



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

" ZARAGOZA "

EFFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA
GENOTOXICIDAD DE LA
CICLOFOSFAMIDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

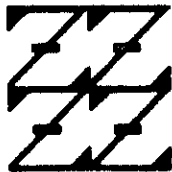
P R E S E N T A :

YOLANDA LINARES ROMERO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A

DIRECTORA DE TESIS: BIOL. MARTHA PATRICIA CRUCES MARTINEZ.

ASESOR INTERNO: DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO.



LO HERMANO S.S.
DE DIRECTOR ESPALAZAN

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

265704



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A MIS PADRES :

ROSA MARÍA ROMERO TORRES Y ROMÁN LINARES SALMÓN.

*En correspondencia al amor, paciencia, comprensión
y por brindarme su confianza. Por ser en todo momento,
mi apoyo más firme y constante. Con profundo agradecimiento.*

A MIS HERMANOS :

GUILLERMO ALFONSO Y JOSÉ ROMÁN.

*Por el cariño y la comprensión en los momentos
más difíciles, por estimular y compartir conmigo
cada uno de mis logros y tropiezos.
Con todo mi amor.*

A DIOS Y A TODA MI FAMILIA :

*Que siguen siendo la razón por la que sigo
adelante y por tener confianza en mí.*

AGRADEZCO SINCERAMENTE A LA BIÓL. MARTHA PATRICIA CRUCES MARTÍNEZ, QUE CON SU CONOCIMIENTO Y EXPERENCIA DIRIGIO EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO, ASÍ COMO POR SUS APORTACIONES EN EL MISMO. MUCHAS GRACIAS POR SU AMISTAD Y POR ALENTARME A SALIR ADELANTE.

AGRADEZCO ESPECIALMENTE A :

DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO.

M. EN B. E. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ.

M. EN C. MA. DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ.

BIOL. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA.

**POR SUS SUGERENCIAS Y APORTACIONES QUE ENRIQUECIERON LA
REALIZACIÓN DE ESTE MANUSCRITO.**

DR. ZIMMERING S.

POR SUS COMENTARIOS Y

SUGERENCIAS EN LA PARTE

EXPERIMENTAL. MUCHAS GRACIAS.

A MIS AMIGAS Y COMPAÑERAS :

SUSANA MURILLO R. Y YOLANDA MARIBEL FLORES E.

Con quienes he compartido éxitos y fracasos.

Gracias por su cariño y amistad que me han demostrado.

ADRIANA HERNANDEZ G.

ARACELI CARBAJAL P.

PATRICIA RAMÍREZ V.

CLAUDIA QUIROZ R.

Por su amistad y afecto.

MI AGRADECIMIENTO POR LAS FACILIDADES Y APOYO DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO A: DORIS BARRON, EMILIO PIMENTEL, CAROLINA ARCEO, DR. VICTOR SALCEDA, M. EN C. OLGA OLVERA Y LA DRA. JUDITH GUZMAN, QUIENES ME BRINDARON SU AFECTO Y CARIÑO.

A TODOS ELLOS Y A LOS QUE HICIERON POSIBLE LA ELABORACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO, LES AGRADEZCO INFINITAMENTE POR SU AYUDA DESINTERASADA, COLABORACIÓN Y ACTITUD POSITIVA.

AGRADEZCO AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES Y AL DEPTO. DE GENÉTICA POR EL APOYO RECIBIDO DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

GRACIAS.....

INDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
2. Generalidades	3
2.1 Agentes Alquilantes	3
2.2 Ciclofosfamida	4
2.3 Antimutágenos	5
2.4 Clorofilina	10
2.5 <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2.6 Ensayos en células germinales de <i>Drosophila</i>	16
2.7 Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas	16
2.8 Justificación	17
3. OBJETIVOS	21
4. Hipótesis	21
5. MATERIAL Y METODOS	22
5.1 Características de las líneas utilizadas de <i>D. melanogaster</i>	22
5.2 Tratamiento	22
5.3 Preparación y Análisis de las alas	27
5.4 Clasificación de las manchas	27
5.5 Criterios utilizados para el análisis de las manchas	28
5.6 Análisis estadístico y evaluación de los datos	28
6. RESULTADOS	33
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	50
9. FIGURAS	51
10.REFERENCIAS	56

RESUMEN

Los antimutágenos son sustancias que pueden disminuir o contrarrestar el daño causado al ADN por diversos agentes. Se ha demostrado que la clorofilina es un antimutágeno contra algunos mutágenos químicos por ejemplo, las aflatoxinas B₁, la dimetil nitrosamina, el benzo(a)pireno, etc. (Ong y col., 1986).

Se evaluó el efecto de la clorofilina sobre la actividad genotóxica de la ciclofosfamida, utilizando la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en el ala de *Drosophila melanogaster* empleando dos marcadores recesivos, mwh (pelos múltiples en el ala), y fir³ (pelos en forma de flama). Se utilizaron dos tratamientos diferentes: En el primero se pretrataron larvas del segundo estadio, con clorofilina (CFL) a las concentraciones de 5, 7 y 10 % durante 24 horas, después del pretratamiento las larvas se sembraron en medio sintético hidratado con 5 ml de ciclofosfamida disuelta en agua. Las dosis de ciclofosfamida que se utilizaron fueron de 1, 2, 3 y 4 mM. En el segundo tratamiento, las larvas correspondientes al segundo y tercer estadio se alimentaron crónicamente con medio sintético, hidratado con 5 ml de las siguientes soluciones: clorofilina (CFL) al 5 %, ciclofosfamida (CFM) al 1, 2 y 3 mM, metil-metano-sulfonato (MMS) 6 mM, o la combinación de clorofilina y cada uno de los mutágenos. Se analizaron las alas de los adultos emergidos de los tratamientos, registrando el número y tamaño de las alas encontradas, además de reportar el porcentaje de viabilidad de los tratamientos. El análisis estadístico de los resultados se hizo por medio de la prueba X² y del programa de cómputo SMART (Frei y Würigler, 1988) con p<0.05. Los resultados indicaron que el porcentaje de viabilidad de las larvas pretratadas con clorofilina no se redujo; sin embargo la combinación de ciclofosfamida y clorofilina resultó ser tóxica para las larvas. Los resultados demuestran que en los dos tratamientos probados la clorofilina no redujo la frecuencia de manchas inducidas por la ciclofosfamida, excepto en el pretratamiento con clorofilina al 10%, sin embargo dado que la combinación fué tóxica hay que tomar con reserva los datos.

1. INTRODUCCIÓN

Las mutaciones se definen como cambios en la calidad, cantidad o arreglo del material genético (Vogel, 1991). Las mutaciones han sido divididas en dos niveles básicamente:

Las mutaciones génicas son alteraciones sobre uno o varios nucleótidos de un gen debidos a sustituciones, inserciones o deleciones de las bases del ADN.

Las mutaciones cromosómicas se conocen comúnmente como aberraciones cromosómicas, pueden ser de tipo estructural o numéricas. Las aberraciones cromosómicas estructurales se deben a alteraciones en la estructura de los cromosomas e incluyen las deleciones, las inversiones y las translocaciones .

Las aberraciones cromosómicas numéricas son el resultado de una alteración de la segregación normal de los cromosomas durante la división celular. Este tipo de aberraciones puede involucrar un solo cromosoma (monosomías y trisomías) o complementos cromosómicos completos (Suzuki y col., 1989).

Las mutaciones se producen espontáneamente o pueden ser inducidas por agentes químicos, físicos o biológicos, tanto en células somáticas como en células germinales (Fried, 1990).

Cuando estas mutaciones ocurren en una célula somática capaz de producir otras células iguales, la correspondiente modificación sólo se perpetúa en células somáticas descendientes de la célula original en que ocurrió la mutación. El daño a células somáticas no es transmisible a futuras generaciones y puede tener efectos en los tejidos corporales del organismo expuesto, pero pueden ocasionar la inducción de enfermedades tales como cáncer.

Las mutaciones en células germinales, pueden ocurrir en cualquier etapa del ciclo vital de un organismo. Cuando la mutación ocurre en un gameto, sólo un miembro de la

progenie es susceptible de poseer el gen mutante. Si, por otro lado, una mutación ocurre a principio de la gametogénesis, varios gametos pueden recibir el gene mutante, incrementándose así sus posibilidades de perpetuación. El daño a células germinales es transmisible a futuras generaciones y puede ocasionar un desarrollo anormal en el feto, muerte fetal, abortos espontáneos, nacimientos prematuros, errores congénitos del metabolismo y alteraciones morfológicas y fisiológicas de diverso orden (Gardner, 1979).

La genética toxicológica, es una subespecialidad de la genética que tiene como objetivo estudiar el efecto de los agentes sobre el material genético y para este fin, utiliza diferentes sistemas de prueba (Brusick, 1987).

La primera evidencia de que un agente químico podía inducir mutaciones fue obtenida por Charlotte Auerbach en 1946, utilizando el sistema de prueba de *Drosophila*, demostró que el gas mostaza incrementaba significativamente la frecuencia de letales recesivos ligados al sexo. Desde entonces se han probado experimentalmente numerosas sustancias químicas, un cálculo aproximado indica que el número de sustancias químicas de uso común actualmente es de mas de 100,000, y que el de sustancias bien estudiadas en cuanto a sus efectos genotóxicos solamente es de entre 8,000 a 10,000, de éstos se ha demostrado que 1,000 son mutagénicas (Vogel, 1991).

2. Generalidades

2.1 Agentes Alquilantes

Los agentes alquilantes forman parte de los fármacos que se utilizan en la quimioterapia del cáncer, son carcinógenos, mutágenos, teratógenos e inmunosupresores. Alquilan diversos grupos nucleofílicos en las proteínas (por ejemplo; grupos sulfhidrilo, carboxilo, nitrógenos imidazólicos) y las bases púricas del ADN, en especial el nitrógeno 7 (N7) , el nitrógeno 3 (N3) y el oxígeno 6 (O6) de la guanina. Como resultado de la interacción con ácidos nucleicos, estos agentes pueden impedir la duplicación del ADN, o producir una mutación que cause la muerte de la célula. En esto se basa el uso de agentes alquilantes en la quimioterapia del cáncer. Por otra parte,

progenie es susceptible de poseer el gen mutante. Si, por otro lado, una mutación ocurre a principio de la gametogénesis, varios gametos pueden recibir el gene mutante, incrementándose así sus posibilidades de perpetuación. El daño a células germinales es transmisible a futuras generaciones y puede ocasionar un desarrollo anormal en el feto, muerte fetal, abortos espontáneos, nacimientos prematuros, errores congénitos del metabolismo y alteraciones morfológicas y fisiológicas de diverso orden (Gardner, 1979).

La genética toxicológica, es una subespecialidad de la genética que tiene como objetivo estudiar el efecto de los agentes sobre el material genético y para este fin, utiliza diferentes sistemas de prueba (Brusick, 1987).

La primera evidencia de que un agente químico podía inducir mutaciones fue obtenida por Charlotte Auerbach en 1946, utilizando el sistema de prueba de *Drosophila*, demostró que el gas mostaza incrementaba significativamente la frecuencia de letales recesivos ligados al sexo. Desde entonces se han probado experimentalmente numerosas sustancias químicas, un cálculo aproximado indica que el número de sustancias químicas de uso común actualmente es de mas de 100,000, y que el de sustancias bien estudiadas en cuanto a sus efectos genotóxicos solamente es de entre 8,000 a 10,000, de éstos se ha demostrado que 1,000 son mutagénicas (Vogel, 1991).

2. Generalidades

2.1 Agentes Alquilantes

Los agentes alquilantes forman parte de los fármacos que se utilizan en la quimioterapia del cáncer, son carcinógenos, mutágenos, teratógenos e inmunosupresores. Alquilan diversos grupos nucleofílicos en las proteínas (por ejemplo; grupos sulfhidrilo, carboxilo, nitrógenos imidazólicos) y las bases púricas del ADN, en especial el nitrógeno 7 (N7) , el nitrógeno 3 (N3) y el oxígeno 6 (O6) de la guanina. Como resultado de la interacción con ácidos nucleicos, estos agentes pueden impedir la duplicación del ADN, o producir una mutación que cause la muerte de la célula. En esto se basa el uso de agentes alquilantes en la quimioterapia del cáncer. Por otra parte,

pueden producirse mutaciones y alteraciones de las propiedades de la superficie celular que causan una multiplicación incontrolada de las células y la pérdida de diferenciación; es decir, las células adquieren características neoplásicas y se desarrollan tumores (Bowman y Rand, 1988).

A partir del año de 1950 se han empleado un gran número de agentes alquilantes en la quimioterapia del cáncer incluyendo las nitrosoureas (carmustina(BCNU), lomustina (CCNU), alquilsulfonatos (busulfán) y a las mostazas nitrogenadas (Farmer, 1994). Este grupo pertenece a la clase de fármacos citotóxicos, que detienen la división celular, principalmente alquilando y uniendo transversalmente bases de la guanina en el ADN (Bowman y Rand, 1988).

2.2 Ciclofosfamida

La ciclofosfamida pertenece al grupo de las mostazas nitrogenadas, se emplea como droga citotóxica para tratar cáncer de mama, enfermedad de Hodgkin, linfomas, leucemias y carcinomas de ovario, entre otros. La ciclofosfamida también presenta propiedades inmunosupresoras, porque se utiliza en el control del rechazo inmunológico, en trasplantes y en desórdenes asociados con una reactividad inmune alterada como son: la artritis reumatoide, el síndrome nefrótico en niños, la granulomatosis de Wegener y los padecimientos alérgicos oculares (Carter, 1976).

Mecanismo de acción

La ciclofosfamida es un agente alquilante capaz de formar uniones covalentes con sustancias nucleofílicas como son los grupos fosfatos, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. Alquila en especial al nitrógeno 7 de la guanina, pero también aunque en menor grado a los nitrógenos 1 y 3 de la adenina, el nitrógeno 3 (N3) de la citosina y el oxígeno 6 (O6) de la guanina, favoreciendo así su tautómero enol, el cual se puede aparear con la timina produciendo finalmente una substitución de las bases guanina-citosina (G-C) por adenina-timina (A-T). La alquilación del nitrógeno 7 de la

guanina, puede también provocar, la apertura del anillo imidazol y la depurinización por escisión de los residuos de guanina, por otra parte, la cadena 2 cloroetil puede alquilar a una segunda guanina a otro grupo nucleofílico, tales como grupos aminos o radicales sulfhidrilos de las proteínas; de esto puede resultar un entrecruzamiento de las dos cadenas del ADN o la unión de éste a una proteína mediante uniones covalentes, reacciones que causan mayor daño al ADN. Cualquiera de estos tres efectos pueden explicar su efecto mutagénico y citotóxico.

La ciclofosfamida es un agente indirecto que requiere del metabolismo del citocromo p450 para llegar a ser un mutágeno (Struck y col., 1971, Sladek, 1973). El principal metabolito alquilante es la mostaza fosforamida, que es el responsable de la actividad de la droga (Coivin y col., 1976, Connors, 1978).

Hampel y col. (1969) demostraron que cuando la ciclofosfamida se activa es capaz de producir aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos humanos *in vitro*. También puede inducir intercambios entre cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en humanos y mamíferos experimentales *in vivo*. En otros sistemas de prueba se ha demostrado que es carcinogénica y teratogénica.

2.3 Antimutágenos

Las mutaciones espontáneas e inducidas por los diferentes agentes tanto en células somáticas como en células germinales merecen especial atención no sólo por razones puramente científicas sino por su significado en la protección humana. Se sabe que el riesgo para la salud, derivado de eventos mutacionales involucran tanto tejido germinal como somático y conduce a enfermedades somáticas, eventos teratogénicos y desordenes hereditarios. Aunque la evidencia directa del origen mutacional de algunas enfermedades en el hombre es limitada, existen algunas inferencias a partir de los resultados experimentales en otros sistemas de prueba. Los estudios sobre la activación de oncogenes en los años recientes indican que las alteraciones específicas en los cromosomas están íntimamente involucradas en los procesos carcinogénicos; aunque la relación entre las mutaciones somáticas y otras enfermedades no está muy bien

establecida, hay evidencia de la relación entre estas y enfermedades tales como la arteriosclerosis, en algunos desordenes neurológicos y el envejecimiento (Ramel y col. 1986).

Los estudios epidemiológicos realizados en los últimos años, indican que el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, aunque la mortalidad debido al cáncer difiere según el lugar, pues en los países situados en las zonas tropicales, en donde las enfermedades transmisibles están todavía muy difundidas, el porcentaje de defunciones debidas al cáncer es mucho menor que en los países industrializados de climas templados, en donde la esperanza de vida se extiende actualmente a unos 70 años (Ondarza, 1985).

Las estimaciones hechas a partir de datos epidemiológicos indican que del 75 al 80 % de los casos de cáncer en los Estados Unidos son provocados por factores ambientales (Doll y Peto, 1981). Estos datos sugieren que ciertos tipos de cáncer en el humano podrían ser prevenidos identificando a los agentes mutagénicos en el ambiente y protegiendo a los humanos de la exposición innecesaria a tales agentes. Dado que es técnicamente imposible eliminar muchos de los mutágenos a los que está expuesto el hombre actualmente, una alternativa es la de identificar agentes que contrarresten o minimizen el daño causado por los mutágenos.

A estas substancias se les conoce como antimutágenos y pertenecen a una gran variedad de familias químicas. Muchos de los antimutágenos que han sido identificados son productos de origen natural (Ong y col., 1986) y como ejemplos se pueden mencionar a la vitamina A y otros carotenoides, las vitaminas C, E y B₂ los elementos traza como el selenio y el zinc, y otros inhibidores, que se encuentran en plantas, tales como la fibra vegetal. Muchos de estos micronutrientes protectores son agentes antioxidantes, por lo cual se ha postulado que el mecanismo de inhibición de la carcinogénesis podría ser el bloqueo en la formación endógena de carcinógenos y la captura de radicales libres del oxígeno o de especies electrofílicas exógenas (Wattenberg, 1983).

Los niveles en que pueden actuar los antimutágenos son los siguientes.

- a) Prevención de la formación de mutágenos.
- b) Intercepción de mutágenos por organelos celulares y tejidos.
- c) Intercepción de mutágenos por enzimas o por componentes presentes en la célula o sus alrededores.
- d) Neutralización de las lesiones premutagénicas o mutagénicas por compuestos químicos o por varios mecanismos que inducen la reparación del ADN libre de error, que bloqueen la reparación propensa a error, o la inactivación metabólica de mutágenos (Wattenberg, 1983).

De Flora y Ramel (1988), propusieron una clasificación de antimutágenos y anticarcinógenos, separando los que actúan extracelularmente de aquéllos que lo hacen intracelularmente (Tabla 1).

Los antimutágenos y anticarcinógenos se dividen en tres grandes grupos :

- A) Extracelulares
- B) Intracelulares
- C) En células iniciadas o neoplasia.

A) Están incluidos aquellos que inhiben la formación del mutágeno y sus precursores, impidiendo la penetración al organismo o a las células y favoreciendo su eliminación ; y lo ayudan a la retención del mutágeno en células no blanco, aquellos que inhiben la activación de los promutágenos y los que inducen mecanismos de desintoxicación.

B) Se encuentran los que bloquean a las moléculas reactivas y reaccionan química o enzimáticamente con moléculas electrofílicas. Estos inhibidores que atrapan metabólicamente electrófilos cargados positivamente o radicales de oxígeno, actúan como antioxidantes que protegen al ADN.

C) Pertenecen a este grupo, los que actúan en células iniciadas o neoplásicas, modulando la promoción del tumor, impidiendo el efecto genotóxico y la proliferación celular, capturando radicales libres, induciendo diferenciación celular o modulando las señales de transcripción.

TABLA 1. MECANISMO DE INHIBICION DE MUTAGENESIS Y CARCINOGENESIS**INHIBIDORES QUE ACTUAN EXTRACELULARMENTE**

a) En la captación de mutágenos o de sus precursores.

- Impidiendo su penetración.
- Favoreciendo su remoción.

b) En la formación endógena de mutágenos.

- Inhibiendo la reacciones de nitrosación.
- Modificando la flora microbiana intestinal.

c) En la desactivación de mutágenos por :

- Reacciones físicas.
Enzimáticas.
- Reacciones químicas {
No Enzimáticas.

INHIBIDORES QUE ACTUAN INTRACELULARMENTE

a) Moduladores del metabolismo.

- Inhibiendo la replicación celular.
- Favoreciendo la retención de mutágenos en células poco importantes para el desarrollo del proceso.
- Inhibiendo la activación de promutágenos.

b) Inducción de mecanismos de desintoxicación.

- Bloqueo de moléculas reactivas.
- Reacción química o enzimática.
- Captación de especies activas del oxígeno.
- Protección de sitios nucleofílicos en el ADN.

c) Moduladores de la replicación o reparación del ADN.

- Incrementando la fidelidad en la duplicación del ADN.
- Favoreciendo la reparación de ADN dañado.
- Inhibiendo la reparación del ADN propensa a error.

Referencia : De Flora, S. y Ramel, C. (1988). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. Mutation Research. 202:285-306.

2.4 Clorofilina

La clorofilina cuprosódica es un derivado de la clorofila que se ha utilizado durante décadas como desodorante interno y como colorante semi-sintético. Se obtiene a partir de la clorofila por saponificación y reemplazo del magnesio quelado por cobre (Chernomorsky, 1993).

A partir de estudios realizados en *Salmonella* se demostró que la clorofilina era un agente antimutagénico sumamente eficiente que reducía significativamente o que eliminaba totalmente la actividad mutagénica de un número notable de carcinógenos y mutágenos químicos como: las aflatoxinas B₁, el 2-aminoantraceno, el benzo(a)pireno, la dimetil nitrosamina y otras nitrosaminas relacionadas con el tabaco y se demostró que inhibía también la mutagenicidad de mezclas complejas, como el humo de cigarro, el tabaco en polvo, las partículas de la combustión del diesel, las partículas suspendidas en el aire, carne frita, pimienta negra y vino tinto (Ong y col., 1986, Warner y col., 1991, Romert y col., 1992, Cho y col., 1996, Madrigal y col., 1997, Negishi y col., 1997, Tang y Edenharter, 1997). El efecto protector de la clorofilina ha sido observado en eventos genéticos inducidos por la radiación gamma y el trióxido de cromo (VI) en células somáticas de *Drosophila melanogaster* y en células de médula ósea de ratón *in vivo* (Zimmering y col., 1990, Olvera y col., 1993, Morales y García, 1994) (Tabla 2).

También se ha evidenciado el efecto anticlastogénico de la clorofilina contra potentes compuestos metálicos (cloruro de cesio, cloruro de cobalto, cloruro de mercurio y óxido de cromo (VI)), en células de la médula ósea en pruebas con ratón (Ghosh y col., 1991a,b, y Sarkar y col., 1993). Sin embargo se ha observado que a baja concentración la clorofilina incrementa la mutagenicidad de las nitrosaminas específicas del tabaco (Romert y col., 1992) (Tabla 3).

En pruebas realizadas en el hígado de rata e hígado de trucha se ha comprobado que la clorofilina forma un complejo molecular actuando como inhibidor contra el carcinógeno 2-amino-3-metilimidazo(4-5f)-quinolina (IQ) y la AFB₁ (Dashwood, 1992, Dashwood y col., 1991).

TABLA 2. EFECTOS DE LA CLOROFILA Y CLOROFILINA CON RESPECTO A LA MUTAGENESIS Y CARCINOGENESIS.

Agente	Sistema de Prueba	Efectos y activación contra mutágenos	Referencias
Efectos antimutagénicos CLOROFILINA	<i>Salmonella typhimurium</i>	Benzo[a]pireno (+) otros carcinógenos (+) Mezclas complejas en la dieta y en el ambiente (+) Aflatoxina B ₁ (AFB ₁) (+)	Arimoto y col., 1980a. Ong y col., 1986. Whong y col., 1988.
	<i>S. typhimurium</i> /hígado de rata y el sistema S9 en microsomas	Productos de la pirolisis del ácido amino (-)	Anmoto y col., 1980b.
	<i>S. typhimurium</i> /prueba en microsomas	Mezclas complejas mutagénicas (-)	Ong y col., 1988.
	<i>Salmonella arabinosa</i>	La MNNG y la AFB ₁ B[a]P.2*A (+)	Warner y col., 1991
	<i>Salmonella</i> /activación hígado de trucha	La AFB ₁ y 2 aminas heterocíclicas (-) 2-amino-3metilimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)	Dashwood y col., 1991.
	<i>Salmonella</i> prueba de mutagenicidad	(+)	Dashwood y Liew., 1992.
	<i>Drosophila</i> Células V79 de hamster chino	Oxido de cromo (VI) (+) Benzo[a]pyreno (+)	Olvera y col., 1993. Katon y col., 1983.
Clorofila y Clorofilina	<i>Salmonella typhimurium</i>	3metilclolantreno y B[a]P (+)	Lai, 1979., y Lai y col., 1980.
	<i>Salmonella</i> y en microsomas de mamíferos	Acción directa e indirecta de carcinógenos (+)	Kimm y col., 1982.
	<i>Salmonella typhimurium</i> cepa TA98 y <i>Drosophila</i> sp.	Trp-P-2 (+)	Negishi y col., 1989.
Otros efectos protectores Clorofilina	<i>Drosophila melanogaster</i>	Rayos γ (+)	Zimmering y col., 1990.
	Ratas Sprague-Dawley	2-amino-3metilimidazo [4,5f]-f quinoline (IQ) (+)	Dashwood y col., 1991.
	Metabolismo microsomal in vitro	IQ (+)	Dashwood y Guo., 1992.
	Epitelio de colon en rata	Dimetilhidrazina (DMH) (+)	Robins y Nelson, 1989.
Actividad co-mutagénica Clorofilina (a bajas concentraciones)	<i>Salmonella</i> y ensayo en microsomas	Aumenta la mutagenicidad dos veces de las NNN y NNK	Romert y col., 1992.
Promoción de tumores Clorofilina	En colon de rata	Actúa como un promotor de tumores antes del tratamiento con la DMH	Nelson, 1992

TABLA 3 EFECTOS ANTICLASTOGENICOS Y CLASTOGENICOS DE LA CLOROFILA Y CLOROFILINA					
Sustancia	Sistema de prueba	Probada la clastogenicidad en contra de los mutagénos	Punto Blanco	Efectos	Referencias
Efectos Anticlastogenicos Clorofilina	Células de la médula ósea (in vivo) Ratón (administración oral)	Thio-tepa	ABERRACIONES CROMOSOMICAS	+	Renner, 1990.
		Nicotina		+	Sen y col., 1991.
		Cloruro de cobalto		+	Palit y col., 1991.
		Cloruro de cesio		+	Ghosh y col., 1991.
		Cloruro de mercurio		+	Ghosh y col., 1991.
		Oxido de cromo (VI)		+	Sarkar y col., 1993.
Suspensión de clorofila		Clordano		-	Sarkar y col., 1993.
		Oxido de cromo (VI).		-	Sarkar y col., 1994.
Efectos Clastogénicos Suspensión de Clorofila	Ratón (administración oral)		ABERRACIONES CROMOSOMICAS	+	Sarkar y col., 1994.

2.5 *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se ha utilizado desde principios de siglo para realizar estudios de genética. En 1911, el profesor Thomas H. Morgan inició los estudios de genética con *Drosophila* y en 1927, H. J. Muller, demostró que podía incrementar el número de mutaciones mediante un tratamiento con rayos X y que dichas alteraciones en el material genético eran transmitidas a la descendencia (Brusick,1987).

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, es decir, sufre metamorfosis completa, presenta dimorfismo sexual, y habita en los mismos ambientes que el hombre.

Drosophila como sistema de prueba presenta muchas ventajas :

-Su ciclo de vida es corto dura de 10 a 12 días en condiciones de laboratorio (25 ° C de temperatura y 60 % de humedad relativa).

-La secuencia y duración aproximada de los diferentes estadios del ciclo de vida es (Cruces, 1988).

Desarrollo Embrionario	1 día
Larva de Primer Estadio	1 día
Larva de Segundo Estadio	1 día
Larva de Tercer Estadio	2 días
Pupa	4-5 días
Adulto	40-50 días

Figura 1.

-Su tamaño pequeño permite cultivar un número considerable de individuos en un espacio reducido (Würgler y col., 1984 ; Vogel, 1987).

-Es un organismo eucarionte. El término eucarionte se refiere a las células que contienen un organelo de doble membrana llamado núcleo.

Un eucarionte tiene su material genético aislado del resto de la célula por una membrana nuclear. Todas las formas de vida (hongos, plantas, y animales) son eucariontes.

-Se pueden realizar pruebas *in vivo* ya que posee las enzimas necesarias para activar promutágenos y procarcinogénos (Sobels y Vogel, 1976), como por ejemplo la monoamino oxidasa que es una de las enzimas más importantes en la activación y desactivación de los mutágenos (Zijlstra y Vogel, 1985). Aunque los insectos no poseen un órgano específico como el hígado de los mamíferos para la desintoxicación, numerosos tejidos están involucrados en este proceso, entre éstos se encuentran los tubuios de Malpighi, algunas partes del tracto digestivo y ciertas regiones del tejido gonadal (Casida, 1969).

-Se pueden realizar pruebas tanto en células somáticas como germinales.

-Se puede manipular fácilmente el genoma. En *Drosophila* se han producido un gran número de mutaciones que sirven como marcadores genéticos que hacen evidentes los efectos causados por los agentes que se evalúan (ININ, 1992).

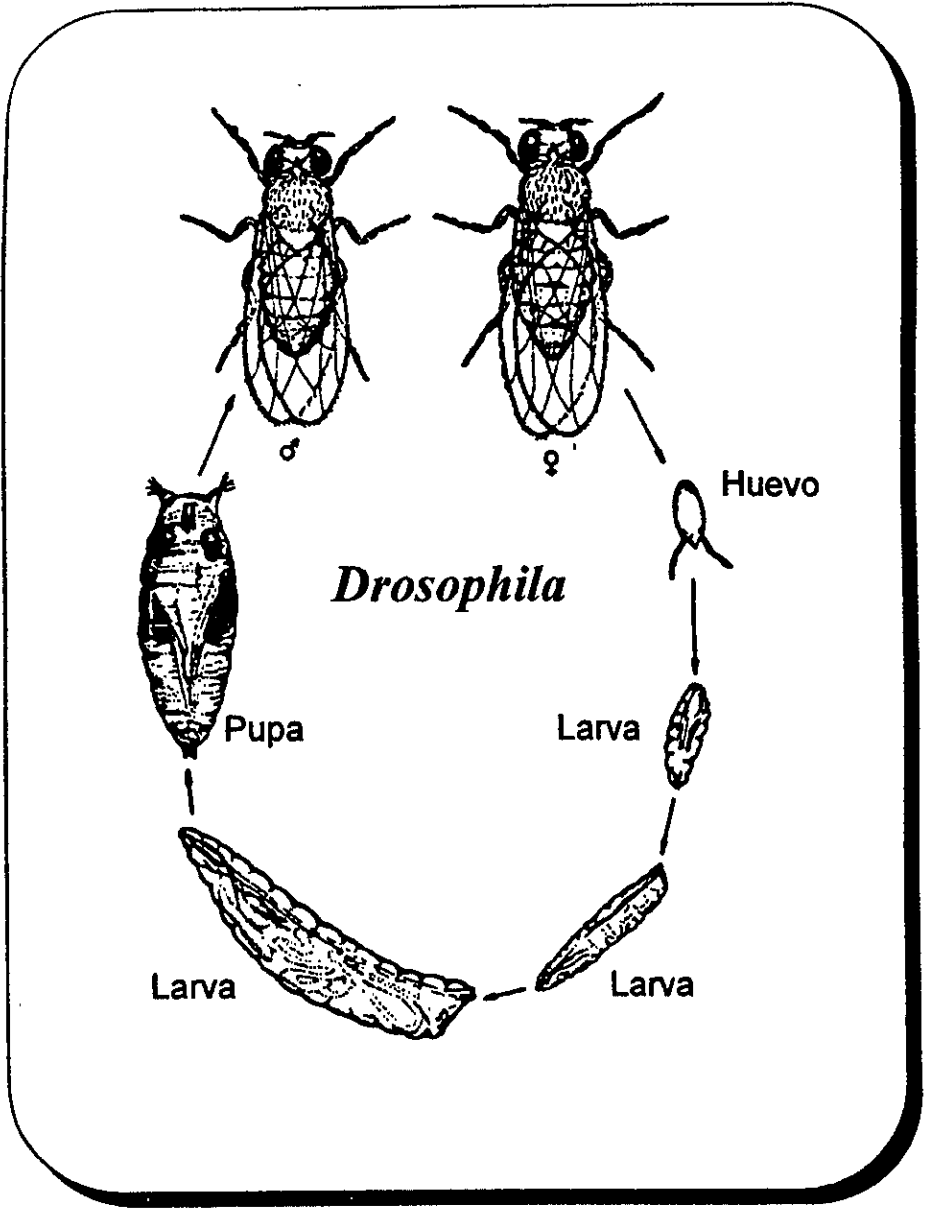


Figura 1. Ciclo de desarrollo en *Drosophila* (Flagg, 1988).

2.6 Ensayos en células germinales de *Drosophila*

La prueba de letales recesivos ligados al sexo (LRLS), ha sido la más utilizada durante los últimos 27 años para realizar estudios de mutagenicidad (Lee y col., 1983; Würigler y col., 1984). Esta prueba ofrece numerosas ventajas : detecta mutaciones puntuales y pequeñas deleciones, es una prueba sensible, ya que involucra todo el cromosoma X, el cual representa el 20 % del total del genoma es decir entre 600 y 800 genes (Würigler, 1986), y la correlación entre la actividad carcinogénica y mutagénica es excelente ya que de los carcinogénos clásicos que se han probado en *Drosophila* entre el 83 % y el 91 % resultaron ser positivos (Graf y col., 1984). Hasta 1983, se habían probado con este ensayo 421 compuestos: de éstos 198 fueron positivos, 46 negativos y 177 resultaron inconclusos, debido en gran parte a que se utilizó un criterio muy rígido para clasificarlos (Lee y col., 1983, Würigler y col., 1984, Vogel, 1987).

Las principales desventajas que presenta la prueba de (LRLS) son : que se realiza en 2 generaciones y que requiere al menos muestrear 7000 cromosomas por tratamiento.

En base a estas limitaciones desde la década de los 80' s, se propuso el uso de las células somáticas.

2.7 Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas

La prueba de mutación y recombinación somáticas SMART (por sus siglas en ingles), consiste en exponer larvas transheterocigóticas para dos marcadores recesivos visibles en la mosca adulta ($mwh-fir^3$) a un agente (Graf y col., 1984). El blanco genético son los discos imagales, que son un conjunto de células indiferenciadas destinadas a dividirse en una configuración fija y que bajo la acción de la hormona ecdisona evaginan durante la metamorfosis para dar origen a los ojos, antenas, patas y alas de la mosca adulta (Gehring, 1985) (Figura 2).

Con esta prueba, si el agente tiene propiedades genotóxicas, puede reordenar a un grupo de genes o bases en los cromosomas y como resultado la célula expuesta se vuelve homocigótica para el marcador. En estas condiciones esta célula y sus descendientes producirán cerdas deformadas en lugar de cerdas normales (García-Bellido, 1978, García-Bellido y col., 1979). La sucesiva división de esta célula genéticamente alterada, forma un grupo de células con cerdas anormales que son reconocidas como una mancha en el ala del adulto. El tamaño de la mancha es inversamente proporcional a la etapa de desarrollo de la larva en el momento que ésta se expone al agente (Graf y col., 1984) (Figura 3).

Esta técnica es capaz de detectar también actividad de recombinación génica de los agentes, este evento es importante porque el entrecruzamiento o intercambio de genes en la mitosis no es común, a menos que se induzca rompimiento en los cromosomas, lo cual es importante, porque se ha sugerido que la recombinación mitótica es un tipo de cambio genético involucrado en ciertas etapas de inducción de cáncer como la promoción (Mollet y Würigler, 1974).

Esta prueba fue diseñada en 1984 por Würigler y col., para la detección de la actividad mutagénica de diferentes agentes. Desde entonces, los resultados han demostrado que esta prueba es sensible para una gran variedad de agentes alquilantes mono y polifuncionales que con otras pruebas resultan difíciles de detectar, además es económica y más rápida que la prueba de letales recesivos ligados al sexo, debido a que se obtienen resultados en una sola generación (Graf y col., 1984, Clements, y col., 1988). En este ensayo se cuenta con 30,800 células blanco, aunque sólo se analizan aproximadamente 24,400 (Vogel, 1987).

2.8 JUSTIFICACIÓN

Actualmente el hombre está expuesto a una gran cantidad de agentes muchos de los cuales pueden alterar su material genético (Ramel y col., 1986). Sin embargo existen componentes naturales en la dieta, con propiedades antimutagénicas que contrarrestan el efecto causado por dichos mutágenos.

Se ha demostrado que la clorofilina es un antimutágeno contra algunos mutágenos químicos por ejemplo, las aflatoxinas B₁, la dimetil nitrosamina, el benzo(a)pireno, etc., (Ong y col., 1986). Entre los mecanismos de acción propuestos para explicar el efecto antimutagénico de la clorofilina, se incluyen su habilidad para formar complejos inactivos con los mutágenos, atrapar radicales libres o interferir con las enzimas responsables de la activación metabólica de los promutágenos (Dashwood y col., 1991). En el Laboratorio de *Drosophila* del Instituto de Investigaciones Nucleares (ININ), desde hace ocho años se ha probado la capacidad de la clorofilina para inhibir la mutagenicidad de algunos agentes con diferentes mecanismos de acción., con la finalidad de proveer información acerca del mecanismo de acción de la clorofilina.

En la presente investigación se determinará el efecto de la clorofilina contra la ciclofosfamida, una droga citotóxica que se usa para tratar el cáncer de mama (Carter, 1976), utilizando la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en el ala de *Drosophila melanogaster*.

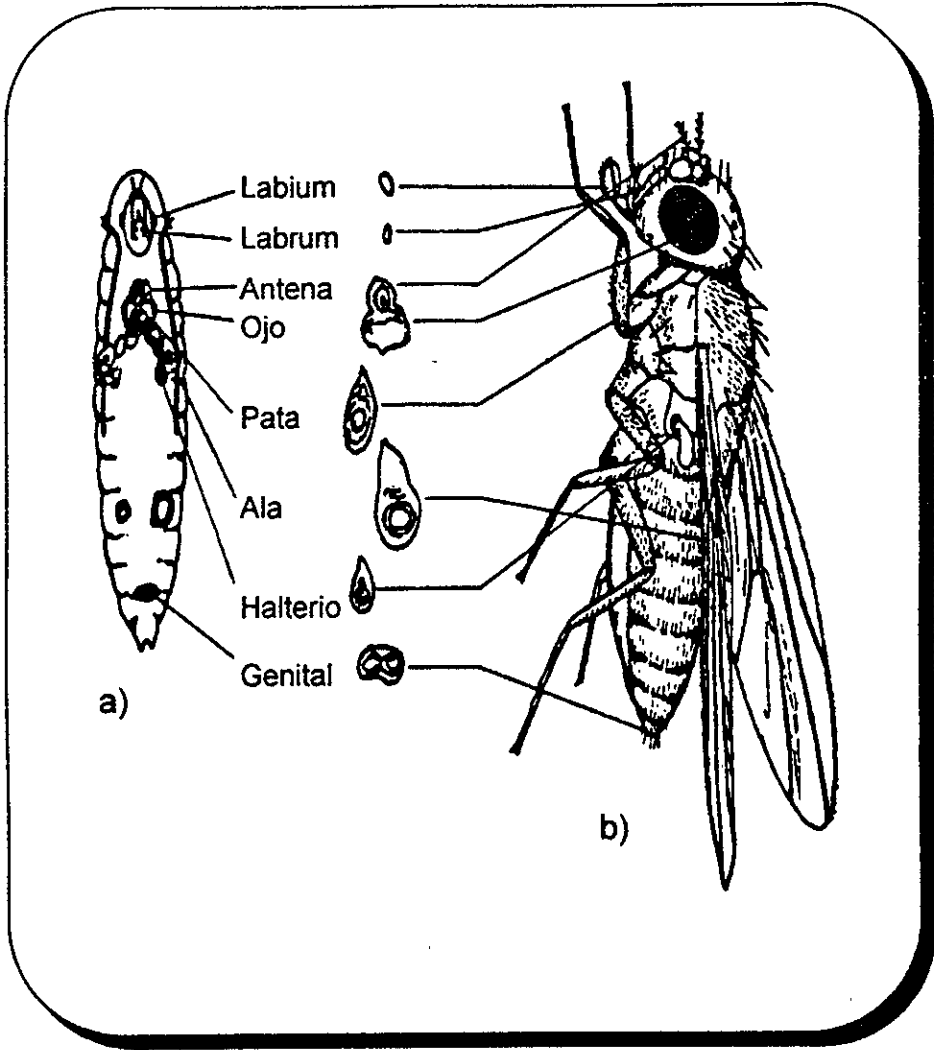


Fig. 2 Los discos imagales de *Drosophila* a) Larva de 3 estadio mostrando la posición de los discos b) Adulto, muestra las partes derivadas de cada disco (En Suzuki y col.,1989).

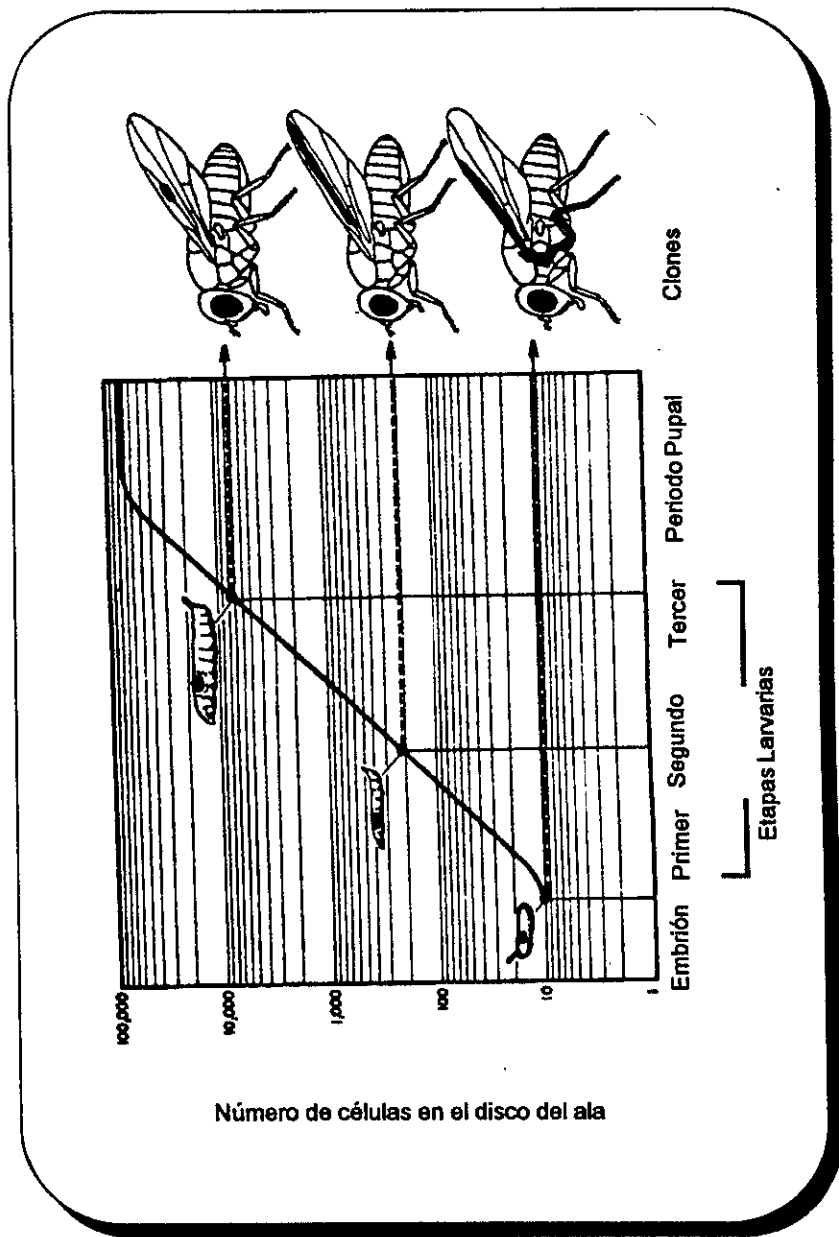


Fig. 3 Tamaño de la mancha dependiendo de la edad de la larva (García-Bellido, y col., 1979).

3. OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar si la clorofilina tiene algún efecto sobre la genotoxicidad de la ciclofosfamida, utilizando la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en el aia de *Drosophila melanogaster*.

PARTICULARES:

- 1) Determinar el efecto de la ciclofosfamida y clorofilina sobre la viabilidad de *Drosophila melanogaster*.
- 2) Determinar el porcentaje de recombinación inducido por la ciclofosfamida.
- 3) Comparar la eficiencia del pretratamiento contra el tratamiento combinado con clorofilina para reducir la genotoxicidad de la ciclofosfamida.

4. HIPÓTESIS

Si la clorofilina es un poderoso antimutágeno químico, entonces al administrarla deberá disminuir las alteraciones genéticas inducidas por el tratamiento con ciclofosfamida en *Drosophila melanogaster*.

5. MATERIAL Y METODO

5.1 Características de las líneas utilizadas de *D. melanogaster* (Tabla 4).

Para realizar la prueba SMART en el ala, se utilizaron individuos de dos cepas diferentes de *Drosophila melanogaster* efectuando la siguiente cruce hembras mwh^+/mwh^+ x machos $fir^3/TM3, Ser.$

5.2 Tratamiento

Se aislaron hembras vírgenes de 0 a 12 horas de edad de la cepa mwh^+/mwh^+ y machos de la cepa $fir^3/TM3, Ser.$ Las hembras se colocaron en frascos lecheros con medio de cultivo normal y levadura. La cruce se realizó en frascos lecheros de 0.25 l de capacidad conteniendo medio de cultivo normal.

Se colectaron huevos durante 6 horas y se incubaron durante 72 horas a $25^{\circ} C$ y 60 % de humedad. Cuando las larvas alcanzaron el segundo estadio se colectaron con una solución de sacarosa al 20 % y se recuperaron en una malla fina. Se colocaron en frascos lecheros con papel filtro impregnado con sacarosa o clorofilina (CFL) al 5, 7 y 10% durante 24 horas.

Después del pretratamiento se colocaron en grupos de 80 larvas en tubos homeopáticos conteniendo 1.0 g de medio sintético (Carolina Biological Supply CO. U.S.A), más 5 mililitros de ciclofosfamida (CFM) disuelta en agua a diferentes concentraciones de acuerdo a la tabla 5 y se incubaron a $25^{\circ} C$ de temperatura y 60 % de humedad relativa, hasta completar el desarrollo.

Tratamiento combinado

Se aislaron hembras vírgenes de 0 a 12 horas de edad de la cepa mwh^+/mwh^+ y machos de la cepa $fir^3/TM3, Ser.$ Las hembras se colocaron en frascos lecheros con

medio de cultivo normal y levadura. La crusa se realizó en frascos lecheros de 0.25 l de capacidad conteniendo medio de cultivo normal.

Se colectaron huevos durante 6 horas y se incubaron durante 48 y 72 horas a 25^oC y 60% de humedad. Cuando las larvas alcanzaron el segundo y tercer estadio larvario se colectaron con una solución de sacarosa al 20 % y se recuperaron en una malla fina. Las larvas de 48 y 72 horas, se colocaron en grupos de 40 larvas en tubos homeopáticos conteniendo 1.0 g de medio sintético (Carolina Biological Supply CO. U.S.A), más 5 mililitros de ciclofosfamida (CFM) disuelta en agua a diferentes concentraciones de acuerdo a la tabla 6, la concentración de clorofilina (CFL) utilizada fue de 5 % y se incubaron a 25^o C de temperatura y 60 % de humedad relativa hasta completar el desarrollo.

Se realizó un tratamiento combinado con metilmetano sulfonato, el cual se utilizó como testigo positivo. Con el MMS, se utilizó una sola dosis 6 mili molar (mM).

Tabla 4.

Características de los Marcadores

Marcador	Nomenclatura	Posición	Fenotipo
múltiple wing hair	<i>mwh</i>	(3-0.0) Roberts y Evans-Roberts (1979).	La mutación <i>mwh</i> en condición homocigótica produce tricomas múltiples por célula en lugar de un solo tricoma.
<i>flare</i> ³	<i>flr</i> ³	(3-39.0) Lindsley y Grell (1985).	La mutación <i>flare</i> ³ se encuentra en condición heterocigótica ya que en condición homocigótica es letal y esta balanceada por TM3/Ser. Produce células deformadas que representan la apariencia de una flama. El marcador serratia (Ser) modifica los bordes de las alas haciéndolas discontinuas.

Tabla 5. Concentraciones utilizadas para el pretratamiento y tratamiento.

Grupo	Pretratamiento	Tratamiento
1	Sol. Sacarosa 5 %.	Sacarosa (testigo).
2	Sol. CFL 5 %.	CFL 5 % (testigo).
3		CFM 1 mM.
4		CFM 2 mM.
5		CFM 4 mM.
6		CFL 5 % + CFM 1 mM.
7		CFL 5 % + CFM 2 mM.
8		CFL 5 % + CFM 4 mM.
9	Sol. Sacarosa 5 %.	Sacarosa (testigo).
10	Sol. CFL 7 %.	CFL 7 % (testigo).
11		CFM 1 mM.
12		CFM 2 mM.
13		CFM 3 mM.
14		CFL 7 % + CFM 1 mM.
15		CFL 7 % + CFM 2 mM.
16		CFL 7 % + CFM 3 mM.
17	Sol. Sacarosa 5 %.	Sacarosa (testigo).
18	Sol. CFL 10 %.	CFL 10 % (testigo).
19		CFM 1 mM.
20		CFM 2 mM.
21		CFM 3 mM.
22		CFL 10 % + CFM 1 mM.
23		CFL 10 % + CFM 2 mM.
24		CFL 10 % + CFM 3 mM.

Nota : Las iniciales CFL indica Clorofilina y CFM Ciclofosfamida.

Tabla 6. Tratamiento Combinado

Grupo	Tratamiento
1	Agua (testigo)
2	Clorofilina 5 %.(testigo)
3	CFM 1 mM.
4	CFM 2 mM.
5	CFM 3mM.
6	MMS 6 mM.
7	CFL 5 % + CFM 1 mM
8	CFL 5 % + CFM 2 mM
9	CFL 5 % + CFM 3 mM
10	CFL 5 % + MMS 6 mM
Nota : Las iniciales CFL indican Clorofilina, CFM Ciclofosfamida, MMS Metil-Metano-Sulfonato.	

5.3 Preparación y Análisis de las alas

Cuando los adultos emergieron, se contaron el número de hembras y machos por cada tubo homeopático, para determinar la viabilidad y compararla con la del grupo testigo. Enseguida se pusieron en una solución de alcohol al 70 %. Se separaron las alas de los individuos (*mwh-fir*³) y *no serratia* y se montaron en preparaciones fijas.

Se analizaron 20 pares de alas en un microscopio óptico a 400 aumentos, por cada tratamiento y se anotó el número de manchas por cada ala y en cada región. Para facilitar la observación el ala se ha dividido en 7 regiones con relación a las venas (Graf y col., 1984) (Figura 4).

5.4 Clasificación de las manchas

A) Tamaño de las manchas.

Según Würgler y Vogel (1986), las manchas pueden ser clasificadas de acuerdo con su tamaño en dos categorías:

- Manchas Chicas : Aquellas que tienen una o dos células.
- Manchas Grandes : Las que tienen más de tres células.

B) Tipos de Manchas.

De acuerdo con el tipo de células involucrados en la mancha, ésta puede ser :

- Mancha Simple *mwh*, presenta más de tres cerdas en cada célula (Figura 5).
- Mancha Simple *fir*², el pelo está modificado, usualmente en forma de flama (Figura6).
- Mancha Gemela, la que representa los dos tipos celulares (*mwh* y *fir*³) (Figura 7).

5.5 Criterios utilizados para el análisis de manchas

- 1.- Para que una célula sea considerada como *mwh*, ésta debe presentar 3 ó mas cerdas.
- 2.- Una célula que presente menos de tres cerdas, puede ser considerada como *mwh*, si presenta al menos 2 cerdas y se encuentra rodeada de 3 ó más células que presenten 3 cerdas.
- 3.- Si existen más de 3 hileras de células normales separando hileras de células que representan la mutación *mwh* o *flr*³, éstas serán consideradas como dos manchas, en caso contrario se considerará como una sola mancha.

5.6 Análisis estadístico y evaluación de los datos

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio de la prueba de χ^2 y del programa de cómputo SMART (Frei y Würigler, 1988) con $p < 0.05$.

Frei y Würigler (1988) publicaron una comparación de métodos estadísticos para decidir a través de la prueba de mutagenesis SMART-ala, los tipos de respuesta. Los métodos estadísticos comparados fueron la prueba binomial condicional, la prueba de χ^2 y un método alternativo basado en el establecimiento de límites de confianza observados en las frecuencias de mutación. En principio estos métodos son equivalentes y conducen a las mismas conclusiones, por lo que Frei y Würigler utilizando el método que establece intervalos de confianza, genera el software SMART versión PC, el cual permite un manejo más ágil y una forma estandarizada en el análisis de los resultados para esta prueba.

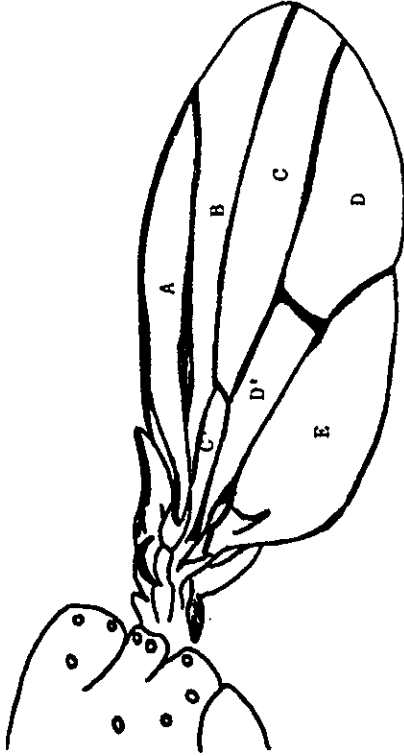


Figura 4. Medio mesotórax de Drosophila melanogaster mostrando la forma en la que se divide al ala para el registro de las manchas (Tomado de García-Bellido y Merriam 1971).

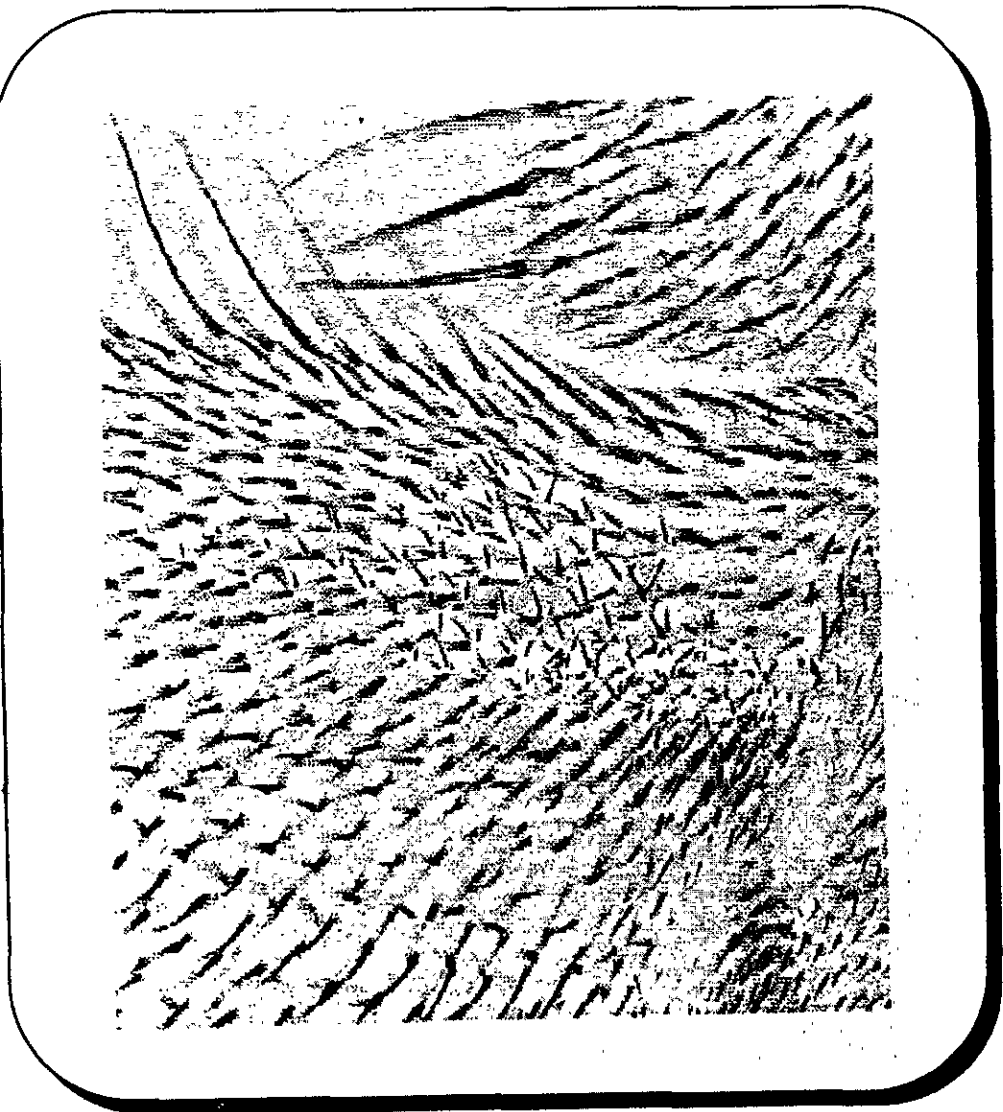


Figura 5. Mancha Simple *mwh*

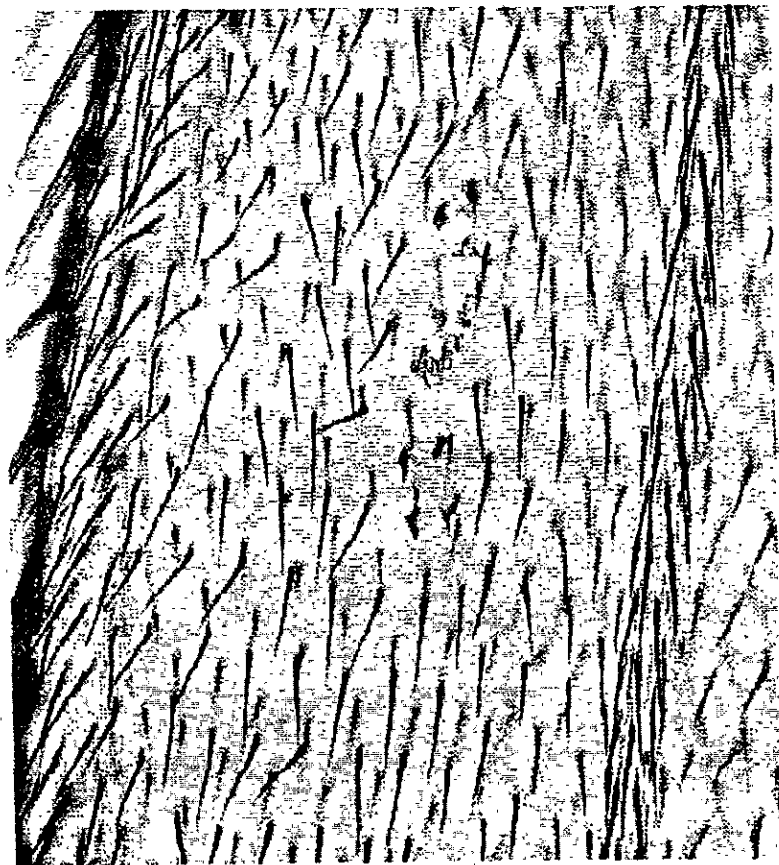


Figura 6. Mancha simple flr^2

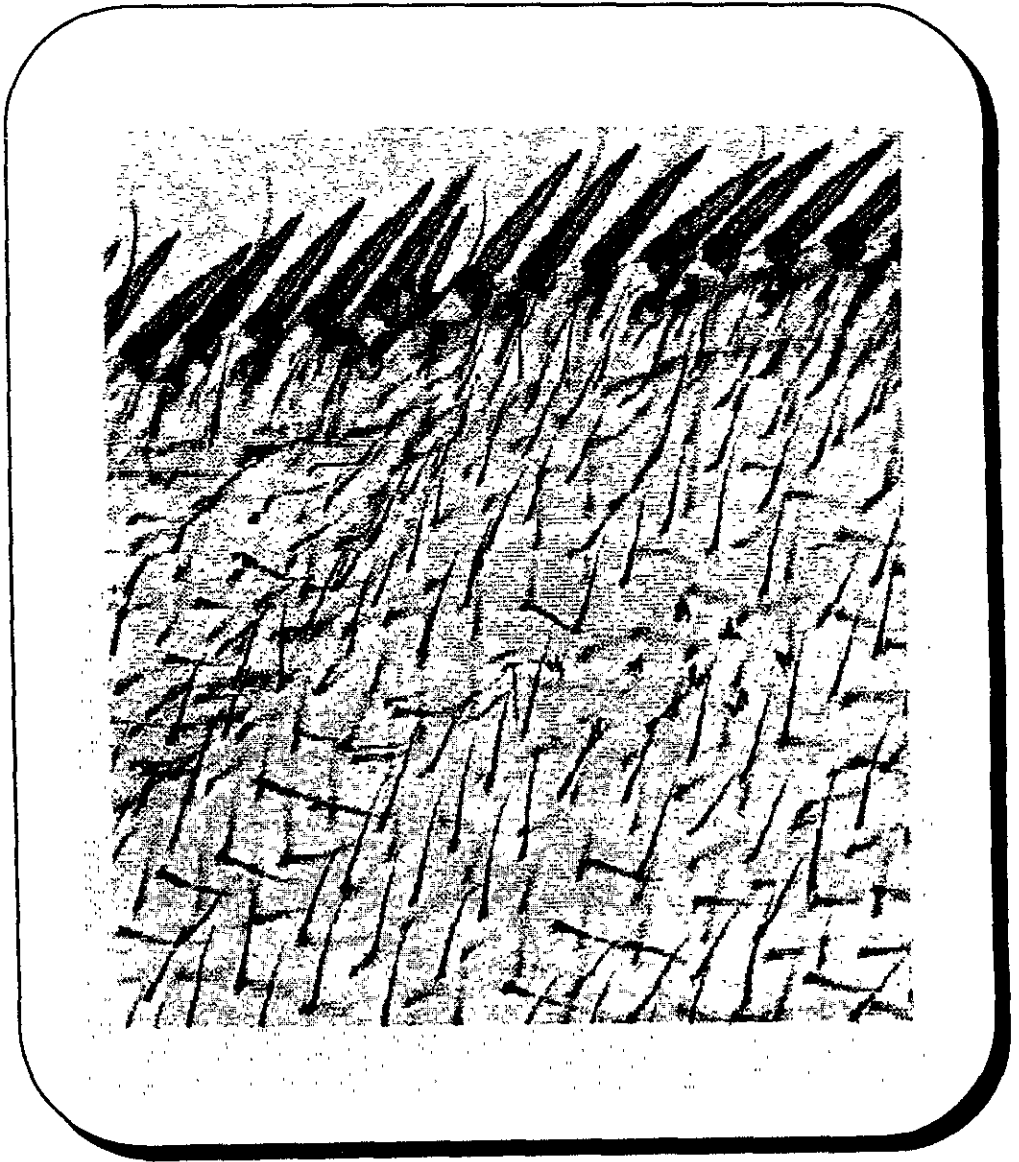


Figura 7. Mancha Gemela *mwh* y *flr*³

6. RESULTADOS

6.1 Viabilidad

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para el porcentaje de viabilidad, se observó que en el pretratamiento, la clorofilina a las concentraciones de 5,7 y 10 %, no disminuyó significativamente la viabilidad de los individuos cuando ésta se comparó con la del grupo testigo (Sacarosa).

Con respecto al efecto de las diferentes dosis de ciclofosfamida sobre la viabilidad de las larvas tratadas, los resultados indicaron que las dosis más bajas de ciclofosfamida (1 y 2 mM) redujeron significativamente la viabilidad de los individuos cuando ésta se comparó con la del grupo testigo (Sacarosa), mientras que las dosis más altas (3 y 4 mM) disminuyeron aún más la viabilidad de los individuos. Con relación al pretratamiento con clorofilina al 5 %, la dosis de 4 mM (Tabla 7), resultó ser altamente tóxica ya que redujo la viabilidad en un 90%. Por lo que no fue utilizada en los experimentos con clorofilina o en los tratamientos combinados clorofilina-ciclofosfamida y fue reemplazada por la dosis de 3 mM.

En el experimento con clorofilina al 5% (Tabla 7, Figura 9), se observó que la viabilidad de las larvas pretratadas con clorofilina más ciclofosfamida fue menor que las no pretratadas, mientras que en el experimento con clorofilina al 7 % (Tabla 7, Figura 10), se observó que la viabilidad de las larvas pretratadas fue mayor.

En el caso del experimento con clorofilina al 10 % (Tabla 7, Figura 11), al igual que en el caso del pretratamiento, con 5 % de clorofilina, la viabilidad de las larvas pretratadas fue menor que las que no recibieron pretratamiento. Cuando se compararon cada uno de los experimentos con el grupo testigo (Sacarosa), se observó que los experimentos con clorofilina al 5 y 10 % disminuyeron significativamente la viabilidad de los individuos.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad de las larvas tratadas con clorofilina.

Tratamiento	No. de Larvas	No. de Adultos	% de Viabilidad
Testigo (Sacarosa)	840	621	74.00
CFL 5 %	240	168	70.00
CFL 7 %	240	192	80.00
CFL 10 %	480	343	71.45
CFM 1mM	840	517	61.54
CFM 2mM	840	448	53.33
CFM 3mM	600	279	33.67 **
CFM 4mM	240	77	32.08 **
CFL5%+CFM1mM	240	150	62.50
CFL5%+CFM2mM	240	103	42.91
CFL5%+CFM4mM	240	23	9.51 **
CFL7%+CFM1mM	240	203	84.58
CFL7%+CFM2mM	240	159	66.25
CFL7%+CFM3mM	240	171	71.25
CFL10%+CFM1mM	480	259	53.95
CFL10%+CFM2mM	480	191	39.80
CFL10%+CFM3mM	480	83	17.29 **

El análisis estadístico se realizó con la prueba de X^2 con $**p < 0.05$.

Con respecto a los tratamientos combinados (Tablas 8 y 9), se observó que cuando las larvas correspondientes al segundo estadio larvario se alimentaron crónicamente con clorofilina al 5 %, la viabilidad se redujo significativamente. Con relación al efecto de las diferentes dosis de ciclofosfamida sobre la viabilidad de las larvas tratadas, los resultados indicaron que las dosis de ciclofosfamida 1, 2 y 3 mM no disminuyeron la viabilidad de las larvas del segundo estadio (Tabla 8), mientras que en las larvas del tercer estadio (Tabla 9), la viabilidad se redujo significativamente cuando ésta se comparó con la del grupo testigo (H₂O).

En los experimentos del tratamiento combinado (Tablas 8-9 y Figuras 12 y 13), se observó que la viabilidad de las larvas de segundo y tercer estadio tratadas con la combinación clorofilina al 5 %-ciclofosfamida fue menor que aquellas tratadas sólo con ciclofosfamida. El tratamiento combinado con clorofilina al 5 % y ciclofosfamida a la dosis de 3 mM (Tabla 9), resultó ser altamente tóxico ya que redujo la viabilidad de los individuos.

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad de las larvas de segundo estadio tratadas con la combinación clorofilina 5%-ciclofosfamida.

Tratamiento	No. de Larvas	No. de Adultos	% de Viabilidad
Testigo (H ₂ O)	360	219	60.83
Clorofilina 5 %	360	153	42.50
CFM 1.0 mM	360	207	57.50
CFM 2.0 mM	360	180	50.00
CFM 3.0 mM	360	215	59.72
CFL+CFM1.0mM	360	241	66.94
CFL+CFM2.0mM	360	110	30.55 **
CFL+CFM3.0mM	360	76	21.11 **

El análisis estadístico se realizó con la prueba X² con **p<0.05

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad de las larvas del tercer estadio tratadas con la combinación clorofilina 5%-ciclofosfamida.

Tratamiento	No. de Larvas	No. de Adultos	% de Viabilidad
Testigo (H ₂ O)	240	187	77.91
Clorofilina 5 %	240	173	72.08
CFM 1.0 mM	240	145	60.41
CFM 2.0 mM	240	98	40.83
CFM 3.0 mM	240	68	28.33 **
CFL+CFM1.0mM	240	146	60.83
CFL+CFM2.0 mM	240	51	21.25 **
CFL+CFM3.0 mM	240	10	4.16 **

El análisis estadístico se realizó con la prueba de X² con ***p<0.05

6.2 Análisis de manchas

Con respecto a la prueba de mutación y recombinación somáticas, se observó que el pretratamiento de clorofilina a las concentraciones de 5, 7 y 10 % (Tablas 10, 11 y 12), no indujo un número de manchas significativamente más alto que el grupo testigo (Sacarosa). El efecto mutagénico de la ciclofosfamida a las dosis utilizadas mostró una relación lineal dosis-respuesta.

En las tablas 10, 11 y 12, notamos que los tratamientos con ciclofosfamida a las concentraciones más bajas (1 y 2 mM) sólo incrementaron significativamente las manchas pequeñas y las dosis de 3 y 4 mM incrementaron significativamente los tres tipos de manchas. Como ya se menciona, el pretratamiento con clorofilina al 5 % y ciclofosfamida 4 mM redujo la viabilidad en un 90 %.

El pretratamiento con clorofilina al 5 % durante 24 horas (Tabla 10), no modificó la frecuencia de los tres tipos de manchas inducidas por las diferentes dosis de

ciclofosfamida, y en algunos casos el número de manchas fue mayor que el de las larvas que no recibieron pretratamiento, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los mismos resultados se obtuvieron cuando las larvas fueron pretratadas con clorofilina al 7% (Tabla 11).

En el caso del pretratamiento con clorofilina al 10 % (Tabla 12), se observó el efecto protector de la clorofilina sobre la inducción de manchas pequeñas y grandes. En el caso de la concentración 1 mM., la clorofilina disminuyó la frecuencia de manchas pequeñas en un 44 %, las grandes en un 38 %, dando como resultado una reducción del 41 % en el total de manchas. En la misma tabla 12 se observó que a la dosis de 3 mM, la clorofilina redujo la frecuencia de manchas pequeñas en un 30 % y totales en un 24%.

Tabla 10. Número de manchas pequeñas, grandes y gemelas inducidas por el pretratamiento clorofilina 5%-ciclofosfamida.

M A N C H A S P O R A L A *					
TRATAMIENTO	No. de ALAS	PEQUEÑAS (1-2 Células) m=2	GRANDES (>2 Células) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
Testigo(Sacarosa)	80	0.46 (37)	0.16(13)	0.09 (7)	0.71 (57)
Clorofilina 5 %	80	0.46 (37)-	0.16(13)-	0.06 (5)-	0.69 (55)-
CFM 1.0mM	120	1.06(127)	0.28(33)	0.04 (5)	1.37(165)
CFL+ CFM1.0mM	120	1.12(135)-	0.34(41)-	0.08(10)-	1.55(186)-
CFM 2.0mM	114	1.93(220)	0.54(61)	0.15(17)	2.61(298)
CFL+ CFM2.0mM	120	1.48(177)w	0.65(78)-	0.19(23)-	2.32(278)-
CFM 4.0mM	62	3.13(194)	1.40(87)	0.48(30)	5.02(311)
CFL+ CFM4.0mM	36	3.28(118)-	1.67(60)-	0.69(25)-	5.64(203)-

*El diagnóstico estadístico se realizó según Frei y Würzler (1988) :+=positivo -=negativo ; (w)=débil positivo i=inconcluso m=factor de multiplicación.Grados de probabilidad de error ;alfa=beta=0.05

Tabla 11. Número de manchas pequeñas, grandes y gemelas, inducidas por el pretratamiento clorofilina 7%-ciclofosfamida.

M A N C H A S P O R A L A *					
TRATAMIENTO	No. de ALAS	PEQUEÑAS (1-2 Células) m=2	GRANDES (>2 Células) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
Testigo(Sacarosa)	40	0.37(15)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.52 (21)
Clorofilina 7 %	40	0.65(26)-	0.08 (3)-	0.03 (1)-	0.75 (30)-
CFM 1.0 mM	40	0.80(32)	0.20 (8)	0.08 (3)	1.08 (43)
CLF+ CFM1.0mM	40	0.75(30)-	0.12 (5)i	0.05 (2)i	0.93 (37)-
CFM 2.0mM	40	1.30(52)	0.82(33)	0.20 (8)	2.32 (93)
CLF+ CFM2.0mM	40	1.37(55)-	0.75(30)-	0.20 (8)-	2.32 (93)-
CFM 3.0mM	40	1.98(79)	1.12(45)	0.45(18)	3.55(142)
CLF+ CFM3.0mM	40	2.20(88)-	1.23(49)-	0.55(22)-	3.97(159)-

*El diagnostico estadístico se realizó según Frei y Würzler (1988) :+=positivo -=negativo (w)=débil positivo
i=inconcluso m=factor de multiplicación.Grados de probabilidad de error :alfa=beta=0.05

Tabla 12. Número de manchas pequeñas, grandes y gemelas, inducidas por el pretratamiento clorofilina 10%-ciclofosfamida.

M A N C H A S P O R A L A *					
TRATAMIENTO	No. de ALAS	PEQUEÑAS (1-2 Células) m=2	GRANDES (>2 Células) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
Testigo(Sacarosa)	40	0.43 (17)	0.15 (6)	0.03 (1)	0.60(24)
Clorofilina 10 %	40	0.57 (23)-	0.03 (1)-	0.00 (0)	0.60(24)-
CFM 1.0mM	100	2.51(251)	0.79 (79)	0.16(16)	3.46(346)
CFL+CFM 1.0mM	100	1.41(141)+	0.49 (49)+	0.15(15)-	2.05(205)+
CFM 2.0mM	100	4.67(467)	1.61(161)	0.53(53)	6.81(681)
CFL+ CFM2.0mM	100	5.71(571)w	1.61(161)-	0.49(49)-	7.81(781)-
CFM 3.0mM	74	10.44(773)	2.48(184)	0.75(56)	13.68(1013)
CFL+ CFM3.0mM	80	6.72(538)+	2.23(179)-	0.55(44)-	9.51(761)+

* El diagnostico estadístico se realizó según Frei y Würigler (1988) :+=positivo -=negativo (w)=débil positivo
i=inconcluso m=factor de multiplicación.Grados de probabilidad de error :alfa=beta=0.05

En los tratamientos combinados (Tablas 13 y 14), se observó que el tratamiento crónico con clorofilina al 5 %, no indujo un número de manchas significativamente más alto que el grupo testigo (H₂O). Con respecto al tratamiento crónico con ciclofosfamida, se observó que al igual que en los pretratamientos el efecto mutagénico de la ciclofosfamida a las dosis utilizadas mostró una relación lineal dosis-respuesta.

En el tratamiento crónico con clorofilina al 5 % y ciclofosfamida en larvas del segundo estadio (Tabla 13), se observó que la clorofilina redujo la frecuencia de manchas gemelas inducidas por la ciclofosfamida a las dosis de 3 mM en un 20 %.

En el siguiente tratamiento en larvas del tercer estadio (Tabla 14), la clorofilina no redujo la frecuencia de manchas inducidas por la ciclofosfamida.

Tabla 13. Número de manchas pequeñas, grandes y gemelas inducidas por el tratamiento combinado clorofilina 5%-ciclofosfamida en larvas del segundo estadio.

M A N C H A S P O R A L A *					
TRATAMIENTO	No. de ALAS	PEQUEÑAS (1-2 Células) m=2	GRANDES (>2 Células) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
Testigo (H ₂ O)	40	0.55(22)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.70 (28)
Clorofilina 5 %	40	0.52(21)-	0.10 (4)-	0.03 (1) _i	0.65 (26)-
CFM 1.0mM	40	0.85(34)	0.35(14)	0.05 (2)	1.25 (50)
CFL + CFM 1.0mM	38	1.11(42)-	0.21 (8)-	0.11 (4)-	1.42 (54)-
CFM 2.0mM	40	1.67(67)	0.70(28)	0.15 (6)	2.53(101)
CFL + CFM 2.0mM	20	2.00(40)-	0.35 (7)-	0.20 (4)-	2.55 (51)-
CFM 3.0mM	40	1.92(77)	0.95(38)	0.60(24)	3.47(139)
CFL + CFM 3.0mM	16	3.18(51)-	0.81(13)-	0.12 (2) ₊	4.12 (66)-

*El diagnostico estadístico se realizó según Frei y Würigler (1988) :+=positivo -=negativo (w)=débil positivo i=inconcluso m=factor de multiplicación. Grados de probabilidad de error :alfa=beta=0.05

Tabla 14. Número de manchas pequeñas, grandes y gemelas inducidas por el tratamiento combinado clorofilina 5%-ciclofosfamida en larvas del tercer estadio.

M A N C H A S P O R A L A *					
TRATAMIENTO	No. de ALAS	PEQUEÑAS (1-2 Células) m=2	GRANDES (>2 Células) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
Testigo (H ₂ O)	40	0.35 (14)	0.05 (2)	0.00 (0)	0.40 (16)
Clorofilina 5 %	40	0.45 (18)-	0.10 (4)-	0.00 (0) _i	0.55 (22)-
CFM 1.0mM	40	0.82 (33)	0.32(13)	0.17 (7)	1.33 (53)
CFL + CFM 1.0mM	40	2.10 (84)-	0.60(24)-	0.12 (5)-	2.83(113)-
CFM 2.0mM	20	5.95(119)	2.20(44)	0.55(11)	8.70(174)
CFL + CFM 2.0mM	20	5.45(109)-	1.60(32)-	0.50(10)-	7.55(151)-
CFM 3.0mM	40	5.90(236)	1.95(78)	0.67(27)	8.52(341)
CFL + CFM 3.0mM	8	5.75 (46)-	1.12 (9)-	0.37 (3)-	7.24 (58)-

*El diagnostico estadístico se realizó según Frei y Würigler (1988) :+=positivo -=negativo (w)=débil positivo i=inconcluso m=factor de multiplicación. Grados de probabilidad de error :alfa=beta=0.05

En el caso del tratamiento combinado clorofilina-metil-metano-sulfonato en larvas del segundo estadio (Tabla 15) y en larvas del tercer estadio (Tabla 16), se observó un claro efecto protector de la clorofilina.

Tabla15. Número de manchas pequeñas, grandes y gemelas inducidas por el tratamiento combinado clorofilina 5%-metil-metano-sulfonato en larvas del segundo estadio.

M A N C H A S P O R A L A *					
TRATAMIENTO	No. de ALAS	PEQUEÑAS (1-2 Células) m=2	GRANDES (>2 Células) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
Testigo (H ₂ O)	40	0.55(22)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.70 (28)
Clorofilina 5 %	40	0.52(21)-	0.10 (4) _i	0.02 (1)-	0.64 (26)-
MMS 6mM	36	2.50(90)	5.64(203)	1.36(49)	9.50(342)
CFL + MMS 6mM	40	1.33(53)+	2.15(86) _w	0.62(25) _w	4.10(164)+

*El diagnostico estadístico se realizó según Frei y Würgler (1988) :+=positivo -=negativo (w)=débil positivo i=inconcluso m=factor de multiplicación. Grados de probabilidad de error :alfa=beta=0.05.

Tabla16. Número de manchas pequeñas, grandes y gemelas inducidas por el tratamiento combinado clorofilina 5%-metil-metano-sulfonato en larvas del tercer estadio.

M A N C H A S P O R A L A *					
TRATAMIENTO	No. de ALAS	PEQUEÑAS (1-2 Células) m=2	GRANDES (>2 Células) m=5	GEMELAS m=5	TOTALES m=2
Testigo (H ₂ O)	40	0.62 (25)	0.05(2)	0.00 (0)	0.68 (27)
Clorofilina 5 %	40	0.65 (26)-	0.05(2) _i	0.03 (1) _i	0.73 (29)-
MMS 6mM	40	5.65(226)	10.37(415)	3.67(147)	19.70(788)
CFL + MMS 6mM	40	1.90 (76)+	4.00(160) _w	1.92 (77) _w	7.82 (313)+

*El diagnostico estadístico se realizó según Frei y Würgler (1988) :+= positivo -=negativo (w)=débil positivo i=inconcluso m=factor de multiplicación. Grados de probabilidad de error :alfa=beta=0.05

7. DISCUSIÓN

Numerosas investigaciones han demostrado que la prueba de mutación y recombinación somáticas en *Drosophila*, es eficiente para detectar la actividad mutagénica de un gran número de compuestos químicos. (Graf y col., 1996). Con esta prueba, se puede detectar mutaciones génicas, deleciones y recombinación mitótica. Este último es de gran importancia ya que existen evidencias de que está involucrado en ciertas etapas en la inducción de cáncer como la promoción (Mollet y Würigler, 1974).

Actualmente la prueba de mutación y recombinación en *Drosophila* se está usando para detectar la posible capacidad antimutagénica de muchas sustancias químicas, como pigmentos y vitaminas. (Graf y col. 1996). Así, por ejemplo, utilizando la prueba SMART, Zimmering y col., 1990 y Olvera y col., 1993, demostraron que la clorofilina fue capaz de reducir la mutagenicidad inducida por la radiación gamma y el trióxido de cromo (VI).

Como parte de los objetivos planteados en esta investigación, se determinó el efecto de diferentes concentraciones de clorofilina sobre la viabilidad de las larvas tratadas. En base a los resultados obtenidos para el porcentaje de viabilidad, se observó que en el pretratamiento, la clorofilina a las concentraciones de 5, 7 y 10 % , no disminuyó significativamente la viabilidad de los individuos cuando esta se comparó con la del grupo testigo (Sacarosa). Nuestros resultados coincidieron con la mayor parte de los trabajos que indican que la clorofilina por sí misma no es tóxica (Lai y col., 1978, 1980, Lai, 1979, Arimoto y col., 1980 a,b ; Munzner, 1981, Kimm y col., 1982, Katoh y col., 1983, Terwell y Van der Hoeven, 1985, Ong y col., 1986, Whong y col., 1988, Elias y col., 1990, y Warner y col., 1991).

Con respecto al efecto de las diferentes dosis de ciclofosfamida sobre la viabilidad de las larvas tratadas, los resultados mostraron una relación dosis-respuesta, esto es a mayor dosis menor viabilidad y a menor dosis mayor viabilidad. El pretratamiento con clorofilina al 5 % y ciclofosfamida a la dosis de 4 mM, resultó ser

altamente tóxica ya que redujo la viabilidad en un 90 % por lo que no fue utilizada en los experimentos combinados y fue reemplazada por la dosis de 3 mM.

En el experimento con clorofilina al 5 % (figura 9), se observó que el porcentaje de viabilidad de las larvas pretratadas con clorofilina más ciclofosfamida fue menor que las no pretratadas, mientras que en el experimento con clorofilina al 7 % (figura 10), se observó que la viabilidad de las larvas pretratadas fue mayor que las no pretratadas.

En el caso del experimento con clorofilina al 10 % (figura 11), al igual que en el caso del pretratamiento, con 5% de clorofilina, la viabilidad de las larvas pretratadas fue menor que las que no recibieron pretratamiento. La ciclofosfamida es un promutágeno y requiere de la actividad metabólica del citocromo p-450 para llegar a ser un agente mutagénico (Struck y col., 1971, Sladek, 1973), por lo que son sus metabolitos los que pueden interactuar con el ADN. Ataca en especial al nitrógeno 7 de la guanina y como resultado impide la duplicación del ADN, o puede producir una mutación que cause la muerte de la célula (Bowman y Rand, 1988).

En cuanto a la mortalidad inducida por la ciclofosfamida, se presentó en la etapa pupa-adulto, ya que se observó que las larvas sobrevivieron a los tratamientos y llegaron a la etapa de pupa, pero de muchas pupas no emergieron los adultos. La letalidad puede resultar del daño a estructuras y tejidos, causando la muerte larval o muerte pupal cuando el compuesto químico actúa en la división de las células mitóticas de los discos imagales (Würgler y Vogel, 1986).

En el caso del tratamiento combinado, se observó que las larvas correspondientes al segundo estadio larvario se alimentaron crónicamente con clorofilina al 5 %, la viabilidad se redujo significativamente cuando ésta se comparó con la del grupo testigo (H₂O). Las larvas de 48 horas de edad que se alimentaron crónicamente con clorofilina, fueron más sensibles que las de 72 horas. Esto puede observarse, en las tablas 8 y 9 donde la viabilidad de las larvas de 48 horas se redujo significativamente con el tratamiento crónico con clorofilina al 5 %. Esto pudo ser debido a que las larvas

más jóvenes son más sensibles y que las larvas de 72 horas son más eficientes metabólicamente y por lo tanto excretan los desechos más rápidamente (Graf, 1995).

En la misma tabla 8, podemos observar que las dosis de 1, 2 y 3 mM de ciclofosfamida, no disminuyeron la viabilidad de las larvas de 48 horas, mientras que en las larvas de 72 horas (tabla 9), la viabilidad si se redujo. Esto podría estar relacionado con lo anteriormente expuesto, ya que como se mencionó las larvas de 72 horas activan más eficientemente los procarcinógenos o promutágenos.

En los experimentos del tratamiento combinado (figuras 12 y 13), se observó que la viabilidad de las larvas de 48 y 72 horas tratadas con la combinación clorofilina al 5%-ciclofosfamida fue menor que aquellas tratadas solo con ciclofosfamida.

El tratamiento crónico fue más tóxico que el pretratamiento, está combinación provocó la muerte de los organismos y se presentó en la etapa de adulto.

Con respecto a la prueba de mutación y recombinación somáticas, se observó que en el pretratamiento, la clorofilina a las concentraciones de 5, 7 y 10 %, no indujo un número de manchas significativamente más alto que el grupo testigo, por lo que se puede decir que la clorofilina no fue mutagénica y tampoco tuvo ningún efecto sobre la frecuencia basal de manchas, lo cual concuerda con lo reportado por Zimmering y col., 1990 y Olvera y col., 1993.

El efecto mutagénico de la ciclofosfamida a las dosis utilizadas mostró una relación lineal dosis-respuesta. La respuesta positiva del promutágeno a estas concentraciones coinciden con los descritos por Spanó y col., 1994. Este compuesto se ha probado en una amplia variedad de sistemas tanto *in vivo* como *in vitro*, originado una respuesta positiva consistente en todos ellos. En células de riñón, hígado y pulmón en roedores tratados *in vivo* induce aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambios entre cromátidas hermanas y cambios en el ADN. En cultivos *in vitro* de células humanas, induce aberraciones cromosómicas e intercambio entre cromátidas hermanas (Richardson y Gangolli, 1993).

Si observamos las tablas 10, 11 y 12, notaremos que el tratamiento con ciclofosfamida a las concentraciones más bajas (1 y 2 mM) sólo incrementaron significativamente las manchas pequeñas. La ciclofosfamida por ser un agente indirecto requiere del metabolismo del citocromo p450 para llegar a ser un agente mutágeno (Struck y col., 1971, Sladek, 1973), por lo que cuando llega a la célula ya han transcurrido la mayor parte de las divisiones celulares, dando lugar a la formación de manchas pequeñas dado que el tamaño de las manchas, es inversamente proporcional a la edad de la larva (Graf y col., 1984).

Las dosis 3 y 4 mM incrementaron significativamente los tres tipos de manchas. Como ya se menciono, el pretratamiento con clorofilina al 5 % y ciclofosfamida a la dosis de 4mM redujo la viabilidad en un 90 %. Por esta razón se analizó un menor número de alas. El número de alas fue suficiente para realizar el análisis estadístico, por lo que estos datos fueron incluidos.

La mayor parte de las manchas inducidas, correspondieron a manchas chicas (70%) que indican efecto indirecto, seguidas de las manchas grandes en un 20 %, esto es indicativo de que se trata de un agente de acción indirecta o bien que fue administrado en las últimas etapas de división.

En esta investigación las manchas pequeñas con pelos en forma de flama (flr^3), fueron las menos frecuentes. La baja viabilidad de las manchas simples flr^3 puede ser debida al mismo efecto letal que conduce a la muerte de los organismos que los portan en forma homocigótica (Szabad y col., 1983). Una muy rara doble recombinación, entre mwh y flr^3 la otra entre flr^3 y el centrómero da como resultado una mancha simple flr^3 (Würgler, 1986), aunque este mecanismo se descarta prácticamente ya que la frecuencia es muy baja de 1 entre 20,000.

En cada uno de los experimentos la presencia de manchas gemelas, en un 10 % indicó que la ciclofosfamida tuvo actividad recombinogénica . Esta baja frecuencia de manchas gemelas, podría sugerir que la ciclofosfamida tiene una pobre actividad recombinogénica, sin embargo la recombinación entre los marcadores mwh y flr^3

produce manchas simples mwh, las cuales no se pueden distinguir de las inducidas por mutación.

Para aclarar este punto se determinó la proporción mutación/recombinación inducida por la ciclofosfamida. Para este fin se analizaron las alas de los individuos mwh/TM3.,Ser. En estos individuos todos los eventos recombinogénicos son eliminados debido a la presencia de inversiones múltiples en el cromosoma TM3.,Ser, por lo que las manchas inducidas son debidas a eventos mutagénicos. El porcentaje de recombinación se obtuvo dividiendo la frecuencia de manchas inducidas en los individuos mwh/TM3,Ser, entre el número de manchas mwh producidas en los individuos mwh/flr³.

Los resultados para la ciclofosfamida indicaron que el 66 % de las manchas fueron inducidas por recombinación y el 34 % por mutación. En la combinación clorofilina más ciclofosfamida se obtuvo un 64 % de recombinación y 36 % por mutación, por lo cual podemos observar que no existió protección de la clorofilina sobre la ciclofosfamida.

Spanó y col., (1994), reportaron que el porcentaje de recombinación para la ciclofosfamida fue de un 70 % por lo que nuestros resultados concuerdan con lo reportado por ellos.

El pretratamiento con clorofilina al 5 % durante 24 horas (tabla 10), no modificó la frecuencia de los tres tipos de manchas inducidas por las diferentes dosis de ciclofosfamida, y en algunos casos el número de manchas fue mayor que el de las larvas que no recibieron pretratamiento, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Cabe mencionar que se eligió esta concentración de clorofilina dado que en trabajos anteriores en el Laboratorio esta concentración disminuyó eficientemente la frecuencia de mutaciones inducidas por rayos gamma y ENU (Zimmering y col., 1990, Carrasco, G. 1996). Los mismos resultados se obtuvieron cuando las larvas fueron pretratadas con clorofilina al 7 % (tabla 11).

En el caso del pretratamiento con clorofilina al 10 % (tabla 12), se observó efecto protector de la clorofilina sobre la inducción de manchas pequeñas y grandes.

En la concentración de 1 mM., la clorofilina disminuyó la frecuencia de manchas pequeñas en un 44 %, y las grandes en un 38% , dando como resultado una reducción del 41 % en el total de manchas. En la misma tabla 12 se observó que a la dosis de 3mM, la clorofilina redujo la frecuencia de manchas pequeñas en un 30 % y totales en un 24 %.

El término antimutágeno fue utilizado originalmente para describir a aquellos agentes que reducen la frecuencia o la tasa de mutaciones espontáneas o inducidas, independientemente de los mecanismos involucrados. En ocasiones, la determinación de un mecanismo protector resulta complicada ya que el efecto antimutagénico puede producirse a distintos niveles (De Flora y Ramel, 1988).

Los mecanismos de inhibición de la mutagénesis y de la carcinogénesis son variados y dependen de la etapa en que intervienen en cada proceso, de los patrones de modulación y de las estrategias de defensa del huésped, entre otros (De Flora y Ramel, 1988).

Los compuestos que actúan extracelularmente son llamados desmutágenos y su actividad se puede ubicar en diferentes niveles : 1) al inhibir la entrada de los mutágenos o de sus precursores, 2) al interferir la formación endógena de mutágenos ; 3) al desactivar mutágenos (Kada y col.,1982). y aquellos que pueden actuar intracelularmente (Ramel y col., 1986), o antimutágenos (Kada y col., 1982), los cuales : 1) modulan el metabolismo ; 2) bloquean moléculas reactivas ; 3) modulan la replicación del ADN o la reparación.

Entre los mecanismos de acción propuestos, para explicar el efecto antimutagénico de la clorofilina, se incluyen su habilidad para unirse a los agentes y de esta manera inactivarlos, el funcionar como captador de radicales libres o interferir con

las enzimas responsables de la activación metabólica de los promutágenos (Dashwood y col., 1991).

La explicación de los resultados obtenidos en esta investigación permiten sugerir que la combinación con clorofilina al 10 % y ciclofosfamida resultó ser significativamente más tóxica que las combinaciones con clorofilina al 5 y 7 %, por lo que se analizó un menor número de alas y cabría la posibilidad de que la reducción en el número de los individuos esté indicando que ocurrió selección, quizá por está misma razón se recuperó un menor número de manchas.

Probablemente la clorofilina a la concentración de 10 %, se comportó como un desmutágeno, en apariencia, bloqueando extracelularmente a la molécula de la ciclofosfamida, ya sea impidiendo su entrada a la célula, o inhibiendo alguno de los pasos en su transformación química, por lo que al existir una mayor cantidad de moléculas en el ambiente la clorofilina redujo la mutagenicidad inducida por la ciclofosfamida.

En trabajos realizados por Abraham y col.,(1994) y Te y col.,(1997), demostraron que la clorofilina fue capaz de reducir la frecuencia de micronúcleos inducidos por ciclofosfamida en las células de la médula ósea de ratón.

En los tratamientos combinados (tablas 13 y 14), se observó que el tratamiento crónico con clorofilina al 5 %, no indujo un número de manchas significativamente más alto que el grupo testigo, por lo que se puede decir que la clorofilina no fue mutagénica, lo cual concuerda con lo reportado por Zimmering y col., 1990 y Olvera y col., 1993.

Con respecto al tratamiento crónico con ciclofosfamida, se observó que al igual que en los pretratamientos el efecto mutagénico de la ciclofosfamida a las dosis utilizadas mostró una relación lineal dosis-respuesta.

En el tratamiento crónico con clorofilina al 5 % y ciclofosfamida en larvas del segundo estadio (tabla 13), se observó que la clorofilina redujo la frecuencia de manchas gemelas inducidas por la ciclofosfamida a la dosis de 3 mM en un 20 %.

En el siguiente tratamiento en larvas del tercer estadio (tabla 14), la clorofilina no redujo la frecuencia de manchas inducidas por la ciclofosfamida. En trabajos publicados han comparado la eficacia entre el pretratamiento y el tratamiento combinado, demostrando que este último es mucho más efectivo, pero en esta investigación no fue así. En nuestro laboratorio se ha probado que el tratamiento combinado es más efectivo que el pretratamiento. Se demostró que el tratamiento combinado trióxido de cromo (VI)-clorofilina podía reducir significativamente la genotoxicidad del cromo (Olvera y col., 1993). Mientras que el pretratamiento no fue eficiente (Cruces, 1996 datos no publicados).

En el caso del tratamiento combinado clorofilina-metil-metano-sulfonato en larvas del segundo estadio (tabla 15) y en larvas del tercer estadio (tabla 16), se observó un claro efecto protector de la clorofilina aún cuando en la bibliografía se reportó que esta última no tenía ningún efecto sobre la frecuencia de mutaciones inducidas por metil-metano-sulfonato en *S. cerevisiae*, en este caso no tenemos ninguna explicación a la diferencia encontrada entre los dos sistemas de prueba ya que en ambos se utiliza un organismo eucarionte y el metil-metano-sulfonato es un agente directo que no requiere activación metabólica.

8. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye:

1) En los pretratamientos, la clorofilina por sí misma a las concentraciones de 5, 7 y 10% no disminuyó la viabilidad de los organismos tratados, sin embargo en el tratamiento crónico y en los tratamientos combinados, la viabilidad sí se redujo significativamente.

2) Se determinó que el 66 % de las manchas fueron inducidas por recombinación y el 34% por mutación. En la combinación clorofilina más ciclofosfamida se obtuvo un 64 % de recombinación y 36 % por mutación, por lo cual podemos observar que no existió protección de la clorofilina sobre la recombinación inducida por la ciclofosfamida.

3) Se determinó que el pretratamiento con clorofilina al 10 % redujo la frecuencia de manchas pequeñas y grandes inducidas por la ciclofosfamida.

Posiblemente la clorofilina a la concentración de 10 %, actuó como un interceptor de los metabolitos responsables de la activación de la ciclofosfamida, por lo que al existir una mayor cantidad de moléculas en el ambiente, la clorofilina redujo la mutagenicidad inducida por la ciclofosfamida, sin embargo dado que la combinación fué tóxica hay que tomar con reserva los datos.



Figura 9. Porcentaje de viabilidad inducido por la clorofilina al 5 %.

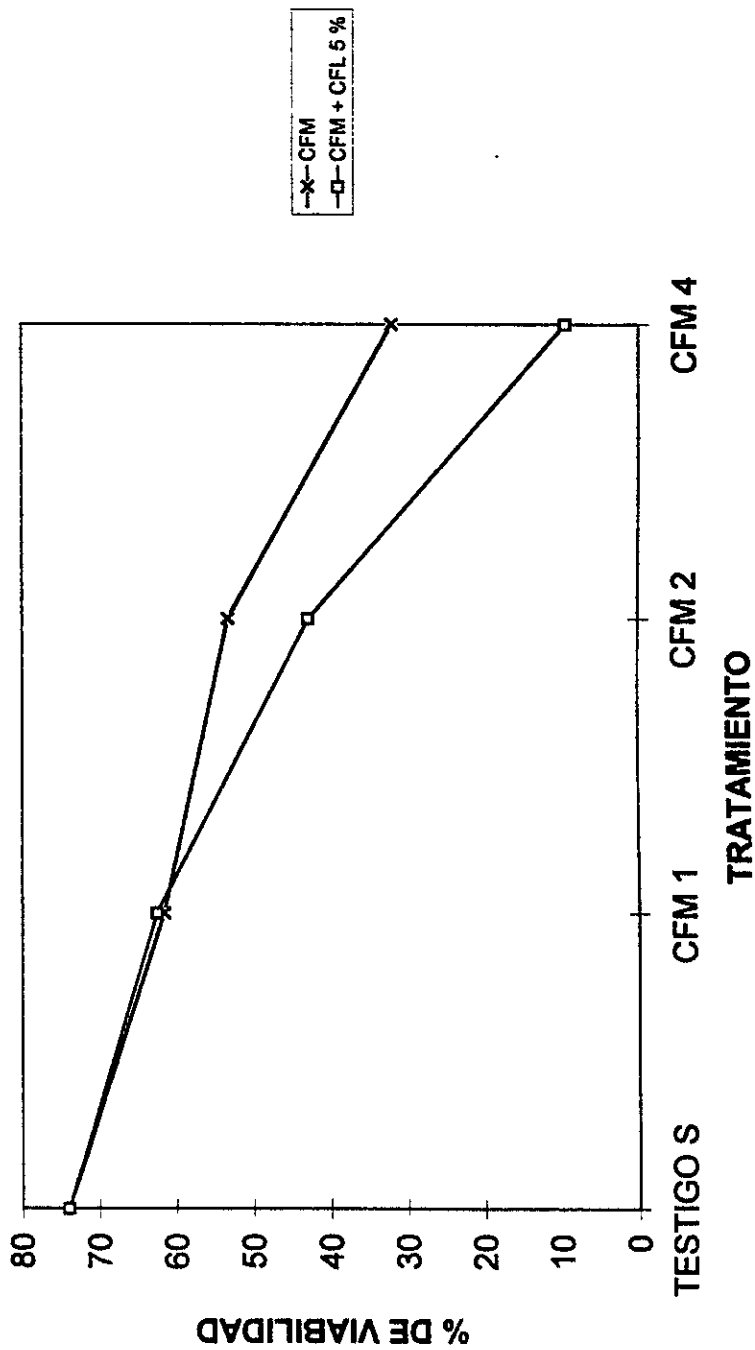


Figura 10. Porcentaje de viabilidad inducido por la clorofilina al 7 %.

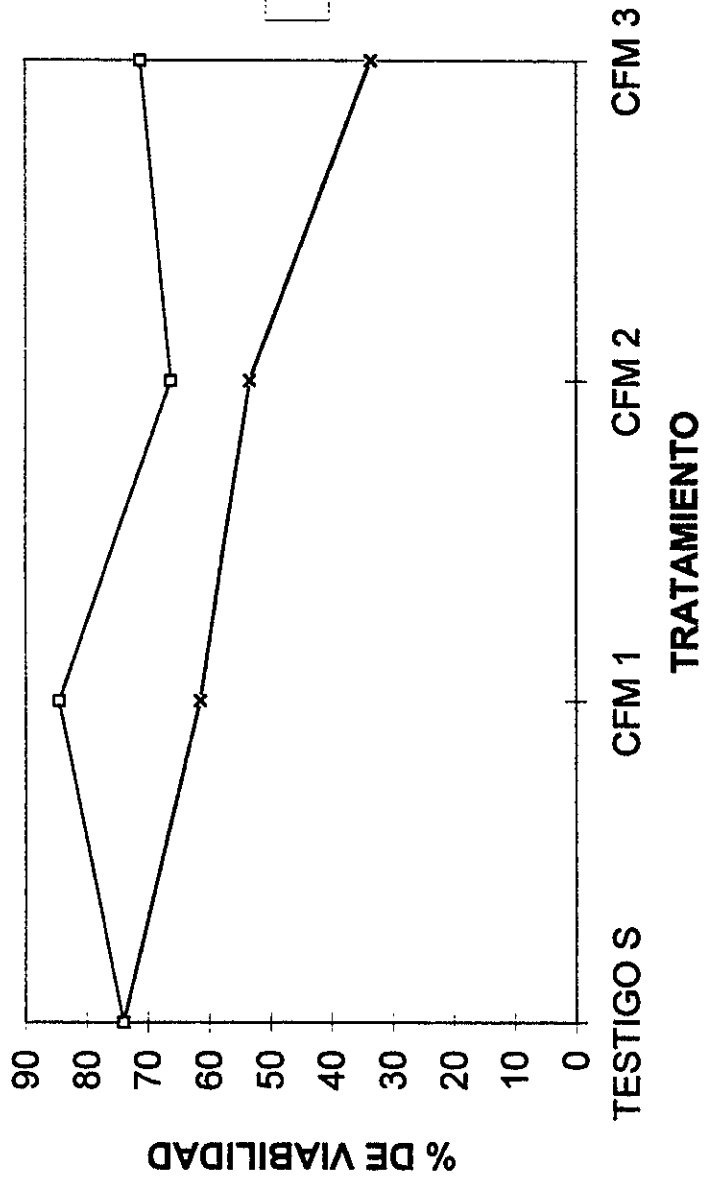


Figura 11. Porcentaje de viabilidad inducido por la clorofilina al 10 %.

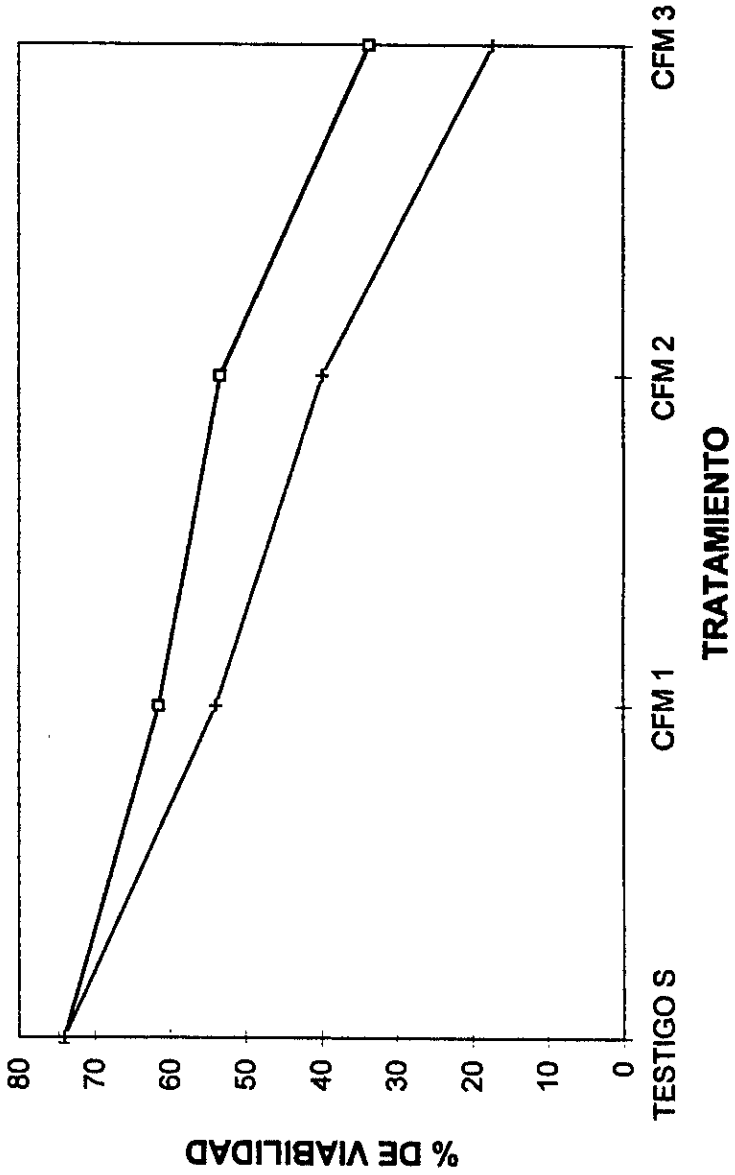


Figura 12. Porcentaje de viabilidad larvas de 48 horas tratadas con CFL-CFM.

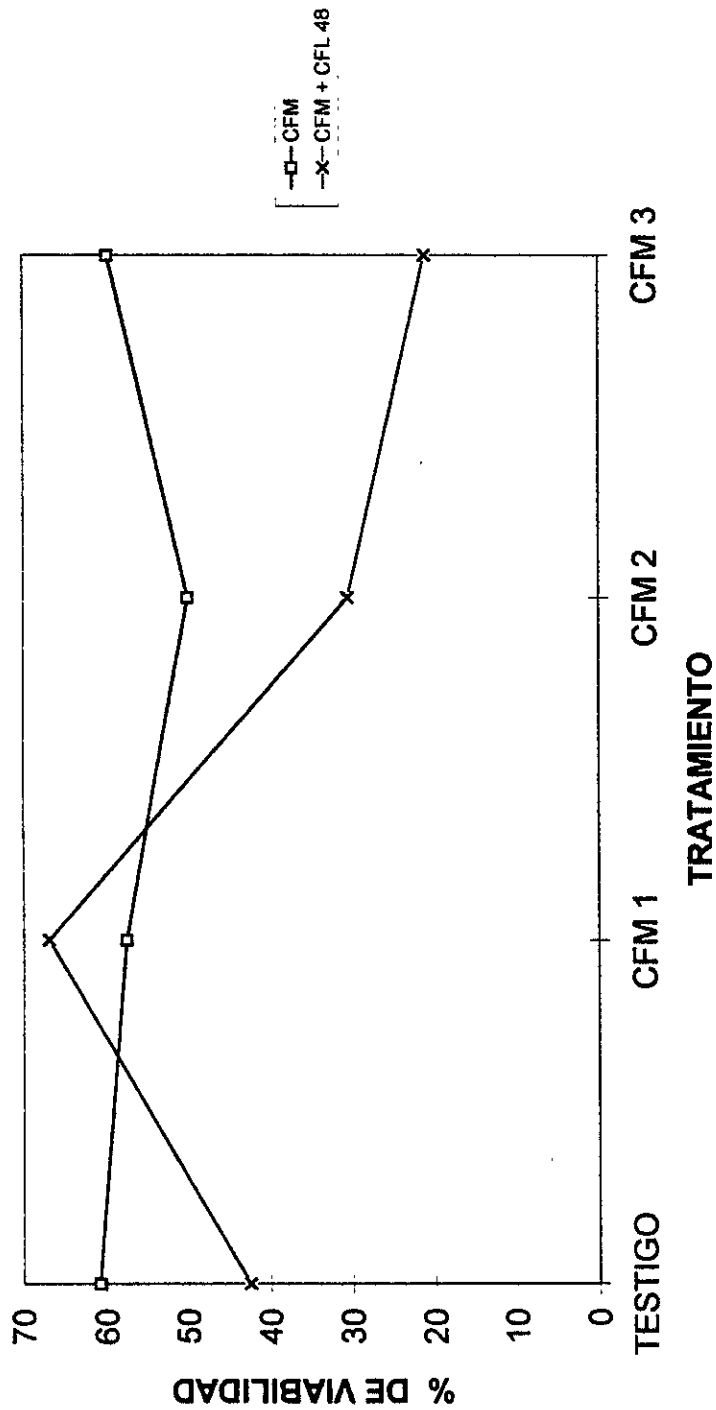
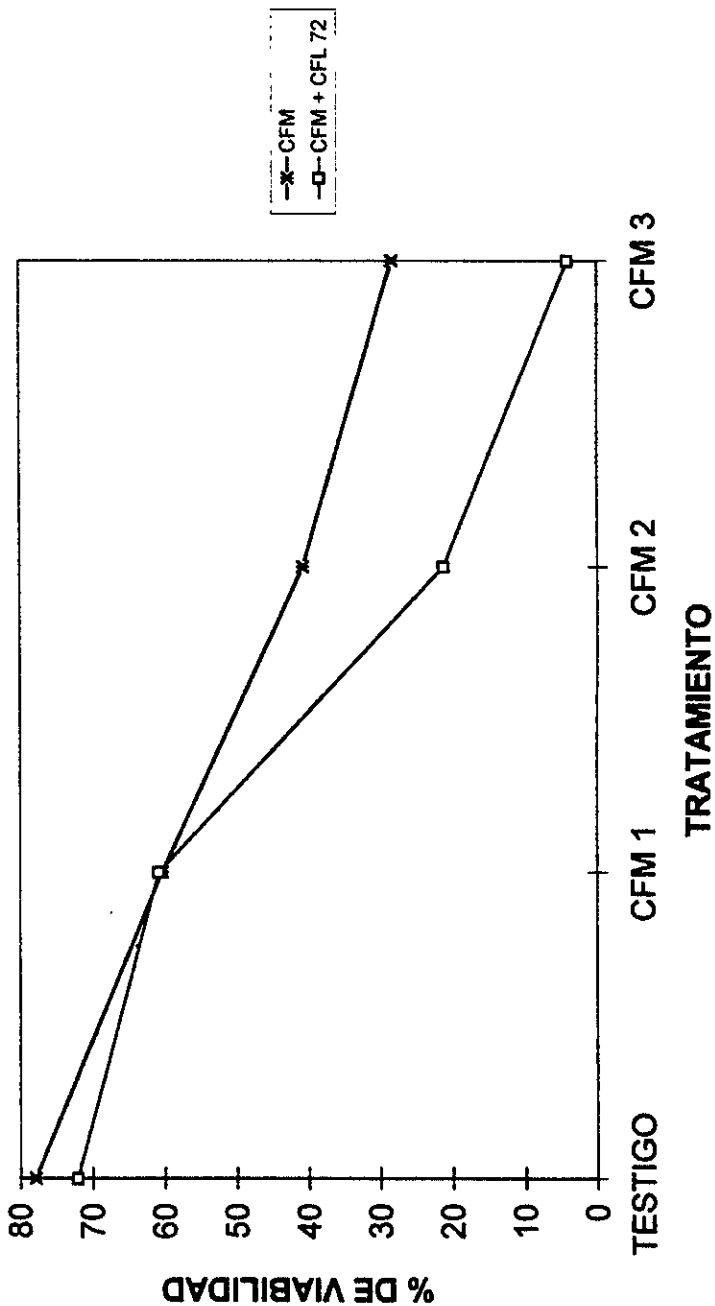


Figura 13. Porcentaje de viabilidad larvas de 72 horas tratadas con CFL-CFM.



10. REFERENCIAS

- Abraham, S. K., Sarma, L. y Kesavan, P. C. (1994). Role of chlorophyllin as an *in vivo* anticlastogen : protection against gamma-radiation and chemical clastogens. *Mutation Res.* 322 :209-212.
- 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. y Hayatsu, H. (1980b). Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92 :662-668.
- Bowman, W. C. y Rand, J. M. (1988). *Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas.* Interamericana. México, D.F., pp 13-25.
- Brusick, David. (1987). *Principles of Genetic Toxicology.* Plenum Press. New York and London., pp 3-284.
- Carrasco, Q. G. (1996). Efecto Antimutagénico de un Derivado de la Clorofila. Tesis para obtener el título de Químico. Facultad de Ciencias Químicas. Puebla, Puebla. 42-51 pp.
- Carter, S. K. (1976). Integration of chemotherapy into combined modality treatment of solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* 3 :144-174.
- Casida, J. E. (1969). Insect microsomes and insecticide chemical oxidations. In Gillette, J. R., Conney, A. H., Cosmides, G. J. and Estabrook, R. W. (Eds). *Microsomes and Drug Oxidation.* Academic Press, New York, pp 517-531.
- Chemomorsky, S. (1993). Chlorophyllin copper complex : Quality Control. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 44 :235-238.

- Cho, Y. S., Kim, B. Y., Lee, S. T., Surh, Y. J. y Chung, A. S. (1996). Chemopreventive effect of chlorophyllin on mutagenicity and cytotoxicity of 6-sulfoxymethylbenzo[a]pyrene. *Cancer Lett.* 107 : 223-228.
- Clements, J. D., Phillips, H. M. y Todd, N. K. (1988). The *Drosophila* wing test: A comparison of the sensitivity of different strains. *Mutation Res.* 203 : 117-123.
- Colvin, M., Brundett, R. B., Kan, M. N., Jardine, I. y Fenselau C. (1976). Alkylating properties of phosphoramidate mustard. *Cancer Research.* 36 :1121-112.
- Connors, T. A. (1978). *Anti-tumor drugs with latent activity.* *Biochimie,* 60:979-978.
- Cruces, M. P. (1988). Frecuencia de mutaciones somáticas y recombinación inducidas por rayos gamma en *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. 69 pp.
- Dashwood, R.H., Breinholt, V. y Bailey, G. S. (1991). Chemopreventive properties of chlorophyllin : Inhibition of aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA binding "in vivo" and anti-mutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis,* 12 :939-942.
- Dashwood, R. H. (1992). Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo-[4-5-f]-quinoline (IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis,* 13 :113-118.
- Dashwood, R. y Guo, D. (1992). Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation. *Carcinogenesis,* 13:1121-1126.
- Dashwood, R. y Liew, C. (1992). Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Environ. Mol. Mutagen.* 20 :199-205

De Flora, S. y Ramel, C. (1988). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Res.* 202 :285-306.

Doll, R. y Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer. Inst.* 66 :1191-1308.

Elias, R., Demes, M. y Vidal-Ollivier, E. (1990). Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *Calendula arvensis* L. and *Hedera helix* L. *Mutagenesis*, 5 :327-332.

Farmer, P. B. (1994). Metabolism and reactions of alkylating agents, in G. P. Powis (Ed.), *Anticancer Drugs: Reactive Metabolism and Drug Interactions*, Pergamon Press, Oxford pp 4-6.

Flagg, R.O. (1988). *Carolina Drosophila Manual*. Carolina Biological Supply Company. U.S.A. 30 pp.

Frei, H. y Würigler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.* 203 :297-308.

Fried, H. G. (1990). *Biología*. McGraw-Hill/Interamericana de México. México, D.F., p97.

Gardner, E. J. (1979). *Principios de Genética*. Limusa. p336.

García-Bellido A, Merriam, J.R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 24:61-87.

García-Bellido, A. (1978). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Molec. Genet.* 128 :117-130.

- García-Bellido, A., Lawrence, A. y Morata, G. (1979). Compartments in animal development. *Scient. Amer.* 241:102-110.
- Gehring, W. J. (1985). Base Molecular del Desarrollo Investigación y Ciencia. 111 :100-112.
- Ghosh, A., Sen, S., Sharma, A. y Talukder, G. (1991). Inhibition of clastogenic effects of cesium chloride in mice *in vivo* by chlorophyllin. *Toxicol. Lett.* 57 :11-18.
- Ghosh, A. K., Sen, S., Palit., S., Ghosh, A., Sharma, A. y Talukder, G. (1991a). Comparative efficacy of chlorophyllin in reducing cytotoxicity of some heavy metals. *Biol. Metals*, 4 : 158-161.
- Ghosh, A. K., Sen, S., Sharma, A. y Talukder, G. (1991b). Modification of clastogenic effects of mercury chloride by chlorophyllin in bone marrow cells *in vivo*. *Food Chemical. Toxicology*, 29 :777-779.
- Graf, U., Würigler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. y Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6 :153-188.
- Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51 :168-173.
- Graf, U., Spanó, M. A, Guzmán, R. J. Abraham, S. K y Heloisa, H. de Andrade (1996). The Wing Somatic And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* :An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. Proceeding second conference of the Pan-African Environmental Mutagen society (PAEMS).

Hampel, K. E., Fritzsche, M. y Stopik, D. (1969). Quantitative Untersuchungen über chromosomenmutationen bei menschlichen Leukocyten durch Cyclophosphamid nach Aktivierung an Leberschnitten, Humangenetik 7:28-37.

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (1992). Sistemas Biológicos de Monitoreo Ambiental y sus Aplicaciones para profesores del Area Química Biológicas del Bachillerato Tecnológico. Curso-Taller. México. 55 pp.

Kada, T., Inoue, T. y Namiki, N. (1982) in: E. J. Klekowski (Ed.), Environmental Mutagenesis and Plant Biology, Praeger, New York, 1988, pp 137-151

Katoh, Y., Nemoto, N., Tanaka, M. y Takayama, S. (1983). Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. Mutation Res. 121 :153-157.

Kimm, S., Tchai, B., Park, S. y Kang, S. (1982). Antimutagenic activity of chlorophyll to direct-acting and indirect-acting mutagens and its contents in vegetables. Korean J. Biochem. 14:1-8.

Lai, C. N., Dabney, B. J. y Shaw, C. R. (1978). Inhibition of *in vitro* metabolic activation of carcinogens by wheat sprout extracts. Nutr. Cancer, 1:27-30.

Lai, C. N. (1979). Chlorophyll: the active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. Nutr. Cancer, 1 :19-21.

Lai, C. N., Butler, M. A y Mathey, T. S. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. Mutation Res. 77 :245-250.

Lee, W. R., Abrahamson, S., Valencia, E., Würgler, F. y Zimmering, S. (1983). The sex linked recessive lethal for mutagenesis in *D. melanogaster*. Mutation Res. 123 : 183-279.

- Lindsley, D. L. y Grell, E. H. (1985). Genetic Variations of *Drosophila melanogaster*, Carnegie, Inst. Wash. Publ. 627 Washington, DC.
- Madrigal, B. E., Velazquez, G. N. y Diaz, B.S. (1997). Inhibitory effect of chlorophyllin on the frequency of sister chromatid exchanges. *Mutation Res.* 388 :79-83.
- Mollet, P. y Würigler, F. E. (1974). Detection of Somatic Recombination and Mutation in *Drosophila*. A method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutation Res.* 25 :421-424.
- Morales, R. P. y García, R. M. C. (1994). *In vivo* effect of chlorophyllin on Y-ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutation Res.* 320:329-334.
- Munzner, R. (1981). Testing meat extracts for mutagenic action. *Fleischwirtschaft.* 61:1586-1588.
- Negishi, T., Arimoto, S., Nishizake, C. y Hayatsu, H. (1989). Inhibitory effect of chlorophyllin on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-p-2). *Carcinogenesis*, 10 :145-149.
- Negishi, T., Rai, H. y Hayatsu, H. (1997). Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutation Res.* 376 :97-100.
- Nelson, R. L. (1992). Chlorophyllin, and antimutagen, acts as tumor-promoter in the rat-dimethylhydrazine colon carcinogenesis model. *Anticancer Res.* 12 :737-739.
- Olvera, O., Zimmering S., Arceo C. y Cruces M. (1993). The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* 301 :201-204.
- Ondarza, N. R. (1985). El impacto sobre sí mismo. Trillas. México D. F., pp 88-90.

Ong, T. M., Whong, W. Z., Stewart, J. y Brockman, H. E. (1986). Chlorophyllin : a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.* 173 :111-115.

Ong, T. M., Whong, W. Z., Stewart y Brockman, H. E. (1989). Comparative antimutagenicity of five compounds against five mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98, *Mutation Res.* 222 :19-25.

Palit, S., Sen, S., Sharma, A. y Talukder, G. (1991). Protection by chlorophyllin against induction of chromosomal aberrations by cobalt in bone marrow cells of mice *in vivo*. *Fitoterapia*, 42 :425-428.

Ramel, C., Alekperov, U. K., Ames, B. N., Kada, T. y Wattenberg, L. W. (1986). Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutation Res.* 168 :47-65.

Renner, H. W. (1990). *In vivo* effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 244 :185-188.

Richardson, M. L y Gangolli, S. (1993). *The Dictionary of substances and their Effects*. De Royal Society of Chemistry, Inglaterra. Pp 778-779.

Roberts y Evans-Roberts. (1979). *Genetics* 93 : 663-79. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Part 4 : Genes L-Z, Balancers, Transposable Elements. DIS 68 1990.

Robins, E. W. y Nelson, R. L. (1989). Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced nuclear damage in rat colonic epithelium by chlorophyllin. *Anticancer Res.* 9:981-986.

Romert, L., Curvall, M. y Jenssen, D. (1992). Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis*, 7 :349-355.

Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G. (1993). Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*. *Mutation Res.* 301 :33-38.

Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G. (1994). Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium (VI) oxide in mice *in vivo*. *Phytother. Res.*

Sen, S., Sharma, A. y Talukder, G. (1991). Inhibition of clastogenic effects of nicotine by chlorophyllin in mice bone marrow cells *in vivo*. *Phytother. Res.* 5 :130-133.

Sladek, N. E. (1973). Evidence for an aldehyde possessing alkylating activity as the primary metabolite of cyclophosphamide. *Cancer Res.* 33 :651-658.

Sobels, H. y Vogel, E. W. (1976). Assaying potential carcinogens with *Drosophila*. *Environmental Health Perspectives.* 15 :141-146.

Spanó, M., Graf, U. y Würgler, F. E. (1994). Quantitative determination of recombinagenic activity in two different crosses of the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10, suppl. 1,17.

Struck, R. F., Kirk, M. C. Mellett, L. B., El Dareer, S. y Hill, D.L. (1971). Urinary metabolites of the antitumor agent cyclophosphamide. *Mol. Pharmacol.* 7 :519-529.

Suzuki, D. T., Griffiths, J. F., Miller, H. y Lewontin, C. (1989). *An Introduction to Genetics.* W. H. Freeman and Company, New York, pp 147,184-624.

Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. y Hejja, G. (1983). Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal test. *Mutation Res.* 113:117-133.

Tang, X. y Edenharder, R. (1997). Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by vitamins, porphyrins and related compounds, and vegetable and fruit juices and solvent extracts. *Food. Chem. Toxicol.* 35 :373-378.

Te, C., Gentile, J.M., Baguley, B. C., Pearson, A. E., Gregory, T. y Ferguson, L. R. (1997). *In vivo* effects of chlorophyllin on the antitumor agent cyclophosphamide. *Int. J. Cancer.* 70 :84-89.

Terwell. L. y Vander Hoeven, J. C. M. (1985). Antimutagenic activity of some naturally occurring compound towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Res.* 152 :1-4.

Vogel, E. W. (1987). Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila* : the need for a change in test strategy. *Mutagenesis*, 2 :161-171.

Vogel, E. W. (1991). Genotoxic Chemicals an Introduction into Basic Principles of genetic toxicology. pp 2-65.

Warner, J. R., Joginder, N. y Ong, T. M. (1991). Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella arabinose*-resistant assay system. *Mutation Res.* 262 :25-30.

Wattenberg, L. W. (1983). Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer, Res.* 43 :2448-2453.

Whong, W., Stewart, J., Brockman, H. E. y Ong, T. (1988). Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B₁-induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 8 :215-224.

Würgler, F. E., Sobels, H. y Vogel, E. W. (1984). *Drosophila* as an assay system for detecting changes. *Handbook of Mutagenicity test procedure.* pp 555-601.

Würgler, F. E. (1986). Mutagenicity assays detecting Recombination. Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part. B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis. pp 85-90.

Würgler, F. y Vogel, E. (1986). *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En de Serres FJ: Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, Vol.10. Plenum Press, New York, pp 1-72.

Zijlstra, J. A. y Vogel, E. W. (1985). The possible involvement of monoamine oxidases in the bioactivation and deactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. In : Fourth International Conference on Environmental Mutagens, Stockholm, 24-28 June 1988, Abstract book, p 106.

Zimmering, S., Olvera, O., Hernández, M. E., Cruces, M. P., Arceo, C. y Pimentel, E. (1990). Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. Mutation Res. 245 :47-49.