

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACION DEL EFECTO ANTIMUTAGENICO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR NEUTRONES DE REACTOR EN Drosophila melanogaster

29/10/15

T E S I S

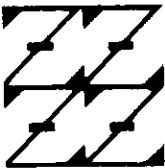
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

A Y N E T O L I M P I A G A R C I A B A R A J A S

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



LO HUMANO ES DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JOSE FERNANDO ZAMBRANO ACHIRICA
ASESOR INTERNO: M. C. RAUL ZAVALA CHAVERO

MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

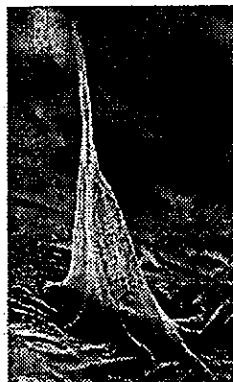


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

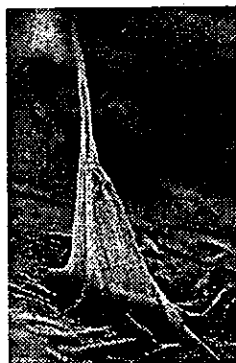
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE DROSOPHILA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y EN EL DEPARTAMENTO DE MATERIALES RADIATIVOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES BAJO LA ASESORÍA DEL M. EN C. FERNANDO ZAMBRANO ACHIRICA.

AGRADEZCO AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES Y A CONACYT POR EL APOYO BRINDADO DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

GRACIAS.....



**A LOS MIEMBROS DEL JURADO LES MANIFIESTO MI AGRADECIMIENTO
POR SUS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS TAN VALIOSAS QUE
ENRIQUECIERON ESTA TESIS:**

DR. FERNANDO ZAMBRANO ACHIRICA

M. C. RAUL ZAVALA CHAVERO

DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

M. EN C. MARIA DEL CARMEN GARCÍA RODRIGUEZ

DRA. ISABEL SOTO CRUZ

MUCHAS GRACIAS A :

DRA. JUDITH GUZMÁN

DR. STANLEY ZIMMERING

DR. JOSÉ ALANIZ

ING. LYDIA PAREDES

POR SUS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS.



A MIS PADRES Y ABUELA:

MARIA TERESA BARAJAS CALDERÓN Y RAÚL GARCIA TAPIA.

MARIA TRINIDAD CALDERÓN GARCIA

**En correspondencia a su confianza y porque con su apoyo,
he logrado concluir uno de mis grandes sueños**

GRACIAS.

A MIS HERMANOS

Por el cariño y apoyo en todo momento.

A TODA MI FAMILIA

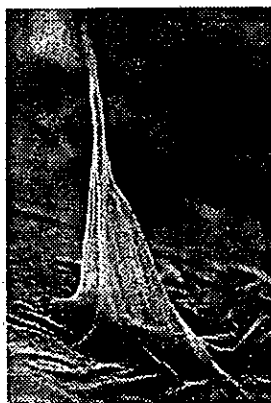
EN ESPECIAL A:

TERESA GARCÍA TAPIA

CONCEPCIÓN GARCÍA TAPIA

ARTURO DELFÍN LOYA

LIDIA GARCÍA TAPIA



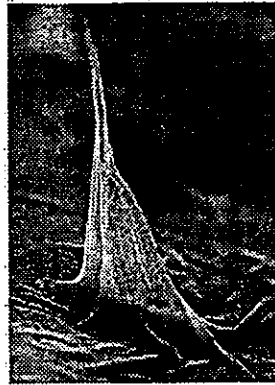
A TODOS MIS AMIGOS DEL ININ

**POR HACER DE ESTE LUGAR NO SÓLO UN INSTITUTO DE
INVESTIGACION, SINO UN LUGAR PARA RECORDAR TODA LA VIDA.....**

GRACIAS POR SER TAN ESPECIALES.

**A SUSI, CARO, DORIS, LICHA
MTRA. OLGA, DR. VICTOR**

**A MIS AMIGOS DEL REACTOR
LAURO, ALANIZ, BALDOMERO, RODRIGO, AVEL
CARLOS GUILLEN, ING.EDUARDO, DVD, RAFAEL.**



A TI TERU:

**POR ABER LLEGADO A MI VIDA EN EL MOMENTO QUE MÁS TE
NECESITABA
GRACIAS POR SER MI COMPAÑERO Y MOTOR DE MI VIDA....TE QUIERO.**

ESTA TESIS ES PARA TI.

RESUMEN

La clorofilina (CLF) es un compuesto cuyas propiedades antimutagénicas y antioxidantes han sido demostradas en varios organismos, en los que se ha comprobado que disminuye el número de mutaciones provocadas por la exposición a diferentes agentes químicos inductores de mutaciones, así como a la radiación γ . Se evaluó el efecto protector de la CLF sobre los daños genéticos inducidos por neutrones utilizando la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en el ala de *Drosophila melanogaster* utilizando dos tipos de cruza: estándar (ST) y de alta bioactivación (BE) la cual presenta como característica esencial, un aumento en su capacidad metabólica debido al nivel elevado del citocromo P-450. Para el pretratamiento con CLF, dos grupos de larvas de 72h de edad, de cada crua, se sometieron a una alimentación por 24h con puré de papa y concentraciones bajas, 45.5mM y altas, 182mM de CLF disueltas en el mismo alimento. Posteriormente fueron irradiadas con neutrones del reactor Triga MARK III, durante 41' 40". Los resultados fueron obtenidos analizando las alas de los adultos emergidos de los dos tratamientos, para ello se contaron las mutaciones inducidas por la irradiación con neutrones, por medio de los marcadores recesivos mwh (pelos múltiples en el ala) y flr³ (pelos en forma de flama). En la crua ST se registró una reducción de los daños del orden del 18.5% cuando se hizo un pretratamiento a la concentración baja de CLF, en tanto que la frecuencia registrada, cuando se le administró la concentración alta de CLF fue hasta un 26.6%. Por otra parte la crua BE registró una disminución en la frecuencia de mutación y recombinación para el mismo tipo de manchas del 34%, con concentración baja de CLF y del 49.9% para la concentración alta de CLF. Los resultados indican que la CLF es un potente radioprotector contra los daños inducidos por neutrones, reduciendo los efectos provocados por éstos en *Drosophila melanogaster*. Esta protección es directamente proporcional a la concentración de CLF que se utilice y al tipo de crua. Los datos de la subpoblación de moscas con balanceador heterócigoto mostraron frecuencias menores a las de las alas con marcador trans-heterócigoto.

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	4
1 Radiación	4
1.1 Tipos de radiación	4
1.1.1 Radiación ionizante	4
1.1.2 Rayos X	5
1.1.3 Rayos Gamma	6
1.1.4 Partículas Alfa	6
1.1.5 Partículas Beta	7
1.1.6 Neutrones	7
1.1.7 Radiación no ionizante	8
1.1.7.1 Radiación ultravioleta	8
1.2 Dosis	8
1.2.1 Dosis absorbida	8
1.2.2 Dosis equivalente	9
1.3 Radiación artificial de fondo	11
1.4 Mutación inducida por radiación ionizante	11
1.5 Clorofilina y antimutagénesis	14
1.6 Antecedentes	16
1.7 Toxicidad	19
1.8 Mecanismos de acción	19
1.9 <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba	21
1.10 Sistema SMART	26
1.11 Citocromo P-450	32
JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GENERAL	34
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	34
HIPÓTESIS	34
METODOLOGÍA	35
4.1 Compuestos	36
4.2 Líneas empleadas	36
4.3 Cruzas	36
4.4 Obtención de larvas	37
4.5 Preparación de CLF	37
4.6 Pretratamiento con CLF	37
4.7 Combinación de la CLF con neutrones	38
4.8 Mapeo de flujo de neutrones	38
4.9 Irradiación de larvas	39
4.10 Elaboración de preparaciones	39
4.11 Análisis de adultos	39
4.12 Análisis estadístico de los datos de SMART	41
RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	66
ANEXOS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN Acido desoxirribonucléico

CLF Clorofilina sal de sodio y cobre derivada de la clorofila

ICRP Comisión Internacional en Protección Radiológica

BNCT Terapia por medio de la Captura de Neutrones por Boro

LET Transferencia Lineal de Energía

TM3 Cromosoma balanceador con inversiones múltiples

SMART Somatic Mutation and Recombination Test,

mwh "multiple wing hair", pelos multiples en el ala

flr "flare", pelos en forma de flama

Bd "Beaded serratia" marcador serratia

AB Alta Bioactivación

ST Estándar

Sv sievert 1J/Kg. Dosis de radiación absorbida para un tejido u órgano

rem (unidad antigua). 1 rem= 0.01Sv. Dosis de radiación absorbida para un tejido u órgano

Mw mega wats

eV electrón volt 1 eV = $1,60 \times 10^{-12}$ erg

mM milimolar

ppm partes por millón

INTRODUCCIÓN

1 Radiación

Para que el núcleo se mantenga en estado estable es necesario que las fuerzas nucleares estén en equilibrio con las fuerzas eléctricas, si esto no sucede entonces el núcleo se encuentra en estado excitado (inestable) y tiende a buscar su estabilidad emitiendo energía por medio de algún mecanismo. Esta energía consiste en la emisión de partículas, o radiación electromagnética de algún tipo, dependiendo del núcleo. De ésta forma a la radiación se le define como el fenómeno de emisión y propagación de energía en forma de ondas o partículas, desde un núcleo atómico que se encuentra en estado excitado y busca por este medio llegar a su estado estable.

1.1 Tipos de radiación

1.1.1 Radiación ionizante

Existen dos fuentes de radiación: natural y artificial; la natural está representada por la radiación cósmica, las fuentes terrestres (^{87}Rb , ^{222}Rn , ^{238}U , etc.) y la debida a la presencia de ciertos radioisótopos en el cuerpo humano, como el ^{14}C y el ^{40}K . La artificial es toda aquella que el hombre produce industrialmente. La radiación ionizante posee la energía necesaria para arrancar uno o varios electrones a los átomos o a las moléculas del medio irradiado, entre ellas se encuentran las radiaciones α , β y también las electromagnéticas como los rayos γ , X (Alonso y Finn, 1970).

Tabla 1 Clasificación de radiación

Corpuscular o de partículas	Electromagnética
radiación alfa (α)	luz visible
radiación beta (β)	ondas de radio
neutrones	rayos X
	radiación gamma

1.1.2 Rayos X

Los rayos X fueron descubiertos en 1895 por Roentgen, al efectuar experimentos de descargas con gases. En poco tiempo se acumularon pruebas de que estos rayos eran radiación electromagnética de longitud de onda muy corta; por ejemplo:

- i) Los rayos X se producen cuando electrones energéticos golpean contra un objeto sólido. En estas circunstancias el electrón sufre una desaceleración violenta y es una consecuencia de la teoría electromagnética en donde un electrón acelerado o retardado emite radiación electromagnética (Alonso y Finn, 1970).
- ii) Haga y Wind demostraron en 1899 que los rayos X podían difractarse con una rendija muy fina, demostrando que eran un fenómeno ondulatorio. El tamaño del patrón de difracción indicó que la longitud de onda era del orden de 10^{-8} cm (Alonso y Finn, 1970).
- iii) En 1906 Barkla probó que las ondas eran transversales al demostrar que podrían polarizarse (Alonso y Finn, 1970).

Por lo tanto, si la radiación electromagnética pasa por una partícula cargada, la partícula oscilará bajo la influencia del campo eléctrico que varía con el tiempo, y adquirirá una aceleración. Luego entonces, una carga eléctrica acelerada emite radiación, es decir, la carga eléctrica dispersa la radiación entrante (Alonso y Finn, 1970).

1.1.3 Rayos Gamma

Son ondas electromagnéticas de origen nuclear y se superponen al límite superior del espectro de rayos X; sus longitudes de onda van desde aproximadamente 10^{-10}m hasta mucho menos de 10^{-14}m , el rango de frecuencias va de 3×10^{16} Hz a más de 3×10^{22} Hz. La energía de los fotones va desde 10^4 eV hasta 10^7 eV aproximadamente; estas energías son del mismo orden de magnitud que las involucradas en los procesos nucleares, por lo que la absorción de estos rayos puede producir cambios nucleares. Estos rayos son producidos por muchas sustancias radiactivas formándose grandes cantidades en los reactores nucleares. La mayoría de las sustancias no lo absorben fácilmente, pero cuando son absorbidos por organismos vivos producen efectos graves. Su manipulación requiere un buen blindaje de protección (Alonso y Finn, 1970).

1.1.4 Partículas Alfa

Una partícula alfa es en realidad el núcleo de un átomo de Helio, se produce cuando un núcleo se encuentra con un número elevado de neutrones y protones registrando así un peso muy elevado. Cuando el número de neutrones con respecto a protones es muy grande se vuelve inestable, radiactivo, y tiende a emitir partículas formadas por neutrones y protones para alcanzar su estabilidad, éstas partículas están cargadas positivamente y son emitidas a velocidades muy elevadas por elementos que están en la naturaleza, tales como el Uranio y el Radio, así como por elementos artificiales. Debido a su gran tamaño, las partículas alfa tienen poco poder de penetración y pueden ser detenidas por la capa exterior de la piel o por una hoja de papel. Sin embargo si el elemento emisor se introduce en el cuerpo, por inhalación o ingestión, puede dañar más que otras radiaciones, debido a su masa y carga eléctrica, ya que tienen un radio del orden de 10^{-8}cm (Johnson y Tutiah, 1985).

1.1.5 Partículas Beta

Las partículas beta, por ser electrones, son mucho más pequeñas y ligeras que las partículas alfa. En consecuencia, son más penetrantes pero atraviesan los materiales en forma de zig-zag. Su tasa de ionización es muy inferior a la de las partículas alfa. La profundidad de penetración de las partículas beta depende de su energía y de la intensidad del material que atraviesan. Una partícula beta de energía media no atravesará una lámina delgada de metal y solo unos 10mm de tejido. Por tanto, los radionucleidos emisores beta son un riesgo para la piel y los ojos lo mismo que si penetran en el cuerpo. La facilidad de detección de la radiación beta depende de su energía; sin embargo, todas las energías, excepto las más bajas, pueden detectarse con una facilidad razonable (Johnson y Tutiah, 1985).

1.1.6 Neutrones

Los neutrones son partículas subatómicas que provienen del Uranio de fisión en reactores nucleares con carga eléctrica neta igual a cero y su masa es aproximadamente igual a 1 uma (unidad de masa atómica), por carecer de carga son capaces de llegar cerca del núcleo atómico y ser capturados por él, o pueden desviarse del núcleo por dispersiones elásticas, en donde parte de su energía se transfiere al núcleo blanco como energía cinética (Azorín, 1997). Sin embargo, a pesar de que se conoce poco sobre sus efectos biológicos (Ayaki *et al.*, 1990), algunos autores han hecho estudios con neutrones térmicos de reactor (Delfin *et al.*, 1998a; Guzmán *et al.*, 1998; Zambrano *et al.*, 1998a,b), así como de su dosimetría (Delfin *et al.*, 1998b). Los neutrones de importancia en física de reactores se dividen en tres clases, de acuerdo a su energía:

Neutrones rápidos	$0.5 \text{ MeV} < E < 20 \text{ MeV}$
Neutrones intermedios	$1 \text{ keV} < E < 0.5 \text{ MeV}$
Neutrones lentos	$0 \text{ keV} < E < 1 \text{ keV}$

Los neutrones lentos con energías cercanas a las de los átomos de agitación térmica (la más probable de estas energías es 0.025eV a 293°K), son llamados neutrones térmicos.

Neutrones lentos con energías mayores a 1eV son llamados neutrones epitérmicos o neutrones de resonancia debido a las muchas resonancias en la sección eficaz del medio en este intervalo (Azorín, 1997).

1.1.7 Radiación no ionizante

1.1.7.1 Radiación ultravioleta

Las longitudes de onda son de $3.8 \times 10^{-7}\text{m}$ hasta alrededor de $6 \times 10^{-10}\text{m}$, con frecuencias desde 8×10^{14} Hz hasta 3×10^{17} Hz aproximadamente. Estas ondas son producidas por átomos y moléculas en descargas eléctricas. Su energía es del orden de magnitud de la energía involucrada en muchas reacciones químicas, lo que explica muchos de sus efectos químicos. El sol es una fuente muy poderosa de radiación ultravioleta, siendo este factor el principal responsable del bronceado de la piel. La radiación ultravioleta del sol también interactúa con los átomos presentes en la atmósfera, produciendo gran cantidad de iones; esto explica por qué la alta atmósfera está fuertemente ionizada a una altura mayor de 80Km; es por este motivo que se denomina ionosfera. Cuando algunos microbios absorben radiación ultravioleta, pueden ser destruidos como resultado de las reacciones químicas producidas por la ionización y la disociación de moléculas; por esta razón los rayos ultravioletas se usan en algunas aplicaciones médicas y también en procesos de esterilización (Alonso y Finn, 1970).

1. 2 Dosis

1.2.1 Dosis absorbida

La dosis absorbida, D , es la cantidad de energía que absorbe un material al ser expuesto a la radiación. Matemáticamente se expresa como:

$$D = \Delta E / \Delta m$$

ΔE = Energía promedio depositada por la radiación ionizante en una porción de materia de masa (Δm).

La unidad especial o tradicional, para la dosis absorbida es el rad, definida como la cantidad de cualquier radiación que deposita 100 erg de energía en un gramo de cualquier material. Actualmente se emplea la unidad del sistema internacional de unidades llamada Gray cuyo símbolo es el Gy y equivale a 100rad:

$$1\text{Gray} = 1\text{J/Kg}$$

Esta cantidad de energía correspondiente a la energía calórica necesaria para elevar la temperatura de un litro de agua de 4°C a 4.00024°C.

Para el caso de que la energía de la radiación electromagnética esté entre 0.2 y 3MeV y que el material absorbente sea tejido humano, se tiene la equivalencia siguiente:

$$D = 0.94 \times (1R = 0.87\text{Rad})$$

Para el caso de que el material absorbente sea aire, la equivalencia es de

$$D = 0.87 \times (1R = 0.87\text{Rad})$$

1.2.2 Dosis equivalente

Es muy importante contar con una relación numérica bien definida entre la dosis absorbida y el efecto biológico que produce. La dosis absorbida es insuficiente para predecir la severidad o la probabilidad del efecto bajo condiciones no especificadas, por ello se ha introducido otra cantidad que interrelaciona la dosis absorbida con los efectos más importantes. Esta cantidad se denomina Dosis Equivalente, H, y se define como:

$$H = D \times Q \times N$$

Donde: D es la dosis absorbida, N es el producto de todos los demás factores modificadores, como rapidez de dosis, fraccionamiento de la misma, etc. Por el momento la ICRP le ha asignado el valor de 1 y Q es el factor de calidad, y representa el daño que cualquier tipo de radiación causa con relación al daño causado por la radiación gamma.

Su unidad es el Sievert (Sv) y representa el efecto de una absorción de un joule de energía en un kilogramo de materia ($1\text{Sv} = 1\text{J/kg}$). La unidad antigua de equivalente de dosis era el rem, el cual representa el efecto de la absorción de 100ergs de energía por gramo de materia por lo que $1\text{Sv} = 100\text{rem}$ (Dominguez, 1998).

El valor del factor de ponderación de la radiación, para un tipo y energía de radiación especificados por la ICPR representa los valores de eficacia biológica relativa de dicha radiación para inducir efectos estocásticos sobre la salud a bajas dosis. La inducción de cáncer es un ejemplo de efecto estocástico, ya que la probabilidad del efecto es función de la dosis recibida.

Todas las personas están expuestas a bajos niveles de radiación todo el tiempo. Los principales contribuyentes al componente natural de esta radiación de fondo son: radiación externa procedente de fuentes cósmicas y terrestres y radiación interna procedentes de fuentes como el Radón y el Potasio-40.

Tabla 2 Media de la dosis equivalente anual

Radiación natural de fondo anual media		
Dosis efectiva (mSv/año)		
Externa	Cósmica	0.36 (1.2 mSv/a, Denver, E.U.)
	Rocas, suelo	0.41 (20 mSv/a, India, Brasil)
Interna	Potasio-40	0.18
	Radón	1.42
Total		2.4

La tasa de dosis de radiación cósmica está en función de la altitud. En una ciudad elevada como Denver, la tasa de dosis es varias veces mayor a las registradas a nivel del mar, como se indica en el cuadro. La contribución de la dosis externa procedente de fuentes terrestres depende también fuertemente de la geología. Por ejemplo, en partes de la India y el Brasil los habitantes están expuestos a tasas de dosis mucho más elevadas que la media. El Potasio-40 es un radioisótopo natural que se incorpora en nuestros alimentos y con estos penetra en el cuerpo por lo que éste queda sometido a una exposición continua. El Radón es un gas producto de la desintegración radiactiva del uranio-238 natural. Se sabe que la dosis aportada por el radón y sus descendientes que se acumulan en el interior de sus viviendas, es un contribuyente importante a la dosis de la población. En los países en los que el clima permite mantener abiertas las viviendas la dosis será mucho menor.

1.3 Radiación artificial de fondo

Además de la radiación natural de fondo, los seres vivos están expuestos a varias fuentes de radiación artificial, o a fuentes naturales que son intensificadas por la tecnología. La utilización de la radiación con fines de diagnóstico en medicina, es en suma el contribuyente artificial más importante. Los valores medios estimados en todo el mundo son alrededor de 0.4mSv/año, pero en los países desarrollados e industrializados la media se acerca a 1mSv/año. La contribución de las precipitaciones radiactivas resultantes de los ensayos de armas nucleares en la atmósfera en los años 50 y 60, disminuye lentamente.

1.4 Mutación inducida por radiación ionizante

La radiación ionizante se origina cuando se presenta una colisión entre un fotón incidente y un electrón del átomo, parte de la energía incidente se transforma en energía cinética o de movimiento, es decir, electrones rápidos y otra parte de la energía es dispersada en forma de fotones. El mecanismo de los procesos de

interacción de la radiación ionizante con la materia viva es compleja. La serie de reacciones causadas por las radiaciones ionizantes para producir un efecto biológico puede ser descrita en tres etapas: la primera tiene una duración del orden de una cuatrillonésima de segundo (10^{-24} s) después de la incidencia de la radiación, en esta etapa ocurren los fenómenos físicos de ionización. Un electrón rápido se moverá a alta velocidad, interaccionando a su vez con otros electrones a los que les habrá cedido parte de su energía a través de colisiones. De esta forma se generan cadenas de electrones secundarios que se mueven aleatoriamente dentro del tejido, ocasionando excitaciones de los átomos de las células debido a la absorción de energía, pasando a una órbita más energética o produciendo ionizaciones en otros átomos. Durante la segunda etapa, llamada fisicoquímica, se rompen los enlaces químicos de las moléculas dando lugar a la formación de radicales libres. Esta etapa también tiene una duración variable, desde unos cuantos segundos hasta semanas, y es un período químico durante el cual los radicales libres que se formaron en la etapa anterior, los cuales son muy reactivos, se ligan con importantes moléculas de la célula tales como proteínas y enzimas y en el peor de los casos, con las moléculas de ADN, dañándolo. En la tercer etapa ocurren eventos bioquímicos y fisicoquímicos que producen alteraciones morfológicas y/o funcionales, y su duración es variable desde horas hasta años (Azorin, 1992)

Los efectos de la radiación ionizante dependerán del sitio de interacción de la radiación ionizante con la célula.

La energía depositada provoca cambios químicos como son modificaciones morfológicas o funcionales de la célula, ya sea por acción directa sobre las moléculas sensibles o por acción química indirecta, afectando moléculas críticas.

Los efectos producidos se pueden dividir desde el punto de vista microscópico, en la célula o macroscópico, en el organismo. Dentro de la célula esta modificación puede alterar su información genética, organización, capacidad para almacenar energía y su capacidad de reproducción, llegando a producir en situaciones extremas la muerte celular.

El núcleo es la parte más sensible de la célula, y los efectos de la radiación pueden incidir en la molécula del ADN, provocando alteraciones entre las que podemos mencionar:

- a) Cambio, pérdida o inserción de una o más bases.
- b) Rompimiento de enlaces químicos.
- c) Rompimiento de alguno de los lados de la hélice.
- d) Rompimiento en ambos lados de la hélice.
- e) Fractura de un lado de dos moléculas de ADN y una subsecuente ligadura entre ellas (Azorín, 1992; Zambrano y Cejudo, 1998). Dando como resultado translocaciones, inversiones, deleciones o duplicaciones.

En células gaméticas el daño producido por radiación también está sujeto a la etapa del ciclo celular que presenten al momento de ser irradiadas, pero las consecuencias en este tipo de células pueden extenderse hasta futuras generaciones.

Basándose en el uso de diferentes sustancias de pruebas microbianas para la detección de mutágenos, se han identificado un gran número de sustancias químicas que disminuyen o anulan los efectos genotóxicos de los mutágenos, a estas sustancias se les conoce como antimutágenos (Hayatsu *et al.*, 1993). Muchos de estos compuestos forman parte natural de la dieta humana e inhiben la mutagénesis y la carcinogénesis y son muy importantes en la prevención del cáncer. Son sustancias que pueden ser obtenidas de los alimentos o sintetizadas por las células, que poseen actividad inhibitoria sobre mutágenos naturales o fabricados por el hombre. Probablemente muchos de estos compuestos están incluidos en los sistemas de defensa de los organismos, protegiéndolos de los daños a los que está expuesto constantemente el material genético y otros componentes de la célula.

1.5 Clorofilina y antimutagénesis

La clorofilina (CLF) es una sal de sodio y cobre derivada de la clorofila (fig.1), se obtiene por saponificación y reemplazo del magnesio quelado por cobre (Chemomorsky, 1993), es estable y soluble en agua pero insoluble en soluciones acuosas, pertenece al grupo de compuestos denominado porfirinas que contienen un ion metal quelado en el centro de la molécula. La CLF (fig.2) puede estar formada por una mezcla compleja de porfirinas cloradas y no cloradas, con un número variable de grupos carboxilo, y en algunos casos el cobre puede estar substituido por algún otro metal como el Fe (Newmark, 1987; Chemomorsky *et al.*, 1997).

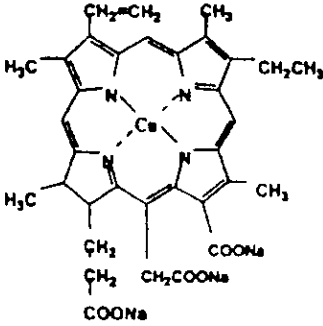
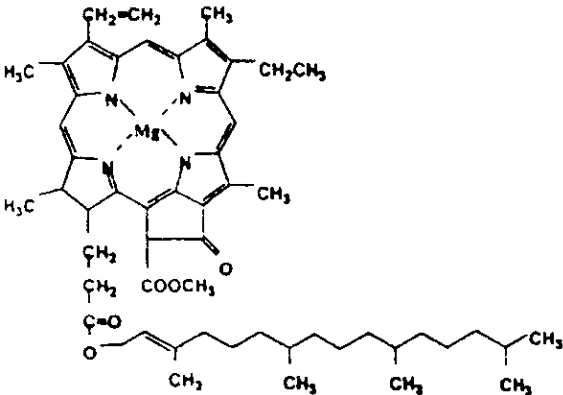


Fig. 1 Estructura de la clorofila

fig. 2 Estructura de la clorofilina

(Chung *et al.*, 1999)

1.6 Antecedentes

Las primeras investigaciones comenzaron a darse en los años 40's, en donde varios investigadores observaron que la CLF tenía la capacidad de actuar como agente terapéutico en la restauración de lesiones ulcerosas, ayudando a la formación de tejido epitelial y a su posterior cicatrización (Gruskin, 1940; Buergi, 1943).

Tomando en cuenta esta propiedad Smith y Sano en 1944; demostraron que la CLF tiene la capacidad de estimular el crecimiento celular, eliminando el periodo de latencia, en un cultivo de tejidos de fibroblastos.

En 1978 Lai y colaboradores, sugirieron que la CLF, derivada del extracto acuoso de las hojas del tallo de trigo tenía la capacidad de inhibir la capacidad de metabolizar algunos carcinógenos dentro del organismo.

1.6.1 Efectos antimutagénicos

Se ha demostrado que la CLF es el compuesto responsable de la mayor actividad antimutagénica de ciertos extractos vegetales (Lai *et al.*, 1980; Kimm *et al.*, 1982). La CLF tiene la capacidad de actuar como un poderoso protector con un amplio margen de efectividad contra la acción directa e indirecta de carcinógenos y mutágenos entre los cuales se incluyen las aflatoxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas, agentes alquilantes y varios otros compuestos como radiaciones (Arimoto *et al.*, 1980a;1980b; Katoh *et al.*, 1983; Terwel y Van der Hoveren, 1985; Ong *et al.*, 1986,1989). La CLF atenúa la genotoxicidad de algunas drogas tumorales como la ciclofosfamida, bleomicina y cisplatino.

Se han desarrollado múltiples estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para comprobar estas propiedades y ampliar los conocimientos de las propiedades antimutagénicas de la CLF.

1.6.2 En *Saccharomyces cerevisiae*

Por mencionar algunos tenemos a Bronzetti *et al.*, 1990, demostró que el tratamiento con CLF aumentara la supervivencia y disminuyeron la frecuencia de mutaciones inducidas por rayos X en *S. cerevisiae*.

1.6.3 En *Salmonella*

En 1991, Dashwood y colaboradores reportaron que la CLF tuvo una potente actividad antimutagénica contra aflatoxina B1 y 2 aminas heterocíclicas activadas por el sistema de metabolización del hígado de trucha en *Salmonella*. Se ha demostrado que inhibe o reduce la mutagenicidad en *Salmonella* provocada por el pimiento negro y el vino tinto (Wamer *et al.*, 1991), así como también la mutagénesis directa del amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b] indol Trp-P2 (Negishi *et al.*, 1989), y del ICR-170, Quinacrina, IQ, AF-2 y 4-nitroquinolina 1-oxido (4NQO) (Arimoto *et al.*, 1993).

1.6.4 En *Drosophila melanogaster*.

Estudios *in vivo* han demostrado que redujo el daño provocado por rayos γ (Zimmering *et al.*, 1990; Olvera *et al.*, 1993), inhibió la mutagenicidad del Trp-P-2 (Negishi *et al.*, 1989). Suprimió la toxicidad del 4NQO, mediante la administración simultánea del 4NQO y CLF (Negishi *et al.*, 1997).

1.6.5 En trucha arcoiris

Redujo la formación de aductos hepáticos de aflatoxina B₁ (AFB₁-DNA), en un 95% y la hepatocarcinogénesis en un 20.5% (Breinholt *et al.*, 1999). Se observó una reducción del 89% en la formación de aductos de dibenzo[a,f]pireno (DBP-DNA) y de un 72% en la incidencia de tumores utilizando una concentración de 400ppm de CLF (Harttig y Bailey, 1998). Se demostró que la CLF es altamente efectiva en la inhibición de carcinogénesis multiorgánica. Cuando la trucha fue expuesta a una dieta con DB[a,f]P conjuntamente con CLF, redujo la incidencia de cáncer en vejiga en un 94%, seguido de hígado en un 71% y del 63% en estómago (Reddy *et al.*, 1999).

1.6.6 En rata y ratón

Se ha observado que el tratamiento oral con CLF reduce la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por algunos mutágenos en células del epitelio colónico de ratas (Robins y Nelson, 1989). Morales-Ramírez y García Rodríguez en 1994 observaron que el tratamiento con CLF disminuye, en forma dependiente de la dosis, la frecuencia de ICH en médula ósea de ratón *in vivo*, inducida por radiación gamma. Por otra parte se encontró que la CLF aplicada a concentración alta actuó con un efecto citotóxico en células tumorales de colon de rata, inducidas por dimetilhidrazina y a concentración baja actuó como citostático (Chernomorsky *et al.*, 1997). Se demostró que puede inhibir la promoción y el progreso de cáncer de piel en ratón inducido por 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA) y 12-O-tetradecanol-forbol-13-acetato (TPA) (Chung *et al.*, 1999).

1.6.7 En humanos

Se evidenció que la administración oral de la CLF regula la presión arterial en pacientes hipertensos sin causar efectos tóxicos, esta acción se relaciona con la capacidad de reducir la arteroesclerosis (Kephart, 1955). Se encontró que la CLF puede disminuir la mutagenicidad en vías urinarias provocada por ciertos alimentos (Ohyama *et al.*, 1987). Redujo los aductos AFB₁-ADN en la hepatocarcinogénesis cuando el inhibidor y el carcinógeno son coadministrados en la dieta (Hayatsu *et al.*, 1993). La sal de CLF se ha usado en el tratamiento de pacientes geriátricos (Young y Beregi, 1980, Yun *et al.*, 1995).

Se han iniciado estudios sobre la acción de la CLF en cierta población china, ya que debido a su dieta diaria se presentan altos niveles de AFB₁ en sus alimentos. A esta población le fue suministrada una mayor cantidad de CLF por cuatro meses, aquí se espera una respuesta favorable en la reducción de los daños genéticos presentes en esta población, provocados por los procarcinógenos presentes en su dieta. (Breinholt *et al.*, 1999).

1.7 Toxicidad

Se han realizado gran cantidad de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar los efectos antígenotóxicos y antimutagénicos de la CLF, así como también posibles efectos contrarios o inocuos. Tal es el caso de los estudios donde no se encontró toxicidad metálica (por el cobre de la CLF) en hígado, riñón, ni bazo de ratas albinas con la inclusión de CLF al 3% en su dieta a lo largo de su vida (Harrison *et al.*, 1954). Tampoco se encontró toxicidad debida a la concentración de CLF aplicada a *Drosophila melanogaster*, donde las concentraciones de 45.5 y 185mM de CLF no fueron tóxicas para las larvas de 96h de edad ni para el desarrollo completo de este organismo (García A *et al.*, 1999; García-Barajas *et al.*, 1999). Sin embargo existe el reporte de Romert y colaboradores en 1992 los cuales observaron que a baja concentración de CLF se incrementaba la mutagenicidad de las nitrosaminas específicas del tabaco.

1.8 Mecanismos de acción

Gracias a la amplia gama de estudios realizados sobre las propiedades antimutagénicas de la CLF, se han podido determinar algunos de los mecanismos mediante los cuales la CLF es capaz de presentar efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos tanto de agentes directos como indirectos.

1.8.1 Captura de radicales libres

Hadnagy y Seemayer en 1988 observaron la reducción de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en fagocitos polimorfonucleares, causada por la CLF, a través de la inactivación de radicales oxígeno como el O^2 , OH^{\cdot} y el H_2O_2 , los cuales están involucrados en las rupturas de las cadenas de ADN (Sato *et al.*, 1984; Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1989; Warner *et al.*, 1991). Morales-Ramírez y García-Rodríguez en 1994 propusieron que la CLF actuaba como atrapador de radicales libres en células de la médula ósea de ratón. Kumar y colaboradores en 1999 demostraron que la CLF tenía la propiedad de atrapar iones OH^{\cdot} y ROO^{\cdot} , inhibiendo así el daño inducido por la irradiación del ADN en el plásmido pBR322. La CLF tiene la capacidad de atrapar radicales peroxil desoxiribosa, generados durante la exposición del plásmido pBR322 a la radiación γ .

1.8.2. Formación de complejos moleculares entre la CLF y el mutágeno

Se ha encontrado que la CLF ejerce su efecto antimutagénico bloqueando o capturando a ciertos mutágenos, en su configuración metabólicamente activa o inactiva, por medio de una reacción química nucleofílica lo que origina a un producto inocuo (Morita *et al.*, 1978). La CLF se acumula preferentemente en células tumorales que en células normales. El grupo hemin inhibe selectivamente la actividad de mutágenos que tienen estructuras policíclicas, mediante la formación de complejos con ellos (Hayatsu *et al.*, 1993). En la fase inicial la CLF opera como un agente bloqueador sobre el daño al ADN, esto es, que se presenta una interacción *in vivo* entre el carcinógeno y el inhibidor (Dashwood y Guo, 1992; Dashwood y Liew, 1992; Dashwood *et al.*, 1998).

Otros autores, indican que la CLF forma complejos moleculares reversibles, con carcinógenos aromáticos planares grandes y sugieren que esta interacción, sirve para limitar y detener la viabilidad del carcinógeno en el intestino, siendo desechado por medio de la excreción fecal (Breinholt *et al.*, 1999). Hayashi y colaboradores en 1999 mencionan, que la CLF forma complejos no covalentes 1:1 con aflatoxina B₁ (AFB₁) reduciendo la cantidad de aflatoxina B₂ (AFB₂) en el hígado. La CLF tiene la capacidad de formar complejos con 4-nitroquinolino 1-óxido (4NQO) acelerando así, el paso del mutágeno por el tracto digestivo (Negishi *et al.*, 1997).

La fuerza estabilizadora más importante en la formación de complejos entre la CLF y algunos mutágenos aromáticos, incluyendo AFB₁, involucra numerosas interacciones del tipo Van der Waals.

1.8.3 Inhibición de la acción de enzimas del citocromo P-450

Se ha observado una inhibición provocada por la CLF, en las enzimas del sistema citocromo P-450, con lo cual se impide que los mutágenos indirectos se activen, disminuyendo así su capacidad mutagénica (Kimm *et al.*, 1982; Terwell y Van der Hoeven, 1985; Yun *et al.*, 1995). En 1989 Negishi y colaboradores mencionan que es posible que se presenten disturbios en la activación metabólica del 4NQO en el cuerpo, provocada por el efecto inhibitorio que ejerce la CLF sobre las enzimas del citocromo P450. La CLF actúa mediante captura electrofílica inhibiendo la acción enzimática de las enzimas del citocromo P-450.

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

1.9 *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba

En 1927, H. J. Müller encontró que los ojos rojos característicos de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se encontraban de color blanco en algunos individuos. En ese momento se le ocurrió cruzar moscas hembras y machos con ojos de diferente color para tratar de establecer si los descendientes portaban ese cambio. Efectivamente, así fue, de tal forma que llegó a la conclusión de que dichas características están determinadas genéticamente. Posteriormente demostró que los agentes ambientales, y ciertos factores químicos y físicos como los rayos X, pueden causar modificaciones genéticas en *D. melanogaster*. También utilizando a *Drosophila*, se ha demostrado que la radiación ionizante aplicada a larvas, afecta a las células de los discos imagales, las cuales durante la metamorfosis dan lugar a varias estructuras de la mosca adulta, como los ojos, las alas, labios, antenas, etc. Cualquier alteración genética ocurrida en alguna de las células de los discos imagales durante la proliferación mitótica, estará presente en todas las células descendientes, estas formarán un clon de células mutantes, este fenómeno es llamado expansión clonal. Si la alteración genética produce un cambio visible en el fenotipo, el clon de células mutantes puede ser detectado en el cuerpo del adulto (Guzmán *et al.*, 1990; Guzmán y Graf, 1995). Estas propiedades han permitido trabajar en dos direcciones, la prueba del ala y la prueba del ojo. Estos ensayos se han utilizado para estudiar los efectos genéticos de compuestos químicos y físicos como las radiaciones, comprobando así, que pueden producir mutaciones y aberraciones cromosómicas. Los sistemas de prueba desarrollados con *D. melanogaster* permiten analizar una gran cantidad de individuos en espacios reducidos, con un ciclo de vida corto, que ofrece la capacidad de determinar la frecuencia de mutaciones inducidas en las diferentes etapas del desarrollo de las células germinales (Lee *et al.*, 1983; Sankaranarayanan y Ferro, 1985).

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

El sistema citocromo P-450 de estos organismos se encuentra distribuido principalmente en el intestino medio, en los cuerpos grasos y en los túbulos de Malpighi. A nivel subcelular, las monooxigenasas se encuentran localizadas en retículo endoplásmico liso y en las mitocondrias (Hodgson y Randy, 1991; Murillo, 1997).

1.9.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

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

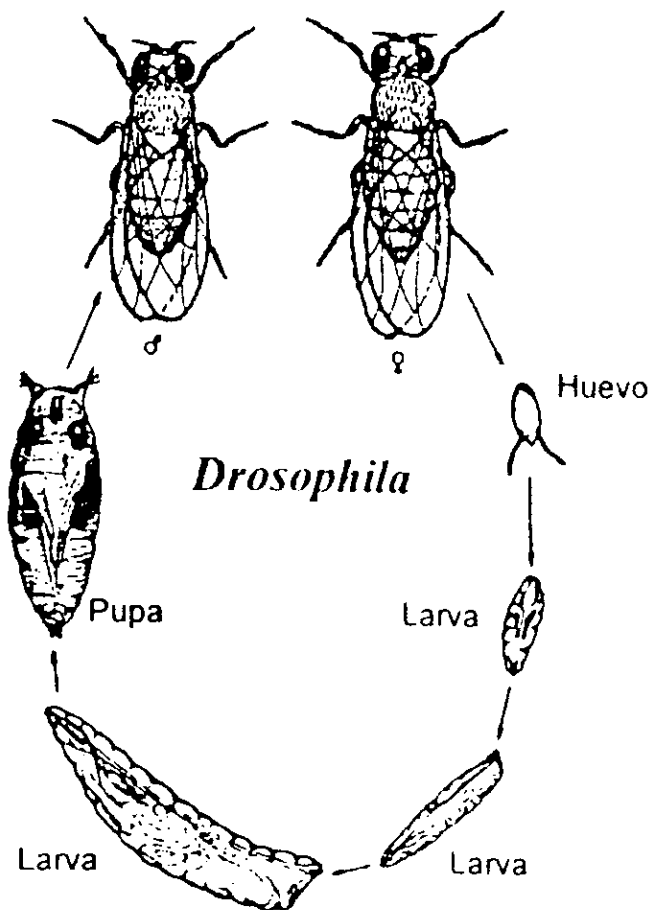


Fig. 3 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*
(Flagg 1988)

La duración de estos estados varía con la temperatura. A 20°C la duración promedio del estado larvario es de 8 días, a 25°C es solamente de 5 días. La vida pupal a 20°C dura alrededor de 6.3 días, mientras que a 25°C, se reduce a 4.2 días. El ciclo de vida, por lo tanto se completa aproximadamente en 10 días a 25°C, mientras que a 20°C se requieren 15 días. (Demerec y Kaufmann, 1975). Después del desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una pequeña larva, la cual se encuentra formada por doce segmentos no aparentes: 1 segmento de la cabeza, 3 torácicos y 8 abdominales. La pared de su cuerpo está formada por una cutícula externa y una epidermis celular interna, la cutícula está formada por dos capas: la exocutícula y la endocutícula (Ramos *et al.*, 1993). La larva, después de salir del huevo sufre dos mudas, de modo que el periodo larvario consta de tres estadios. En el último o tercer estadio, alcanza una longitud de 4.5 milímetros aproximadamente (fig. 3).

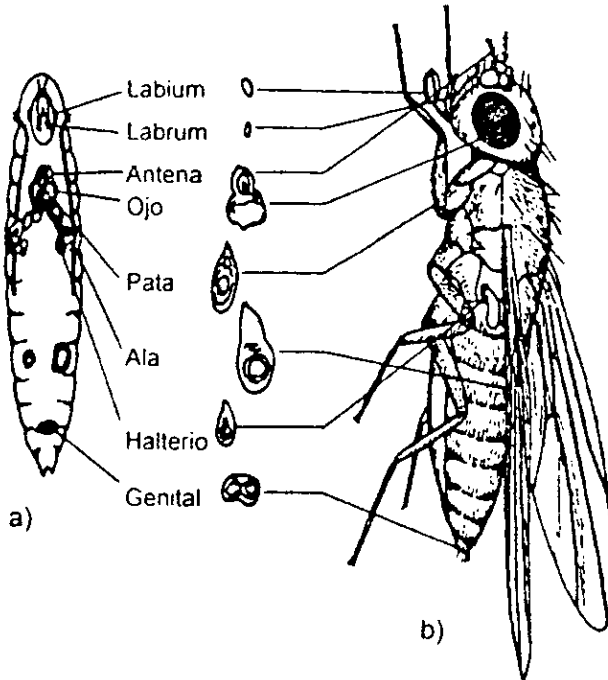


Fig. 4 Discos imagales de *Drosophila* a) Larva de 3er estadio mostrando la posición de los discos, b) Adulto, muestra las partes derivadas de cada disco (Suzuki et al., 1989)

Las células que forman el cuerpo de la larva se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y sólo aumentan su volumen; en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides, están determinadas y diferenciadas genéticamente. Las células imagales no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva, son de tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, conservan la capacidad de división celular, están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva sufre la metamorfosis (fig. 4). Estas células se localizan en estructuras denominadas discos imagales, los cuales aumentan de tamaño por divisiones mitóticas que ocurren en determinados tiempos durante el desarrollo larvario (Demerec y Kaufmann, 1975).

El reconocimiento del sexo en la mosca adulta es determinado de varias maneras. El extremo del abdomen es alargado en la hembra y un poco redondeado en el macho. A medida que la hembra crece se facilita la distinción del sexo a simple vista ya que el abdomen aumenta de volumen por los huevecillos maduros que contiene. El abdomen de la hembra tiene siete segmentos los cuales se distinguen fácilmente, mientras que el macho tiene solo cinco segmentos estando estos muy juntos por lo que se observan a simple vista como una sola franja gruesa. Los machos cuentan con una fila de aproximadamente diez cerdas cortas y gruesas de color negro, en la superficie distal del segmento tarsal basal superior de la pata anterior, llamado peine sexual. Esta característica esta ausente en las hembras (Demerec y Kaufmann, 1975).

1.10 Sistema SMART

La prueba de mutación y recombinación somáticas llamado SMART por sus iniciales en inglés Somatic Mutation and Recombination Test, es un bioensayo con un amplio espectro, que se utiliza para determinar la genotoxicidad de agentes químicos y físicos. Mediante este ensayo se pueden detectar simultáneamente los cambios mutacionales clásicos, así como ciertos tipos de arreglos genéticos, dentro de los cuales se encuentra la recombinación mitótica y la conversión génica (Graf *et al.*, 1984; Würzler y Vogel, 1986; Vogel y Zijlstra, 1987). El sistema permite detectar en los ojos y en las alas de los organismos adultos las alteraciones ocurridas en las células de los discos imagales de la larva. En recientes estudios se ha demostrado que el sistema SMART es sensible al daño inducido por neutrones y responde de una

forma directamente proporcional a la dosis de radiación, así como a la razón de dosis, por lo que puede ser empleado para estudiar sus efectos así como la interacción con moduladores químicos (Zambrano *et al.*, 1998b).

En caso de que se presente una mutación durante el proceso de diferenciación de las células de los discos, ya sea espontánea o inducida por un mutágeno, como los neutrones, ésta dará origen a una estirpe celular con la misma característica alterada, originando un clon que podrá ser observado como una mancha en la estructura imagal correspondiente.

Tabla 3

TIPO DE MANCHA	ORIGEN	FORMA DEL PELO
Pequeña simple (1 a 2 células) Grande simple (más de 2 células)	Delección, mutación puntual, recombinación mitótica, no disyunción, conversión génica, quizás monosomía y cierto tipo de aberraciones cromosómicas	Pelos múltiples (<i>mwh</i>) (fig.5) o pelos en forma de flama (<i>flr</i>) (fig.6)
Gemela	Se originan sólo cuando la recombinación se lleva a cabo cerca del centrómero	presencia simultánea de pelos múltiples (<i>mwh</i>) y pelos en forma de flama (<i>flr</i>) (fig.7)

En la cruce estándar del sistema SMART para las alas se emplean marcadores *mwh* y *flr*. El marcador *mwh* (multiple wing hair), pelos múltiples en el ala, se reconoce fenotípicamente porque expresa su alteración en el número de tricomas por célula en el ala. Este locus se localiza en el cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa. El marcador *flr* "flare", pelos en forma de flama, se reconoce por la presencia de tricomas

en forma irregular en tórax, abdomen y alas. Se ubica a 38.8 unidades del mapa sobre el cromosoma 3 y en condición homocigota es letal, sin embargo, la presencia de un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (TM3), permite mantener esta línea, la cual porta además el marcador dominante "Beaded serratia" (Bd^e), con éste último se logra el reconocimiento fenotípico de la línea $flr^3/TM3, Bd^e$ por la expresión serratia (alas con bordes discontinuos). Siendo letal en condición homocigota, la línea está formada por individuos heterocigotos para los marcadores flr^3 y Bd^e , es decir individuos $flr^3/TM3, Bd^e$. (Lindsley y Zimm, 1990). Para la cruce ST las hembras con genotipo $flr^3/TM3, Bd^e$ son fecundadas por machos mwh/mwh , esta cruce es eficiente para estudiar los efectos genéticos inducidos por mutágenos llamados directos, en los cuales no se necesita de la activación metabólica del mutágeno, como en el caso de los neutrones, o cualquier otro tipo de radiación.

En la segunda cruce, de activación elevada (BE), además de los marcadores descritos anteriormente, porta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT (Dapkus y Merrell, 1977) y se caracteriza por tener niveles elevados del citocromo P-450. Este tipo de cruces permite estudiar el efecto genotóxico de agentes químicos que necesitan de la activación metabólica para poder actuar como mutágenos (Hällström y Blank, 1985).

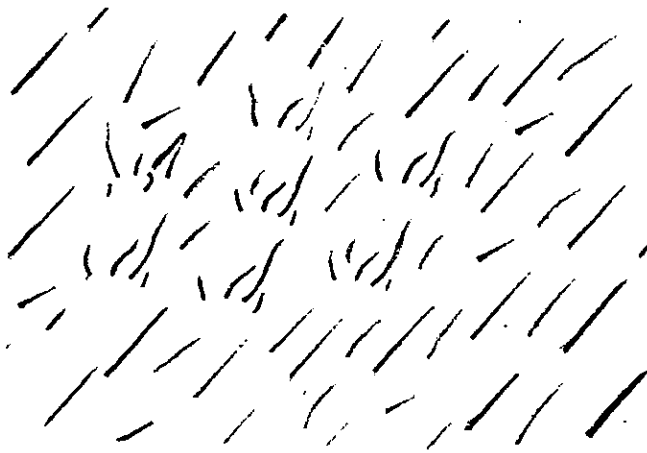


Fig.5 Pelos múltiples "mwh" en el ala de *Drosophila melanogaster* (García-Barajas)

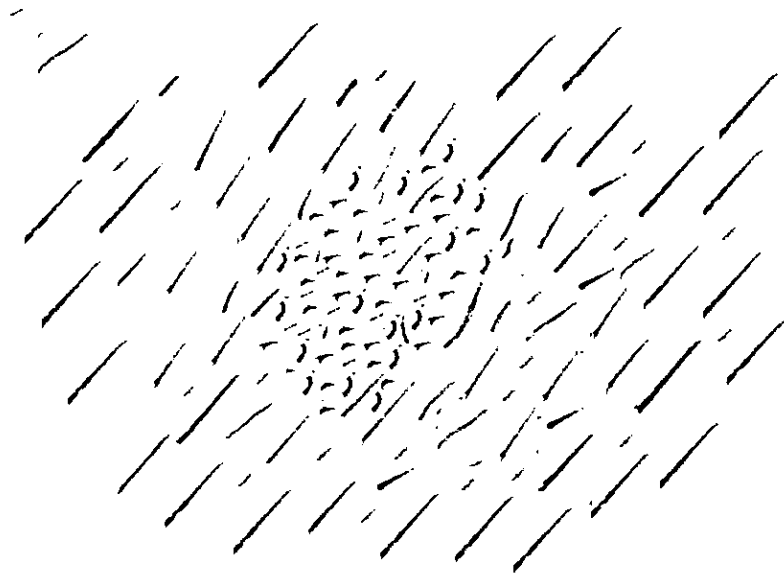


Fig. 6 Pelos en forma de flama "flare" en el ala de *Drosophila melanogaster*

(Garcia-Barajas)

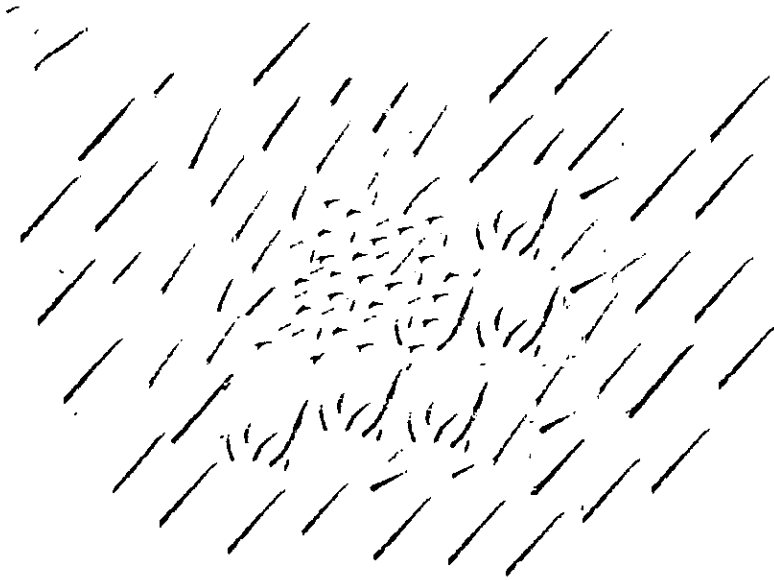


Fig. 7 Mancha gemela pelos "mwh y flare" en el ala de *Drosophila melanogaster*

(García-Barajas)

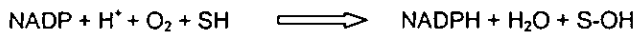
1.11 Citocromo P-450

En 1958 fue descubierto un pigmento microsómico (P) asociado al bióxido de carbono cuyo espectro de acción fotoquímica demostró ser una oxidasa terminal del sistema enzimático hepático responsable del metabolismo oxidante de medicamentos. Por su único pico de absorbancia a 450nm se le llamó citocromo P-450, el cual fue aislado, caracterizado e identificado como una hemoproteína con un átomo de hierro unido al azufre de un residuo de cisteína (Nebert y González, 1987).

El citocromo P-450 de procariontes se encuentra en el citoplasma al igual que en todos los eucariontes desde microorganismos, hongos, invertebrados, peces, anfibios y reptiles. En aves han sido detectadas algunas formas de citocromo P-450 en retículo endoplásmico y en mitocondrias de glándulas endócrinas (Nebert y González, 1984).

1.11.1 Reacciones catalizadas por citocromo P-450

El citocromo P-450 constituye un amplio grupo de isoenzimas que metabolizan gran variedad de compuestos lipofílicos endógenos o exógenos, representa una monooxigenasa externa y cataliza la siguiente reacción:



Donde S, es el sustrato y representa un esteroide, ácido graso o cualquier compuesto químico que tenga un grupo alcano, alqueno, anillo aromático o heterocíclico, el cual puede servir como sitio de reacción para que se produzca la oxigenación. La reacción es conocida como una monooxigenación, en la cual solamente uno de los dos átomos del oxígeno molecular es incorporado al sustrato y el otro pasa a formar agua.

1.11.2 Funciones metabólicas del citocromo P-450

Los citocromos P-450 en las fracciones microscópicas hepáticas tienen como papel fundamental llevar a cabo la desintoxicación o la modificación de toxicidad ya sea incrementándola, disminuyéndola, anulándola o formando especies de oxígenos altamente reactivos para el ADN (Parke *et al.*, 1991).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que los seres vivos están expuestos a una gran cantidad de agentes genotóxicos, es necesario no sólo la identificación de los mismos, sino tratar de encontrar agentes que prevengan la aparición de mutaciones o que minimicen el daño provocado por los genotóxicos.

Por este motivo es necesario tratar de encontrar agentes que prevengan la aparición de mutaciones o que minimicen el daño provocado por genotóxicos.

Para realizar este tipo de estudios, se cuenta con modelos animales que implican el uso de organismos que exhiban una respuesta similar a la de los humanos, bajo condiciones de exposición más o menos comparables.

Para ello se puede utilizar el bioensayo SMART (Somatic Mutation and Recombination Test), el cual se basa en la pérdida de heterocigosis en células somáticas de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, presentándose fenotípicamente como una mancha sobre la cutícula del ala en el adulto. En recientes estudios se ha demostrado que el sistema SMART es sensible al daño inducido por neutrones y responde de una forma directamente proporcional a la dosis de radiación, así como a la razón de dosis, por lo que puede ser empleado para estudiar los efectos biológicos de estos mutágenos físicos así como también mutágenos químicos.

Utilizando paralelamente las propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas que ha demostrado tener la clorofilina, se podrían adoptar medidas preventivas para que antes de que a los pacientes se les sometiera a este tipo de tratamientos, recibieran un pretratamiento con clorofilina e intentar de esta manera disminuir los efectos secundarios que la radiación provoca en estos pacientes.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto modulador de la clorofilina sobre el daño inducido por neutrones en *Drosophila melanogaster* mediante el uso del bioensayo SMART.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la influencia de la concentración de la clorofilina sobre los daños inducidos por neutrones en *D. melanogaster* midiendo las frecuencias de mutación y recombinación por medio del sistema SMART.

Evaluar si el posible efecto antigenotóxico de la clorofilina en la cruce estándar y la de bioactivación elevada es el mismo.

HIPÓTESIS

Si la clorofilina es un poderoso antimutágeno químico, entonces al administrarla por vía oral en *Drosophila melanogaster*, esta podrá disminuir las alteraciones genéticas inducidas por neutrones de reactor.

METODOLOGÍA

4.1. Compuestos

La clorofilina ($C_{34}H_{31}N_4Na_3MgO_6$) es de la marca Sigma USA., producto No. 74H006.

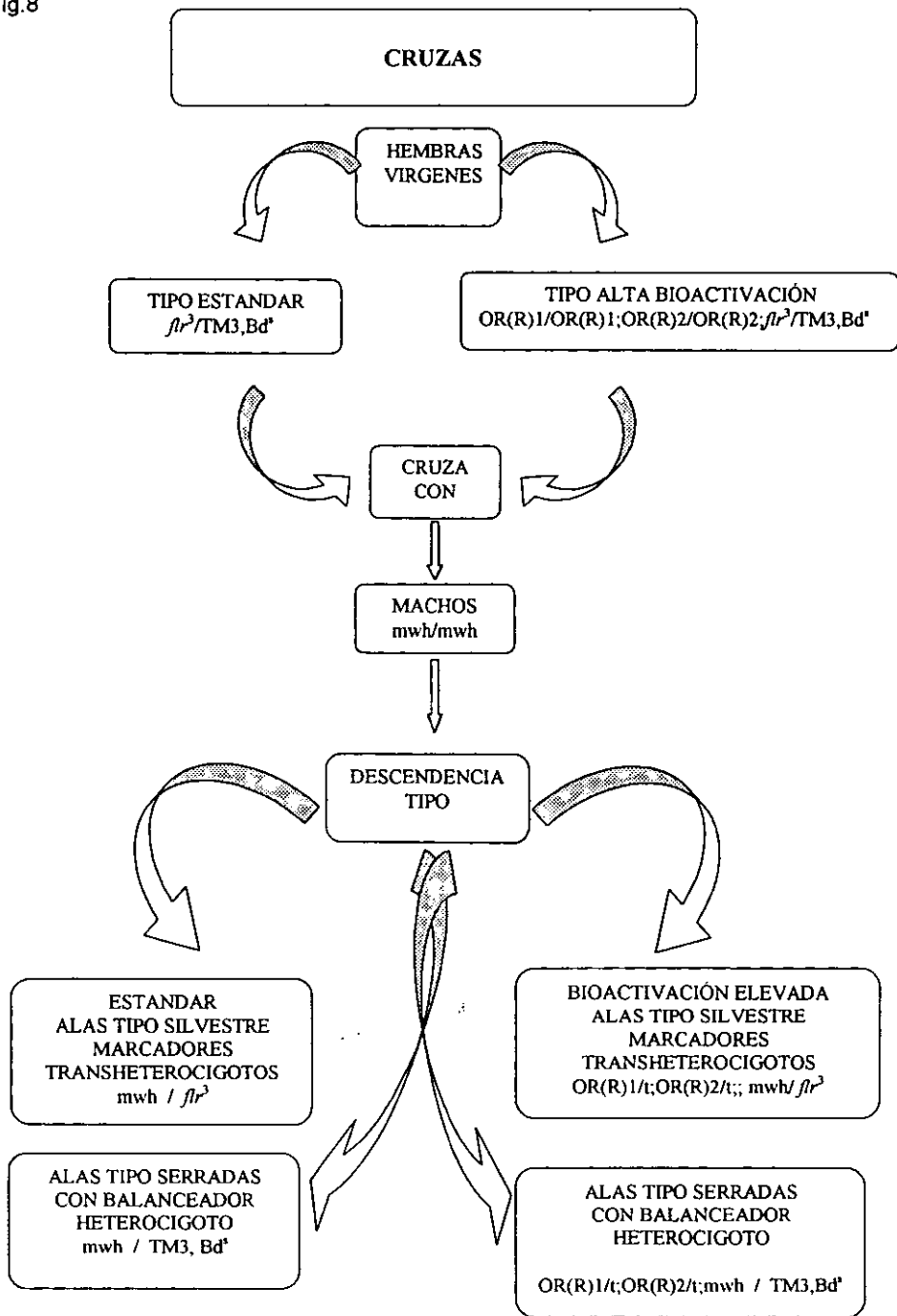
4.2. Líneas empleadas

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

4.3. Cruzas

Se utilizaron dos tipos de cruzas, para la craza estándar (ST), hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster* de la línea $flr^3/TM3, Bd^e$ fueron fecundadas por machos mwh/mwh , crecidos a una temperatura de 25°C y 65% de humedad relativa. Para la segunda craza, de bioactivación elevada (BE), se utilizaron hembras vírgenes de la línea $OR(R)1/OR(R)1;OR(R)2/OR(R)2;flr^3/TM3, Bd^e$, resistente al DDT, las cuales se cruzaron con machos mwh/mwh , incubados a las mismas condiciones de temperatura y humedad. Los individuos derivados de esta craza se caracterizan por tener niveles elevados de citocromo P-450, responsable de activar metabólicamente a un amplio número de promutágenos (fig.8).

Fig.8



4.4 Obtención de larvas

Una vez realizada la cruce se colectaron los huevos en botellas de cultivo durante 8h a 25°C en medio fresco con levadura, para asegurar una buena producción de huevecillos, al cabo de este tiempo se eliminaron los progenitores y se incubaron los huevos durante 96h bajo las mismas condiciones de laboratorio.

4.5 Preparación de CLF

Se etiquetaron 6 tubos homeopáticos (viales) de la siguiente manera: 0 para el testigo, B y A para las dos concentraciones de clorofilina, baja (B) o alta (A), I para el testigo positivo con irradiación, B + I y A + I para las dos concentraciones que serían pretratadas a las 72h e irradiadas a las 96h. Posteriormente se le agregó a cada vial 0.7g de puré de papa previamente molido. Se pesaron 250mg de clorofilina en una balanza analítica y se colocaron en un vaso de precipitado de 50ml, se agregaron 20ml de agua destilada para obtener una concentración de clorofilina de 45.5mM. Esta es la concentración baja "B" equivalente a 1.25%. A un segundo vaso de precipitados de 50ml se le agregó 1g de clorofilina y se hidrató con 20ml de agua destilada, para obtener una concentración de 182mM. Esta es la concentración alta "A" equivalente a 5%. De las concentraciones de 45.5mM o 182mM se tomaron 5ml y se depositaron en los viales con el puré de papa, previamente marcados. Se agregaron 5ml de agua destilada a los dos viales testigo. Las concentraciones de clorofilina utilizadas, fueron tomadas en base a los estudios realizados en el laboratorio de *Drosophila* del ININ (Zimmering *et al.*, 1990).

4.6 Pretratamiento con CLF

Larvas de 72h de edad, fueron divididas en 6 grupos, en 4 de ellos se colocaron aproximadamente igual número de larvas en cada vial con la clorofilina y el puré de papa, Posteriormente se mantuvieron 24h dentro del cuarto de cultivo, alimentándolas con las concentraciones de 45.5 y 182mM de clorofilina. Los dos grupos testigo restantes, sólo fueron alimentados con puré de papa hidratado con agua destilada. Todos los viales se incubaron a una temperatura constante de 25°C y 65% de

humedad relativa para un desarrollo óptimo. El mismo tratamiento fue aplicado a otros 6 grupos de larvas de la línea de BE.

4.7 Combinación de la CLF con neutrones

Cuando las larvas cumplieron 96h fueron aisladas del medio de cultivo con una solución de sacarosa al 20% utilizando el método de (Nothinger. 1970). Este método se basa en la formación de un gradiente de densidad que hace que floten las larvas que se encuentren en el frasco, separándose del medio de cultivo, disminuyendo así el efecto de manipulación. Para protegerlas de la alta molaridad, las larvas fueron colectadas con una coladera al chorro del agua, se tomaron éstas con una espátula y se depositaron en contenedores de lucita, a los que previamente se les colocó un círculo de papel filtro humedecido con una solución de sacarosa al 4%, para permitir la supervivencia de las larvas durante el tiempo de irradiación. Se sellaron con cinta adhesiva cada uno de los contenedores con las larvas, considerando un contenedor para las larvas pretratadas con la concentración baja de clorofilina, otro para la concentración alta y uno más para el testigo positivo alimentado con puré de papa solo. La irradiación se llevó a cabo en el Reactor TRIGA Mark III del Centro Nuclear de México. Además se corrieron los testigos correspondientes sin irradiación, pero alimentados con la concentración alta o baja de clorofilina y el testigo negativo alimentado únicamente con puré de papa.

4.8 Mapeo de flujo de neutrones

Los flujos de neutrones se obtuvieron utilizando el método de activación de laminillas, para lo cual se colocaron cuatro arreglos constituidos por diez laminillas de oro cada uno, en la instalación de irradiación de la columna térmica del RTMIII. El montaje de cada arreglo se llevó a cabo bajo el siguiente procedimiento: se tomaron cinco laminillas de oro y cada una se envolvió en un papel absorbente, se tomaron otras cinco y se cubrieron con cadmio por ambas caras, para que sólo reaccionaran con neutrones de energías mayores a 0.48eV, finalmente se envolvieron con papel absorbente y cinta adhesiva. Se colocaron las diez laminillas alternadamente, en una hoja de cartón que preservó un área similar a la utilizada para irradiar larvas. Los arreglos se emplearon para activarlos a la potencia de 1000kW, con un tiempo

determinado de irradiación. Terminada la irradiación y con el reactor en modo apagado, se retiró el arreglo llevándolo a un cuarto de conteo, donde se estimó la actividad de cada laminilla por medio de un sistema de detección, que consta de un detector de Germanio hiperpuro y electrónica asociada.

Con los datos obtenidos se ejecutó el programa CALFLUX para determinar el flujo de neutrones subcádmicos y epicádmicos así como las razones de cadmio. Finalmente se calcularon las dosis con los parámetros del ICRP publicación 90 (Delfin *et al.*, 2000).

4.9 Irradiación de larvas

La dosis equivalente de radiación con neutrones térmicos y rápidos fue de 8.51Sv (Delfin *et al.*, 2000) y corresponde a un tiempo de irradiación de 41min 40seg en la columna térmica del reactor a 1MW de potencia, donde se tiene una razón de cadmio de 4.9%, lo cual significa una contribución pequeña de neutrones rápidos en comparación con la de térmicos. Estos últimos tienen una energía promedio de 0.025eV. Inmediatamente después de la irradiación, se colocaron las larvas en medio fresco y se incubaron a 25°C y 65% de humedad relativa hasta completar su desarrollo.

4.10 Elaboración de preparaciones

Después de la eclosión se colectaron las moscas adultas con ayuda de un eterizador y se almacenaron en etanol al 70%. Se prepararon las laminillas disectando las alas de los adultos y colocándolas posteriormente en un portaobjetos con solución de Faure.

4.11 Análisis en adultos

Se analizaron las superficies ventral y dorsal de las alas usando un microscopio compuesto a una amplificación de 400X para contar las manchas *mwh* y *flr* simples o gemelas, considerando la ubicación de las manchas en el ala. La región distal está dividida en siete secciones: A, B, C, C', D, D' y E (fig.9) (García-Bellido y Merriam, 1971).

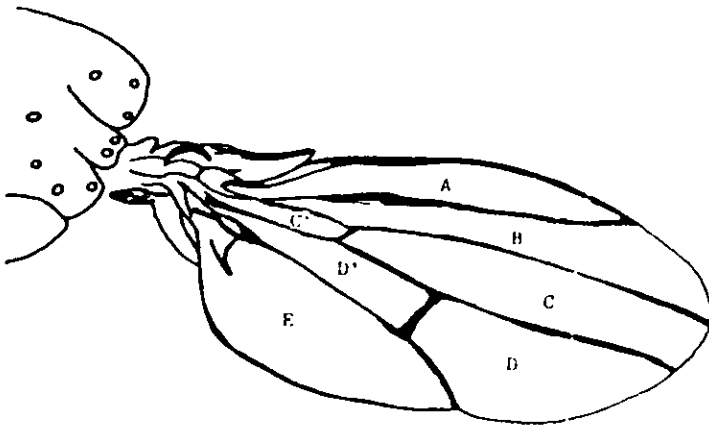


Fig. 9 Región distal del ala dividida en secciones
(García-Bellido y Merriam 1971)

4.12 Análisis estadístico de los datos de SMART

Para el análisis estadístico se determinó por medio de la prueba de X^2 , mediante la frecuencia de manchas por ala en los grupos tratados comparados con los testigos. El procedimiento está basado en dos hipótesis: (1) la frecuencia de mutación inducida más la espontánea en grupos tratados, no es más grande que la frecuencia de mutación en un grupo testigo y (2) la frecuencia de mutación inducida en las series tratadas no es menor que "m" veces la observada en grupos testigos. Ambas hipótesis son aprobadas a un nivel de significancia del 5%. Para decidir si el resultado es positivo, no concluyente o negativo, se utilizó un análisis de decisión múltiple. El valor de "m" para las manchas chicas y manchas totales, que presentan una frecuencia de mutación espontánea relativamente alta, es de 2. Para las manchas grandes simples y para manchas gemela, las cuales tienen una baja frecuencia espontánea, el valor es de 5 (Frei y Würzler, 1988).

Para evitar los resultados no concluyentes, en un diseño de prueba óptimo, deberán ser realizadas igual número de alas con un mínimo de 110 en todos los grupos experimentales (Frei, 1994; Ramírez, 1999).

Para todos los tratamientos se realizaron tres experimentos y se sumaron los resultados para incrementar el tamaño de muestra.

RESULTADOS

Para cada tratamiento se realizaron tres experimentos y se compararon los resultados obtenidos en las distintas series así como en los testigos, como no se encontraron diferencias entre los experimentos los resultados se sumaron. En la tabla 4 se presentan las frecuencias de mutación y recombinación somáticas para la cruce estándar, en la cual se observa que no existen diferencias significativas para las frecuencias de manchas entre los grupos pretratados con CLF y el grupo testigo, este efecto fue evidente sobre todo para manchas totales.

Tabla 4 **CRUZA ESTÁNDAR.**

Efecto de neutrones térmicos del reactor TRIGA Mark III de México pretratadas con dos concentraciones diferentes de clorofilina, en la cruce estándar. Moscas con marcador heterocigoto.

Tratamiento	Número de alas	Manchas chicas m=2	Manchas grandes m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2
Testigo sin Irradiación y sin CLF	120	0.41 (49)	0.05 (6)	0.00 (0)	0.46 (55)
CLF 45.5mM	120	0.57 (68) i	0.04 (5) i	0.03 (3) i	0.63 (76) i
CLF 182mM	120	0.47 (56) -	0.08 (9) -	0.01 (1) i	0.55 (66) -
Irradiación 8.51Sv	120	2.98 (358) +	1.37 (164) +	0.46 (55) +	4.81(577) +
CLF 45.5mM con Irradiación	120	2.15 (258) +	1.33 (160) +	0.44 (53) +	3.92(471) +
CLF 182mM con Irradiación	120	1.75 (210) +	1.34 (161) +	0.44 (53) +	3.53(424) +

Se analizaron 720 alas con alrededor de 25,000 células por ala. Abreviaturas: CLF, clorofilina; + positivo; - negativo; i, no concluyente; m, factor de multiplicación w, débil positivo.

Las frecuencias obtenidas de los grupos pretratados con dos concentraciones diferentes 45.5 y 185mM de CLF fueron similares al testigo sin pretratamiento alguno, mientras que al analizar los grupos irradiados, se observó que el tratamiento con neutrones a 8.51Sv incrementó significativamente la frecuencia de manchas chicas, grandes, gemelas y totales. Este efecto fue más evidente para manchas chicas y totales, encontrando una frecuencia de 2.98 y 4.81 comparados con el testigo sin irradiación el cual registró unas frecuencias de 0.41 y 0.46, para los mismo tipos de manchas.

Por otra parte, el daño producido por la irradiación se ve disminuido significativamente cuando las larvas recibieron un pretratamiento con CLF a dos concentraciones diferentes antes de ser irradiadas, reduciendo la frecuencia de 2.98, para manchas chicas, 1.37 para manchas grandes, 0.46 para manchas gemelas y de 4.81 para manchas totales, hasta una frecuencia de 2.15, 1.33, 0.44 y 3.92 para el mismo tipo de manchas con concentración baja de CLF 45.5mM, mientras que para la concentración alta de CLF de 185mM la frecuencia de manchas chicas se redujo comparado con el testigo irradiado, de 2.98 hasta 1.75 de 1.37 a 1.34 para manchas grandes, para manchas gemelas de 0.46 a 0.44 y para manchas totales de 4.81 hasta 3.53. Este efecto pudo observarse claramente para manchas chicas, y totales, sin embargo la reducción en la frecuencia para las manchas grandes y gemelas, es la misma para las dos concentraciones diferentes de CLF. A pesar de esto se puede decir que el efecto en la reducción de las frecuencias de mutación y recombinación, para los organismos que fueron pretratados con CLF antes de ser irradiados, es dependiente de la concentración (ver Tabla 4 y fig. 10).

Los resultados obtenidos en la cruz BE (ver Tabla 5) muestran que no existen diferencias significativas entre las frecuencias registradas para manchas chicas, grandes, gemelas y totales del testigo y los individuos que recibieron pretratamiento con concentraciones de 45.5mM y 185mM de CLF sin irradiación, para el mismo tipo de manchas.

FRECUENCIA DE MUT. Y REC. CRUZA ST

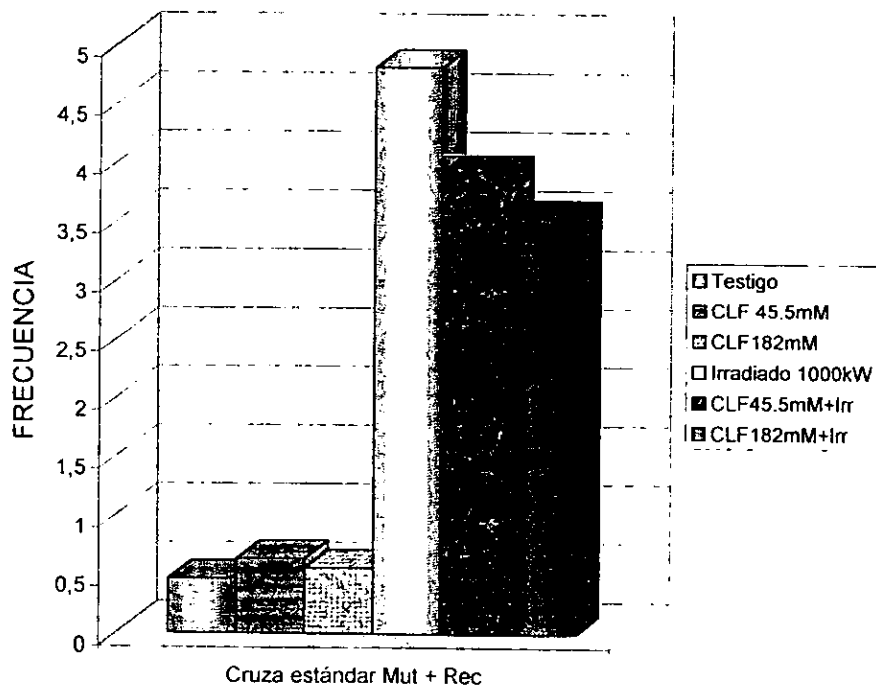


Fig. 10 Comparación de las frecuencias de mutación y recombinación obtenidas de los grupos de manchas de la curza estándar, las cuales recibieron pretratamiento con dos concentraciones diferentes de CLF (clorofilina de 45.5mM y 182mM) antes de ser irradiados a 1000kW por 41' 40" y sus respectivos testigos. Significado: CLF 45.5mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 45 5mM, CLF 182mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 182mM, Irr irradiación a 1000kW, mut., mutación; rec , recombinación

Tabla 5 CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA

Efecto de los neutrones térmicos del reactor TRIGA Mark III de México a dos concentraciones diferentes de clorofilina, con la cruce de bioactivación elevada para promutágenos. Moscas con marcador transheterocigoto.

Tratamiento	Número de alas	Manchas chicas m=2	Manchas grandes m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=5
Testigo sin Irradiación y sin CLF	120	0.56 (67)	0.03 (4)	0.02 (2)	0.61 (73)
CLF 45.5mM	120	0.66 (79) -	0.04 (5) -	0.02 (2) i	0.72 (76) -
CLF 182mM	120	0.60 (72) -	0.04 (5) -	0.01 (1) i	0.65 (78) -
Irradiación 8.51Sv	120	2.68 (322) +	1.80 (216) +	0.73 (88) +	5.22(626) +
CLF 45.5mM con Irradiación	120	1.57 (188) +	1.27 (152) +	0.61 (73) +	3.44(413) +
CLF 182mM con Irradiación	120	1.07 (128) +	1.17 (140) +	0.40 (48) +	2.63(316) +

Se analizaron 720 alas con alrededor de 25,000 células por ala. Abreviaturas: CLF, clorofilina; + positivo; - negativo; i, no concluyente; m, factor de multiplicación; w, débil positivo.

En cuanto a los individuos que fueron expuestos a irradiación, sin CLF la frecuencia de manchas totales aumentó en comparación con el testigo 87 veces más. Los individuos que recibieron pretratamiento de CLF a una concentración de 45.5mM antes de ser irradiados, registraron una significativa disminución en la frecuencia de manchas chicas, grandes, gemelas y totales, respecto al testigo irradiado obteniendo una disminución desde 2.68, 1.80, 0.73, 5.22 hasta 1.57, 1.27, 0.61, 3.44 para el mismo tipo de manchas respectivamente. Este comportamiento es más evidente en manchas chicas y totales ya que los valores obtenidos fueron de 2.68 y 5.22 respectivamente bajando hasta 1.57 y 3.44 para el mismo tipo de manchas. En cuanto a los individuos que fueron pretratados a una concentración de 182mM antes de la irradiación

FRECUENCIA DE MUT. Y REC. CRUZA BE

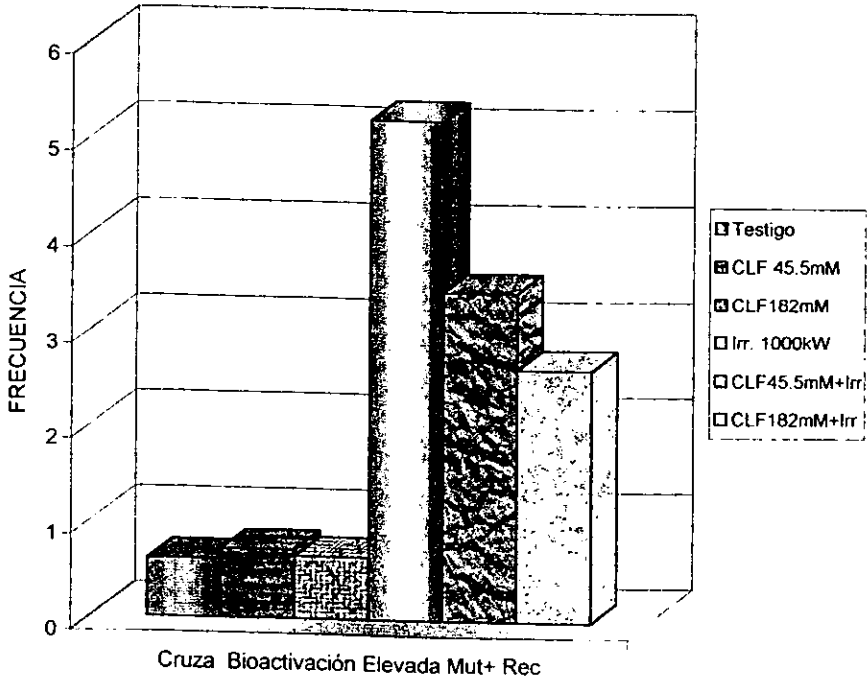


Fig. 11 Comparación de frecuencias de mutación y recombinación obtenidas de los grupos de manchas de la curza Oregon de alta bioactivación, con dos concentraciones diferentes de CLF (clorofilina 45.5mM y 182mM) y CLF más irradiación a 1000kW, y sus respectivos testigos. Significado: CLF 45.5mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 45.5mM; CLF 182mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 182mM; Irr irradiación a 1000kW; mut., mutación; rec., recombinación.

presentaron una reducción de 2.68, 1.80, 0.73 y 5.22 para manchas chicas, grandes, gemelas y totales, hasta 1.07, 1.17, 0.40 y 2.63 para los mismos tipos de manchas respectivamente (fig.11).

El comportamiento de la craza BE al recibir un pretratamiento en estado larval de 72h con CLF a dos concentraciones diferentes de 45.5 y 182mM (fig.11), es similar al testigo de esta misma craza. Mientras que los organismos que recibieron pretratamiento con CLF con las dos concentraciones diferentes de 45.5mM y 182mM y que además, fueron irradiadas con neutrones a la dosis de 8.51Sv, mostraron una marcada reducción en cuanto a la frecuencia de manchas totales encontradas en las alas de estos individuos respecto a su testigo irradiado de 34% para la concentración baja de CLF 45.5mM, siendo mayor la reducción de las frecuencias de manchas totales en los organismos que fueron pretratados con la concentración alta de CLF 182mM llegando a reducir la frecuencia en un porcentaje de 49.6%.

En cuanto al comportamiento obtenido al utilizar una concentración de CLF de 185mM, la craza ST registró una disminución en su frecuencia del 26.6% para manchas totales en comparación con su testigo irradiado. Mientras que para la craza BE el porcentaje de reducción con la misma concentración fue del 49.6% también para manchas totales, comparado con su respectivo testigo irradiado.

Cuando comparamos los resultados obtenidos en la craza ST, con los de BE (fig.12), se observa que las frecuencias de mutación espontánea son ligeramente mayores para la craza BE, presentándose este mismo comportamiento en los individuos que fueron irradiados sin recibir pretratamiento de CLF. Este efecto es inverso cuando comparamos las frecuencias obtenidas en los individuos expuestos al pretratamiento con dos concentraciones diferentes de CLF 45.5 y 185mM más irradiación. El porcentaje de reducción en la frecuencia del número total de machas para los individuos de BE, que además recibieron pretratamiento con CLF a una concentración de 45.5mM antes de ser irradiados, es del 34% en comparación con su respectivo testigo irradiado, mientras que los valores obtenidos para la misma concentración pero de la craza ST se observó un porcentaje de reducción del 18.5%.

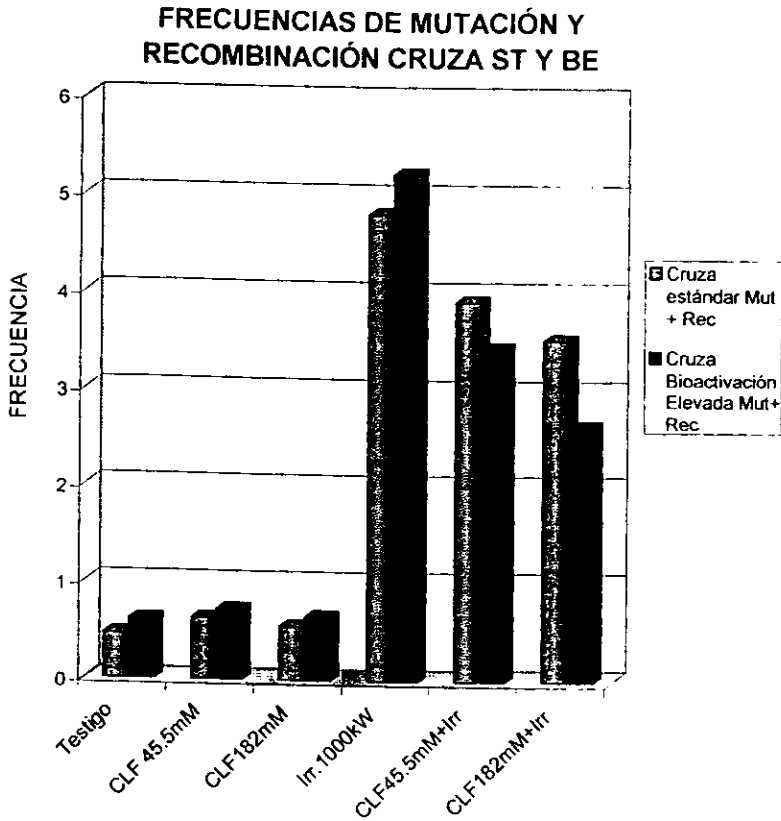


Fig.12 Comparación de frecuencias obtenidas de los grupos de manchas de la curza estándar y Oregon de bioactivación elevada, con dos concentraciones diferentes de CLF (clorofilina 45.5mM y 182mM) y CLF más irradiación de 8.51Sv a 1000kW, y sus respectivos testigos. Significado: CLF 45.5mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 45.5mM; CLF 182mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 182mM; Irr irradiación a 1000kW; mut., mutación; rec., recombinación.

Al comparar los resultados obtenidos en ambas cruzas (ST y BE) para los grupos irradiados, se pudo comprobar que no existen diferencias significativas, determinándose las frecuencias de 2.98, 1.37, 0.46 y 4.81 para manchas chicas, grandes, gemelas y totales en la cruz ST, mientras que en la cruz BE los valores fueron de 2.68, 1.80, 0.73 y 5.22 respectivamente.

Tabla 6 **CRUZA ESTÁNDAR SERRATIA**

Efecto de neutrones térmicos del reactor TRIGA Mark III de México a dos concentraciones diferentes de clorofilina, con la cruz estándar con marcador serratia.

Tratamiento	Número de alas	Manchas chicas m=2	Manchas grandes m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2
Testigo sin Irradiación y sin CLF	120	0.40 (48)	0.01 (1)	0.00 (0)	0.41 (49)
CLF 45.5mM	120	0.54 (65) i	0.03 (4) i	0.00 (0) i	0.57 (69) i
CLF 182mM	120	0.55 (66) i	0.00 (0) i	0.00 (0) i	0.55 (66) i
Irradiación 8.51Sv	120	1.39 (167) +	0.32 (39) +	0.00 (00) i	1.72 (206) +
CLF 45.5mM con Irradiación	120	0.90 (108) +	0.21 (25) +	0.00 (0) i	1.11 (133) +
CLF 182mM con Irradiación	120	0.87 (105) +	0.25 (30) +	0.00 (0) i	1.12 (135) +

Se analizaron 720 alas con alrededor de 25,000 células por ala. Abreviaturas: CLF, clorofilina; +, positivo; -, negativo; i, no concluyente; m, factor de multiplicación w, débil positivo.

CRUZA ESTÁNDAR Y ST CON MARCADOR SERRATIA

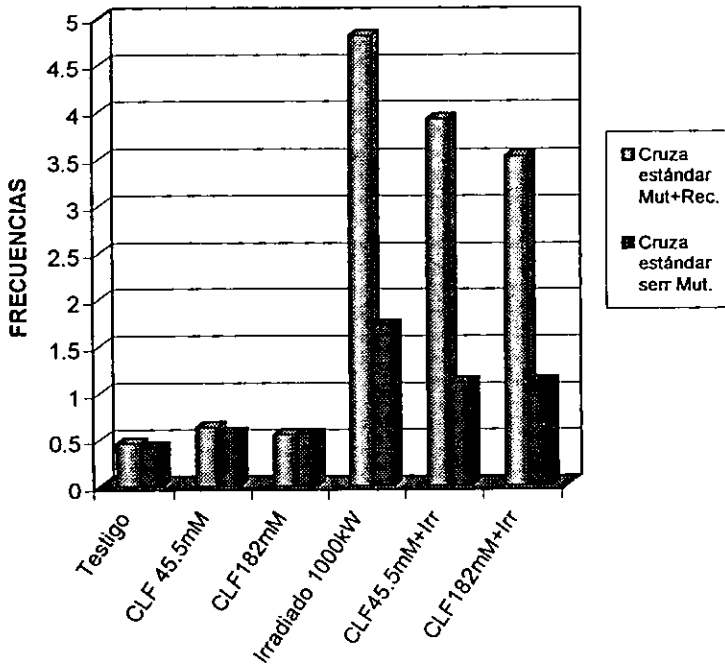


Fig.13 Comparación entre la craza estándar y ST con alas tipo serratia, con dos concentraciones diferentes de CLF (Clorofilina 45.5mM y 182mM) y CLF mas irradiación 8.51Sv a 1000kW, con sus respectivos testigos. Significado: CLF 45.5mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 45.5mM; CLF 182mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 182mM; Irr. irradiación a 1000kW; irr. irradiado a 1000kW; mut., mutación; rec., recombinación.

Al comparar los resultados obtenidos de la cruza ST con los individuos de la misma cruza pero con alas tipo serratia (Tabla 6 y fig. 13), encontramos que la frecuencia de manchas en el testigo, no presenta ninguna variación, para ambos grupos, este mismo evento se observa en los individuos que recibieron pretratamiento de CLF a concentraciones de 45.5mM y 182mM sin irradiación. Para el testigo con irradiación la frecuencia de manchas totales se redujo en un 64% en los individuos con alas tipo serratia, En tanto que para los individuos que recibieron pretratamiento de 45.5mM de CLF antes de ser irradiados, la frecuencia de manchas totales disminuyó en un 71% comparado con la frecuencia obtenida con el mismo tratamiento pero con alas normales. Para manchas chicas y grandes en alas normales la frecuencia fue de 2.15 y 1.33 reduciéndose en alas serratia a 0.90 y 0.21 para el mismo tipo de manchas.

CRUZA DE BE CON LAS NORMALES Y ALAS TIPO SERRATIA

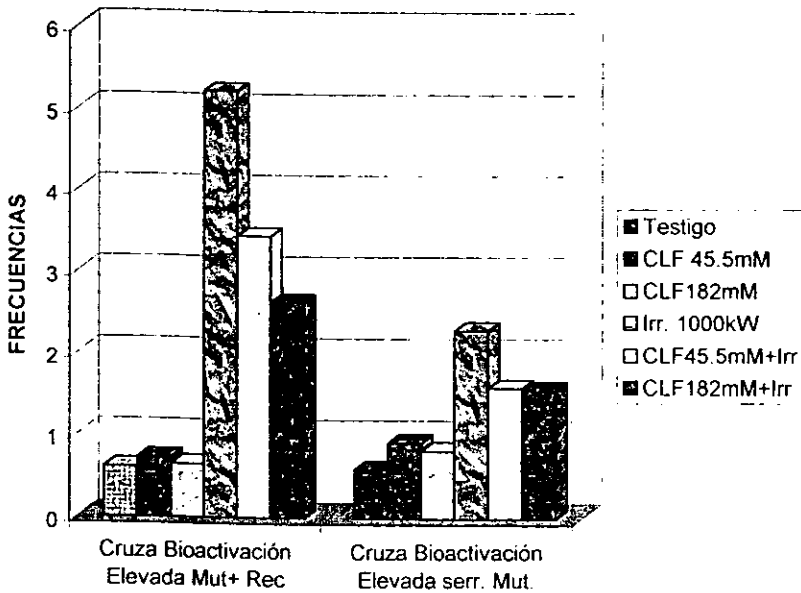


Fig. 14 Comparación entre la cruce BE y BE con alas tipo serratia, con dos concentraciones diferentes de CLF (Clorofilina 45.5mM y 182mM) y CLF mas irradiación 8.51Sv a 1000kW, con sus respectivos testigos Significado CLF 45.5mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 45.5mM; CLF 182mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 182mM; Irr irradiación a 1000kW; irr. irradiado a 1000kW, mut., mutación, rec., recombinación.

Los individuos que recibieron pretratamiento de CLF al 185mM antes de ser irradiados, disminuyeron su frecuencia de manchas totales en un 64%, mientras que para las manchas chicas y grandes con alas normales los valores se redujeron de 1.75 y 1.34 respectivamente a 0.87 y 0.25 para el mismo tipo de manchas pero con alas tipo serratia.

Tabla 7 CRUZA ALTA BIOACTIVACIÓN CON MARCADOR SERRATIA

Efecto de neutrones térmicos del reactor TRIGA Mark III de México a dos concentraciones diferentes de clorofilina, con la alta bioactivación con marcador serratia.

Tratamiento	Número de alas	Manchas chicas m=2	Manchas grandes m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2
Testigo sin Irradiación y sin CLF	120	0.56 (67)	0.04 (5)	0.00 (0)	0.60 (72)
CLF 45.5mM	120	0.87 (105) w	0.07 (8) i	0.00 (0) i	0.94(113) w
CLF 182mM	120	0.82 (98) w	0.02 (2) -	0.00 (0) i	0.83(100) w
Irradiación 8.51Sv	120	1.92 (231) +	0.37 (44) +	0.00 (0) i	2.29(275) +
CLF 45.5mM con Irradiación	120	1.34 (161) +	0.25 (30) +	0.00 (0) i	1.59(191) +
CLF 182mM con Irradiación	120	1.28 (154) +	0.28 (33) +	0.00 (0) i	1.56(187) +

Se analizaron 720 alas con alrededor de 25,000 células por ala. Abreviaturas: CLF, clorofilina; +, positivo; -, negativo; i, no concluyente; m, factor de multiplicación w, débil positivo.

Cuando se observan los resultados de frecuencias registradas por la cruce BE con alas normales y los resultados de la misma cruce pero con alas serratia (Tabla 7 fig. 14), se observa un ligero aumento en la frecuencia de manchas originadas por mutación para las dos concentraciones diferentes de CLF mas irradiación respecto al testigo irradiado., El porcentaje de reducción en la frecuencia del testigo irradiado para

alas tipo serratia es del 56% en comparación con el testigo de alas normales. Para el tratamiento de 45.5mM de CLF mas irradiación el porcentaje de reducción en la frecuencia de manchas totales fue del 53%, comparado con el mismo tratamiento pero en alas normales. Mientras que para la concentración de 185mM, las alas serratia redujeron su frecuencia de manchas totales en un 40%, respecto al mismo tratamiento pero con alas normales.

Cuando comparamos las cruza ST y BE pero en ambas con alas serratia encontramos que la frecuencia de mutación es ligeramente mayor en BE para las manchas totales del testigo comparadas con las dos concentraciones del pretratamiento. Se obtuvo una disminución en la frecuencia de la cruza ST de 1.72 para el testigo irradiado hasta 1.11 y 1.12 para las dos concentraciones diferentes de CLF. En cuanto a la cruza BE el testigo irradiado registró una frecuencia de 2.29 para el testigo irradiado para el mismo tipo de manchas y esta fue reducida hasta 1.59 y 1.56 para las dos frecuencias de los pretratamientos (fig 15).

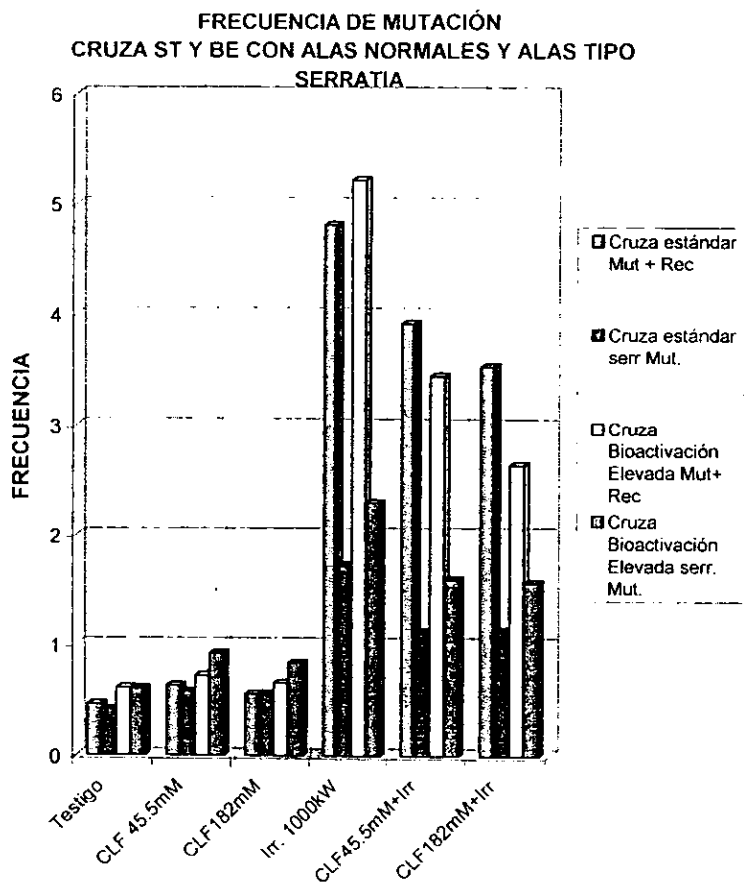


Fig. 15 Comparación de las frecuencias obtenidas de los grupos de manchas de la cruce estándar y Oregon de bioactivación elevada con dos concentraciones diferentes de CLF (Clorofilina 45.5mM y 182mM) y CLF mas irradiación 8.51Sv a 1000kW, con sus respectivos testigos. Significado: CLF 45.5mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 45.5mM; CLF 182mM, tratamiento con clorofilina a una concentración de 182mM; Irr irradiación a 1000kW; irr irradiado a 1000kW, mut., mutación; rec., recombinación.

DISCUSIÓN

La exposición a radiación por neutrones es un evento que se presenta tanto natural como artificialmente, a nivel natural está presente por medio de la radiación cósmica y a nivel artificial, en el área médica, donde se están desarrollando nuevas técnicas y procedimientos usando neutrones para radioterapia.

Los efectos producidos por los neutrones, se pueden dividir desde el punto de vista microscópico, en la célula, o macroscópico, en el organismo. Dentro de la célula esta modificación puede alterar su información genética como resultado de translocaciones, inversiones, deleciones o duplicaciones (Azorín, 1992; Zambrano y Cejudo, 1998).

En recientes estudios se ha demostrado que el sistema SMART es sensible al daño inducido por neutrones y responde de una forma directamente proporcional a la dosis de radiación, así como a la razón de dosis, por lo que puede ser empleado para estudiar los efectos biológicos de estos mutágenos físicos así como también para la identificación de los mutágenos químicos (Zambrano *et al.*, 1998b).

Además de las fuentes de mutágenos físicos a las que están expuestos los seres vivos, existen otras provenientes de la exposición a químicos, los cuales inducen daños genotóxicos a los individuos. Este tipo de mutágenos y carcinógenos se han identificado basándose, en algunos casos, en el uso de pruebas microbianas. Afortunadamente existen otras sustancias que disminuyen o anulan los efectos genotóxicos de los mutágenos, a estos agentes se les conoce como antimutágenos. Algunos forman parte natural de la dieta humana e inhiben la mutagénesis y la carcinogénesis y son muy importantes en la prevención del cáncer. Son sustancias que pueden ser obtenidas de los alimentos o sintetizadas por las células, que poseen actividad inhibitoria sobre mutágenos naturales o fabricados por el hombre, como la clorofilina, la cual es un derivado de la clorofila que se ha administrado a pacientes geriátricos para su protección (Young y Beregi, 1980). Probablemente muchos de estos compuestos están incluidos en los sistemas de defensa de los organismos, protegiéndolos de los daños a los que está expuesto constantemente el material genético y otros componentes de la célula.

El término antimutagénico fue utilizado originalmente para describir 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 para inhibir los eventos de mutagénesis y 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 *et al.*, 1982) y aquellos que pueden actuar intracelularmente (Ramel *et al.*, 1986) o antimutágenos Kada *et al.*, 1982), los cuales: 1) modulan el metabolismo; 2) bloquean moléculas reactivas; 3) modulan la replicación del ADN o la reparación.

La CLF ha sido catalogada como una sustancia con propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas para mutágenos indirectos, entre los cuales se incluyen las aflatoxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas, agentes alquilantes (Arimoto *et al.*, 1980a;1980b; Kato *et al.*, 1983; Terwel y Van der Hovenen, 1985; Ong *et al.*, 1986,1989). La CLF atenúa la genotoxicidad de algunas drogas tumorales como la ciclofosfamida, bleomicina y cisplatino.

También ha sido catalogada como una sustancia que puede ser efectiva para contrarrestar los daños producidos con mutágenos directos, como en el caso de *S. cerevisiae* la cual aumento la supervivencia y disminuyó la frecuencia de mutaciones inducidas por rayos X (Bronzetti *et al.*, 1990), y en *Drosophila melanogaster* donde se logró reducir el daño provocado por rayos γ (Zimmering *et al.*,1990; Olvera *et al.*, 1993), por lo que también se está proponiendo como una alternativa para tratar de

reducir los daños genéticos mutacionales y recombinacionales provocados por neutrones.

Utilizando el bioensayo SMART se estudió el efecto modulador de la CLF sobre el daño inducido por neutrones de reactor midiendo las frecuencias de mutación y recombinación ocurridas en las primeras etapas del desarrollo larvario de *Drosophila melanogaster*. Al graficar los datos obtenidos por medio de este sistema encontramos que para la primer muestra, donde se utilizó la craza ST, la frecuencia de manchas para los organismos que únicamente recibieron pretratamiento con CLF a la concentración baja de 45.5 y alta de 185mM, no presentaron aumento significativo para manchas chicas, grandes, gemelas y totales. Por lo que respecta a la craza BE las larvas que únicamente recibieron tratamiento con las dos concentraciones de CLF 45.5 y 185mM, tampoco registraron aumento alguno en las frecuencias de manchas chicas, grandes, gemelas y totales, respecto al testigo que únicamente fue alimentado con puré de papa. Esto demuestra que estas concentraciones no afectan las frecuencias de mutación y recombinación somáticas, tanto para la craza ST como para la BE ya que se obtuvieron frecuencias semejantes a la basal.

Al observar las frecuencias de los individuos que únicamente recibieron irradiación, sin pretratamiento con CLF, encontramos que estos resultados son semejantes, para las cruza ST y BE, lo que nos confirma que la radiación neutrónica es un mutágeno directo, ya que el daño genético se expresa inmediatamente (García A. *et al.*, 1999), y no necesita metabolizarse. Si fuera un promutágeno los valores de las frecuencias serían mayores en la craza BE que en la ST.

Mientras que el tratamiento químico con el modulador se realizó a las 72h de edad larval, la irradiación con neutrones se llevó a cabo a las 96h, precisamente porque una de las recomendaciones de Graf (1995) es que la edad óptima para el tratamiento de las larvas es de 72h, sin embargo, a las 96h el tratamiento con radiación es más eficiente para hacer estudios con moduladores. Esto se debe a que el blanco de la radiación, las célula imagales, a las 72h son pocas, alrededor de 487 células, sin embargo en las larvas de 96h los discos imagales tienen mayor número de células, por

lo que se contó con blancos de mayor tamaño que dan lugar a una frecuencia alta de manchas aunque de tamaño pequeño (Zambrano *et al.*, 1998a).

Cuando comparamos las frecuencias de los organismos que fueron sometidos a irradiación de la cruz ST, contra los organismos que previamente fueron tratados con CLF a concentración baja de 45.5mM y concentración alta 185mM, de la misma cruz, observamos que la frecuencia de mutación disminuye para las manchas chicas, grandes gemelas y totales, lo que supone un efecto protector de la clorofilina frente a los daños inducidos por neutrones. De forma semejante a la encontrada por Olvera *et al.*, 1993 para radiación γ .

La cruz de BE también registró reducción en la frecuencia de manchas chicas, grandes, gemelas y totales, siendo más evidente el efecto protector, cuando se utilizó la concentración de 185mM.

El hecho de haber obtenido un comportamiento semejante de frecuencias de manchas chicas y gemelas, con las frecuencias de manchas totales es importante, porque puede reflejar tanto el momento en que se originaron las mutaciones, como el fenómeno biológico involucrado, ya que las manchas gemelas sólo se originan por recombinación mitótica (García *et al.*, 1999). Cuando el fenómeno biológico se lleva a cabo entre el centrómero y el marcador *flr*. Se puede presentar recombinación entre los dos marcadores, *mwh* y *flr*, pero en este caso se generan dos células hijas, una de las cuales es homocigota para el marcador *mwh* y dará origen a una mancha simple con pelos múltiples; la otra célula tendrá un fenotipo normal.

Con estos resultados obtenidos podemos confirmar que la CLF ejerce un efecto protector hacia mutágenos directos como son los neutrones y que el grado de eficiencia de este compuesto está en función de la concentración que se utilice ya que a mayor concentración, su efecto es mayor. Sin embargo, Chernomorsky en 1997 encontró que la CLF a concentración alta presenta un efecto citotóxico en células tumorales inducidas por dimetilhidrazina y a concentración baja actúa como un agente citostático en colon de rata. Una de las razones por las que el efecto de la CLF no es

el mismo en varios experimentos, puede ser debida al grado de pureza de la misma, ya que en pruebas realizadas a diferentes lotes por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se ha encontrado que la pureza no es la misma. Por lo cual es conveniente realizar estudios previos de pureza a la clorofilina, para disminuir errores en los resultados. Otra de las razones por las que la CLF presenta diferentes respuestas en diversos estudios, podría deberse a la localización de la misma en el momento que se presentan los eventos mutacionales, ya que puede encontrarse en mitocondrias, lisosomas, membranas o en el núcleo de las células.

Las frecuencias de mutación y recombinación obtenidas en la cruce BE que se sometieron al pretratamiento con CLF antes de ser irradiados, muestran mayor disminución en la frecuencia de mutación y recombinación que las obtenidas en la cruce ST, lo que indica que la CLF podría estar ejerciendo un mayor efecto de protección del ADN contra los daños provocados por neutrones, posiblemente debido a la presencia de niveles elevados de las enzimas del citocromo P-450.

Los datos obtenidos en las cruces ST con moscas portadoras del marcador serratia, es decir, individuos con balanceador heterocigoto (*fir³/TM3, Bcd*), muestran que en presencia de CLF se reduce la frecuencia de mutación inducida por neutrones, sin embargo la frecuencia de manchas para las muestras pretratadas con dos concentraciones diferentes de CLF 45.5mM y 182mM, no es diferente. Este mismo comportamiento se observó en la cruce de BE para el mismo tipo de manchas. Lo que podría significar que la CLF ejerce sus mecanismos de acción en el momento de la recombinación, ya que es esta etapa donde se puede observar que el efecto protector de la CLF, está en función de la concentración.

La cruce BE se caracteriza por que puede activar promutágenos vía el camino metabólico dependiente del citocromo P-450, esta cruce se empleó para observar el comportamiento de la CLF en combinación con un mutágeno directo como los neutrones, los cuales no requieren del metabolismo que involucra a las enzimas del citocromo P-450 para inducir daños en el ADN.

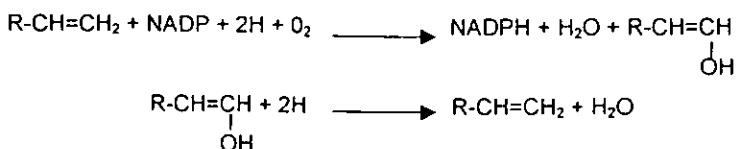
Estudios anteriores han mencionado que la CLF inhibe la acción de las enzimas del citocromo P-450 (Yun *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1999), lo que en nuestro estudio provocaría que las frecuencias de mutación obtenidas para la cruce BE fueran similares a las de la cruce ST, ya que al inhibir la acción de las enzimas del citocromo P-450 el metabolismo de la cruce BE sería reducido llegando a ser quizás, similar al de la cruce ST. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que las frecuencias registradas en la cruce BE son menores, esto podría deberse a la presencia de una cantidad mayor de enzimas del citocromo P-450.

El paso de la CLF por el tracto digestivo provoca que esta se ponga en contacto directo con las enzimas del citocromo P-450, en donde participan un amplio grupo de isoenzimas que metabolizan gran variedad de compuestos lipofílicos endógenos o exógenos, representada por una monooxigenasa externa y catalizada de acuerdo a la siguiente reacción:



Donde S, es el sustrato y representa un esteroide, ácido graso o cualquier compuesto químico que tenga un grupo alcano, alqueno, anillo aromático o heterocíclico, el cual puede servir como sitio de reacción para que se produzca la oxigenación. La reacción es conocida como una monooxigenación en la cual solamente uno de los dos átomos de oxígeno molecular es incorporado al sustrato y el otro pasa a formar agua (Murillo, 1997).

Si esta ecuación la adaptamos a la estructura química de la clorofilina, la cual conocemos de antemano que presenta ramificaciones con grupos alcanos y alquenos entre otros, podríamos encontrar que al ponerse en contacto con las enzimas del citocromo P-450 y participar en el metabolismo, se podría presentar la siguiente reacción:



Lo que demostraría que la clorofilina podría modificarse al ser metabolizada cuando entra en contacto con las enzimas del citocromo P-450, provocando un aumento en la capacidad de la CLF para atrapar radicales libres, disminuyendo así los daños inducidos por los neutrones al ADN.

Con estos resultados podríamos considerar una nueva hipótesis sobre el mecanismo de acción posible de la clorofilina, que sería, la capacidad de aumentar sus efectos protectores al ser metabolizada, además de los ya citados por la bibliografía, los cuales mencionan los siguientes mecanismos:

- Desactivación de mutágenos por formación de complejos entre ellos (Hayatsu *et al.*, 1993; Dashwood, 1998) En nuestro estudio no es posible, ya que el mutágeno utilizado para provocar daño genético, penetra directamente a las células en forma de partículas, sin embargo otros autores encontraron que la CLF participa como un agente bloqueador sobre el daño al ADN, debido a la alteración precisamente entre el carcinógeno y el inhibidor, actuando como un interceptor molecular in vivo (Dashwood *et al.*, 1998).
- Captura de radicales libres y especies de oxígeno reactivo (Hadnagy y Seemayer en 1998; Kumar, 1999). Este mecanismo de acción es comprobado parcialmente en el presente estudio ya que cuando el organismo es expuesto a casi cualquier tipo de radiación, estos provocan cambios o pérdida de bases, ruptura de las cadenas de ADN, ruptura de enlace de hidrógeno, etc., dando como consecuencia el aumento de iones alrededor de la molécula, provocando un aumento de daño genético. En nuestros resultados observamos que en la cruce ST los daños provocados por los neutrones disminuyeron en forma significativa y esta disminución está condicionada a la concentración, ya que al aumentar la concentración de CLF el daño ocasionado es menor.

- c) Transformación enzimática de mutágenos al inhibir la acción de las enzimas del P-450, provocando la no activación de promutágenos. (Yun, 1995; Negishi *et al.*, 1989). Esta acción de la CLF no fue confirmada, porque en nuestro experimento se utilizó un mutágeno directo que en este caso fueron neutrones, sin embargo se obtuvo una disminución en la frecuencia de mutación tanto para la cruce ST como para la cruce de bioactivación elevada.

El hecho de que en la cruce de Bioactivación elevada las frecuencias de mutación y recombinación registraran una disminución mayor que en la cruce ST es muy significativo ya que muestra que la CLF ejerce un mayor efecto de protección al momento de aumentar su grado de metabolización.

Considerando estas afirmaciones encontramos que la CLF tiene respuestas muy diferentes de acuerdo al tipo de mutágeno con el que esté actuando, y esto probablemente podría deberse a las características de la misma, las cuales mencionan que la CLF puede presentar un efecto protector sobre diversos agentes cancerígenos y mutagénicos, tanto de acción directa como indirecta (Zimmering *et al.*, 1990). Se ha encontrado que las porfirinas se acumulan preferentemente en células tumorales (Dashwood *et al.*, 1998). En algunos casos el tipo de respuesta está condicionado a la concentración que se utilice, ya que como se mencionó en ciertos estudios (Chemomorsky *et al.*, 1997), se ha comprobado que la CLF a bajas concentraciones actúa como un citotóxico en células de mieloma y con altas concentraciones es citocídico. De acuerdo a nuestros resultados podemos establecer que el bioensayo SMART puede emplearse en estudios con moduladores químicos del daño inducido por neutrones, ya que como se observó el daño producido por esta radiación particulada fue modificado o modulado por la presencia de un agente químico como la CLF. En este caso el efecto de la CLF redujo los daños inducidos, es decir, actuó como un antimutagénico: Sin embargo en otros casos se ha observado que la presencia de una sustancia química con Boro, como las porfirinas, pueden potenciar el efecto causado por los neutrones. Este sinergismo se ha empleado para cierto tipo de radioterapia de pacientes con el propósito de disminuir las células malignas de tumores profundos localizados en cerebro. Usando precisamente este tipo de radiación se logra destruir a las células cancerígenas localizadas en ese órgano, sin

dañar a las células sanas que se encuentran en la periferia de los gliomas. Los estudios con moduladores de los daños inducidos por radiación, son relativamente más completos que los realizados empleando únicamente radiación, debido a que los seres vivos están expuestos a mutágenos físicos y químicos en su medio ambiente. Aún así, es difícil igualar en el laboratorio condiciones semejantes a las que se presentan en los seres vivos, ya que en organismos completos podemos obtener diferentes respuestas, las cuales son debidas a varios factores que son difíciles de controlar en el laboratorio. Esto se confirma al hacer estudios con otros moduladores del daño producido por neutrones en donde se ha visto, un efecto antimutagénico *in vivo* pero no *in vitro* (Zambrano *et al.*, 1999).

Este tipo de estudios abre la posibilidad de modificar la respuesta de la exposición humana a carcinógenos, precisamente por el uso de estas porfirinas, las cuales generalmente son constituyentes de la dieta y que son recomendables para ejercer un efecto protector contra diversos tipos de cáncer.

CONCLUSIONES

- ◆ La frecuencia de mutación espontánea es ligeramente mayor en la cruce de alta bioactivación que en la cruce estándar
- ◆ Las concentraciones de clorofilina de 45.5 a 182mM modifican las frecuencias de mutación y recombinación espontáneas
- ◆ La clorofilina ejerce un efecto radioprotector contra los daños inducidos por neutrones térmicos de reactor tanto en la cruce ST como en la de BE
- ◆ El efecto protector de la clorofilina es dependiente de la concentración de este modulador, tanto en la cruce ST como en la BE
- ◆ El efecto protector de la clorofilina es mayor en la cruce de *Drosophila* que posee una capacidad metabólica aumentada

- ◆ Encontramos cuatro diferentes porcentajes de antimutagenicidad:

Cruza ST	concentración	baja (45.5mM)	con porcentaje de inhibición del	18%
Cruza ST	" "	alta (182mM)	" "	27%
Cruza BE	" "	baja (45.5mM)	" "	34%
Cruza BE	" "	alta (182mM)	" "	50%

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso M y Finn EJ. (1970). Física Fondo Educativo interamericano. 2: 791-795.
- Arimoto S, Ohara Y, Namaba T, Negishi T y Hayatsu H. (1980a). Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 92: 662-668.
- Arimoto S, Negishi T y Hayatsu H. (1980b). Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.* 11: 29-33.
- Arimoto S, Fukuoka S, Itome Chiho A y Nakano H. (1993). Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutation Res.* 287: 293-305.
- Ayaki T, Fujikawa K, Ryo H, Itoh T y Kondo S. (1990). Induced rates of mitotic crossing over and possible mitotic gene conversion per wing anlage cell in *Drosophila melanogaster* by X rays and fission neutrons. *Genetics.* 126: 157-166.
- Azorín NJ. (1992). Protección radiológica III. Efectos Biológicos. Serie de divulgación técnico-científica. 9-19pp.
- Azorín NJ. (1997). Introducción a la física nuclear. Ediciones Científicas AZVEG. México. 240pp.
- Baars AJ, Blijleven WGH, Monh GR, Natarajan AT y Breimer DD. (1980). Preliminar studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 72: 257-264.
- Breinholt V, Arbogast D, Loveland P y Pereira C. (1999). Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B₁ bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability vs. target organ protective mechanisms. *Toxicology and Pharmacology.* 158: 141-151.
- Bronzetti G, Galli A y Della Croce C. (1990). Antimutagenic effects of chlorophyllin. (En: Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism II. Kuroda Y, Shankei D y Waters M., Eds), Plenum Press. New, EUA. 463-468.
- Buergi E. (1943). Porphyrins in the healing of wounds. *J.A.M.A* 121: 1237-1943.
- Chemomorsky, S. (1993). Chlorophyllin copper complex: Quality Control. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 44: 235-238.
- Chemomorsky S, Rancourt R, Viridi K y Segelman A. (1997). Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. *Cancer Lett.* 120: 141-147.
- Chung WY, Lee JM, Park MY, Yook JI, Kim J, Chung AS, Surh YJ y Park KK. (1999). Inhibitory effects of chlorophyllin on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene induced bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett.* 145: 57-64.
- Dapkus J y Merrell DJ. (1977). Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 87: 685-697.

- Dashwood R, Brinholts V y Bailey G. (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 y Guo D. (1992a). Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies enzyme inhibition and molecular complexformation. *Carcinogenesis*. 13: 1121-1126.
- Dashwood R y Liew Ch. (1992b). Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecalmutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)quinoline. *Environ. And Mol. Mutagen*. 20: 199-205.
- Dashwood R, Negishi T, Hayatsu H y Breinholt V. (1998). Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutation Res*. 399: 245-253.
- De Flora S y Ramel C. (1988). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Res*. 202: 285-309.
- Delfín A, Paredes L, Guzmán J y Zambrano F. (1998a). Cuantificación de dosis equivalente originada por neutrones en *D. melanogaster*. *Genetics Mol. Biol.* 21 (supl. 3): 60.
- Delfín A, Paredes L, Zambrano F y Guzmán J. (1998b). Determinación de la dosis equivalente por neutrones en *Drosophila melanogaster*. *Memorias IX Congreso de la Soc. Nuc. Mex. Oaxaca de Juárez, Oax. México*. 155-162
- Delfín-Loya A, Paredes-Gutiérrez L, Zambrano-Achirica F, Guzmán-Rincón J y Ureña-Nuñez F. (2000). Genetic effects induced by neutrons in *Drosophila melanogaster*. I. Determination of equivalent dose. *Radiation Res*. En prensa
- Demerec M y Kaufmann BP. (1975). Introducción a la genética y citología de *Drosophila melanogaster*. México. 56pp.
- Domínguez AC. (1998). Curso de protección radiológica y Seguridad Radiológica en el Diagnóstico Médico con Rayos X. ININ. 24-26.
- Frei H y Würigler FE. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res*. 203: 297-308
- Frei H. (1994). Statistical analysis of data from somatic mutation and recombination tests. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10 (supl. 1): 9 - 14.
- García A, Guzmán J, Zambrano F, Paredes L y Delfín A. (1999). Evaluación del efecto antimutagénico de la clorofilina sobre el daño inducido por neutrones de reactor en *Drosophila melanogaster*. Reunión Internacional Conjunta de la Sección Latinoamericana de la American Nuclear Society. Acapulco, Gro. México. 61-67. Jul.
- García-Barajas A, Zambrano F, Guzmán J, Paredes L y Delfín A. (1999). Efecto antigenotóxico de la clorofilina sobre los daños inducidos por neutrones de reactor. V Concurso del Cartel Científico. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. IX Semana de Biología Experimental. Academia de la Investigación Científica. UAM. Iztapalapa; D.F. Oct.

- García-Bellido A y Merriam JR. (1971). Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Bio.* 24: 61-87.
- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB y Kale PG. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6: 153 - 188.
- Gruskin, B. (1940). Chlorophyllin, its therapeutic place in acute and supparative disease. *Am. J. Surg.* 49: 49.
- Guzmán RJ, Würgler FE y Vogel EW. (1990). Training course on *Drosophila* somatic genotoxicity assays in Mexico. *Mutation Res.* 234: 107-109.
- Guzmán-Rincón J y Graf U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. (En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*, Butterworth et al, Eds.) Plenum Press. New.York. 12: 169-181.
- Guzmán J, Zambrano F, Paredes L, Delfín A y Quiroz C. (1998). Análisis de la relación entre las frecuencias de mutación y recombinación somáticas inducidas por neutrones y la edad de las larvas en *D. melanogaster*. *Memorias del VIII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN*. Salazar, Edo. de México. México. 239-244.
- Hadnagy W y Seemayer N. (1988). Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. *Mutation. Res.* 205: 205-206.
- Hällström I y Blank A. (1985). Genetic variation in cytochrome P450 system in *Drosophila melanogaster*. 1 Chromosomal determination of some cytochrome P450-dependent reactions. *Chem. Biol. Interacciones.* 56: 157-171.
- Harttig U, Bailey G. (1998). Chemoprotection by natural chlorophylls in vivo: inhibition of dibenzo[*a,h*]pyrene-DNA adducts in rainbow trout liver. *Carcinogenesis.* 19, 7: 1323-1326.
- Hayashi T, Schimerlik M, Bailey G. (1999). Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis: dose-responsive inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 158: 132-140.
- Hayatsu H, Negishi T, Arimoto S y Hayatsu T. (1993). Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutation Res.* 290: 79-85.
- Harrison J, Levin S y Travin B. (1954). The safety and fate of potassium sodium copper chlorophyllin and other copper compounds. *J. Amer. Pharm. Assoc.* 43: 722-737.
- Hodgson E y Randy R. (1991). Insect cytochrome P-450 (En: *Molecular aspect of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds*. E. Arinc, J.B. Shenkman y E. Hodgson, Eds.). Plenum Press Nato Series. 202: 75-91.
- Imai K, Aimoto T, Sato M, Watanabe K, Kimura R y Murata T. (1986). Effects of sodium metallochlorophyllins on the activity and components of the microsomal drug metabolizing enzyme system in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 4287-4293.
- Johnson H y Tutiah. (1985). La radiación es parte de nuestra vida. *Series de Información Nuclear ININ Whiteshell Nuclear Res. Establishment.* 79-86.

- Kada T, Inoue T y Maniki N. (1982) in: E.J. Klekowski (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger, New York, 1988: 137-151
- Katoh Y, Nemoto N, Tanakata M y Takayama S. (1983). Inhibition of benzo[a]pyrene induced mutagens in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutation Res.* 121: 153 -157.
- Kephart J. (1955). Chlorophyll derivatives: their chemistry, commercial preparation and uses. *Economic Botany* 9: 3-38.
- Kimm S, Tchai B, Park S y Jikang S. (1982). Antimutagenic activity of chlorophyll to direct and indirect-acting mutagens and its contents in vegetables. *Korean J. Biochem.* 14: 1-7
- Kumar S, Chaubey R, Devasagayam T y Priyadarsini K. (1999). Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. *Mutation Res.* 425: 71-79.
- Lai CN, Dabney BJ y Shaw CR. (1978). Inhibition of *in vitro* metabolic activation of carcinogens by wheat sprout extracts. *Nutrition and Cancer.* 1: 27-30.
- Lai C, Butler M y Matney T. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Res.* 77: 245-250.
- Lee WR, Abrahamson S, Valencia R, von Halle ES, Würgler FE y Zimmering S. (1983). The sex linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 123: 183-279.
- Lindsley DL y Zimm GG. (1990). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inform. Serv.* 68: Part 1.
- Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez P. (1989). Effect of pretreatment with cysteamine on γ - radiation-induced sister chromatid exchanges in mouse bone marrow cells *in vivo*. *Radiation Res.* 118: 131-138.
- Morales-Ramírez P y García-Rodríguez M. (1994). In vivo effect of chlorophyllin on gamma ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutation Res.* 320: 329-334.
- Monta K, Hara M y Kada T. (1978). Studies on natural desmutagens screening for vegetables and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1235-1238.
- Murillo S. (1997). Efecto de la capacidad de inducción de la actividad metabólica del etanol y del ciclohexanol frente al daño producido por la N,N-dimetilnitrosamina en *Drosophila melanogaster*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. México. 5-16.
- Nebert DW y González FJ. (1984). Cytochrome P-450 genes and their regulation. *Symp. Mol. Cell Biol.* 19: 309-329.
- Nebert DW y González FJ. (1987). P-450 Genes. Structure, evolution and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 945-993.

- Negishi T, Arimoto S, Nishizaki 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.
- Newmark H. (1987). Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**: 461-466.
- Nöthinger R. (1970). Sucrose density separation: a method for collecting large numbers of *Drosophila* larvae. *Dros. Inform. Serv.* **45**: 117.
- Ohyama SS, Kiyamori H, Kawano T, Yamada T, Inamasu M, Ishizawa E, Ishinishi N. (1987). Ingestion of parsley inhibits the mutagenicity of male human urine following consumption of fried salmon. *Mutation Res.* **192**: 7-10.
- Olvera O, Zimmering S, Arceo C y Cruces M. (1993). The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium VI oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* **301**: 201-204.
- Ong T, Whong W, Stewart J y Brockman H. (1986). Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.* **173**: 111-115.
- Ong T, Whong W, Stewart J y Brockman H. (1989). Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutation Res.* **222**: 19-25.
- Parke DV, Ioannides C. y Lewis DF. (1991). The role of the cytochromes P450 in the detoxification and activation of drugs and other chemicals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**: 537-549.
- Ramel C, Alekperov UK, Ames BN, Kada T y Wattenberg LW. (1986) Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutation Res.* **168**: 47-65.
- Ramirez VP. (1999). Evaluación antigenotóxica del ácido ascórbico, clorofilina y ácido retinoico ante el condensado de humo de cigarro y dos de sus componentes en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 95pp.
- Ramos MP, Abundis HM, Gayton JC, Ordaz MG, Orozco PG, Maldonado J, Hernández J, González E, Reyes P, Galicia E y Muñoz JA. (1993). Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill. México. 131pp.
- Reddy AP, Hartig U, Barth M y Baird W. (1999). Inhibition of dibenzo[a,l] pyrene-induced multi-organ carcinogenesis by dietary chlorophyllin in rainbow trout. *Carcinogenesis*. **20**, 10: 1919-1926.
- Robins E y Nelson R. (1989). Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced nuclear damage in rat colonic epithelium by chlorophyllin. *Anticancer* **9**: 185-986.
- Romert L, Curvall M y Jenssen D. (1992). Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagen*. **7**: 349-355.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Sankaranarayanan K y Ferro W. (1985). Studies on mutagen-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*. VIII. Further data on differences between Canton-S and ebony strains with respect to maternal effects for the X-ray induction of autosomal translocations and ring-X chromosome losses in mature spermatozoa. *Mutation Res.* 150: 225-234.
- Sato M, Imai K, Kimura R y Murata T. (1984). Effects of sodium copper chlorophyllin lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 716-722.
- Smith L y Sano M. (1944). Chlorophyll: an experimental study of its water-soluble derivatives. IV. The effect of water-soluble chlorophyll derivatives and other agents upon the growth of fibroblast in tissue culture. *J. Lab. Clin. Med.* 29: 241-246.
- Terwel y Van der Hoeven J. (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.
- Vogel EW y Zijlstra JA. (1987). Mechanistic and methodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 182: 243-264.
- Warner JR, Nath J y Ong TM. (1991). Antimutagenic studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose-resistant assay system. *Mutation Res.* 262: 25-30.
- Würgler FE y Vogel EW. (1986). In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. (En: *Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection* Seres FJ., Ed.). Vol. 10, New York; Plenum. 1-72.
- Young R y Beregi J. (1980). Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. *J. Am. Geriatrics Soc.* 28: 46-47.
- Yun Ch, Jeong H, Jhoun J y Guengerich F. (1995). Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis.* 16 6: 1437-1440.
- Zambrano F, Guzmán J, Paredes L y Delfín L. (1998a). Influencia de la edad larval en la inducción de la mutación y recombinación somáticas con neutrones de reactor en el sistema SMART de *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Biol. Supp.* 213: 61.
- Zambrano F, Guzmán J, Paredes L, Delfín A y García-Barajas A. (1998b). Determinación de las frecuencias de mutación y recombinación somáticas inducidas por neutrones de reactor en *Drosophila melanogaster*. *Memorias del VIII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN*. Salazar, Edo. de México. México. 245-250.
- Zambrano A y Cejudo J. (1998d). Efectos biológicos causados por la radiación ionizante. *Cursos de protección radiológica para profesionistas*. ININ. México. 72-80.
- Zambrano F, Guzmán J, García A, Paredes L, y Delfin A. (1999). Antimutagénesis de moduladores químicos contra el daño inducido por neutrones térmicos de reactor. *Memorias del IX Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN*. Salazar, Edo. de México. México. 229-233.
- Zimmering S, Olvera O, Hernández M, Cruces M, Arceo C y Pimentel E. (1990). Evidence for radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Res.* 245: 47-49.

ANEXOS

5.1 Preparación de medio de cultivo y de soluciones

5.2 Preparación de medio de cultivo

Medio de cultivo mejorado para preparar 3 litros	
Agua destilada	2500ml
Agar en polvo	57g
Harina de maíz	132g
Sacarosa	90g
Dextrosa	76g
Levadura de cerveza	105g
Agua para levadura	450ml
Acido propiónico ¹	15ml
Nipagin ¹ (12.5%)	15ml

¹ El ácido propiónico y el nipagin se utilizan como agentes inhibidores del crecimiento de hongos y bacterias impidiendo así la contaminación de los cultivos.

Colocar en un recipiente 2500ml de agua destilada, agregar 57g de agar en polvo, 132g de harina de maíz, 90g de sacarosa y 76g de dextrosa, calentar al fuego al tiempo que se está agitando hasta que se mezcle perfectamente. Al momento de hervir, agregar 105g de levadura de cerveza previamente disuelta en 450ml de agua destilada, dejarlo hervir a fuego moderado por 20min. Cuando la mezcla baje su temperatura hasta 55°C agregar 15ml de ácido propiónico y 15ml de nipagin al 12.5%, mezclar perfectamente y vaciar aproximadamente 30ml en frascos lecheros de ¼ litro, tapar con tapones de hule espuma. Tanto los frascos como los tapones deben estar limpios y esterilizados antes de ser utilizados. La esterilización debe hacerse en un homo a temperaturas de 75°C, 100°C y 125°C durante periodos de 3h, 40min o 30min respectivamente.

5.3 Preparación de Solución de Faure.

Mezclar 30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de cloral hidratado y 50ml de agua destilada, calentar un poco para disolver perfectamente los componentes y dejar reposar por 24h.

5.4 Preparación de solución de sacarosa al 20 %

Pesar 200g de sacarosa en una balanza granataria, colocarla en un matraz Erlenmeyer de 1000ml, agregar agua destilada agitando para disolverla, hasta completar 1000ml.

5.5 Preparación de solución de sacarosa al 4 %

Pesar 2g de sacarosa en una balanza granataria, colocar la sacarosa en un matraz Erlenmeyer de 50ml, agregar agua destilada agitando para disolverla, hasta completar 50ml.

5.6 Preparación de solución de nipagin al 12.5%

Pesar 12.5g de nipagin en una balanza granataria y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml, agregar etanol de 96° agitando hasta disolverlo y aforar.

5.7 Preparación de levadura para agregar a la superficie del medio de cultivo contenido en frascos lecheros de 1/4

Mezclar levadura en polvo, azúcar y unas gotas de agua agitando vigorosamente, hasta que la mezcla quede ligeramente pastosa, posteriormente agregar un poco de ésta en la superficie de los frascos con medio de cultivo.

5.8 Proliferación de moscas

Para la obtención de un buen número de moscas, es necesario colocar un grupo de aproximadamente 50 moscas entre hembras y machos, de las tres líneas por separado, en frascos que contengan medio de cultivo y un poco de levadura en pasta sobre la superficie del mismo. Estas moscas serán conservadas a 25°C y 65% de humedad y ser trasvasarán cada tercer día, en frascos con el mismo tipo de medio de cultivo. Los frascos donde fueron retiradas las moscas se conservarán bajo las mismas condiciones de laboratorio, ya que el medio estará llenos de huevecillos, los cuales tardarán de 11 a 14 días para completar su desarrollo.

5.9 Sexado de moscas

Es fundamental contar con hembras vírgenes al hacer las cruas experimentales entre moscas pertenecientes a líneas diferentes.

Como regla, las hembras no son fecundadas antes de las primeras doce horas después de emerger, de manera que si todas las moscas son retiradas de la botella de cultivo, las hembras colectadas en las 12 horas siguientes tendrán una buena probabilidad de ser vírgenes.