 219-233.
- Sato, M., Imai, K., Kimura, R. y Murata, T., (1984), Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of Its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. Chem. Pharm. Bull. 32(2):716-722
- Schneider, E. L., Chaillet, J.R. y Tice, R.R., (1976), *In vivo* BrdUrd labeling of mammalian chromosomes. Exp. Cell. Res. 100:396-399.
- Schreck, R. R., Paika, I. J. y Latt, S. A., (1979), *In vivo* induction of sister-chromatid exchanges in liver and marrow cells by drugs requiring metabolic activation. Mutation Res. 64:315-328.
- Schwartzman, J.B. y Gutierrez, C., (1980), The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. Mutation Res. 72:483-489.
- Schwartz, J. L., Banda, M. J. y Wolff, S., (1982), 12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA), induces sister-chromatid exchanges and delays in cell progression in Chinese hamster ovary and human cell

- lines. Mutation Res. 92:393-409.
- Selman J., (1983), Elements of Radiobiology. Charles C. Thomas, United States. pp.
- Shamberger, R.J., Corlett, C.L., Beaman, D.K. y Kasten, B.L., (1979), Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and β -propiolactone. Mutation Res. 66:349-355.
- Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I. y Kada, T., (1985), Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Echerichia coli* B/r. Mutation Res. 149:17-23.
- Speit, G., Wolf, M. y Vogel, W., (1980), The effect of sulfhydryl compounds on sister-chromatid exchanges. Mutation Res. 78:267-272
- Stenstrand, K., (1985), Effects of ionizing radiation on chromosome aberrations, SCE and micronuclei in lymphocytes of smokers and non smokers. Hereditas 102:71-76.
- Stetka, D. G. y Wolff, S., (1976a), Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage by mutagen-carcinogens. I. *In vivo* test for compounds requiring metabolic activation. Mutation Res. 41:333-342.
- Stetka, D. G. y Wolff, S., (1976b), Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. *In vitro* test for compounds requiring metabolic activation. Mutation Res. 41:343-350.
- Stich, H.F., Rosin, M.P. y Bryson, L., (1982), Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffe and tea. Mutation Res. 95:119-128.
- Tawashi, R., Cousineau, M. y Denis, G., (1982), Crystallisation of calcium oxalate dihydrate in normal urine in presence of sodium copper

- chlorophyllin. Urology Res. 10:173-176.
- Taylor, J.H., (1958), Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. Genetics. 43:515-529.
- Terwel, L. y Jan, van der Hoeven C. M., (1985), Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the *Salmonella*/microsome assay. Mutation Res. 152:1-4.
- Thus, R. y Ronne, M., (1982), Localization of SCEs and their possible relationship to dA-dT of dG-dC clusters, respectively, in Chinese hamster V79-E chromosomes. Hereditas 96:295-298.
- Tice, R., Chaillet, J. y Schneider, E. L., (1976), Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges *in vivo*. Exp. Cell Res. 102:426-429.
- UNCEAR.- (1982), La radiación ionizante: Fuentes y efectos biológicos. Comité científico de las naciones unidas para el estudio de los efectos de las radiaciones atómicas. New York. pp.779.
- Vergroesen, A; Budke, L. y Vos, O, (1962), Protection of tissue-culture cells against ionizing radiation. III the influence of anoxia on the radioprotection of tissue culture cells by cysteamine. Int. J. Radiat. Biol. 6(2):117-126.
- Verly, W. G., Paquette, Y. y Tobodeau, C., (1973), Nuclease for DNA Apurinic site may be involved in the maintenance of DNA in normal cells. Nature. 244:67-69.
- Wood, A. W., Huang, M., Chang, R. L., Newmark, H. L., Lehr, R. E., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M. y Conney, A.H., (1982), Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:5513-5517.

- Wolff, S., Bodycote, J. y Painter, R. B., (1974a), Sister chromatid exchanges induced in chinese hamster cells by U.V. irradiation at difeorent stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. Mutation Res. 25:73-81.
- Wolff, S. y Perry, P., (1974b), Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. Chromosoma. 48:341-353.
- Young, W. R. y Beregi, S. J., (1980), Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. Journal of the american geriatrics society. 28(1):46-48.
- Yuhus, M.; (1973), Radiotherapy of experimental lung tumors in the presence and absence of radioprotective drug s-2-(3-aminopropylamino)ethyloesphorothioic acid (WR-2721). J. of the Nat. Con. Inst. 50:69-78.
- Zimmering, S., Olvera, O., Hernandez, M.E., Cruces, M.P., Arceo, C. y Pimental, E., (1990), Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. Mutation Res. 245:47-49.
- Zubiri, V.A., (1946), Medicamentos fotosensibilizadores y fotoprotectores. Trabajos del INCM, tomo VI, Madrid España. 466-474.