



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ACCION DE LA CLOROFILINA Y PROTOPORFIRINA  
SOBRE EL DAÑO GENETICO INDUCIDO POR  
RADIACION GAMMA Y AFLATOXINA B1**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MARTHA PATRICIA CRUCES MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. ADALBERTO EMILIO PIMENTEL PEÑALOZA**

**México ,D.F.**

**Diciembre ,2009**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad que me ofreció para obtener el grado académico

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dr. Rosario Rodríguez Arnaiz

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar

Dra. Patricia Ramos Morales

Dr. Mario Altamirano Lozano

Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza

Muchas gracias por sus comentarios y sugerencias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la invaluable oportunidad de tener una educación profesional.

A mi asesor el **Dr. Emilio Pimentel Peñaloza**

Gracias por toda su dedicación y su trabajo, porque esta investigación se realizó en su totalidad gracias a él.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Drosophila del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, agradezco a las autoridades del instituto por las facilidades otorgadas para la realización de del mismo.

A la maestra Matilde Breña Valle.

Por sus consejos y apoyo.

A Dora Luz Barrón Manrique.

Por el entusiasmo y la dedicación con que siempre colaboró con nosotros.

A Lourdes Olvera.

Por su apoyo incondicional.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis con todo mi cariño a:

Mi madre: María de Lourdes Martínez

Por todo lo que has hecho por mí.

A mi hijo Alejandro

Porque eres lo mejor que me ha dado la vida.

A mi esposo, Emilio.

Muchas gracias por todo.

A mi hermana María Esther, porque no podía tener una mejor amiga.

A mi muy querido Dr. Stanley Zimmering:

Mi amado profesor, el mejor maestro que he tenido.

A mis queridos sobrinos: Didí, Toño, Adrián, Lucy, Mariana, Jocabeth y Máximo.

A la memoria del Ing. Rodolfo Martínez Rojas

Porque esto también te lo debía a ti.

A mis queridos amigos

A todos ustedes, los de siempre, gracias por estar siempre cuando más los he necesitado.

A la familia Díaz-Ramírez

Porque son los mejores amigos que se puede tener.

## INDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. La Clorofilina Cupro-Sódica (CCS).....	3
2.2. Mecanismos de acción de la CCS.....	4
2.2.1. La CCS como antioxidante.....	4
2.2.2. La CCS como interceptor.....	7
2.3. Acción promotora de la CCS del daño genético inducido.....	9
2.4. Efecto biológico de la Protoporfirina IX.....	10
2.4.1 El centro metálico cobre y su potencial oxidante en la CCS.....	12
2.5. Importancia de evaluar la actividad de la CCS sobre el daño genético inducido por la Aflatoxina B1.....	13
2.6. Drosophila como sistema de prueba.....	15
2.6.1. Pruebas en células somáticas.....	16
2.6.1.1. Prueba de mutación y recombinación somáticas en el ala.....	16
2.6.2. Pruebas en células germinales.....	18
2.6.2.1. Prueba de letales recesivos ligados al sexo (LRLS) en Drosophila.....	18
2.6.2.2. Pérdida de cromosomas X en anillo.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. HIPOTESIS.....	21
5. MATERIALES Y METODOS.....	22
5.1. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de CCS sobre la frecuencia de mutaciones inducidas por radiación gamma.....	22
5.1.1. Material biológico.....	22
5.1.2. Pretratamiento y tratamiento.....	22
5.1.3. Irradiación.....	22
5.2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de CCS sobre la frecuencia de mutaciones inducidas por AFB1.....	23
5.3. Efecto del pretratamiento con PP-IX en la inducción de mutación por radiación gamma y AFB1.....	23
5.3.1. Preparación de laminillas y análisis de las alas.....	24
5.3.2. Análisis estadístico.....	24
5.4. Efecto de la CCS en el daño inducido por radiación gamma en células germinales.....	25
5.4.1. Prueba de LRLS.....	25
5.4.1.1. Cruza de la P1.....	25
5.4.1.2 Cruza de la F1-P2.....	25
5.4.1.3 Análisis de la F2.....	25
5.4.2. Prueba de la pérdida de cromosoma X en anillo.....	26
5.4.2.1. Pretratamiento.....	26
5.4.2.2. Análisis de los descendientes.....	27
5.4.2.3. Análisis estadístico.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1. Acción de las concentraciones bajas de la CCS sobre la promoción o inhibición	

del daño genético inducido por radiación gamma.....	28
6.2. Acción de las concentraciones bajas de CCS sobre el daño genético inducido por AFB1.....	28
6.3. Efecto de la PP-IX sobre la frecuencia de mutación inducida por radiación gamma y por AFB1.....	29
6.4. Acción de la CCS sobre el daño genético inducido en células germinales	29
7. TABLAS.....	31
8. DISCUSIÓN.....	38
8.1. Acción de las concentraciones bajas de la CCS sobre el daño genético inducido por la radiación gamma.....	38
8.2. Acción de las concentraciones bajas de la CCS sobre la promoción o inhibición del daño genético inducido por la aflatoxina (AFB1).....	41
8.3. Evidencias de la importancia del centro metálico en la capacidad antimutagénica de la CCS.....	42
8.4. Acción moduladora de la CCS del daño inducido por radiación gamma en células germinales	43
9. CONCLUSIONES.....	45
10. INDICE DE ABREVIATURAS.....	46
11. REFERENCIAS.....	48
12. PUBLICACIONES.....	60
12.1 Cruces, M. P., Pimentel, A. E. (2006). Antimutagénesis: La clorofilina ¿Una alternativa? En: Pimentel E., Ortíz A., Breña M. (editores) Tópicos de Genética. UAEM-SMG, pp. 55-75	
12. 2 Cruces, M.P., Pimentel, E., Zimmering, S. (2009). Evidence that low concentrations of chlorophyllin (CHLN) increase the genetic damage induced by gamma rays in somatic cells of <i>Drosophila</i> . <i>Mutat. Res.</i> 679: 84-86	



## RESUMEN

La clorofilina cuprosódica (CCS) puede actuar inhibiendo, y bajo ciertas circunstancias incrementado el daño genético provocado por varios mutágenos. Algunos autores han señalado que el efecto dual de la CCS puede estar relacionado con su concentración. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de las concentraciones bajas (0.03-69 mM) de CCS y comparar su acción con la protoporfirina IX (PP-IX), una porfirina sin centro metálico, sobre el daño inducido por radiación gamma y la aflatoxina B1 con la prueba de mutación y recombinación somáticas en el ala de *Drosophila*. Además y dado que existen muy pocos estudios sobre el efecto de la CCS en células germinales, se evaluó su acción antimutagénica sobre el daño genético inducido por radiación gamma con las pruebas de letales recesivos ligados al sexo y la de pérdida de cromosomas X. Los resultados indicaron que las concentraciones bajas de CCS, incrementaron la frecuencia de mutaciones inducidas por 10 Gy de radiación gamma. Dado que la CCS *per se* no fue genotóxica, es posible que al igual que otras porfirinas con centro metálico, la CCS puede actuar como antioxidante y/o como pro-oxidante, y que cuando su concentración es alta el efecto pro-oxidante se oculta. La falta de actividad antigenotóxica de la PP-IX pone de manifiesto la importancia del centro metálico en la acción inhibidora de la CCS. Adicionalmente, nuestros resultados confirmaron el mecanismo de acción por formación de complejo CCS-AFB1, que evita la absorción/activación metabólica del carcinógeno en el rango de las concentraciones probadas. La CCS no redujo el daño inducido por radiación gamma en las células germinales pero provocó un incremento en la frecuencia de letales recesivos post-meióticos *per se*.

## **ABSTRACT**

Sodium copper chlorophyllin (SCC) may act by inhibiting and, under certain circumstances, increasing the genetic damage caused by several agents. Some authors have suggested that the dual effect of CCS may be related to the concentration. The objective of this investigation was to evaluate the effect of low concentrations of CCS and compare its activity with protoporphyrin IX (PP-IX); a porphyrin without a metal center on the mutagenic action of gamma radiation and aflatoxin B1 in the somatic cells of *Drosophila*. Moreover, as there are very few studies on the effect of CCS in germ cells, we tested its effect on genetic damage induced by gamma radiation using the sex-linked recessive lethal test and the X ring chromosomes loss test. The results indicated that low concentrations of CCS significantly increased the frequency of mutations induced by 10 Gy of gamma radiation. Since CCS was not genotoxic *per se*, it is possible that like other porphyrins with a metal center, CCS could act as an antioxidant or as a pro-oxidant as well; and when the concentration of CCS is higher, the pro-oxidant effect is masked by its antioxidant activity. The lack of activity of PP-IX highlights the importance of the metal center in the inhibitory action of genetic damage by CCS. Additionally, our results confirmed the mechanism of action for the complex formation CCS-AFB1, which prevents the absorption / carcinogen metabolic activation in the range of concentrations tested. CCS did not reduce the damage induced by gamma radiation in germ cells, but it caused an increase in the frequency of post-meiotic recessive lethals *per se*

# **ACCIÓN DE LA CLOROFILINA Y PROTOPORFIRINA SOBRE EL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR RADIACIÓN GAMMA Y AFLATOXINA B1**

## **1. INTRODUCCIÓN**

La gran cantidad de agentes a los que está expuesto el hombre como consecuencia de la industrialización de la sociedad, ha traído como resultado el incremento de padecimientos relacionados con sus efectos. De acuerdo con el Programa Nacional de Salud 2007-2012 (PNS 2007-2012) del gobierno federal, el perfil epidemiológico que caracteriza a nuestro país, está ocupado por las enfermedades crónico-degeneradoras. Actualmente se sabe que el 15 % de las muertes en México, se deben a infecciones comunes, problemas reproductivos y padecimientos asociados a la desnutrición que en conjunto se clasifican bajo el término de rezago epidemiológico; el 11 % corresponden a lesiones accidentales e intencionales y el 73 % restante a padecimientos crónico-degenerativos: cardiovasculares, la diabetes y el cáncer (PNS 2007-2012). Estas constituyen un grupo de situaciones patológicas caracterizadas por un período largo de latencia y de degeneración celular (Izzoti, 2003a). Los resultados de los estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo indican, que en la aparición de estas patologías están involucrados diferentes factores tanto ambientales, como los relacionados con el estilo de vida (Doll y Peto, 1981). Se sabe por ejemplo que actualmente, el 35 % de todos los tipos de cáncer que se presentan en el mundo, están asociados con el consumo del tabaco (Weisburger, 1999).

Ante este panorama surge la necesidad de establecer estrategias encaminadas a reducir la ocurrencia de las enfermedades degenerativas. La primera, consiste en evitar la exposición a aquellos agentes que tienen la capacidad de modificar el material genético y por lo tanto incrementar el riesgo de contraer padecimientos como el cáncer. Sin embargo, en la práctica esto es casi imposible, pues muchos de ellos se encuentran de manera natural en la atmósfera como la radiación ionizante o la ultravioleta y otros son el producto del metabolismo de compuestos inocuos, tales como los nitratos (Jakszyn y González, 2006).

La segunda alternativa consiste en incrementar el consumo de sustancias capaces de prevenir o reducir los efectos adversos de los agentes mutagénicos. Esta estrategia a la que se denomina quimio-prevención, se define como la utilización de productos químicos, sobre todo aquellos de origen natural que provocan la inhibición o la reversión de la mutagénesis o de la carcinogénesis en su estado pre-maligno (Ferguson *et al.*, 2004; De Flora y Ferguson, 2005).

La investigación y el uso de los agentes con propiedades quimio-preventivas, se originó a partir de los estudios que establecieron una relación entre la dieta y la inducción de cáncer. Doll y Peto, (1981) estimaron que los hábitos alimenticios contribuyen con el 70 % de todos los cánceres en el ser humano. Los estudios epidemiológicos de diferentes poblaciones alrededor del mundo, demuestran una correlación directa entre el consumo de carne y las dietas altas en grasa, con algunos tipos de cáncer como el de colon y el de mama, mientras que los individuos que consumen gran cantidad de vegetales exhiben menor riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares o cáncer (Ferguson *et al.*, 2004; Philipot *et al.*, 2009).

Estas correlaciones estimularon los estudios encaminados a evaluar el potencial antimutagénico de diferentes compuestos de origen natural, especialmente de aquellos con poca o nula toxicidad (Odin, 1997a). Los resultados de estas investigaciones, demostraron que muchos de los compuestos que se encuentran en las plantas, desempeñan un papel importante en la disminución del daño genético (Ferguson *et al.*, 2004; Khan y Sinha, 2008). Muchos de estos trabajos, se enfocaron en la exploración del potencial antimutagénico de pigmentos tales como los carotenos y las clorofilas, dada su abundancia en la naturaleza.

## **RESUMEN**

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. La Clorofilina Cupro-Sódica (CCS)

Al utilizar diferentes sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado que la clorofila (Fig. 1a), el pigmento natural de las plantas, así como su derivado semi-sintético la clorofilina (CCS), (Fig. 1b) son capaces de disminuir el daño al ADN inducido por otros agentes (Ferguson y Philipot, 2008). La CCS pertenece a un grupo de compuestos llamados porfirinas que contienen un ión metálico en el centro de la molécula. En el caso de la CCS incluye al  $\text{Cu}^{2+}$  y carece del grupo fitol (una larga cadena hidrofóbica que se encuentra unida al anillo tetrapirrólico por un enlace tipo éster). Se obtiene a partir de la clorofila, mediante el proceso de saponificación, que da como resultado una mezcla de diferentes derivados, los más abundantes son las dihidroporfirinas e4 y e6 además del rodin g7 (Ferruzzi y Blakeslee, 2007). El compuesto final es una sustancia micro cristalina de color verde-azul, que absorbe luz visible entre 440 y 660 nm. Su fórmula química condensada es  $\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{CuN}_4\text{Na}_3\text{O}_6$  y su peso molecular es de 722.13 g/mol (Kephart, 1955).

La CCS, se ha utilizado como colorante en alimentos, cosméticos, cremas faciales y jabones, sin que hasta el presente se haya reportado evidencia de toxicidad, sensibilización de la piel u otros efectos adversos. También se ha usado para el tratamiento de cortadas, quemaduras y abrasiones en la piel, así como para acelerar su curación en forma de ungüento (Chernomorsky *et al.*, 1997).

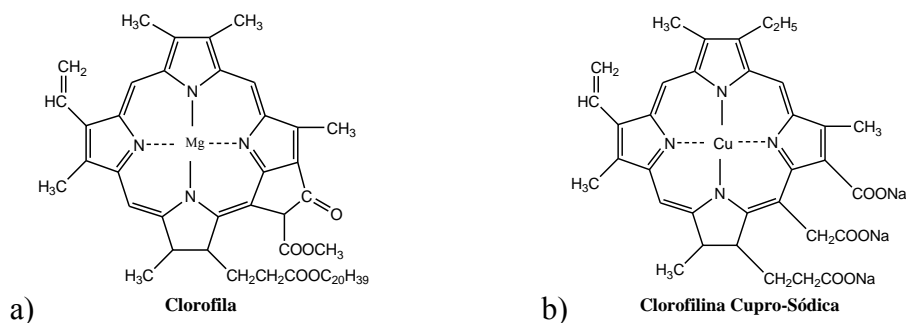


Figura 1. Estructuras de la clorofila (a) y de la CCS (b)

Durante la década de los 80s, los estudios realizados tanto en procariontes como en eucariontes demostraron que la clorofila y la CCS reducen la frecuencia de daño genético inducido por agentes químicos pertenecientes a diferentes familias (Arimoto *et al.*, 1980; Lai *et al.*, 1980; Ong *et al.*, 1986; 1989; Negishi *et al.*, 1989; Madrigal-Bujaidar *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos con roedores y trucha arcoíris, aportaron evidencia de su actividad anticarcinogénica contra agentes como la aflatoxina B1, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas heterocíclicas (Dashwood *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1999).

## **2.2. Mecanismos de acción de la CCS**

Un agente antimutagénico puede ejercer su acción mediante diferentes mecanismos; 1) interceptando al agente mutagénico antes de que alcance su objetivo, 2) evitando la transformación metabólica de los pro-mutágenos ó 3) interfiriendo con la fijación del daño al ADN. De acuerdo con lo anterior, los antimutágenos se clasifican tradicionalmente en dos grandes grupos: desmutágenos y bio-antimutágenos (De Flora y Ferguson, 2005). Los primeros incluyen a aquellos agentes que actúan directamente sobre los mutágenos o sus precursores inactivándolos, ya sea formando complejos, favoreciendo así su remoción, o bien, evitando su interacción con las moléculas de importancia biológica. Los bio-antimutágenos, también conocidos como antimutágenos verdaderos, son aquéllos que están involucrados en el proceso de fijación y/o la reparación del daño genético incrementando por ejemplo la expresión de las enzimas que participan en la reparación (De Flora y Ferguson, 2005).

A partir de los resultados obtenidos con los diferentes sistemas de prueba, se estableció que la CCS actúa esencialmente a través de dos mecanismos de acción: como antioxidante, inactivando a los radicales libres ó mediante la formación de complejos con los mutágenos y carcinógenos o sus precursores (Dashwood, 1997; 2002; Ferruzzi y Blakeslee, 2007).

### **2.2.1. La CCS como antioxidante**

Los organismos aerobios están expuestos continuamente a la acción de los radicales libres, esto debido a que el oxígeno molecular es el aceptor más importante de electrones y puede

dar lugar a la formación de especies reductoras conocidas en conjunto como especies reactivas de oxígeno (ERO) que incluyen radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), súper óxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), peróxido ( $\text{ROO}^\cdot$ ), alcoxilo, singuletes de oxígeno y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Halliwell, 2006). El aumento de estos radicales provoca un estado conocido como estrés oxidante. Uno de los efectos más importantes de la exposición de las células a estos agentes es la peroxidación lipídica que puede causar enfermedades crónico degenerativas como arteroesclerosis, Alzheimer y cáncer (Halliwell y Chirico, 1993).

A pesar de que muchas ERO se generan continuamente durante el metabolismo, ni las células ni sus componentes son dañados, gracias a la acción de las defensas fisiológicas que los inactivan, y que incluyen a las enzimas constitutivas: superóxido dismutasa (Sod), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) (Frei *et al.*, 1992). Además de los antioxidantes enzimáticos, la célula puede hacer frente al estrés oxidante mediante la acción de antioxidantes exógenos. Un antioxidante es difícil de definir, sin embargo, el concepto más aceptado es el establecido por Halliwell (1996) que lo define como cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas comparadas con aquellas de un sustrato oxidable previene o retrasa significativamente la oxidación de éste.

Muchos antioxidantes se encuentran en los alimentos, por lo que sus niveles en el organismo se pueden incrementar al consumirlos. Los compuestos que han sido más ampliamente estudiados por su actividad antioxidante, son el ácido ascórbico, el  $\alpha$  tocoferol y el  $\beta$  caroteno. Estos compuestos presentan una estructura similar, que es responsable de su actividad e incluye al menos un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilo que pueden actuar como donadores de electrones inactivando a los radicales (Simic y Jovanovic, 1988).

Los antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de los ERO ó inactivándolos (Frei *et al.*, 1992). La prevención la ejercen mediante la inactivación de las enzimas que los producen por ejemplo inactivando a la xantina oxidasa y la NADP-H oxidasa. La inactivación la logran interceptando los radicales, una vez formados. Tradicionalmente el término antioxidante se utiliza para describir esta función. Los mejores antioxidantes desde

el punto de vista biológico deben combinar dos funciones: primero tienen que reaccionar con los radicales libres, pero al donar uno de sus hidrógenos, se pueden transformar en radicales, entonces también deben ser capaces de interactuar con compuestos solubles en agua para poder regenerarse y recuperar sus funciones (Rose y Bode, 1993). El mejor ejemplo es el  $\alpha$ -tocoferol, considerado como el antioxidante más eficiente en la fase lipídica, su mecanismo de acción, está relacionado con las propiedades redox de su anillo de cromano, que es capaz de interrumpir la propagación de la peroxidación lipídica (Halliwell, 2006).

Una de las actividades mejor documentadas de la CCS es su acción antioxidante (Odin, 1997b; Bloor *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2004), ya que es capaz de inhibir la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas en la membrana, provocadas tanto por radiación ionizante como por agentes químicos inductores de ERO (Kumar *et al.*, 1999; Kamat *et al.*, 2000), además se observó que restaura las funciones de las enzimas GPX y SOD (Bloor *et al.*, 2000). Kumar *et al.*, (1999) reportaron que el compuesto redujo el número de rupturas dobles inducidas por radiación ionizante en el plásmido pBR322 y también disminuyó la frecuencia de mutaciones puntuales inducidas por los rayos X en *Saccharomyces cerevisiae* (Bronzetti *et al.*, 1992). En *Drosophila*, la CCS mostró ser antimutagénica (Rodríguez-Arnaiz y Zimmering, y 1989) y además disminuyó la frecuencia de mutaciones inducidas por 20 Gy de radiación gamma (Zimmering *et al.*, 1990) y por el trióxido de cromo (Olvera *et al.*, 1993; Cruces *et al.*, 2003). Estos resultados fueron confirmados posteriormente en células de la médula ósea y espermatogonias de ratón (Abraham *et al.*, 1994; Morales y García, 1994; Morales y Mendiola, 1995). Mediante estudios de radiólisis de pulso, se demostró que el pigmento puede capturar los radicales libres que se originan por la interacción de ERO con las biomoléculas (Bloor *et al.*, 2000). Algunos autores han señalado que el potencial antioxidante de la CCS es mayor que el de los antioxidantes:  $\beta$  caroteno,  $\alpha$  tocoferol y ácido ascórbico (Ong *et al.*, 1989).

No existe duda de que las reacciones de óxido-reducción pueden activar promutágenos o procarcinógenos y que los antioxidantes son capaces de interferir en este mecanismo, sin embargo, es importante destacar que los procesos oxidantes son necesarios para la salud y



la supervivencia de los organismos (Zeiger, 2000). Por ejemplo, el radical oxígeno está involucrado en muchas actividades bioquímicas de la célula tales como la transcripción y la transcripción (Uttara *et al.*, 2009). El aumento de la capacidad antioxidante endógena en la dieta o bien farmacéutica, se ha considerado como una forma plausible de evitar la carcinogénesis mediada por las ERO. No obstante, actualmente se sabe que la mayoría de los radicales libres pueden actuar en reacciones de oxidación-reducción reversible (Schwartz, 1996) y algunos de los antioxidantes pueden actuar como tales o como oxidantes, en función de sus estructuras y las condiciones como la concentración de metales de transición (Lee y Lee, 2006). El equilibrio entre evitar la activación de genotóxicos y permitir el flujo libre de electrones en una célula, es materia de investigación.

### **2.2.2. La CCS como interceptor**

El primer mecanismo que se propuso para explicar el efecto antimutagénico de la CCS, fue la capacidad del anillo porfirínico para unirse a compuestos aromáticos, habilidad sugerida a partir de los estudios en que se encontró que la talocianina, compuesto estructuralmente relacionado con las porfirinas, se unía a los compuestos aromáticos con tres o más anillos (Hayatsu, 1995).

Mediante estudios de espectrofotometría se observó que la CCS forma complejos muy estables principalmente con compuestos aromáticos policíclicos que poseen tres o más anillos conjugados (Dashwood y Guo, 1993; Breinholt *et al.*, 1995; 1999; Xu y Dashwood, 1999). Se determinó que la relación estequiométrica de los complejos CCS-mutágeno es de 2:1 en el caso de las aminas heterocíclicas y de 1:1 para el caso de los mutágenos que no tienen un sistema de anillos (Dashwood y Guo, 1993). Los ensayos *in vitro* han sido particularmente favorables para confirmar la formación de estos complejos, utilizando las líneas celulares HL-60 y MCF-7 de humano, se observó que la CCS fue más efectiva reduciendo el daño genético inducido por la mostaza de quinacrina (con estructura aromática) que frente al producido por la mostaza de nitrógeno, estos resultados concuerdan con lo observado en los estudios *in vitro* en el sentido de que la molécula tiene mayor afinidad por las estructuras aromáticas (Ardelt *et al.*, 2001).

Actualmente hay suficiente evidencia que demuestra que la formación de complejos entre la CCS y los mutágenos es responsable del efecto antimutagénico en contra de agentes como la aflatoxina B1 (AFB1), el 2-aminoantraceno (2AA), el benzo [*a*] pireno (BP) la N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG), algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Dashwood *et al.*, 1991; Romert *et al.*, 1992; Arimoto *et al.*, 1993; Dashwood y Guo, 1993; Negishi *et al.*, 1994;1997; Waters *et al.*, 1996) y de determinados agentes alquilantes mono funcionales tanto de acción directa como de aquellos que requieren activación metabólica (Olvera *et al.*, 1997; 2000). La CCS contribuye en la hidrólisis del benzo-a-pireno de forma dosis dependiente, también se observó que la presencia del pigmento inhibió la actividad de algunas enzimas del citocromo P450 (Imai *et al.*, 1986; Yun *et al.*, 1995).

Los estudios moleculares realizados por Dashwood y Guo (1993), revelaron que el grupo amino exo-cíclico que poseen algunos mutágenos, se alinea consistentemente con el grupo ácido de la CCS, lo que sugiere que tanto los puentes de hidrógeno como las interacciones electrostáticas facilitan la formación del complejo. En contraste, si el grupo amino se sustituye por un grupo nitro, cambia la orientación de la estructura química del mutágeno, lo que provoca que la constante de asociación del complejo disminuya.

Además de formar complejos con mutágenos y carcinógenos o sus precursores, la CCS es capaz de unirse químicamente al ADN desnudo de timo de carnero (Tajmir-Riahi *et al.*, 2004). A concentraciones bajas, el pigmento se intercala en las regiones ricas en GC y AT y en una menor forma, entre los grupos fosfato. Otra evidencia de su interacción con el material genético proviene del estudio en que la CCS evitó la fragmentación del núcleo de las células infectadas con un ARN-virus (Botelho *et al.*, 2004). En solución acuosa y en presencia de ADN de doble banda, la CCS interacciona con los tres agentes intercalantes por excelencia: la naranja de acridina, la mostaza de quinacrina y la doxorubicina. Estos hallazgos sustentan el hecho de la CCS como molécula interceptora que compite por el ADN (Pietrazk *et al.*, 2006).

Tomando como base los resultados obtenidos con los diferentes sistemas de prueba, se iniciaron estudios experimentales con seres humanos, estos se llevaron a cabo en la

provincia de Daxin, China en donde un porcentaje significativo de la población padece de cáncer hepático como consecuencia de la exposición a niveles elevados de AFB1 en combinación con la infección por el virus de la hepatitis B. En los individuos a los que se les administró CCS, se encontró una reducción significativa de los aductos AFB-Guanina (Egner *et al.*, 2001; 2003), los resultados confirman que la CCS reduce la bio-disponibilidad de la AFB mediante la formación de complejos.

### **2.3. Acción promotora de la CCS del daño genético inducido**

A pesar que la mayoría de las investigaciones han aportado evidencia de que la CCS es un excelente antimutágeno y/o anticarcinógeno, algunas otras han demostrado que este compuesto puede aumentar el daño al ADN, ya sea el espontáneo o el inducido por otros agentes. La CCS *per se*, puede incrementar la fragmentación del ADN en relación directa con la concentración (Frenzilli *et al.*, 2000) y puede ser tanto citotóxica como genotóxica (Rigonato *et al.*, 2004).

Otros autores han encontrado que a concentraciones bajas, la CCS aumenta la frecuencia de mutaciones inducidas por algunas nitrosaminas en Salmonella (Romert *et al.*, 1992) y por dimetil hidrazina (Dashwood *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Blum *et al.*, 2003). Los estudios con células germinales de Drosophila, indicaron que la CCS disminuyó la frecuencia de letales dominantes post-embrionarios pero incrementó la frecuencia de los embrionarios (Olvera *et al.*, 2003) y en estudios con mamíferos se ha encontrado que la molécula produce efectos teratogénicos (García *et al.*, 2002).

En nuestro laboratorio mediante un protocolo diseñado para determinar la persistencia del efecto antimutagénico de una sola dosis de CCS, se encontró que en el caso de la radiación ionizante el efecto persistía por lo menos 3 días después de concluido el pretratamiento con el pigmento (Pimentel *et al.*, 1999) y en el caso del trióxido de cromo 2 días solamente, después de ese tiempo se observó incremento en la frecuencia de mutación y recombinación somáticas en los individuos que habían sido pretratados con 69 mM de CCS (Cruces *et al.*, 2003). Este comportamiento dual, podría estar relacionado con la concentración de CCS probadas, como ya lo habían señalado algunos autores (Romert *et*

*al.*, 1992, Odin 1997b; Xu *et al.*, 2001). Una posible explicación a nuestros resultados es que cuando la concentración disminuye en la larva debido a su metabolismo y/o excreción de la CCS, el daño genético se incrementa por la falta de moléculas capaces de inhibir el efecto provocado por la radiación ionizante. Sin embargo, hay evidencias que indican que el metabolismo de la CCS podría tener como consecuencia la disociación del anillo porfirínico del cobre, de tal manera que el efecto observado pueda ser debido tanto a las concentraciones bajas como a la acción de los metabolitos de la CCS. Hay evidencias que apoyan la sugerencia anterior, y proviene de los experimentos en los que después de administrar CCS a ratones de laboratorio, se recuperó cobre soluble en su plasma (Harrisson *et al.*, 1954).

#### **2.4. Efecto biológico de la protoporfirina IX**

Las porfirinas son derivados de un compuesto tetrapirrólico original, la porfina (Fig. 2a). Los derivados de ésta, que incluyen a las clorofilas, hemoglobinas y metaloporfirinas están ampliamente distribuidos en la naturaleza y participan en procesos fundamentales como la fotosíntesis, la respiración aeróbica y la activación metabólica de algunos agentes químicos. El hecho de ser compuestos naturales, garantiza en buena medida que no sean tóxicas. De todas las porfirinas las más abundantes son las protoporfirinas, estas contienen 4 grupos metilo, dos de vinilo y dos de ácido propiónico. La PP-IX es la única que se encuentra en la naturaleza: se halla en la hemoglobina, en la mioglobina y en la mayor parte de los citocromos (Lehninger, 1980)

Las porfirinas pueden formar complejos con algunos iones metálicos cuyas valencias sean +2 ó +3, como el magnesio, el hierro y el cobre que se fijan en el centro de la molécula. El complejo permite que dentro de éste puedan fluir libremente electrones.

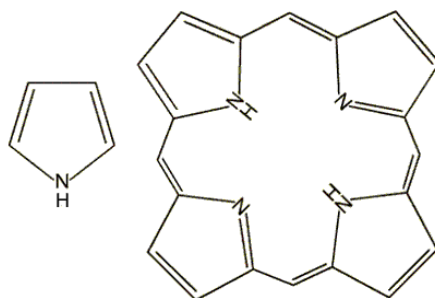


Figura 2. Estructura básica de las porfirinas.

Durante mucho tiempo se pensó que los pigmentos biliares como la biliverdina y la bilirrubina eran productos de desecho de la hemoglobina y que su acumulación en el cuerpo era tóxica. Sin embargo, hay evidencias experimentales que revelan que estos pigmentos poseen una importante actividad antimutagénica y antioxidante (Stoker, 2004; Bulmer *et al.*, 2007, 2008). Actualmente se sabe que son capturadores potentes de radicales peróxido e inhiben la mutagenicidad de compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas heterocíclicas y otros agentes oxidantes. Lo anterior podría explicar porque las personas que tienen niveles elevados de bilirrubina son menos propensas a desarrollar enfermedades cardiovasculares (Hayatsu, 1995).

La protoporfirina IX (PP-IX) es precursor del grupo hemo, de las clorofilas, de la mioglobina y de la mayor parte de los citocromos. Esta porfirina que carece de centro metálico, se produce a partir del ácido aminolevulínico y de la succinil coenzima A a través de la vía de la biosíntesis hemática (Castro y Moreno, 2004).

Algunos estudios aportaron evidencia de que la PP-IX puede actuar como antioxidante y también como prooxidante, por ejemplo, en presencia de luz, estimula la peroxidación lipídica inducida por  $Fe^{+2}$  y ascorbato (Williams *et al.*, 1994) mientras que en la oscuridad la inhibe. Se ha encontrado además incremento en los niveles de SOD, en los ratones tratados con PP-IX, lo que sugiere que este compuesto induce la formación de radicales súper-óxido (Afonso *et al.*, 1999).

La PP-IX se utiliza en la terapia foto-dinámica, que es un procedimiento alternativo para tratar los tumores que son resistentes a la radioterapia o a la quimioterapia (Zawacka-Pankau *et al.*, 2008). Esta terapia está basada en la utilización de compuestos conocidos

como foto-sensibilizadores y luz de una longitud de onda apropiada, en las reacciones de foto-sensibilización, el pigmento absorbe un fotón y pasa del estado basal a un estado excitado, a partir de este punto se pueden producir dos reacciones que se conocen como tipo I y tipo II (Girotti, 1998). En la reacción tipo I el pigmento foto-activado sustrae un  $H^+$  de un ácido graso poli-insaturado (AGP), produciendo de esta manera un radical libre que al reaccionar con el  $O_2$  propaga la peroxidación lipídica. En la reacción tipo II, la energía del pigmento se transfiere al  $O_2$ . Los singuletes de oxígeno resultantes pueden reaccionar directamente con los AGP para producir peróxidos. Durante la peroxidación, cualquier radical peroxilo que choque con otro, puede reaccionar para formar pequeñas cantidades de oxígeno molecular que genera a su vez más peróxidos (Halliwell y Chirico, 1993). Los principales efectos de la peroxidación lipídica son: desarreglo estructural de la membrana, disminución en la fluidez, pérdida de la selectividad en cuanto a los iones que la cruzan, daño a las proteínas, inactivación de los receptores, las enzimas y los canales iónicos todo lo cual produce la muerte celular (Girotti, 1985).

#### **2.4.1 El centro metálico (cobre) y su potencial oxidante en la CCS**

El cobre (Cu) ocupa el lugar 29 en la tabla periódica de los elementos, el ión cuproso (Cu I) tiene completamente lleno el orbital  $d$  con 10 electrones, mientras que el cúprico (Cu II) tiene solamente 9 (Valko *et al.*, 2005). El cobre es uno de los metales esenciales para el funcionamiento de los seres vivos ya que forma parte de las proteínas involucradas en los procesos como la fotosíntesis, la respiración, la formación del tejido conectivo y el metabolismo del hierro, entre otros (Linder y Hazeg-Azam, 1996).

A pesar de que el cobre es un elemento fundamental, su concentración en los sistemas biológicos tiene que estar bien regulada, ya que se ha observado que cuando se encuentra en exceso, facilita la producción de radicales libres y la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Valko *et al.*, 2006), mientras que su deficiencia produce que las células se tornen más sensibles al daño oxidante. Un ejemplo de la importancia de su equilibrio son las enfermedades de Menke y Wilson, que son producidas por defectos en las proteínas encargadas de su transporte causando su acumulación en el hígado y la mucosa intestinal.

Entre los síntomas de estas enfermedades se encuentran hipopigmentación, las alteraciones en el sistema óseo y la degeneración neurológica progresiva (Valko *et al.*, 2005).

El cobre, al igual que otros metales de transición, ya sea en estado cúprico o cuproso es tóxico y mutagénico (Agarwal *et al.*, 1989; Drouin *et al.*, 1996). En presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico ó la GSH, el ión cúprico, se reduce a su forma cuprosa y puede, mediante la reacción de Fenton, catalizar la producción del radical hidroxilo por la descomposición del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Se ha observado que las lesiones al ADN producidas por el cobre son similares a las que se observan después de exponerlo a radiación ionizante, esto es, rupturas y oxidación de las bases (Aruoma *et al.*, 1991; Valko *et al.*, 2006). Dado que la CCS contiene al cobre como centro metálico una posibilidad es que el estrés oxidante provocado por este metal sea el responsable del incremento en la mutagenicidad observada en nuestros trabajos anteriores (Pimentel *et al.*, 2000; Cruces *et al.*, 2003; Cruces y Pimentel 2006).

## **2.5. Importancia de evaluar la actividad de la CCS sobre el daño genético inducido por la aflatoxina B1**

Las aflatoxinas pertenecen a la familia de las difurano-cumarinas, son producidas por *Aspergillus flavus* y otros hongos del mismo género como *A. niger* y *A. parasiticus*. El Instituto Internacional de Investigación en Cáncer, clasificó a los agentes que son carcinogénicos en los seres humanos como de clase I, la aflatoxina B1 (AFB1) (Fig. 3), que está incluida en este grupo es considerada como la más hepatotóxica (Smella *et al.*, 2001; Bedard *et al.*, 2005; Bedard y Massey, 2006).

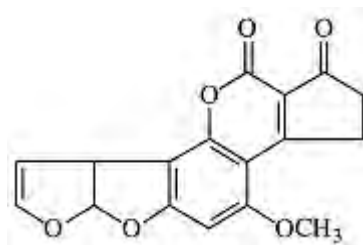


Figura 3. Estructura química de la AFB1.

Los estudios epidemiológicos sustentan que en la etiología del cáncer hepático existe una relación estrecha entre la exposición a AFB1 y la infección por el virus de la hepatitis B (Smella *et al.*, 2001; Bedard *et al.*, 2005; Bedard y Massey, 2006). Se ha documentado que la frecuencia de cáncer hepático como consecuencia de la exposición a AFB1, es muy alta en los países en vías de desarrollo como consecuencia del almacenamiento inadecuado de granos tales como el maíz, el arroz y los cacahuates, entre otros (Egner *et al.*, 2003). El cáncer de hígado es causante de la quinta parte de las muertes provocadas por esta enfermedad. En algunas regiones de Africa contribuye con el 70 % de las muertes, en los Estados Unidos de América, la incidencia del cáncer de hígado es de un caso por cada 100,000 habitantes, mientras que esta cifra se eleva a 100 casos en 100,000 habitantes en algunas zonas rurales de China (Egner *et al.*, 2003; Farombi, 2006). En México se ha reportado la presencia de maíz contaminado con AFB1 principalmente en el estado de Tamaulipas (Guzmán-de Peña, 1997). Este dato es alarmante dado que en nuestro país cada habitante consume en promedio 325 g de tortilla al día.

La AFB1 es un compuesto que requiere transformación metabólica para generar al epóxido reactivo el 8,9-dihidro-8-(N7 guanil)-9-hidroxi aflatoxina. En el ser humano su activación la llevan a cabo los citocromos, principalmente el CYP1A2, la lipooxigenasa y la prostaglandina H (Guengerich, 2003; Bedard y Massey, 2006). El epóxido puede reaccionar con el ADN y formar 2 aductos, el más frecuente es el 8,9-dihidro-8-(N7 guanil)-9-hidroxi aflatoxina B1 (AFB1-N7Gua) y el segundo es la aflatoxina B1-formamido pirimidina (AFB1-FAPY). Mediante experimentos de mutagénesis dirigida, se ha podido establecer que los dos producen los mismos tipos de mutaciones, las más frecuentes son las transversiones G→T (Smela *et al.*, 2001). En los individuos que tienen cáncer hepático se ha encontrado la misma mutación en el codón 249 de la molécula P53 (Smela *et al.*, 2001).

Basados en las evidencias obtenidas con distintos sistemas experimentales, en 2002 se inició un estudio a largo plazo en la provincia de Daxin en China, que es una comunidad rural de 40,000 habitantes localizada cerca del río Yangtze. El objetivo del estudio fue establecer si la CCS podía reducir la cantidad de aductos ADN-AFB. Los primeros



resultados indicaron que el pigmento redujo el número de aductos (Egner *et al.*, 2003). Sin embargo, faltan muchos años para conocer en toda su dimensión el efecto a largo plazo del tratamiento con CCS sobre todo tomando en cuenta, los estudios que señalan que este compuesto puede incrementar el daño genético provocado por otros agentes.

## **2.6. Drosophila como sistema de prueba**

El vasto conocimiento de la biología y de la genética de *Drosophila melanogaster* han hecho de este organismo un excelente candidato para realizar estudios de diferentes aspectos entre los que destacan la genotoxicidad y antigenotoxicidad (Graf *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1999, Andrade *et al.*, 2004). Entre sus ventajas se mencionan las siguientes: ciclo de vida corto, bajo costo de mantenimiento, se cuenta con gran cantidad de mutantes con los que se pueden diseñar diferentes protocolos y ofrece la posibilidad de realizar ensayos tanto en células somáticas como en germinales (Vogel *et al.*, 1999). *Drosophila* posee solamente 4 pares de cromosomas que han sido mapeados. Actualmente se sabe que el genoma de *Drosophila* está compuesto por 180 millones de pares de bases que codifican para 14,000 genes y que tienen su equivalente en el genoma de *Drosophila* el 60 % de los genes que provocan enfermedades en los seres humanos (Adams *et al.*, 2000).

*Drosophila* permite la detección de muchos tipos de eventos mutacionales entre los que destacan: sustituciones de pares de bases; mutaciones génicas con efecto deletéreo; deleciones pequeñas que podrían ser transmitidos como amorfos; re-arreglos cromosómicos como inversiones y translocaciones; no disyunción y recombinación mitótica (Zijlstra, 1987).

Los efectos adversos de muchos mutágenos y carcinógenos, dependen de la formación de intermediarios que reaccionan con los sitios nucleofílicos de los ácidos nucleicos, la formación de estos intermediarios depende de un grupo de enzimas entre las que destacan los citocromos. Una de las principales ventajas de *Drosophila*, es que posee las enzimas necesarias para la activación de los mutágenos por lo que no requiere de la adición de un sistema metabólico externo como en el caso de las pruebas con procariontes (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 2006).

La gran cantidad de marcadores genéticos y los numerosos arreglos cromosómicos que se han inducido por radiación ionizante o por agentes químicos, hacen posible examinar gran cantidad de alteraciones génicas o cromosómicas. Otra de las ventajas del sistema es la posibilidad de emplear varias vías de administración de las sustancias: inhalación, inyección, etc., no obstante la vía oral, es probablemente la más utilizada, además se pueden combinar diferentes protocolos de administración: pretratamiento, post-tratamiento, etc. (Würgler *et al.*, 1984).

## **2.6.1. Prueba en células somáticas**

### **2.6.1.1. Prueba de mutación y recombinación somáticas en el ala**

La prueba consiste en exponer a un agente, larvas heterocigóticas para dos marcadores fácilmente identificables en la cutícula de la mosca adulta. Las larvas poseen grupos de células no diferenciadas conocidas como discos imagales (Fig. 4) y que son tejidos de la larva que dan origen a las estructuras externas del adulto: ojos, antenas alas y patas (Atkins y Mardon, 2009).



Figura 4. Posición de los discos imagales y su relación con las estructuras del adulto.

Las células de los discos imagales están destinadas genéticamente a dividirse un número finito de veces, de tal manera que si se produce una mutación en una de ellas que provoque una alteración del fenotipo, va a dar lugar a un grupo de células mutantes (mancha) fácilmente identificables en el adulto (Würgler *et al.*, 1984; Andrade *et al.*, 2004).

Los heterocigotos, son los descendientes de la cruce entre individuos *mwh /mwh* por *flr<sup>3</sup> / TM3, Ser*. El gen *mwh* (multiple wing hair) se localiza en el cromosoma 3 en posición 0.01 y origina células que poseen de 3 a 5 tricomas. El gen flare (*flr<sup>3</sup>*) cuando se expresa fenotípicamente causa que las cerdas sean más cortas y más anchas en la base, lo que les confiere la forma de flama. Este gen, también se encuentra en el cromosoma 3 en la posición 38.8 y es letal en condición homocigótica, sin embargo para evitarlo, el locus está balanceado con el fragmento cromosómico TM3 que porta inversiones múltiples y está asociado al marcador dominante *Serratia* (*Ser*), que origina alas con bordes aserrados.

Durante los diferentes estadios larvarios y en la etapa temprana de la pupa, cada una de las células de los discos se divide aproximadamente 12 veces. Se ha calculado que cada uno de los discos imagales que dará origen al ala, contiene entre 10 y 30 células al inicio, de tal manera que al final de la metamorfosis cada ala estará constituida por alrededor de 30,000 células. El número total de manchas en un grupo de larvas tratadas con un determinado agente proporciona información cuantitativa de la actividad genotóxica de un compuesto mientras que el tipo de manchas puede revelar los mecanismos genéticos involucrados en la producción de las mismas (Andrade *et al.*, 2004).

Los grupos de células mutantes o manchas, se clasifican de acuerdo con el número de células involucradas en chicas (1 ó 2 células) de fenotipo ya sea *mwh* como *flr* o en grandes, cuando involucran más de 3 células (Graf *et al.*, 1984). La importancia de distinguir entre las manchas chicas o grandes, radica en el hecho de que eventualmente podrían indicar si el agente probado es de acción directa o indirecta. Dependiendo del tipo de células involucradas, las manchas pueden ser sencillas cuando incluyen un sólo gen o bien gemelas cuando en la misma mancha coexisten los dos tipos celulares (Andrade *et al.*, 2004).

Las manchas *mwh* o *flr* (chicas o grandes) pueden originarse a partir de una mutación puntual o una delección en el alelo silvestre de cada uno de los locus. La recombinación mitótica en la región entre *mwh* y *flr<sup>3</sup>* da lugar a células con fenotipo *mwh*, mientras que si el intercambio ocurre entre *flr<sup>3</sup>* y el centrómero, se producirá una mancha gemela.

## **2.6.2. Pruebas en células germinales**

Es importante hacer notar, que existen muy pocos estudios del efecto de la CCS sobre el daño genético inducido en las células germinales, aún cuando se sabe que las alteraciones causadas en este tipo de células pueden trascender a las generaciones futuras. De los pocos estudios que existen se pueden mencionar el de Olvera *et al.* (2003) quienes reportaron que el pretratamiento con 69 mM (en trabajos anteriores 5 %) de CCS incrementó los letales dominantes provocados por radiación gamma en *Drosophila* y el realizado por García *et al.* (2002) quienes encontraron que la CCS administrada a las hembras de ratón preñadas, produjo la pérdida total de las camadas en forma dosis-dependiente. También reportaron que la inyección de CCS indujo malformaciones externas y esqueléticas. En contraste, Morales y Mendiola (1995) describen que la CCS disminuyó 100 % la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en espermatogonias de ratón.

### **2.6.2.1. Prueba de letales recesivos ligados al sexo (LRLS) en *Drosophila***

Esta es una prueba en la que los cambios genéticos en condición hemicigótica y homocigótica causan la muerte de un organismo en cualquier etapa del desarrollo. Estos cambios genéticos denominados letales recesivos pueden inducirse en todos los cromosomas, sin embargo por razones prácticas se trabaja con los que se encuentran en el cromosoma X, pues la detección de los letales se realiza en sólo dos generaciones (Würgler *et al.*, 1984). El cromosoma X constituye el 20 % del genoma total de *Drosophila* e incluye aproximadamente 1000 bandas constituyendo un gran número de loci que pueden mutar y convertirse en letales recesivos (Würgler *et al.*, 1984).

El criterio para determinar la presencia de un letal es muy objetivo y está basado en la recuperación de un fenotipo determinado. La prueba consiste en exponer al macho que porta un solo cromosoma X a un agente mutagénico y observar el daño en sus descendientes machos de la F2. Debido a que el cromosoma X está en condición hemicigótica y el cromosoma Y no porta alelos silvestres que supriman su expresión fenotípica; esta prueba se basa en el hecho de que la mitad de los descendientes machos de la F2 portadores de genes letales morirán.

Un prerrequisito para este ensayo, es prevenir el entrecruzamiento de los cromosomas X de la hembra y el del macho portador del letal, debido a que la transferencia de éste, del cromosoma X paterno al materno, podría reparar el daño por recombinación genética y devolver la viabilidad al macho. Para ello se utiliza el cromosoma *Base* que contiene una combinación de dos inversiones que abarcan por completo al cromosoma X, impidiendo el intercambio entre ambos cromosomas. El gen *Bar*, reduce el número de omatidias de los ojos en condición homocigótica y en condición heterocigótica produce ojos con forma de riñón.

#### **2.6.2.2. Pérdida de cromosomas X en anillo**

Con la prueba de la pérdida del cromosoma X en anillo, se detectan esencialmente rompimientos cromosómicos (Vogel *et al.*, 1979; Zimmering, 1981). La pérdida de un cromosoma se revela mediante la recuperación de un machos XO en la F1, mientras que la deleción de los segmentos del cromosoma Y, se manifiesta por la ausencia de los marcadores que se introducen en este cromosoma. El cromosoma X en anillo es más sensible al efecto de la radiación ionizante y a los agentes químicos, comparado con el cromosoma en varilla. Uno de los mecanismos involucrados en la pérdida total del cromosoma X es una ruptura cromosómica ya sea simple o doble (Vogel y Natarajan, 1979; Zimmering, 1981; Zijilstra y Vogel, 1988).

La pérdida parcial de los segmentos del cromosoma Y, se detecta por la falta de los marcadores que se encuentran en los brazos cortos o largos de ese cromosoma. En las células post-meióticas, la pérdida parcial del cromosoma Y se puede producir por deleción y la subsecuente reunión de los extremos libres o mediante una translocación (Valencia *et al.*, 1984).

Una de las ventajas de esta prueba es que requiere de una sola generación y consiste en exponer un macho que es portador de un cromosoma X en anillo, a la acción de un agente mutagénico. Aun cuando el daño puede ser reparado después de la fertilización por los mecanismos presentes en el óvulo, con esta prueba se aprovecha el hecho de que en *D. melanogaster* los espermatozoides ya no poseen mecanismos de reparación (Sankaranarayanan y Sobels, 1976). Las grandes diferencias entre los fenotipos normal y el

de los descendientes excepcionales, permiten un análisis objetivo, rápido y preciso de los descendientes (Zimmering, 1981). El cromosoma Y del macho está modificado por la incorporación de los genes  $B^s$  y  $y^+$  en los brazos largo y corto respectivamente (Zimmering, 1975).

### **3. OBJETIVOS**

3.1. Evaluar el efecto de concentraciones bajas de la CCS en la acción promotora o inhibidora de daño genético inducido por la radiación gamma y la aflatoxina B1 en células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

3.2. Evaluar si el centro metálico de la CCS contribuye en su acción promotora del daño genético inducido por radiación gamma en células somáticas *Drosophila melanogaster*.

3.2.1. Determinar la acción inhibidora de la protoporfirina IX, un análogo de la CCS sin centro metálico, sobre el daño genético inducido por radiación gamma y la aflatoxina B1 en células somáticas.

3.3. Evaluar la acción antmutagénica de la CCS sobre el daño genético inducido por la radiación gamma en células germinales de *Drosophila melanogaster*.

### **4.0 HIPOTESIS**

La CCS tiene un efecto dual inhibiendo o incrementando el daño genético inducido por algunos agentes mutagénicos. Si la concentración de CCS disminuye en el individuo debido a su metabolismo y/o excreción, el daño genético se incrementará tanto en células somáticas como en germinales por la falta de moléculas del pigmento capaces de inhibir la acción de los mutágenos y/o por el incremento de los productos de su disociación: el anillo porfirínico y el cobre.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de CCS sobre la frecuencia de mutaciones inducidas por radiación gamma**

Para realizar esta investigación la prueba que se empleó fue la de mutación y recombinación somáticas en el ala de *Drosophila*, SMART por sus siglas en inglés (Andrade *et al.*, 2004).

#### **5.1.1. Material biológico**

Las cepas utilizadas en esta investigación fueron *mwh/mwh* y *flr<sup>3</sup> / TM3; Ser* (Lindsley y Zimm, 1985). Se aislaron hembras vírgenes de la cepa *mwh/mwh* durante una semana y se dejaron madurar de 2 a 3 días en medio de cultivo estándar con una pequeña cantidad de levadura fresca. Posteriormente, se cruzaron con machos de la cepa *flr<sup>3</sup> / TM3, Ser* de la misma edad, en proporción 2:1 en frascos de 250 ml. De esta cruce se colectaron los huevos depositados durante 2 h para homogeneizar al máximo la edad de los individuos y éstos se incubaron en condiciones de laboratorio durante 72 horas hasta obtener larvas de 48 h correspondientes al segundo estadio larvario. Estas larvas se separaron del medio por diferencia de densidad con una solución de sacarosa al 20 %.

#### **5.1.2. Pretratamiento y tratamiento**

Las larvas se dividieron en diferentes grupos, uno de ellos se pretrató con una solución de sacarosa al 5 % (grupo testigo) y los demás con CCS disuelta en una solución de sacarosa al 5 %, en un rango de concentraciones desde 0.03 hasta 69 mM. El pretratamiento se realizó vía oral durante 24 h en frascos de 250 ml con papel filtro (Whatman No. 2) saturado con 3.5 mL de la solución correspondiente.

#### **5.1.3. Irradiación**

Después de concluido el pretratamiento, las larvas se enjuagaron con agua corriente para eliminar el exceso de CCS. Las larvas correspondientes a cada uno de los grupos se irradió o no, con 10 Gy de radiación gamma y de esta manera se establecieron dos lotes: uno



irradiado y el otro no, para determinar de esta manera el efecto de las diferentes concentraciones de CCS *per se*.

La irradiación se llevó a cabo colocando a las larvas en tubos homeopáticos (2.5 cm de diámetro y 3 cm de alto) con un círculo de papel filtro húmedo (Whatman No. 2) cubierto con un tapón de poliuretano. Se utilizó el irradiador Gamma-Cell Co60 (Nordion, Canada) con una razón de dosis en la fecha de la exposición de 121.127 Gy/h. Una vez irradiadas, las larvas se pusieron en tubos de polietileno con 1.5 g de medio de cultivo sintético para *Drosophila* (Formula 4-24 Carolina Biological Suply Co.) hidratado con 5 ml de agua destilada. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 25 °C y 60 % de humedad relativa hasta que los organismos concluyeron su desarrollo.

## **5.2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de CCS sobre la frecuencia de mutaciones inducidas por AFB1**

Para determinar el efecto de las distintas concentraciones de CCS, las larvas se pretrataron como se describió anteriormente. Una vez concluido el pretratamiento, se colocaron en tubos homeopáticos con 1.5 g de medio sintético (Fórmula 4-24, Carolina Biological Suply Co.) y 5 ml de una solución de AFB1 (0.38 mM).

## **5.3. Efecto del pretratamiento con PP-IX en la inducción de mutación por radiación gamma y AFB1**

Para evaluar la contribución del centro metálico de la CCS en su acción promotora del daño genético inducido por radiación gamma, se formaron dos grupos de larvas, uno de ellos se pre-trató con una solución de 69 mM de PP-IX y el otro con 0.01mM de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) durante 24 h. La concentración de cobre se calculó con base en la cantidad de este metal presente en 69 mM de CCS. Las larvas de cada pretratamiento se subdividieron para ser tratadas o no, con 10 Gy de radiación gamma. Para determinar el efecto de la PP-IX en la genotoxicidad de la AFB1 se siguió el mismo procedimiento descrito para el pretratamiento con CCS.

### 5.3.1. Preparación de laminillas y análisis de las alas

Cuando los adultos emergieron se fijaron en alcohol al 70 %. Las alas de los descendientes *mwh +/ + flr<sup>3</sup>* se disectaron utilizando pinzas entomológicas del No. 5 y se realizaron preparaciones fijas con solución de Faure (goma arábica, glicerol, hidrato de cloral y agua) (Graf *et al.*, 1984); se dejaron secar de 3 a 5 días y después se les colocó el cubreobjetos.

Para realizar el análisis microscópico de las alas se examinan las regiones dorsal y ventral, en un microscopio óptico a 400X. De cada una de las alas analizadas se registra el número y el tipo de manchas encontradas.

Para facilitar el análisis se registran las manchas observadas en las diferentes regiones en que está dividida el ala (Fig. 5).

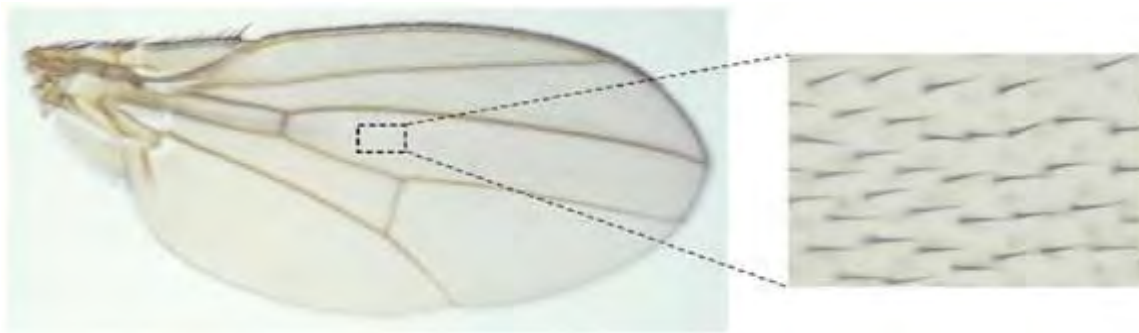


Figura 5. El ala de *Drosophila* y las regiones que la constituyen, en la figura se muestra el fenotipo silvestre de las células del ala.

### 5.3.2. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando la prueba de ji cuadrada para proporciones con un nivel de significancia de  $P \leq 0.5$ .

## **5.4. Efecto de la CCS en el daño inducido por radiación gamma en células germinales**

### **5.4.1. Prueba de LRLS**

Para realizar esta prueba, se pretrataron machos de la línea Canton-S de tres días de edad durante 24 h con una solución de 69 mM de CCS disuelta en sacarosa al 5%. Después de 24 h, la mitad de los machos tratados con Sac ó CCS se irradiaron con 20 Gy de rayos gamma, la irradiación se realizó en tubos homeopáticos sin medio de cultivo. Las condiciones de irradiación fueron idénticas a las de los experimentos con células somáticas.

#### **5.4.1.1. Cruza de la P1**

Después de la irradiación, cada uno de los machos se colocó en un tubo homeopático con 3 hembras vírgenes de genotipo *Basc/Basc* y se rotularon para su seguimiento a través de las diferentes camadas. Cada tres días, los machos fueron transferidos a tubos nuevos con alimento y con otras tres hembras vírgenes; este procedimiento se repitió dos veces más para monitorear, en la camada I espermatozoides, en la II células meióticas y en la III espermatogonias .

#### **5.4.1.2 Cruza de la F1-P2**

Cuando emergió la F1, los organismos se anestesiaron y se examinaron cuidadosamente para cruzarlos entre sí individualmente en tubos homeopáticos de 9.5 cm de alto por 2.5 de diámetro con alimento normal. Cada hembra de la F<sub>1</sub> representa un cromosoma X proveniente del macho P1 tratado.

#### **5.4.1.3 Análisis de la F2**

Entre el treceavo y catorceavo día después de la cruza, se examinó cada tubo bajo el microscopio estereoscópico y se registró el número de letales. Los tubos en los que se presentaron los dos tipos de macho (ojos redondos y ojos en barra) se consideraron como normales, mientras que la ausencia de machos con ojos redondos fue evaluado como un evento letal. La frecuencia de letales se obtuvo dividiendo el número de éstos entre la cantidad total de cromosomas probados en cada camada, y se expresó como porcentaje.

Los criterios que se siguieron para considerar a un letal fueron los establecidos por Würigler *et al.* (1984) y son los siguientes: 1) un tubo con al menos 2 machos de tipo silvestre se considera como normal, 2) para considerar a un letal, tiene que haber en el tubo al menos 9 machos de ojos barra y un mínimo de 20 descendientes. Los tubos con poca descendencia se sembraron para luego ser revisados en la F3.

## 5.4.2. Prueba de la pérdida de cromosoma X en anillo

### 5.4.2.1. Pretratamiento

Las pruebas para determinar la pérdida de cromosomas, se realizan tratando al macho con el agente genotóxico en virtud del gran número de células germinales que producen los machos además de la capacidad de detectar rupturas en las células post meióticas. Se utilizan machos que portan un cromosoma X en anillo  $X^{c2}$  marcado con los mutantes recesivos *y* (yellow) *f* (forked) y un cromosoma especial Y:  $Bs Y y^+$  que porta el marcador dominante  $Bs$  en el brazo largo y el alelo silvestre  $y^+$  en el brazo corto. La pérdida del cromosoma X se detecta mediante la recuperación de machos XO en la F1, mientras que la pérdida de los segmentos del cromosoma Y se evidencia por la ausencia de marcadores incluidos en el cromosoma Y (Zimmering, 1975). En la figura 6 se presenta el genotipo de los progenitores y los descendientes normales y los anormales.

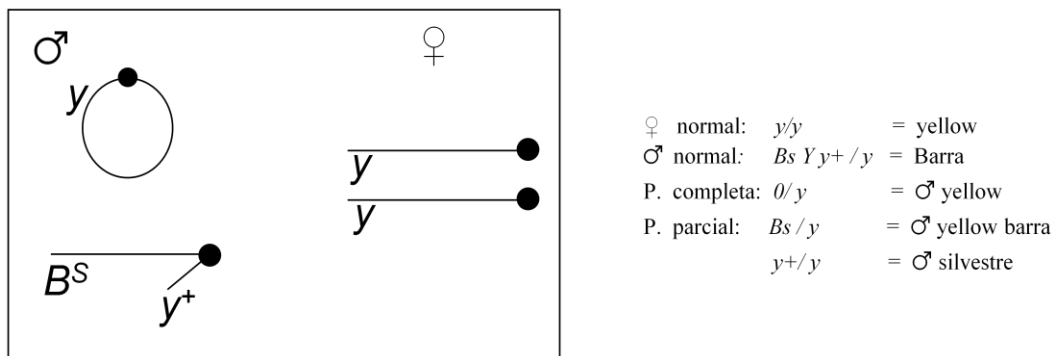


Figura 6. Genotipo y fenotipo de los progenitores utilizados para realizar la prueba de pérdida de cromosomas, así como los descendientes normales y los anormales.

En el protocolo 1, se cruzaron hembras vírgenes de la cepa  $y/y$  con los machos  $X^{c2}, y/B^S Y y^+$ , los machos se alimentaron durante 24 h con una solución de 69 mM de CCS, una vez concluido el pretratamiento se irradiaron con 20 Gy de rayos gamma. Se establecieron 4 grupos:

- 1.- Machos tratados con sacarosa + hembras sin tratar.
- 2.- Machos tratados con CCS + hembras sin tratar.
- 3.- Machos tratados con sacarosa e irradiados con 20 Gy + hembras sin tratar.
- 4.- Machos tratados con CCS e irradiados con 20 Gy + hembras sin tratar.

Los machos se cruzaron individualmente con tres hembras vírgenes  $y/y$ , de 3 días de edad, se siguió el mismo sistema de camadas que en el ensayo de LRLS.

En el protocolo 2, el pretratamiento con CCS administró a las hembras que se cruzaron también en proporción 3:1 con los machos que se habían irradiado o no con 20 Gy de rayos gamma. En este caso los grupos establecidos fueron los siguientes:

1. Hembras tratadas con sacarosa + machos sin irradiar.
2. Hembras tratadas con CCS + machos sin irradiar.
3. Hembras pretratadas con sacarosa + machos irradiados.
4. Hembras pretratados con CCS + machos irradiados.

#### **5.4.2.2. Análisis de los descendientes.**

Para cada uno de los tubos correspondientes a cada macho probado, se contó el número y el tipo de descendientes separando los machos y las hembras para determinar de esta manera la proporción de organismos normales, así como la frecuencia de pérdidas tanto completas como parciales.

#### **5.4.2.3. Análisis estadístico**

El análisis de los resultados se realizó utilizando la prueba de ji cuadrada para proporciones con un nivel de significancia de  $P \leq 0.5$ .

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Acción de las concentraciones bajas de la CCS sobre la promoción o inhibición del daño genético inducido por radiación gamma**

Para evaluar el efecto de las concentraciones bajas de la CCS se probó un rango de once concentraciones desde 0.03 hasta 69 mM. En la Tabla 1 se muestran las frecuencias de los tres tipos de manchas: chicas, grandes y gemelas obtenidas con las diferentes concentraciones. Las columnas encabezadas como valores de  $P$ , indican el nivel de significancia obtenido con la prueba de ji cuadrada de la comparación entre el grupo de larvas tratadas con sacarosa (testigo) *versus* cualquier grupo tratado con CCS. La prueba indicó que ninguna de las concentraciones de CCS, modificó la frecuencia basal de manchas.

En la Tabla 2, se presentan las frecuencias de manchas obtenidas por el pre-tratamiento a las larvas con las distintas concentraciones de CCS y luego irradiadas con 10 Gy de rayos gamma. Se encontró que la concentración de 69 mM de CCS redujo significativamente todos los tipos de manchas. No se hallaron diferencias significativas con las concentraciones entre 8.6 y 35 mM. La concentración de 4.3 incrementó todos los tipos de manchas excepto las chicas mientras que la de 2.2 mM aumentó significativamente solo las manchas totales. Por último, las cuatro concentraciones más bajas: 0.03 a 1.1 mM, elevaron significativamente la frecuencia de todas las categorías de manchas.

### **6.2. Acción de las concentraciones bajas de CCS sobre el daño genético inducido por la aflatoxina (AFB1)**

Para evaluar el efecto de las concentraciones bajas de la CCS sobre la genotoxicidad inducida por la AFB1 se probó el mismo rango de concentraciones que en los experimentos con radiación y una sola concentración de AFB1: 0.38 mM. Las frecuencias de manchas obtenidas de estos experimentos se muestran en la Tabla 3, se puede observar que la CCS redujo significativamente la acción de la AFB1 en todo el rango de concentraciones probadas ( $P < 0.001$ ). El análisis estadístico no indicó efecto relacionado con la dosis de

CCS ya que las concentraciones de 0.03 y 4.5mM redujeron significativamente todos los tipos de manchas en cambio de 0.25 a 1.1 mM de CCS sólo disminuyeron la frecuencia de manchas chicas. A partir de la concentración de 2.2 mM se observó una reducción significativa de las manchas chicas y grandes hasta alcanzar un descenso del 32 % en la frecuencia total con la concentración más alta (69mM) de CCS. Destaca el hecho de que no se notó efecto de la CCS sobre las manchas gemelas en la mayoría de las concentraciones probadas excepto con 0.03 y 4.5 mM de CCS.

### **6.3. Efecto de la PP-IX sobre la frecuencia de mutación inducida por radiación gamma y por AFB1**

En la Tabla 4, están los resultados obtenidos por el pretratamiento con la PP-IX y  $\text{CuCl}_2$  sobre el daño genético provocado por la radiación gamma. El análisis estadístico indicó que por sí sola, la PP-IX, no modificó la frecuencia basal de manchas, la comparación entre el grupo tratado sólo con 10 Gy contra el grupo tratado con PP-IX+10 Gy, indicó que la frecuencia de manchas grandes se incrementó significativamente en este último ( $P \leq 0.01$ ) repercutiendo en un aumento en la frecuencia de manchas totales ( $P < 0.05$ ). En el caso del  $\text{CuCl}_2$ , se observó que por sí mismo tampoco modificó la frecuencia basal de manchas. En combinación con la radiación gamma el  $\text{CuCl}_2$  redujo la frecuencia de manchas grandes y totales.

La Tabla 5 muestra las frecuencias de manchas obtenidas por el tratamiento de PP-IX en combinación con AFB1, el análisis estadístico indicó que las diferentes categorías de manchas no se modificaron con la PP-IX (69 mM) pero las manchas grandes se incrementaron en combinación con la AFB1 (0.038 mM).

### **6.4. Acción de la CCS sobre el daño genético inducido en células germinales**

La tabla 6 muestra los porcentajes de LRLS inducidos por el tratamiento con 20 Gy después de pretratar a los machos con 69 mM de CCS. El análisis estadístico indicó que la CCS produjo un aumento de los letales inducidos por radiación ionizante ( $P < 0.01$ ) en

espermatozoides. Mientras que la CCS *per se* aumentó significativamente los LRLS en las dos primeras camadas monitoreadas ( $P < 0.01$ ).

Los resultados sobre la frecuencia de pérdidas completas y parciales, cuando el pretratamiento se administró a los machos se presentan en la tabla 6 y en la 7 los resultados obtenidos cuando del pretratamiento lo recibieron las hembras. En estas tablas aparece el número de cromosomas probados en cada una de las tres camadas (N) así como el número y la frecuencia de pérdidas completas del cromosoma X en anillo (PC), parciales de segmentos del cromosoma Y (PP) y totales (PT). La CCS por sí misma no modificó la frecuencia de pérdidas de cromosomas, estos resultados no indicaron ningún efecto protector de la CCS, con ninguno de los dos protocolos empleados.



## 7.0. TABLAS

**Tabla 1. Frecuencia de todos los tipos de manchas inducidas en larvas de 48 h por el tratamiento con diferentes concentraciones de CCS**

MANCHAS													
Tratamiento	No. de Alas	Chicas <i>mwh + flr<sup>3</sup></i>		Grandes <i>mwh + flr<sup>3</sup></i>		Gemelas		Totales		Valores de <i>P</i>			
CCS (mM)		#	m/a	#	m/a	#	m/a	#	m/a	Chicas.	Grandes	Gemelas	Totales
0.00	480	106	0.22	14	0.03	1	0.002	121	0.25				
0.03	240	57	0.24	5	0.02	4	0.02	66	0.27	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
0.12	240	43	0.18	13	0.05	0	0.00	56	0.23	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
0.25	240	43	0.18	4	0.02	5	0.02	52	0.22	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
1.1	240	46	0.19	1	0.004	0	0.00	47	0.20	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
2.2	240	41	0.17	6	0.02	0	0.00	47	0.20	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
4.3	240	43	0.18	3	0.01	1	0.001	47	0.20	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
8.6	240	50	0.21	2	0.01	0	0.00	52	0.22	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
17	240	46	0.19	5	0.02	1	0.004	52	0.22	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
35	240	50	0.21	6	0.02	0	0.00	56	0.23	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>
69	240	41	0.17	7	0.03	1	0.004	49	0.20	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>

Los símbolos # y m/a corresponden al número y a la frecuencia de manchas por ala respectivamente. Las columnas encabezadas por valores de *P*, reflejan la probabilidad de la diferencia entre cada una de las concentraciones de CCS y el grupo testigo.

**Tabla 2. Frecuencia de todos los tipos de manchas inducidas en larvas de 48 h por el pretatamiento con diferentes concentraciones de CCS y tratadas con 10 Gy de radiación gamma**

MANCHAS														
Tratamiento CCS+Gammas		No. de Alas	Chicas <i>mwh + flr<sup>3</sup></i>		Grandes <i>mwh + flr<sup>3</sup></i>		Gemelas		Totales		Valores de <i>P</i>			
(mM)	10 Gy		#	m/a	#	m/a	#	m/a	#	m/a	Chicas	Grandes	Gemelas	Totales
0.00	+	240	61	0.25	114	0.47	9	0.04	184	0.77				
0.03	+	240	96	0.40	218	0.91	55	0.23	369	1.54	↑<0.01	↑<0.001	↑<0.001	↑<0.001
0.12	+	240	103	0.43	182	0.76	41	0.17	326	1.36	↑<0.01	↑<0.01	↑<0.001	↑<0.001
0.25	+	240	94	0.39	170	0.71	19	0.08	283	1.18	↑<0.02	↑<0.01	<i>n.s.</i>	↑<0.001
1.1	+	240	108	0.45	161	0.67	24	0.10	293	1.23	↑<0.001	↑<0.01	↑<0.01	↑<0.001
2.2	+	240	77	0.32	130	0.54	14	0.06	221	0.92	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	↑<0.05
4.3	+	240	67	0.28	163	0.68	22	0.09	252	1.05	<i>n.s.</i>	↑<0.05	↑<0.05	↑<0.01
8.6	+	240	86	0.36	118	0.49	1	0.004	205	0.85	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
17	+	240	64	0.27	116	0.48	3	0.01	183	0.76	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
35	+	240	79	0.33	115	0.48	0	0.00	194	0.81	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	↓<0.05	<i>n.s.</i>
69	+	240	27	0.11	57	0.24	1	0.004	85	0.35	↓<0.001	↓<0.001	↓<0.05	↓<0.001

Los símbolos # y m/a corresponden al número y a la frecuencia de manchas por ala respectivamente. Las columnas encabezadas por valores de *P*, reflejan la probabilidad de la diferencia entre cada una de las concentraciones de CCS y el grupo testigo (0.0). La dirección de las flechas indica: ↑ incremento ó ↓ inhibición.

**Tabla 3. Frecuencia de todos los tipos de manchas inducidas en larvas de 48 h por el pretratamiento con diferentes concentraciones de CCS y tratadas con 0.038 mM de AFB1**

MANCHAS													
Tratamiento (mM)	No. de Alas	Chicas <i>mwh + flr</i> <sup>3</sup>		Grandes <i>mwh + flr</i> <sup>3</sup>		Gemelas		Totales		Valores de <i>P</i>			
		#	m/a	#	m/a	#	m/a	#	m/a	Chicas	Grandes	Gemelas	Totales
CCS + AFB1 0.38													
0.0 +	120	202	1.68	131	1.51	34	0.38	370	3.08				
0.03 +	120	117	0.97	168	1.40	18	0.15	303	2.52	<0.001↓	<0.05↓	<0.05↓	<0.01 ↓
0.12 +	120	57	0.47	183	1.52	39	0.32	279	2.32	<0.001↓	<0.01↓	n.s.	<0.001↓
0.25 +	120	63	0.52	123	1.02	42	0.35	228	1.90	<0.001↓	n.s.	n.s.	<0.001↓
0.5 +	120	75	0.60	128	1.07	40	0.33	243	2.02	<0.001↓	n.s	n.s.	<0.001↓
1.1 +	120	90	0.75	138	1.16	39	0.32	267	2.22	<0.001↓	n.s.	n.s.	<0.05 ↓
2.2 +	120	115	0.96	72	0.60	31	0.26	218	1.82	<0.001↓	<0.001↓	n.s.	<0.001↓
4.5 +	120	96	0.80	63	0.53	13	0.11	172	1.43	<0.001↓	<0.001↓	<0.01↓	<0.001↓
8.6 +	120	105	0.88	75	0.63	28	0.23	208	1.73	<0.001↓	<0.001↓	n.s.	<0.001↓
17 +	120	98	0.82	81	0.68	29	0.24	208	1.73	<0.001↓	<0.001↓	n.s.	<0.001↓
34 +	120	146	1.22	88	0.73	26	0.22	260	2.17	<0.01 ↓	<0.001↓	n.s.	<0.001↓
69 +	120	116	0.97	112	0.93	23	0.19	251	2.09	<0.001↓	<0.001↓	n.s.	<0.001↓

Los símbolos # y m/a corresponden al número y a la frecuencia de manchas por ala respectivamente. Las columnas encabezadas por valores de *P*, reflejan la probabilidad de la diferencia entre cada una de las concentraciones de CCS y el grupo testigo (0.0). La dirección de las flechas ↓ indica inhibición.

**Tabla 4. Frecuencia de todos los tipos de manchas inducidas en larvas de 48 h pretratadas con 69 mM de PP-IX y tratadas con 10 Gy de radiación gamma.**

MANCHAS													
Tratamiento	No. de Alas	Chicas		Grandes		Gemelas		Totales		Valores de <i>P</i>			
		<i>mwh + flr<sup>3</sup></i>		<i>mwh + flr<sup>3</sup></i>						Chicas	Grandes	Gemelas	Totales
(mM) + 10 Gy		#	m/a	#	m/a	#	m/a	#	m/a				
SAC	120	29	0.24	1	0.01	0	0.00	30	0.25				
(0.01) CuCl <sub>2</sub>	120	12	0.01	6	0.05	11	0.09	29	0.24				
(69) PP-IX	120	24	0.20	0	0.00	0	0.00	24	0.20				
SAC + $\gamma$	120	31	0.26	54	0.45	4	0.03	89	0.74				
PP-IX + $\gamma$	120	35	0.29	89	0.74	2	0.02	126	1.05	n.s.	↑<0.01	n.s.	↑<0.05
CuCl <sub>2</sub> + $\gamma$	120	23	0.19	23	0.19	1	0.01	47	0.39	n.s.	<0.001↓	n.s.	<0.001↓

Los símbolos # y m/a corresponden al número y a la frecuencia de manchas por ala respectivamente. Las columnas encabezadas por valores de *P*, reflejan la probabilidad de la diferencia entre cada una de los tratamientos y el grupo testigo (10 Gy). La dirección de las flechas indica: ↑ incremento ó ↓ inhibición.

**Tabla 5. Frecuencia de todos los tipos de manchas inducidas en larvas de 48 h pretratadas con 69 mM de PP-IX y tratadas con 0.038 mM de AFB1.**

MANCHAS													
Tratamiento	No. de Alas	Chicas $mwh + flr^3$		Grandes $mwh + flr^3$		Gemelas		Totales		Valores de $P$			
		#	m/a	#	m/a	#	m/a	#	m/a	Chicas	Grandes	Gemela	Totales
SAC	480	106	0.22	14	0.03	1	0.002	121	0.25				
PP-IX	120	24	0.20	0	0.00	0	0.00	24	0.20				
AFB1	120	166	1.38	121	1.00	28	0.23	316	2.63				
PP-IX+AFB1	120	146	1.22	162	1.35	44	0.37	352	2.93	n.s.	↑ < 0.05	n.s.	n.s.

Los símbolos # y m/a corresponden al número y a la frecuencia de manchas por ala respectivamente. Las columnas encabezadas por valores de  $P$ , reflejan la probabilidad de la diferencia entre el tratamiento con AFB1 y el grupo PP-IX+AFB1. La dirección de las flechas ↑ indica promoción.

**Tabla 6. Porcentaje de LRLS inducidos por 20 Gy de radiación gamma después de pre-tratar a los machos con 69 mM de CCS**

Tratamiento	No. ♂	No. de cromosomas probados por camada			No. y porcentaje de letales por camada						Total de letales		
		I	II	III	n	%	n	%	n	%	n	%	
SAC	179	3260	2960	2152	22	0.67	16	0.54	17	0.79	8372	55	0.66
CCS	183	3537	3024	2212	41	1.16*	33	1.09*	18	0.81	8773	92	1.05**
SAC+20 Gy	79	1191	867	576	45	3.8	32	3.7	26	4.5	2634	103	3.91
CCS+20 Gy	76	1169	1047	781	75	6.4**	40	3.8	25	3.2	2997	140	4.67

Significativo \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

**Tabla 7. Frecuencia de pérdidas parciales y totales del cromosoma X, provocadas por 20 Gy de radiación gamma después de un pretratamiento con 69 mM de CCS a los machos**

Machos pretratados																					
Tratamiento	Cromosomas por camada			Pérdidas completas (Pc)						Pérdida parciales (Pp)						Totales (Pc+Pp)					
	I	II	III	I%		II%		III%		I%		II%		III%		I	II	III			
SAC	1785	668	1650	16	0.89	11	1.65	18	1.09	0	0	0	0	1	0.06	4103	16	11	19	<b>46</b>	1.12
CCS	1455	908	1587	16	1.09	13	1.43	19	1.20	2	0.13	0	0	3	0.19	3950	18	13	22	<b>53</b>	1.34
SAC+20 Gy	2680	2157	1350	104	3.88	83	3.85	41	3.04	9	0.33	5	0.23	8	0.59	6187	113	88	49	<b>250</b>	4.04
CCS+20 Gy	3632	2707	1843	144	3.96	96	3.55	54	2.93	13	0.36	6	0.22	11	0.60	8182	157	102	65	<b>324</b>	3.96

**Tabla 8. Frecuencia de pérdidas parciales y totales del cromosoma X, provocadas por 20 Gy de radiación gamma después de un pretratamiento con 69mM de CCS a las hembras**

Hembras pretratadas																					
Tratamiento	Cromosomas por camada			Pérdidas completas (Pc)						Pérdida parciales (Pp)						Totales (Pc+Pp)					
	I	II	III	I%		II%		III%		I%		II%		III%		I	II	III			
SAC	6510	5063	3937	75	1.15	67	1.32	43	1.09	2	0.03	5	0.10	4	0.10	15510	77	72	47	<b>196</b>	1.26
CCS	5451	5196	3964	57	1.04	58	1.12	44	1.11	4	0.07	1	0.02	1	0.02	14611	61	59	45	<b>165</b>	1.13
SAC+20Gy	6832	4063	2068	239	3.50	141	3.47	73	3.53	18	0.26	11	0.27	15	0.72	12963	257	152	88	<b>497</b>	3.83
CCS+20Gy	5230	3617	2032	181	3.46	127	3.51	84	4.13	7	0.13	12	0.33	13	0.64	10879	188	139	97	<b>424</b>	3.90

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Acción de las concentraciones bajas de la CCS sobre el daño genético inducido por la radiación gamma

La identificación de compuestos con actividad antimutagénica, sobre todo de aquellos de origen natural con pocos o nulos efectos tóxicos, ofrece la posibilidad de contrarrestar el daño causado por agentes cuya exposición en el ser humano no se puede evitar (Zeiger, 2000). La lista de agentes quimio-preventivos incluye varios compuestos denominados colectivamente como fitoquímicos que se encuentran en las frutas y las verduras (Dashwood, 1997).

Uno de los compuestos más estudiados en las dos últimas décadas es la clorofila y su derivado soluble, la clorofilina cuprosódica. Entre los mecanismos de acción mejor documentados de este compuesto está su capacidad para actuar como antioxidante, sustentado por diferentes investigaciones.

A pesar de que la mayoría de las investigaciones han aportado evidencia de que la CCS es un buen antimutágeno y/o anticarcinógeno y lo consideran como candidato para su utilización en los seres humanos, otros estudios han demostrado que este compuesto puede incrementar el daño al ADN ya sea el espontáneo o el inducido por otros agentes. En nuestro laboratorio, mediante un protocolo diseñado originalmente para determinar la persistencia del efecto protector de una sola dosis de CCS, obtuvimos evidencia de que la molécula puede actuar como inhibidora o promotora del daño inducido por radiación gamma (Pimentel *et al.*, 1999; 2000), posteriormente y utilizando el mismo protocolo, encontramos que cuando el tratamiento con trióxido de cromo se realizó inmediatamente y 24 h más tarde, provocó la disminución significativa en la frecuencia tanto de mutación como de recombinación somáticas, mientras que cuando el retraso fue mayor, provocó un incremento significativo en el daño genético. El mismo comportamiento se mostró cuando se examinó la acción de la CCS sobre la mutagenicidad de la etil-nitroso-urea (ENU) (Pimentel y Cruces, 2008). Este efecto promotor después de varios días, se atribuyó a la disminución progresiva de la concentración inicial de la CCS (69 mM).



En la literatura hay pocos antecedentes acerca del efecto de las concentraciones bajas de la CCS, el primer trabajo que describió que las concentraciones altas redujeron y las bajas incrementaron el número de mutaciones provocadas por las nitrosaminas: N-nitroso nornicotina (NNN) y 4-(N-methyl-N-nitroso amino)-1-31 (3-pyridinyl)-2 butanona (NNK) en *Salmonella thyphimurium* fue realizado por Romert *et al.* (1992). Adicionalmente Sengottuvelan *et al.* (2006), encontraron que las concentraciones bajas de CCS aumentaron el efecto mutagénico de la dimetil hidrazina, un compuesto que produce daño al ADN mediante la generación de epóxidos. También se halló que la administración de 1% de CCS a ratas durante 16 semanas, disminuyó el número de criptas en el colón producidas por 2-amino-3,8-dimetil imidazol (4,5-f) quinolina (IQ), las concentraciones intermedias de 0.1 y 0.01 % no tuvieron efecto, pero la más baja, 0.001 % aumentó el número de lesiones. Los autores de este trabajo concluyeron que los resultados obtenidos se deben a que la CCS provocó un desequilibrio entre la tasa de división celular y la apoptosis a favor de la primera lo que resaltó un efecto promotor del daño genético (Dashwood *et al.*, 2001).

En el estudio realizado por Romert *et al.* (1992) la concentración que representaba el 10 % de la que produjo el efecto inhibitor, duplicó el número de mutantes. En la presente investigación, la concentración más alta (69 mM) redujo 54 % la frecuencia de manchas por ala (m/a), en contraste, la concentración más baja (0.03 mM) que representa tan sólo el 0.04 % de la que produjo el efecto inhibitor, duplicó la frecuencia de manchas totales. Dado que no se encontró ninguna evidencia de que la CCS por sí sola sea genotóxica y que el mayor incremento en la frecuencia de daño genético se halló en las cuatro concentraciones más bajas, sugerimos que éstas como tratamiento previo a la irradiación gamma, pueden ser suficientes para inducir una promoción importante del daño al ADN en las células somáticas de *Drosophila*.

Waters *et al.* (1996) sugieren que el efecto potenciador de la CCS a dosis bajas reportado por Romert *et al.* (1992) se enmascara cuando se usan concentraciones más altas, probablemente bajo estas circunstancias, las moléculas de CCS interaccionan con las enzimas encargadas de la activación metabólica o participan formando complejos con los agentes mutagénicos. Este razonamiento también podría considerarse para explicar nuestros

resultados que sugieren que el efecto inicial de una concentración alta de CCS, en combinación con los rayos gamma, puede reducir el daño al ADN, mientras que cuando la concentración de CCS disminuye progresivamente en los organismos, los puede colocar en mayor riesgo de sufrir lesiones en su material genético.

El hecho de que la CCS incluya en su anillo porfirínico al cobre, condiciona a la molécula a pasar por diferentes estados de oxidación que a su vez pueden producir ERO, su acumulación en la célula podría ser responsable del incremento en la frecuencia de mutación y recombinación somáticas. Al estudiar la proliferación de las células del bazo estimuladas con concavalina A (Con A), confirmaron que la CCS tiene efecto bifásico (Sharma *et al.*, 2007), estos autores señalan que la CCS al igual que otros antioxidantes como el resveratrol, la vitamina E ó el ácido elágico pueden actuar como antiapoptóticos y que a concentraciones bajas el efecto antiapoptótico predomina mientras que a las concentraciones altas el que impera es el antioxidante mientras que en las concentraciones intermedias ambos coexisten.

En esta investigación, las concentraciones de CCS mayores de 34.5 mM inhibieron el daño genético provocado por la radiación ionizante muy probablemente mediante su acción antioxidante. Dado que la condición necesaria para recuperar una mutación, es que la célula que la porta sobreviva, el incremento en la frecuencia de mutación y recombinación promovido por las concentraciones más bajas podría ser explicado con base en que la CCS evitó la muerte de las células incluyendo a las que llevan mutaciones.

En conclusión, al igual que otras porfirinas con centro metálico, la CCS puede actuar como antioxidante o como pro-oxidante, es muy posible que los dos fenómenos estén ocurriendo simultáneamente dentro de la célula y que cuando la concentración de CCS es muy alta el efecto pro-oxidante, se vea enmascarado por su actividad como antioxidante.

## **8.2. Acción de las concentraciones bajas de la CCS sobre la promoción o inhibición del daño genético inducido por la AFB1**

Todas las concentraciones de CCS, inhibieron significativamente el daño genético inducido por AFB1, no obstante, llama la atención que prácticamente ninguna tuvo efecto sobre los eventos de recombinación (identificados en este ensayo como manchas gemelas) excepto la concentración más baja, 0.03 y la de 4.5 mM que los redujeron. Se ha demostrado que la co-administración de clorofila (CLF) ó CCS y la aflatoxina B1 inhiben las lesiones pre neoplásicas en ratas y los aductos con el ADN de las células del hígado (Simonich *et al.*, 2007; 2008) lo que indica que los pigmentos impiden la absorción de la AFB1 en el hígado. Los resultados de fluorescencia *in vitro*, sugirieron un mecanismo de inhibición de ambos pigmentos mediante la formación de un complejo no covalente, con una constante de disociación de 1.22  $\mu\text{M}$ , en el caso de la CLF y de 3.05  $\mu\text{M}$  con la CCS y reportaron una relación estequiométrica de 1:1. Los estudios en trucha arcoíris arrojaron resultados similares, cuando la CCS y la CLF, se probaron contra el efecto carcinogénico del dibenzo [a] pireno. La co-administración redujo significativamente la cantidad de tumores en el estómago y el hígado. Sin embargo, no se observó la inducción de la hepato-quinona-reductasa (NADPH), la quinona oxidoreductasa ni la glutatión S-transferasa (GST), enzimas que participan en la activación de la AFB1 y confirma un mecanismo de acción por formación de un complejo y no por la participación de las enzimas de la fase II bajo estas condiciones (Simonich *et al.*, 2008)

La formación de complejos CCS-AFB1 también podría explicar nuestros resultados. El hecho de que no se haya observado promoción de la mutagenicidad de la AFB1 por la CCS apoya el mecanismo de constitución de complejos antes de que cualquiera de las dos (AFB ó CCS) ejerza un papel mutagénico. Aunque todas las concentraciones redujeron la frecuencia de mutación, no se observó relación dosis-respuesta lo que es contradictorio por la relación estequiométrica hallada *in vitro* por Simonich *et al.* (2007, 2008). La concentración más baja utilizada en este estudio (0.03 mM) en la que esta relación fue casi de 1:1, produjo reducción en la frecuencia de manchas totales del 18 %, mientras que la más alta que representa 1800 moléculas de CCS por cada una de AFB1, sólo produjo reducción del 32 % en las manchas totales, estos resultados coinciden con los reportados

por Breinholt *et al.* (1995) en que 2000 ppm de CCS contra 20 ppb de AFBI disminuyó solamente 32 % el número de aductos ADN-AFB1. Este análisis nos indica que no se puede descartar la posibilidad de que a concentraciones altas, las moléculas de CCS interactúen entre sí (Breinholt *et al.*, 1995) o con otras moléculas incluyendo a los ácidos nucleicos. Dado que en esta investigación la CCS se administró como pretratamiento, al estar previamente presente en el organismo probablemente permitió que el pigmento interaccionará con otras moléculas orgánicas.

### **8.3. Evidencias de la importancia del centro metálico en la capacidad antimutagénica de la CCS.**

En esta investigación el papel del centro metálico en la acción moduladora de la CCS, se evidenció al comparar el efecto de la PP-IX, una porfirina libre de centro metálico sobre la acción mutagénica de los rayos gamma y sobre la AFB1 un agente químico indirecto. La PP-IX (69 mM), incrementó la frecuencia de mutación provocada por 10 Gy de rayos gamma, en el caso de la AFB1 se incrementaron sólo las manchas grandes.

La contribución del centro metálico en la acción antimutagénica de la CCS, se evidenció con los trabajos realizados por Ferruzzi *et al.* (2006), quienes demostraron que los derivados de la degradación de la clorofila que conservan su centro metálico fueron más eficaces como antioxidantes que los que no lo tienen. Se ha sugerido que las porfirinas que poseen hidrógenos alfa adyacentes al anillo tetrapirrólico, como la CCS, pueden formar radicales estables, incapaces de propagar la cadena de formación de radicales libres y de esta manera evitar el daño a las moléculas de importancia biológica, a este respecto los trabajos realizados por Stocker (2004), demostraron que la bilirrubina durante su interacción con algunas ERO, se transforma en un radical estable al reducirse, como resultado de la estabilización de su electrón en resonancia. Algunos trabajos han señalado que la PP-IX puede actuar como antioxidante, mediante el mecanismo descrito anteriormente, sin embargo en la presente investigación no disminuyó el daño genético provocado por la radiación gamma.

Por lo tanto y de acuerdo con los resultados en que la CCS redujo la mutagenicidad de la AFB1 pero no así la PP-IX (Tabla 5), es posible sugerir que el centro metálico de la molécula es esencial para que la CCS ejerza un efecto antimutagénico. Breinholt *et al.* (1995) estudiaron *in vitro* la formación de complejos entre la AFB1 y algunas porfirinas, entre ellas la PP-IX y encontraron que las constantes de disociación son similares para todas, no obstante en el presente estudio *in vivo* no se encontró reducción del daño cuando la PP-IX se administró previo al tratamiento con los mutágenos. Estos resultados son similares a los reportados por Romert *et al.* (1992), cuando compararon el efecto de la CCS contra dos porfirinas sin centro metálico: la biliverdina y la bilirrubina y encontraron que no tuvieron efecto ni inhibidor ni promotor sobre el daño inducido por nitrosaminas. Con relación al incremento en la frecuencia de mutación inducido por el pretratamiento con PP-IX y radiación gamma, éste podría ser explicado con base en que esta molécula es capaz de inducir estrés oxidativo en presencia de metales de transición (Williams *et al.*, 1994).

Arimoto *et al.* (1980), estudiaron la actividad antígenotóxica de algunas porfirinas frente a 6 productos de la pirrolisis de los aminoácidos que requieren activación metabólica. La hemina y la CCS fueron las que presentaron la mayor actividad antimutagénica mientras que la PP- IX, sólo redujo la mutagenicidad de 3 de los 6 compuestos, en cambio la bilirrubina no tuvo efecto. Estos estudios además de demostrar la importancia del metal en la molécula, establecieron que el anillo tetrapirrólico es esencial para la formación de complejos. La hemina, la CCS y la PP-IX fueron más eficientes que los tetrapirroles de anillos abiertos como la biliverdina y la bilirrubina.

#### **8.4. Acción moduladora de la CCS del daño inducido por radiación gamma en células germinales**

Las pruebas con células germinales permiten determinar si el daño al ADN trasciende a los descendientes de los individuos que fueron expuestos a xenobióticos. No obstante, existen pocos estudios de antimutagénesis en células germinales y por lo tanto poca información sobre la acción moduladora de una sustancia que haya sido probada tanto en células somáticas como en germinales. Probablemente se deba a que estos estudios, requieren de una cantidad elevada de individuos y de que sus ciclos de vida sean cortos (Waters *et al.*,

1998). Las evidencias del efecto dual de la CCS sobre el daño inducido en células somáticas, sugieren uno o varios mecanismos de acción dependiendo del mutágeno. Específicamente nos referimos a los eventos genéticos relacionados con rompimientos/recombinación.

En estudios anteriores, se encontró que la CCS incrementó significativamente los eventos de recombinación provocados por el tratamiento con 20 Gy en larvas de 72 h (Pimentel *et al.*, 2000). En contraste, el pretratamiento con diferentes concentraciones de CCS prácticamente no tuvo efecto sobre los eventos de recombinación inducidos por la AFB1. Con el fin de evaluar la acción de la CCS sobre estos eventos de rompimientos/recombinación, se seleccionó la prueba de pérdida de cromosomas X en anillo, en la que el fundamento genético está basado en rompimientos cromosómicos y se compararon los resultados con los obtenidos con la prueba de letales recesivos ligados al sexo que detecta esencialmente eventos de mutación (Würgler *et al.*, 1984). Las evidencias indicaron que la CCS no es capaz de proteger a las células germinales del daño ocasionado por radiación ionizante con ninguna de las dos pruebas utilizadas.

En principio, se podría especular que la CCS no llega a las células de la línea germinal, sin embargo, se encontró evidencia de que incrementó la frecuencia basal de los letales recesivos post-meióticos así como los provocados por el pretratamiento con CCS y 20 Gy de rayos gamma. Estos resultados indican que la CCS, sí es capaz de llegar al blanco genético y provocar daño, principalmente por mutación (mutación por sustitución de bases o por corrimiento del marco de lectura) pero no por rompimientos cromosómicos.

Es importante señalar que hay estudios que demuestran que las porfirinas son capaces de unirse a una sola hebra del ADN, intercalándose entre las regiones G-C de la secuencia 5'TCG 3' (Lipscomb *et al.*, 1996) con una constante de disociación de  $10^6 \text{ M}^{-1}$  (Sari *et al.*, 1990) a este tipo de intercalación se le conoce como hemi-intercalación, y provocar modificaciones en la hélice tales como: bases giradas y protuberancias (un residuo no apareado en una banda) que alteran la apertura de los surcos provocando inestabilidad al ADN. Si esto está ocurriendo con la CCS, tanto en células somáticas como en germinales,

entonces podría explicar en parte la acción mutagénica que se reporta en la presente investigación.

## 9. CONCLUSIONES

Dado que no se encontró evidencia de que la CCS por sí sola sea genotóxica y que el mayor incremento en la frecuencia de daño genético se halló en las cuatro concentraciones más bajas se sugiere que la CCS a bajas concentraciones y como tratamiento previo a la irradiación gamma, puede ser suficiente para inducir una importante promoción de daño al ADN en células somáticas de *Drosophila*.

Al igual que otras porfirinas con centro metálico, la CCS puede actuar como antioxidante o como pro-oxidante y es muy posible que los dos fenómenos estén ocurriendo simultáneamente dentro de la célula y así cuando la concentración de CCS es muy alta el efecto pro-oxidante, es enmascarado por su actividad como antioxidante.

Nuestros resultados confirman un mecanismo de acción por formación de un complejo CCS-AFB1 que evita la absorción/activación metabólica del carcinógeno en el rango de concentraciones probadas.

No se encontró evidencia de que la CCS en células germinales ejerza acción inhibitoria del daño genético inducido por radiación, pero si incremento *per se* sobre la frecuencia de letales recesivos post-meióticos. Estos resultados indican que la CCS, es capaz de llegar al blanco genético e inducir daño, principalmente por mutación pero no por rompimientos cromosómicos.



## 9. CONCLUSIONES

Dado que no se encontró evidencia de que la CCS por sí sola sea genotóxica y que el mayor incremento en la frecuencia de daño genético se halló en las cuatro concentraciones más bajas se sugiere que la CCS a bajas concentraciones y como tratamiento previo a la irradiación gamma, puede ser suficiente para inducir una importante promoción de daño al ADN en células somáticas de *Drosophila*.

Al igual que otras porfirinas con centro metálico, la CCS puede actuar como antioxidante o como pro-oxidante y es muy posible que los dos fenómenos estén ocurriendo simultáneamente dentro de la célula y así cuando la concentración de CCS es muy alta el efecto pro-oxidante, es enmascarado por su actividad como antioxidante.

Nuestros resultados confirman un mecanismo de acción por formación de un complejo CCS-AFB1 que evita la absorción/activación metabólica del carcinógeno en el rango de concentraciones probadas.

No se encontró evidencia de que la CCS en células germinales ejerza acción inhibitoria del daño genético inducido por radiación, pero si incremento *per se* sobre la frecuencia de letales recesivos post-meióticos. Estos resultados indican que la CCS, es capaz de llegar al blanco genético e inducir daño, principalmente por mutación pero no por rompimientos cromosómicos.

## 10. INDICE DE ABREVIATURAS

<b>2AA</b>	2 amino antraceno
<b>AFB1</b>	aflatoxina B1
<b>AFB1-FAPY</b>	aflatoxina B1-formamido pirimidina
<b>AFB1-N7Gua</b>	8,9-dihidro-8 -(N7 guanil)-9-hidroxi aflatoxina B1
<b>AGP</b>	ácido graso poli insaturado
<b>BP</b>	benzo [a] pireno
<b>CAT</b>	catalasa
<b>CCS</b>	clorofilina cupro sódica
<b>Con A</b>	conavalina A
<b>Cu</b>	cobre
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	cloruro de cobre
<b>ENU</b>	etil nitroso urea
<b>ERO</b>	species reactivas de oxígeno
<b>GPX</b>	glutation peroxidasa
<b>GST</b>	glutación S-transferasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrógeno
<b>HAP</b>	hidrocarburos aromáticos policíclicos
<b>IQ</b>	2-amino-3,8-dimetil imidazol (4,5) quinolina
<b>LRLS</b>	letales recesivos ligados al sexo
<b>MNNG</b>	metil nitroso nitro guanidina
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NNK</b>	4-(N-methyl-N-nitroso amino)-1-31 (3-pyridinyl)-2 butanona

<b>NNN</b>	N-nitroso normicotina
<b>OH</b>	hidróxilo
<b>PNS2007-2012</b>	Programa Nacional de Salud 2007-2012
<b>PP-IX</b>	protoporfirina IX
<b>ROO</b>	peroxilo
<b>SMART</b>	Somatic Mutation and Recombination Test
<b>SO</b>	super óxido
<b>SOD</b>	super óxido dismutasa

## 11. REFERENCIAS

- Abraham, S.K., Sarma, L., Kesavan, P.C. (1994). Role of chlorophyllin as an *in vivo* anticlastogen: protection against gamma-radiation and chemical clastogens. *Mutat. Res.* 322: 209-212.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R. A., *et al.*, (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Afonso, S., Vanore, G., Battle, A. (1999). Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31: 161-170.
- Agarwal, K., Sarma, A., Taludker, G. (1989). Effects of copper on mammalian cell components. *Chem. Biol. Interact.* 69: 1-16.
- Andrade de H., Reguly, M.L., Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test: En: *Drosophila Cytogenetics Protocols*. Henderson Ed. Human Press. pp. 389-412.
- Ardel, B., Kunicki, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. (2001). Chlorophyllin protects cells from the cytostatic and cytotoxic effects of quinacrine mustard but not of nitrogen mustard. *Int. J. Oncol.* 18: 849-853.
- Arimoto, S., Ohara, Y., Namba T., Negishi, T., Hayatsu, H. (1980). Inhibition of the mutagenic of aminoacid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 662-668.
- Arimoto, S., Fukuoka, S., Itome, C., Nakano, H., Rai, H., Hayatsu, H. (1993). Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutat. Res.* 287: 293-305.
- Aruoma, O., Halliwell, B., Gaajewski, E., Dizdaroglu, M. (1991). Copper-ion dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 273: 601-604.
- Atkins, M., Mardon, G. (2009). Signaling in the third dimension: the peripodial epithelium in eye disc development. *Dev. Dyn.* 238: 2139-2148.
- Bedard, L., Alessi, M., Davey, S., Massey, T. (2005). Susceptibility to aflatoxin B1-induced carcinogenesis correlates with tissue-specific differences in DNA repair activity in mouse and rat. *Cancer Res.* 65: 1265-1270.

- Bedard, L., Massey, E. (2006). Aflatoxin B1 induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*. 24: 174-183.
- Blum, C.A., Tanaka, T., Zhong, X., Li, Q., Dashwood, W.M., Pereira, C., Xu, M., Dashwood, R. H. (2003). Mutational analysis of *Cttnb1* and *Apc* in tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline: mutational 'hotspots' and the relative expression of beta-catenin and *c-jun*. *Mol. Carcinog*. 36: 195-203.
- Boloor, K.K., Kamat, J.P., Devasagayam, T.P. (2000). Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against gamma-radiation and photosensitization. *Toxicology* 155: 63-71.
- Botelho, M.V., Orlandi, J.M., de Melo, F.L., Mantovani, M.S., Linhares, R.E., Nozawa, C. (2004). Chlorophyllin protects HEP-2 cells from nuclear fragmentation induced by poliovirus. *Lett. Appl. Microbiol*. 39: 174-177.
- Breinholt, V., Schimerlik, M., Dashwood, R., Bailey, G. (1995). Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chem. Res. Toxicol*. 8: 506-514.
- Breinholt, V., Arbogast, D., Loveland P, Pereira C, Dashwood R, Hendricks J, Bailey G. (1999). Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B (1) bath treatment: An evaluation of reduced bioavailability vs. target organ protective mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 158: 141-151.
- Bronzetti, G., Della Croce, C., Galli, A. (1992). Antimutagenicity in yeast. *Mutat. Res*. 267: 193-200.
- Bulmer, A. C., Ried, K., Coombes, J. S., Blanchfield, J. T., Toth, I., Wagner, H.T. (2007). The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test. *Mutat. Res*. 629: 122-132.
- Bulmer, A.C., Ried, K., Blanchfield J.T., Wagner, K.H. (2008). The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat. Res*. 658: 28-41.
- Castro, N., Moreno, R. (2004). Biosíntesis del grupo hemo. *REB*. 23:99-106.
- Chernomorsky, S., Rancourt, R., Viridi, K., Segelman, A., Poretz, R.D. (1997). Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. *Cancer Lett*. 120: 141-147.

- Cruces, M.P., Pimentel, E., Zimmering, S., (2003). Evidence suggesting that chlorophyllin (CHLN) may act as an inhibitor or a promoter of genetic damage induced by chromium (VI) oxide (CrO<sub>3</sub>) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 536: 139-144.
- Cruces, M. P., Pimentel, A. E. (2006). Antimutagénesis: La clorofilina ¿Una alternativa? En: Pimentel E., Ortíz A., Breña M. (editores) *Tópicos de Genética*. UAEM-SMG, pp. 55-75.
- Cruces, M. P., Pimentel, A. E. (2008). Acción moduladora de algunas porfirinas del daño genético inducido. Informe Técnico. GCB-032/08. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México.
- Dashwood, R.H., Breinholt, V., Bailey, G.S. (1991). Chemo-preventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* 12: 939-942.
- Dashwood, R.H., Guo, D. (1993). Antimutagenic potency of chlorophyllin in the *Salmonella* assay and its correlation with binding constants of mutagen-inhibitor complexes. *Environ. Mol. Mutagen.* 22: 164-171.
- Dashwood, R.H. (1997). Chlorophylls as anticarcinogens *Int. J. Oncol.* 10: 721-727.
- Dashwood, R.H., Xu, M., Orner, G.A., Horio, D.T. (2001). Colonic cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci development in rats given 2-amino-3-methylimidaz. *Eur. J. Cancer. Prev.* 10:139-145.
- Dashwood, R. (2002). Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an „A-to-Z’ guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models *Mutat. Res.* 511(2): 89–112.
- De Flora, S., Ferguson, L.R. (2005). Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 591: 8-15.
- Doll, R., Peto, R. (1981). *The causes of cancer*. Oxford: Oxford University Press.
- Drouin, R., Rodriguez, H., Gao, S.W., Gebreyes, Z., O'Connor, T.R., Holmquist, G.P., Akman, S. A. (1996). Cupric ion/ascorbate/hydrogen peroxide-induced DNA damage: DNA-bound copper ion primarily induces base modifications. *Free. Radic. Biol. Med.* 21: 261-273

- Egner, P.A., Wang, J.B., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Wu, Y., Zhang, Q.N., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Helzlsouer, K.J., Bailey, G.S., Groopman, J.D., Kensler, T.W. (2001). Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Med. Sci.* 98: 14601-14606.
- Egner, P.A., Munoz, A., Kensler, T.W. (2003). Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutat. Res.* 523: 209-216.
- Farombi, E. O. (2006). Aflatoxin contamination of foods in developing countries: Implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. *African Journal of Biotechnology* 5: 1-14.
- Ferguson, L.R., Philpott, M., Karunasinghe, N. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* 198: 147-159.
- Ferguson, L.R., Philpott, M. (2008). Nutrition and mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr.* 28: 313-329.
- Ferruzzi, M.G., Böhm, V., Courtney, P.D., Schwartz, S.J. (2006). Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* 67: 2589- 2595.
- Ferruzzi, M.G., Blakeslee, J. (2007). Chlorophyll bioavailability and physiological relevance as dietary phytochemicals. A Review: *Nutr. Res.* 27:1-12.
- Frei, B., Stocker, R., Ames, B. (1992). Small molecule antioxidant defenses in human extracellular fluids. In: *Molecular biology of free radical scavenging systems. Current communications in cell & molecular biology.* Cold Spring Harbor, USA., pp. 23-45.
- Frenzilli, G., Bosco, E., Barale, R. (2000). Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutat. Res.* 468: 93-108.
- Garcia, M.C., Morales, P., Altamirano, M. (2002). Effects of chlorophyllin on mouse embryonic and fetal development *in vivo*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22: 461-471.
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.

- Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán J., Friedrich, E. Würgler, R. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402:203-209.
- Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 1: 87-95.
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hidroperoxide generation, turnover, and effectors action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39: 1529-1542.
- Guengerich, F.P. (2003). Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 409: 59-71.
- Guzmán-de Peña, D. (1997). Estudios de la Aflatoxina en México: En Guzmán- de Peña, D., Ruíz- Herrera, J., Peña- Cabriales, J. (editores). *Perspectivas de la Microbiología en México. Salud Pública de México, México D. F.* pp. 181-199.
- Halliwell, B., Chirico, A. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 715-725.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease. *An. Rev. Nutr.* 16: 33-50.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J. Neurochem.* 97:1634-1658.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free. Radic. Biol. Med.* 46:531-542.
- Harrisson, J. W. E., Levin, S.E., Trabin, B. (1954). The safety and fate of potassium in sodium copper chlorophyllin and other copper compounds, *J. Am. Pharm. Assoc.* 18:722-737.
- 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. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158: 132-140.
- Hayatsu, H. (1995). Complex formation of heterocyclic amines with porphyrins: its use in detection and prevention. *Princess Takamatsu Symp.* 23: 172-180.
- Imai, K., Arimoto, T., Sato, M., Watanabe, K., Kimura, R., 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.

- Izzotti, A. (2003a). DNA damage and alterations of gene expression in chronic-degenerative diseases. *Acta. Biochim. Pol.* 50: 145-154.
- Izzotti, A., Saccà, S.C., Cartiglia, C., De Flora, S. (2003b). Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients. *Am. J. Med.* 114: 697-698.
- Jakszyn, P., Gonzalez, C.A. (2006). Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J. Gastroenterol.* 12: 4296-4303.
- Kamat, J.P., Bloor, K.K., Devasagayam, T.P. (2000). Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage *in vitro* and *ex vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1487: 113-1127.
- Kephart, J.C. (1955). Chlorophyll derivatives their chemistry commercial preparation and uses. *Econ. Bot.* 9: 33-38.
- Khan, P.K., Sinha, S.P. (2008). Antimutagenic profile of antioxidant vitamins in *Drosophila* mutation test. *Biomed. Environ. Sci.* 21: 163-166.
- Kumar S.S., Chaubey, R.C., Priyadarsini, K.I., Devasagayam, T.P.A., Chauhan, P.S. (1999). Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. *Mutat. Res.* 425: 71-79.
- Lai, C., Butler, M.A., Matney, T.S. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat. Res.* 77: 245-250.
- Lee, K.W., Lee, H.J. Biphase effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis (2006). *Mech. Ageing. Dev.* 127: 424-431.
- Lehninger, A.L. (1980). *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2ª Ed. Ediciones Omega, Barcelona, 1117 p.
- Linder, M., Hazeq-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 793-811.
- Lindsley, D., Zimm G., (1987). *The genome of Drosophila melanogaster.* University of California, San Diego, La Jolla CA 92093.

- Lipscomb, L. A., Zhou, F. X., Presnell, S.R., Woo, R.J., Peek, M.E., Plaskon, R.R., Williams, L.D., (1996). Structure of a DNA-Porphyrin complex. *Biochemistry* 35: 2818-2823.
- Madrigal-Bujaidar, E., Velázquez-Guadarrama, N., Díaz-Barriga, S. (1997). Inhibitory effect of chlorophyllin on the frequency of sister chromatid exchanges produced by benzo[a]pyrene *in vivo*. *Mutat. Res.* 388: 79-83.
- Morales, P., García, M.C. (1994). *In vivo* effect of chlorophyllin on gamma-ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutat. Res.* 320: 329-334.
- Morales, P., Mendiola, M.T. (1995). *In vivo* radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells. *Mutat. Res.* 344: 73-78.
- Negishi, T., Arimoto, S., Nishizaki, C., Hayatsu, H. (1989). Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis* 10:145-149.
- Negishi, T., Nakano, H., Kitamura, A., Itome, C., Shiotani, T., Hayatsu, H. (1994). Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*. *Cancer Lett.* 83: 157-164.
- Negishi, T., Rai, H., Hayatsu, H. (1997). Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat. Res.* 376: 97-100.
- Odin, A. P. (1997a). Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat. Res.* 386: 39-67.
- Odin, A. P. (1997b). Antimutagenicity of the porphyrin and non-enzyme porphyrin-containing proteins. *Mutat. Res.* 387: 55-68.
- Olvera, O., Arceo, C., Zimmering, S. (2003). The effect of treating *Drosophila* females with chlorophyllin on the yield of dominant lethals recovered from irradiated sperm. *Mutat. Res.* 534: 201-202.
- Olvera, O., Zimmering, S., Arceo, C., Cruces, M. (1993). The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 301: 201-204.

- Olvera, O., Zimmering, S., Cruces, M.P., Pimentel, E., Arceo, C., Guzmán J., De la Rosa, M. (1997). Antimutagenesis in somatic cells of *Drosophila* as Monitored in the wing spot test. En: Food Factors for Cancer Prevention. Ohigasshi, Osawa T. Terao. J. Watanabe S. y Yoshikawa T. (editores). Springer-Verlag, Tokio, pp. 567-571.
- Olvera, O., Arceo, C., Zimmering, S. (2000). Chlorophyllin [CHLN] and the mutagenicity of monofunctional alkylating agents in *Drosophila*: the action of CHLN need not include an influence on metabolic activation. *Mutat. Res.* 467: 113-117.
- Olvera, O., Arceo, C., Zimmering, S. (2003). The effect of treating *Drosophila* females with chlorophyllin on the yield of dominant lethals recovered from irradiated sperm. *Mutat. Res.* 534: 201-202.
- Ong, T. M., Whong, W.Z., Stewart, J., Brockman, H. E. (1986). Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutat. Res.* 173: 111-115.
- Ong, T.M., Whong, W.Z., Stewart, J., Brockman, H. E. (1989). Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutat. Res.* 222: 19-25.
- Philpott, M., Lim, C.C., Ferguson, L.R. (2009). Dietary protection against free radicals: a case for multiple testing to establish structure-activity relationships for antioxidant potential of anthocyanic alant species. [Int. J. Mol. Sci.](#) 10:1081-1103.
- Pietrzak, M., Wieczorek, Z., Wieczorek, J., Darzynkiewicz, Z. (2006). The “interceptor” properties of chlorophyllin measured within the three component system: Intercalator-DNA-chlorophyllin. *Biophys. Chem.* 123: 11-19.
- Pimentel, E., Cruces, M.P., Zimmering, S. (1999). On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 446: 189-192.
- Pimentel, E., Cruces, M.P., Zimmering, S. (2000). Evidence that chlorophyllin (CHLN) may behave as an inhibitor or a promoter of radiation-induced genetic damage in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 472: 71-74.

- Programa Nacional de Salud 2007-2012. Secretaria de Salud, Gobierno Federal, México.
- Rigonato, J., Mantovani, M. S. Jordão, B. Q. (2004). Mechanism of Action of Chlorophyllin against Mitomycin-C Mutagenicity in *Allium cepa*. *Cytologia* 69: 459-465.
- Rodríguez-Arnaiz, R. y Zimmering, S. (1989) Chlorophyllin is an antimutagen in *Drosophila*. *Environ. Mol. Mut.* 14: 165.
- Rodríguez-Arnaiz R., Castañeda, A., Ordaz, G. (2006). Biotransformación de xenobióticos mediada por los citocromos P450 en *Drosophila melanogaster* En: Pimentel E., Ortiz A., Breña M. (editores) Tópicos de Genética. UAEM-SMG, pp. 77-93.
- Romert, L., Curvall, M., Jenssen, D. (1992). Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis* 7: 349-355.
- Rose, R., Bode, A., (1993). Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* 7: 1135-1142.
- Sankaranarayanan, K., Sobels, F.H. (1976). Radiation genetics. In: Ashburner M., Novitski E. *The genetics and biology of Drosophila*. Academic Press, New York, pp. 1090-1223.
- Sari, M.A., Battioni, J.P., Dupre, D., Mansuy, D., Le Pecq, J. B. (1990). Interaction of cationic porphyrins with DNA: importance of the number and position of the charges and minimum structural requirements for intercalation. *Biochemistry* 29: 4205-4215.
- Sengottuvelan, M., Viswanathan, P., Nalini N. (2006). Chemopreventive effect of trans-resveratrol [a] phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1, 2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27: 1038–1046
- Schwartz J. (1996). The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: Their effects on tumor cell growth. *The Journal of nutrition. Supplement. International Symposium: “Prooxidant effects of antioxidant vitamins”*. Atlanta, GA.

- Simic, M.G., Jovanovic, S.V. (1988). Mechanisms of inactivation of oxygen radicals by dietary antioxidants and their models. In Kuroda, Y., Shankel, M., Waters; M.D. (editors). Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II. Ed. Basic Life Sci. 52: 127-138.
- Sharma, D., Kumar, S.S., Sainis, K.B. (2007). Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. Mol. Immunol. 44:347-359.
- Simonich, M.T., Egner P.A., Roebuck, B. D., Orner, G. A., Jubert, C., Pereira, C., Groopman, J. D., Kensler, T. W., Dashwood, R. H., Williams D. E., Bailey, G. S. (2007). Natural chlorophyll inhibits aflatoxin B1-induced multi-organ carcinogenesis in the rat. Carcinogenesis 28: 1294-1302.
- Simonich, M.T., McQuistan, T., Jubert, C., Pereira, C., Hendricks, J.D., Schimerlik, M., Zhu, B., Dashwood, R.H., Williams, D.E., Bailey, G.S. (2008). Low-dose dietary chlorophyll inhibits multi-organ carcinogenesis in the rainbow trout. Food. Chem. Toxicol. 46: 1014-1024.
- Smela, M., Currier S.S., Bailey, E., Essigmann M. (2001). The chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. Carcinogenesis 22: 535-545.
- Stocker, R. (2004). Antioxidant Activities of Bile Pigments. Antioxid. Redox Signal. 6: 841-849.
- Tajmir-Riahi, H.A, Neault, J,F,, Diamantoglou, S. (2004). DNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin as antimutagenic agents. Methods Mol. Biol. 274: 159-171.
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Curr. Neuropharmacol. 7: 65–74.
- Valencia, R., Abrahamson, S., Lee, W.R., Von Halle, E.S., Woodruff, R.C., Würgler, F.E., Zimmering S. (1984). Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res. 134:61-88
- Valko, M., Morris H., Cronin, M.T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. Curr. Med. Chem. 12: 1161-1208.

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40.
- Vogel, E., Natarajan, A.T. (1979). The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II. Total and partial sex-chromosome loss in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 62: 51-100.
- Vogel, E.W., Graf, U., Frei, H.J., Nivard, M. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens *IARC Sci Publ.* 146: 427-470.
- Waters, M.D., Stack, H.F., Jackson, M.A., Brockman, H.E., De Flora S. (1996). Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. *Mutat. Res.* 350: 109-129.
- Waters, M.D., Stack, H.F., Jackson, M.A. (1998). Inhibition of genotoxic effects of mammalian germ cells mutagens. *Mutat. Res.* 402: 129-138.
- Weisburger, J.H. (1999). Antimutagens, anticarcinogens, and effective worldwide cancer prevention. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 18: 85-93.
- Williams, M., Krootjes, B.B., van Steveninck, J., van der Zee, J. (1994). The pro- and antioxidant properties of protoporphyrin IX. *Biochim. Biophys. Acta* 1211: 310-316.
- Würgler, F.E., Sobels, F.H., Vogel, E. (1984). *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. In: *Handbook of mutagenicity test procedures*. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. Elsevier Science Publishers BV.
- Xu, M., Dashwood, R. H.(1999). Chemoprevention studies of heterocyclic amine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Lett.* 143: 179-183.
- Xu, M., Orner, G.A., Bailey, G.S., Stoner, G.D., Horio, D.T., Dashwood, R.H. (2001). Post-initiation effects of chlorophyllin and indole-3-carbinol in rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methyl- imidazo. *Carcinogenesis* 22: 309-314.
- Yun, C.H., Jeong, H.G., Jhoun, J.W., Guengerich, F.P. (1995). Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis.* 16: 1437-1440.

- Zawacka-Pankau, J., Krachulec, J., Grulkowski, I., Bielawski, K.P., Selivanova, G. (2008). The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232: 487-497.
- Zeiger, E. (2000). Death and antimutagenicity. *Mutat. Res.* 466: 125-127.
- Zijilstra, J.A. (1987). Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Doctoral Thesis. University of Leiden. Capítulo 1, pp. 7-19.
- Zijilstra, J.A., Vogel, E.W. (1988). The ratio of induced recessive lethals to ring-x loss has prognostic value of functionality of chemical mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 201: 27-38.
- Zimmering, S. (1975). Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 269:26-33.
- Zimmering, S. (1981). Review of the current status of the mei-9<sup>a</sup> test for chromosome loss in *Drosophila melanogaster*: an assay with radically improved detection capacity for chromosome lesions induced by methyl methanesulfonate (MMS), dimethylnitrosamine (DMN) and especially diethylnitrosamine (DEN) and procarbazine. *Mutat. Res.* 83: 69-80.
- Zimmering, S., Olvera, O., Hernández, M.E., Cruces, M.P., Arceo, C., Pimentel, E., (1990). Evidence for radioprotective effects of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 245: 47-49.

## **ANTIMUTAGÉNESIS: LA CLOROFILINA ¿UNA ALTERNATIVA?**

---

---

*Martha P. Cruces Martínez y Adalberto E. Pimentel Peñaloza  
Departamento de Biología  
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares  
Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa  
Ocoyoacac, México. CP. 52750  
[aepp@nuclear.inin.mx](mailto:aepp@nuclear.inin.mx)*

### **1. INTRODUCCIÓN**

La exposición a agentes físicos y químicos de origen antropogénico puede producir daño genético y provocar enfermedades entre las que se incluye al cáncer. Ahora se sabe, gracias a los avances en la genética molecular, que la mayoría de las enfermedades genéticas en los humanos son el producto de mutaciones en uno o en varios genes que controlan la división, la diferenciación o la muerte de las células. Entre las causas de muerte en las sociedades actuales las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar y el cáncer el segundo. Ambos casos están relacionados con el estilo de vida y con la dieta.

Desde 1913, cuando se relacionó por primera vez la dieta y otros hábitos con el cáncer, hasta nuestros días, se ha progresado significativamente en el conocimiento de esta relación (Lipman, 2002). Se sabe por ejemplo que los productos de la combustión del tabaco son responsables de aproximadamente 30% de todas las muertes por cáncer (Hecht, 1997) y que los alimentos pueden contener sustancias mutagénicas y carcinogénicas. La cafeína se ha relacionado con el cáncer de vejiga; las aflatoxinas producidas por hongos con el cáncer de hígado; los alimentos ahumados y los embutidos contienen abundantes nitratos los cuales se han relacionado con el cáncer gastrointestinal. Estos nitratos que no son carcinógenos por sí mismos son reducidos a nitritos por las bacterias del tubo digestivo, transformándolos en nitrosaminas. Los residuos industriales y los plaguicidas son otro grupo de sustancias que también representan un riesgo para la salud del hombre.

La mejor estrategia para evitar el daño al ADN (con todas las consecuencias que esto implica) sería evitar o disminuir la exposición a todos los agentes que se han identificado como mutágenos y carcinógenos. Desgraciadamente esto es prácticamente imposible puesto que muchos agentes, como ya se mencionó, se encuentran en forma natural en los alimentos que el hombre



consume (Lippman y Hong, 2002). La evidencia experimental relaciona a los radicales libres con el cáncer y la arteroesclerosis. Los factores externos que producen estrés oxidante incluyen un consumo bajo de antioxidantes y elevado de grasas saturadas y la exposición a la radiación ionizante y al humo del cigarro (Bankson *et al.*, 1993).

La prevención química se refiere al consumo de agentes químicos sintéticos o naturales que disminuyen o inhiben la actividad mutagénica o carcinogénica de los compuestos (Sandler, 1996). La acción de las sustancias de origen natural en la prevención de las principales enfermedades crónicas incluyendo al cáncer se encuentra bajo intensa investigación en muchos laboratorios alrededor del mundo. Las evidencias obtenidas a partir de los estudios epidemiológicos y las pruebas realizadas en los diferentes laboratorios sugieren que los alimentos consumidos por la población en general también contienen compuestos que pueden desempeñar un papel importante en la disminución del daño al ADN. Estos compuestos pertenecen a diferentes familias químicas (flavonoides, saponinas y carotenoides, entre otros). Aunque los mecanismos de acción de muchos de ellos aún no se conocen, algunos tienen propiedades antioxidantes y pueden atrapar radicales libres generados durante el metabolismo celular o los producidos por los mutágenos. Como estos radicales reaccionan con los lípidos, las proteínas, las membranas y el ADN, el control de sus niveles en el organismo puede prevenir el desarrollo de numerosas enfermedades. El presente capítulo trata de la actividad modificadora de la clorofilina cuprosódica (CCS) sobre el daño genético inducido por diferentes xenobióticos tanto físicos como químicos.

## **2. LA CLOROFILINA CUPROSÓDICA**

Los estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la clorofila, el pigmento natural que confiere el color verde a las plantas, así como su derivado semi-sintético la CCS (figura 1) son capaces de disminuir o inhibir el daño al ADN inducido por agentes mutagénicos (Lai, 1979; Ong *et al.*, 1986; 1989; Olvera *et al.*, 1997). La CCS pertenece a un grupo de compuestos llamados porfirinas que contienen un ión  $\text{Cu}^{+2}$  en el centro del anillo tetrapirrólico y tienen sustituido el grupo fitol por sodio lo que hace que la molécula sea soluble en agua y más estable que la clorofila.

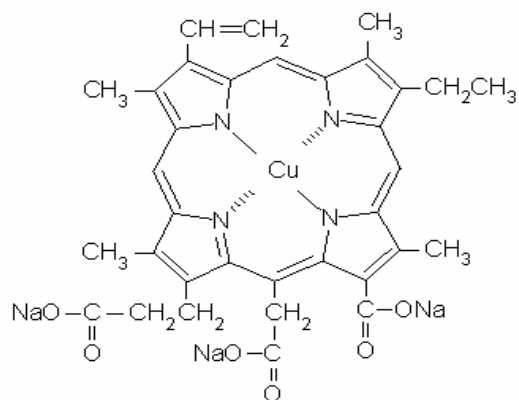


Figura 1. Estructura química de la CCS.

Durante la década de los ochenta, los estudios realizados tanto en procariontes como en eucariontes demostraron que la clorofila y la clorofilina reducen la frecuencia de daño genético inducido (Lai, 1979; Ong *et al.*, 1986; 1989; Negishi *et al.*, 1989; Arimoto y Hayatsu, 1989). Estos trabajos fueron de los primeros que evidenciaron que la CCS podía disminuir significativamente la frecuencia de mutaciones inducidas por algunos compuestos químicos de acción indirecta como el benzo( $\alpha$ )pireno y algunas otras mezclas complejas presentes comúnmente en los alimentos tales como carne frita, jugo de uva y vino tinto entre otros. Ya entonces Negishi *et al.* (1989) sugería que la molécula tenía propiedades antioxidantes y que podía formar complejos con los promutágenos o procarcinógenos evitando así su interacción con el ADN. La actividad anticarcinogénica de la CCS también ha sido estudiada en varias especies. Los resultados obtenidos utilizando los sistemas de ratón, rata y trucha arco iris, evidenciaron su actividad inhibidora de carcinógenos tales como las aflatoxinas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas heterocíclicas (Dashwood, 1997; Hayashi *et al.*, 1999).

En el laboratorio de *Drosophila* del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares los estudios sobre la actividad radioprotectora y antimutagénica de la CCS se iniciaron a finales de la década de los ochenta, tomando como base los resultados antes mencionados.

### 3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CLOROFILINA

Los antimutágenos han sido clasificados tradicionalmente en dos grandes grupos: a) desmutágenos y b) antimutágenos (De Flora y Ramel, 1988; De Flora *et al.*, 2002). Los primeros incluyen a aquellos agentes que actúan extra celularmente formando

complejos no covalentes con los mutágenos o sus precursores, favoreciendo así su remoción y/o evitando su interacción con las moléculas blanco. Los antimutágenos también denominados “verdaderos antimutágenos” son aquellos que tienen la capacidad para interferir con las enzimas encargadas de la activación y la desintoxicación de los mutágenos y carcinógenos, actúan intracelularmente e intervienen con los mecanismos de reparación de las células. Dentro de los mecanismos de acción propuestos para la CCS y del que se tiene mayor evidencia experimental es el de su acción como desmutágeno (Odin, 1997; Dashwood, 1992).

Los resultados obtenidos a partir de los estudios de espectrofotometría demostraron que forma complejos moleculares no covalentes con las aminas heterocíclicas limitando su biohabilidad (Dashwood y Guo 1992; Guo *et al.*, 1995). En este complejo se encuentran involucradas las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno formados entre los grupos carboxilos de la CCS con el mutágeno. Debido al alto grado de resonancia de la molécula y la des-localización de sus electrones también puede actuar como un captador de radicales libres (Kumar *et al.*, 1999).

Las investigaciones recientes han puesto de manifiesto que la molécula, al igual que otras porfirinas, es capaz de inducir a las enzimas de la fase II de la reparación del ADN que son las encargadas de la desintoxicación, entre las más importantes están la catalasa y la glutatión reductasa (Fahey *et al.*, 2005).

#### **4. LA CLOROFILINA EN LA MODULACIÓN DE LA MUTACIÓN INDUCIDA EN CÉLULAS SOMÁTICAS**

##### **4.1. La clorofilina como radioprotector**

En el campo de la radiobiología se han realizado numerosos estudios encaminados a identificar compuestos que disminuyan o eliminen el daño producido por la radiación ionizante. Aunque se han propuesto algunos como la cisteína y el  $\alpha$ -tocoferol, entre otros, muy pocos tienen una aplicación práctica, principalmente porque son tóxicos o porque las concentraciones necesarias para proteger producen efectos secundarios no deseados (Hall, 1988). Lo anterior destaca una vez más la importancia de realizar estudios relacionados con el papel radioprotector de sustancias con pocos o nulos efectos tóxicos.

Como se mencionó, entre los mecanismos de acción propuestos para la CCS está su habilidad para capturar radicales libres, por esta razón decidimos probar su posible actividad radioprotectora. Para este estudio se utilizó el ensayo de mutación somática y recombinación mitótica en el ala de *Drosophila melanogaster*, una

prueba que ha demostrado su eficacia para identificar mutágenos y carcinógenos (Graf *et al.*, 1984; Würgler, 1992). Para una revisión más detallada del ensayo, ver el capítulo “Estudios de toxicidad...” de este libro.

*Drosophila melanogaster*, modelo biológico con el cual es posible realizar las investigaciones *in vivo*, es un organismo holometábolo o de metamorfosis completa que tiene la ventaja de que los tratamientos se pueden administrar en cualquier fase del desarrollo. Estos pueden ser por vía oral o por medio de inyección, agudos o crónicos. La selección del tipo de tratamiento va a depender del agente y de los objetivos de la investigación, en este estudio se administraron 72 mM de CCS por vía oral durante 24 h antes de la exposición al mutágeno. Posteriormente se expusieron a 20 Gy de radiación gamma.

Los resultados obtenidos de este estudio están representados gráficamente en la figura 2, en la que se puede ver que el pretratamiento con la CCS redujo significativamente los tres tipos de manchas inducidas dando un total de reducción de 56%, lo relevante de ello es que se inhibieron 98% las manchas gemelas. Este tipo de manchas son evidencia contundente de la inhibición de los eventos de recombinación mitótica (Zimmering *et al.*, 1990); se sabe que este mecanismo además de ser de reparación, también puede introducir cambios genéticos involucrados en ciertas etapas de inducción y promoción de cáncer (Würgler *et al.*, 1984). Esta fue la primera evidencia de la actividad radio-protectora de este compuesto, posteriormente fue confirmado por Morales y García (1994) y Morales y Mendiola (1995) utilizando las pruebas de micronúcleos e intercambio entre cromátidas hermanas en espermatogonia y en ratón. Dado que la radiación ionizante es un agente cuyos efectos mutagénicos se deben en gran medida a la generación de radicales libres, nuestros resultados apoyan el papel de la molécula como captadora.

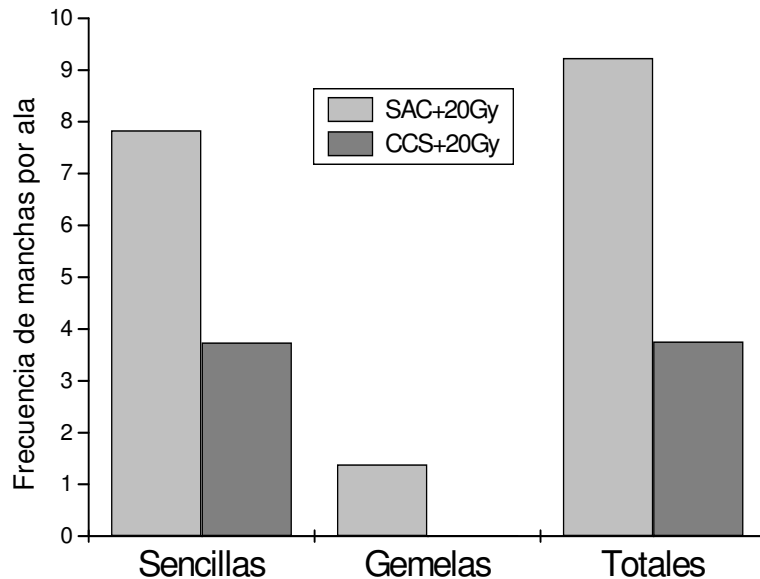


Figura 2. Evidencia del efecto radioprotector de la CCS en *Drosophila* (Zimmering *et al.*, 1990) (SAC: sacarosa).

Con base en los resultados obtenidos con radiación gamma, se probó su habilidad reductora contra los efectos del trióxido de cromo ( $\text{CrO}_3$ ) conocido como un agente radiomimético debido a que induce daño genético a través de la generación de especies reactivas. En estos experimentos se administraron 72 mM de CCS en cotratamiento con 5 mM de  $\text{CrO}_3$ . Los resultados fueron similares a los obtenidos con radiación (figura 3) la CCS redujo 73% los eventos de recombinación inducidos por el  $\text{CrO}_3$ . El análisis de las alas de los descendientes con el arreglo TM3 demostró que el cotratamiento con CCS+ $\text{CrO}_3$  inhibe los eventos relacionados con la recombinación mitótica (Olvera *et al.*, 1993). Resultados similares encontraron posteriormente García *et al.* (2001) con protocolos en donde la CCS fue administrada como pretratamiento intraperitoneal a ratones o como pre y post tratamiento y se observó que se inhibe la inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos. Se sabe que más de 90% del daño inducido por el  $\text{CrO}_3$  es debido a rupturas dobles del ADN (Graf *et al.*, 1992). En el caso de la prueba SMART las manchas gemelas son el resultado exclusivamente de recombinación mitótica en la región heterocromática del cromosoma y son el resultado de rupturas dobles. La recombinación mitótica es un mecanismo de tolerancia al daño genético que puede

producir cambios en la información contenida en la región y como consecuencia activar de oncogenes, por ejemplo (Ramel *et al.*, 1996), por esta razón las pruebas que permiten detectar recombinación mitótica son recomendables para la evaluación de compuestos con potencial carcinogénico.

Los resultados obtenidos con ambos mutágenos demostraron que la CCS inhibe eficientemente el daño genético inducido por agentes oxidantes debido muy probablemente a su actividad antioxidante (Cruces *et al.*, 2003).

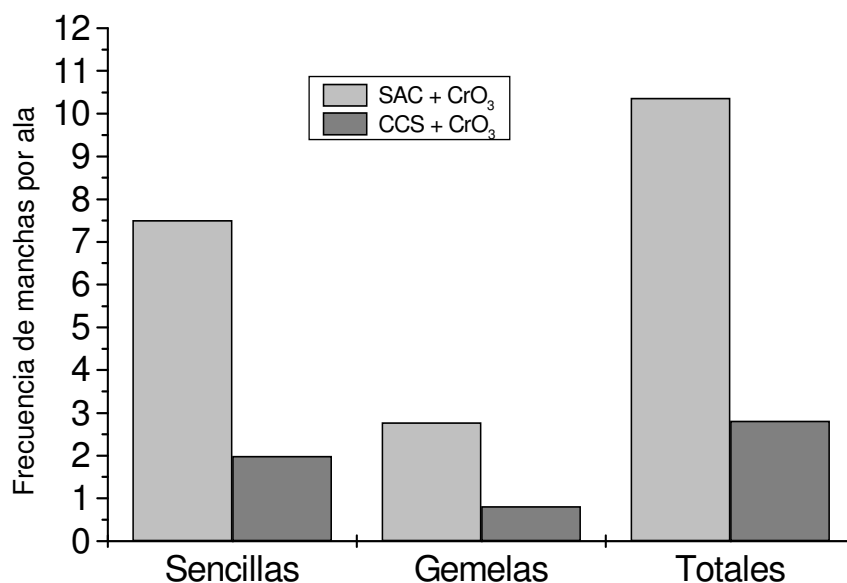


Figura 3. Efecto inhibitor de la CCS sobre el daño genético inducidas por CrO<sub>3</sub> (Olvera *et al.*, 1993).

#### 4.2. La clorofilina en la modulación del daño inducido por agentes alquilantes de referencia

Entre los fármacos que se utilizan en la quimioterapia del cáncer está un grupo de sustancias llamadas genéricamente agentes alquilantes. Lo anterior porque introducen grupos alquilo (metilo, etilo, propilo, etc.) en las fracciones nucleófilas del ADN, por ejemplo los nitrógenos 3 y 7 así como en el oxígeno 6 de la guanina. Los agentes alquilantes son carcinógenos, mutágenos, teratógenos e inmuno

supresores. Como resultado de la interacción con los ácidos nucleicos, estos agentes pueden impedir la replicación del ADN, ocasionar la muerte de la célula o bien pueden producirse mutaciones en los genes que controlan la división y la diferenciación celulares, entonces las células pueden adquirir características neoplásicas y desarrollar tumores. Por esto, los agentes alquilantes son considerados mutágenos modelo para realizar estudios de antimutagénesis.

En la figura 4 se presentan los resultados obtenidos al comparar el efecto inhibitor de la CCS en la mutagenicidad inducida por cinco agentes alquilantes, tres de ellos de acción directa: etil nitroso urea (ENU), metil nitroso urea (MNU) y metil metano sulfonato (MMS) y dos que requieren activación: dietil etilnitroso urea (DEN) y dimetilhidrazina (DMH). Para una revisión sobre el papel del metabolismo en la inducción del daño, ver el capítulo “Biotransformación...” en este libro. La CCS redujo la frecuencia de mutación inducida por todos ellos. El efecto inhibitor fue más notable sobre la acción de los compuestos nitrosos, ya que se forman en el intestino del humano al consumir alimentos ricos en nitratos. El mayor efecto inhibitor se obtuvo con el agente indirecto DEN. A este respecto se ha propuesto que la CCS puede unirse a las enzimas encargadas de la activación metabólica de los promutágenos inactivándolas o formando complejos con los metabolitos intermedios evitando así su transformación (Odin, 1997).

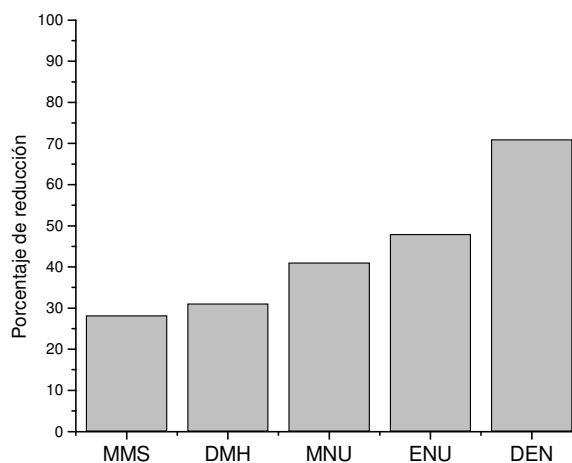


Figura 4. Comparación del efecto inhibitor de la CCS 72 mM sobre la mutagenicidad de diferentes agentes alquilantes (Olvera *et al.*, 1997, 2000; Guerrero, 2004).

Nuestros resultados contrastan con los obtenidos utilizando un ensayo *in vitro* (Romert *et al.*, 1992) en el que no se encontró inhibición de la mutagenicidad

inducida por los agentes alquilantes monofuncionales MNU y EMS, mientras que Abraham *et al.* (1994), utilizando el ensayo de micronúcleos en las células de la médula ósea de ratón, reporta resultados similares a los nuestros.

De todos los agentes alquilantes probados con nuestro sistema, la ciclofosfamida fue la única cuyo efecto no fue inhibido por la CCS (Linares, 1998.) No obstante, con la prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón, Abraham *et al.* (1994) encontraron una reducción del daño relacionada con la concentración. Es difícil determinar a qué se deben las diferencias entre sus resultados y los nuestros; sin embargo, pueden ser atribuidos a las diferencias en las rutas metabólicas con los que cuenta cada organismo para la activación de los mutágenos y carcinógenos.

## **5. EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL DAÑO ESPONTÁNEO**

En esta línea de investigación el análisis del efecto de la CCS en células somáticas ha indicado que la CCS no modifica la frecuencia basal de mutación y recombinación. La frecuencia de mutación espontánea obtenida en nuestro laboratorio fue de 0.40 mientras que para la CCS fue de 0.43 manchas/ala.

Estos resultados coinciden con los reportados por Morales y García (1994) quienes no encontraron efecto *per se* de la CCS sobre la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en médula ósea de ratón y con los obtenidos por Madrigal *et al.* (1997). Sin embargo, en *Drosophila*, con la prueba de letales dominantes que principalmente son el resultado de los dobles rompimientos en el ADN y la de recesivos ligados al sexo (LRLS), así como de mutaciones puntuales (Lee *et al.*, 1983), se ha visto que la CCS puede incrementar la frecuencia de éstos, tanto en estado post-embriionario (Olvera *et al.*, 2003) como en las células post-meióticas (Moreno, 2004).

## **6. PERSISTENCIA DEL EFECTO INHIBIDOR DE LA CLOROFILINA**

Los resultados obtenidos, tanto en *Drosophila* como en otros sistemas, indicaban que la CCS podría ser un candidato para ser utilizado como un agente quimiopreventivo en los humanos. En todos ellos el compuesto se había administrado antes, al mismo tiempo o inmediatamente después del mutágeno. Aun cuando se habían realizado pruebas *in vitro* para determinar la estabilidad de la molécula, no existían estudios *in vivo* sobre cuánto tiempo persistía su efecto protector. Para responder esta pregunta, se diseñó el siguiente protocolo; se pretrataron larvas de 48 y de 72 h de edad durante 24 h con CCS (72mM), inmediatamente después se enjuagó un grupo de larvas tratadas con sacarosa o con CCS se irradió con 20 Gy de radiación gamma y a las restantes se les retrasó la irradiación 24, 48 o 72 h.



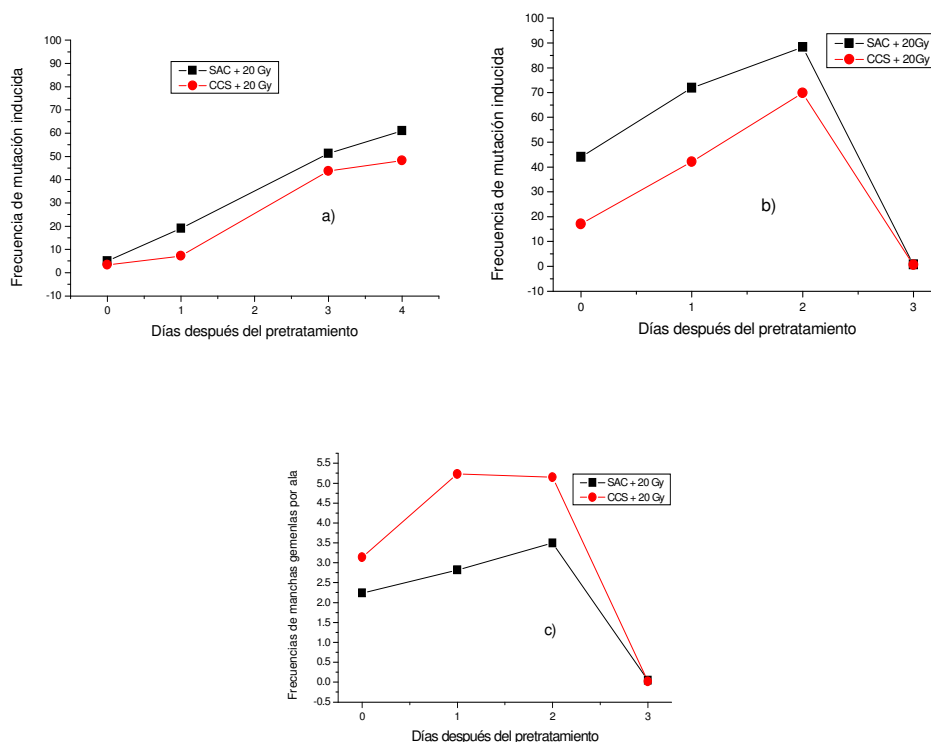


Figura 5. Frecuencia de mutación inducida en diferentes tiempos del desarrollo de: a) las larvas pretratadas a las 48 h de edad con 72 mM de CCS (Pimentel *et al.*, 1999), b) pretratadas a las 72 h de edad y c) Frecuencia de manchas gemelas inducidas en las larvas pretratadas a las 72 h de edad (Pimentel *et al.*, 2000).

Los resultados están representados gráficamente en la figura 5, donde se puede observar que en los individuos pretratados a las 48 h de edad e irradiados a diferentes tiempos después de finalizado el pretratamiento, la CCS provocó una disminución significativa de la frecuencia de mutación (figuras 5a y 5b) (Pimentel *et al.*, 1999), pero en los pretratados cuando tenían 72 h de edad, se encontró un incremento significativo en los eventos relacionados con la recombinación mitótica en todos los tiempos monitoreados (figura 5c) (Pimentel *et al.*, 2000).

Estos resultados sugieren que se debieron a una unión preferencial de la CCS por regiones heterocromáticas del cromosoma; sin embargo, todavía no se tienen evidencias experimentales al respecto. El mismo protocolo se utilizó para evaluar su acción, pero ahora contra algunos mutágenos químicos como la ENU, el CrO<sub>3</sub> y la DMH. Se encontró que el efecto protector de la CCS persistió después de concluido

el pretratamiento hasta por dos días contra los efectos de la ENU; un día contra el  $\text{CrO}_3$  (Cruces *et al.*, 2003) y sólo inmediatamente después contra la DMH (Guerrero, 2004). Después de este periodo de protección, en los individuos pretratados con CCS y luego tratados con DMH se incrementó significativamente la frecuencia de mutación con respecto a los que no se les administró CCS (figura 6).

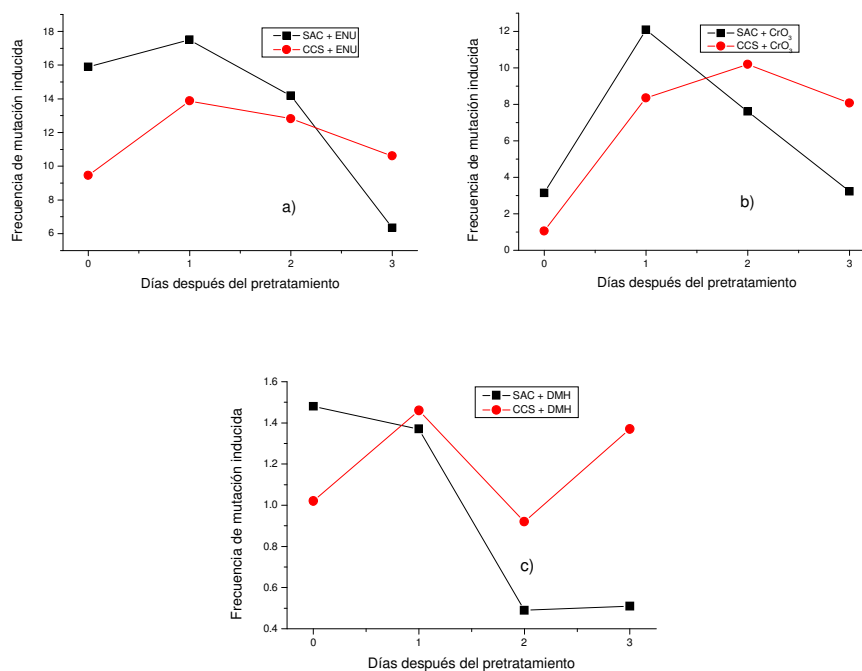


Figura 6. Efecto del retraso en el tratamiento con diferentes mutágenos a) ENU, b)  $\text{CrO}_3$  (Cruces *et al.*, 2003) y c) DMH (Guerrero, 2004) después de concluido el pretratamiento con CCS.

Aun cuando algunos autores reportaron el efecto inhibitor y promotor de la CCS, (Romert *et al.*, 1992) frente a mutágenos de diversas clases y utilizando diferentes sistemas de prueba, ambos efectos los observaron de manera independiente; con nuestro protocolo fue posible evidenciar en los mismos individuos la doble actividad, cuando se pretrataron con una sola concentración de la CCS y contra el mismo agente genotóxico (Pimentel *et al.*, 2000; Cruces *et al.*, 2003; Guerrero, 2004).

## **7. ACCIÓN MODULADORA DE LA CLOROFILINA DEL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO EN CÉLULAS GERMINALES**

Las pruebas con células germinales permiten determinar si el daño al ADN se manifiesta en los descendientes de los individuos que fueron expuestos a agentes mutagénicos. Este aspecto es particularmente importante porque uno de los objetivos de la toxicología genética es el de identificar a todos aquellos compuestos potencialmente mutagénicos cuyos efectos trasciendan a las futuras generaciones de modo que sea posible evitar la exposición y tratar de preservar la integridad del material genético de los seres humanos y sus descendientes. Con base en los resultados obtenidos con células somáticas, en los que se encontró que la CCS tiene un efecto importante sobre las rupturas cromosómicas, se seleccionaron dos pruebas muy útiles para detectar genotoxicidad: La prueba de letales recesivos ligados al sexo (LRLS) y la prueba de la pérdida del cromosoma X en anillo. La primera, como ya se mencionó, sirve para detectar mutaciones génicas, pequeñas deleciones y algunos tipos de aberraciones cromosómicas (Lee *et al.*, 1983; Würigler *et al.*, 1984) y la segunda para detectar rompimientos cromosómicos. Ambas se realizaron con un sistema de camadas para detectar el daño genético inducido durante la espermatogénesis.

### **7.1. Evaluación con la prueba de Letales Recesivos Ligados al Sexo (LRLS)**

Consiste básicamente en exponer a un agente mutagénico los machos de una cepa silvestre cruzarlo con hembras de genotipo *Basc/Basc* y después de dos generaciones contar los letales inducidos. Esta prueba también es conocida como Muller-5. Para tal efecto se usaron machos de la cepa Canton-S y se cruzaron con hembras del mencionado genotipo.

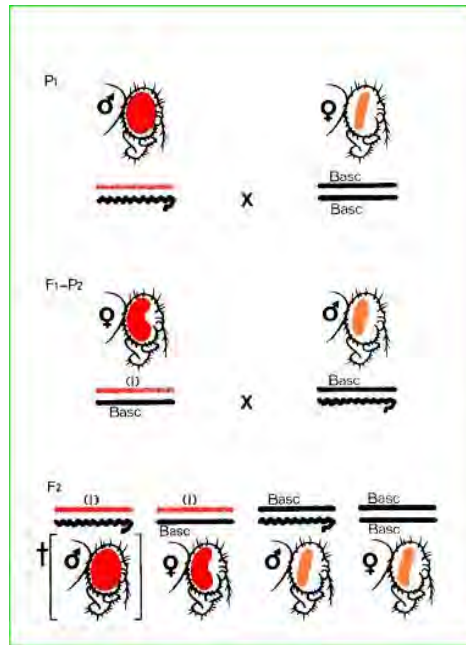


Figura 7. La prueba de letales recesivos ligados al sexo (LRLS). Representado el sistema de cruces ( $P_1$ ;  $F_1 = P_2$ ) y los diferentes tipos de descendientes que se obtienen en la  $F_2$  † representa el macho que muere cuando se induce un letal (Würgler *et al.*, 1984).

Los machos se pretrataron con 72 mM de CCS durante 24 h y después se irradiaron con 0, 10, 20 o 40 Gy de rayos gamma e inmediatamente se cruzaron con las hembras. Los resultados se muestran en la figura 8, donde se puede ver que el daño inducido fue relacionado con la dosis de radiación y que la CCS *per se* incrementó la frecuencia basal de letales. Además, con excepción de las células postmeióticas irradiadas con 20 Gy no se observó efecto protector en ninguna de las células monitoreadas (Moreno, 2005). Estos resultados son congruentes con los obtenidos en un estudio que se hizo en el laboratorio con la prueba de letales dominantes, con el que se demostró que la CCS *per se* incrementó la inducción de letales embrionarios (Olvera *et al.*, 2003), estos resultados contrastan notablemente con los obtenidos en las células somáticas.

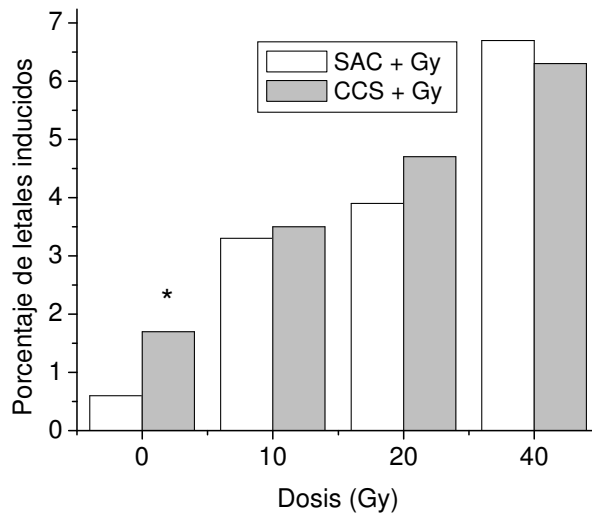


Figura 8. Acción de 72 mM de CCS sobre los letales recesivos inducidos por diferentes dosis de radiación gamma. \*  $P \leq 0.001$  (Moreno, 2004).

## 7.2. Evaluación con la prueba de pérdida del cromosoma X en anillo

Con esta prueba se puede detectar la pérdida parcial del cromosoma X en anillo que portan los machos o las pérdidas de segmentos del cromosoma Y, en ambos casos debido a rupturas dobles. Con esta prueba se siguieron dos protocolos, en uno se pretrató con CCS a los machos y en el otro a las hembras. En ambos casos los machos se irradiaron con 20 Gy de rayos gamma. Con el primer protocolo la CCS no tuvo efecto sobre la frecuencia de pérdidas completas o parciales. Cuando las hembras recibieron el pretratamiento se observó que se redujo la pérdida completa del cromosoma X en los espermatozoides, pero ésta se incrementó en las células meióticas (figura 9). Estos resultados sugieren que la actividad de la CCS en células germinales está relacionada con las enzimas de reparación presentes en el óvulo (Moreno, 2005).

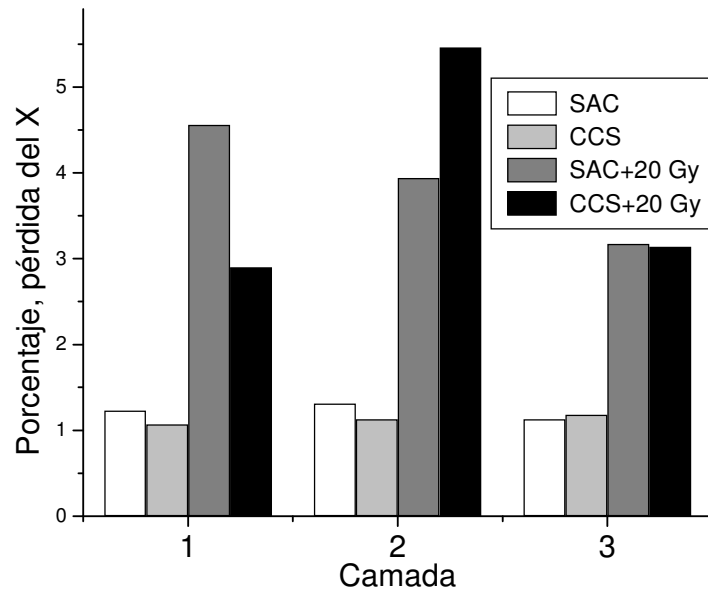


Figura 9. Acción de 72 mM de CCS sobre la pérdidas de cromosomas causadas por 20 Gy de radiación gamma, cuando las hembras fueron pretratadas (Moreno, 2005).

Por último y con base en lo anterior, cabe resaltar que a otro nivel se ha encontrado que la CCS afecta el desarrollo embrionario. Un estudio realizado en ratones en el que a las hembras se les administró diferentes concentraciones del pigmento vía intraperitoneal en el octavo día de la gestación indicó que la CCS provocó la pérdida de los fetos relacionada e indujo malformaciones externas y esqueléticas. Este estudio dejó evidencia de que el agente inhibidor interfiere con el desarrollo embrionario y fetal debido probablemente a un efecto tóxico más que teratógeno (García *et al.*, 2002).

## 8. PERSPECTIVAS

A pesar del avance sustancial en la identificación de posibles quimiopreventores, la aplicación práctica aún presenta serias limitaciones. Algunos agentes actúan como protectores en un órgano, pero son carcinogénicos en otro, por ejemplo el tamoxifén previene el cáncer de mama pero es carcinogénico en las células del útero (Lippman *et al.*, 1998). Algunos otros pueden ser tanto preventivos como carcinogénicos en el mismo órgano dependiendo de las condiciones de exposición y concentración, entre

otras causas. Muchos antioxidantes aceptan y donan electrones, lo que explica su doble actividad como antioxidante y pro-oxidantes. Por ejemplo el ácido ascórbico puede actuar de las dos formas dependiendo de la concentración; la N-acetil cisteína puede actuar como anti o como carcinógeno en pulmón de mamíferos a través de daño oxidante.

Nuestros resultados señalan claramente que la CCS puede actuar como inhibidor o promotor del daño inducido por agentes químicos y radiación ionizante. Aunque algunos otros autores ya han señalado esta doble actividad; ésta es la primera evidencia utilizando el mismo tipo de células y frente al mismo agente mutagénico. Esta doble actividad parece estar relacionada con su concentración dentro del organismo en el momento del tratamiento con el mutágeno. Los resultados obtenidos en esta línea de investigación sugieren la posibilidad de que las concentraciones, más bajas de la probada, de CCS o alguno de sus metabolitos, promuevan el daño al ADN durante el desarrollo larvario, ya que al ir disminuyendo su concentración gradualmente, también lo hace su nivel de protección, de tal manera que en el momento del tratamiento con el mutágeno el resultado puede ser el incremento del daño genético, que hemos observado, en las etapas tardías del desarrollo larvario. Aunque existen pocos antecedentes acerca del efecto de las concentraciones bajas de CCS, se ha sugerido que facilita el transporte de electrones debido a su capacidad oxido reductiva. Este tipo de fenómeno se ha descrito para compuestos endógenos que pueden funcionar como preoxidantes a bajas concentraciones generando radicales libres, pero a concentraciones altas actúan como antioxidantes eliminándolos (Lee y Park, 2003). Esta hipótesis es una de las que se están probando actualmente en el laboratorio de *Drosophila* del ININ.

Dado que la molécula tiene como centro metálico al  $\text{Cu}^{+2}$  el cual puede estar en diferentes estados de oxidación, se presume que podría ser el responsable de la capacidad de la CCS para atrapar radicales libres aunque por sí misma podría generarlos y causar daño genético. Éste podría sumarse al provocado por el tratamiento con el mutágeno, lo que resultaría en un efecto promotor. Para definir con mayor claridad el papel que representa el cobre, actualmente se están probando moléculas análogas a la CCS, pero sin centro metálico. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y en otros alrededor del mundo no han permitido esclarecer con exactitud cuál es el mecanismo de acción de la CCS y bajo qué condiciones la molécula se comporta como un promotor o como un inhibidor del daño genético inducido.

El fracaso de las pruebas clínicas con el  $\beta$ -caroteno administrado a los seres humanos representa el mejor ejemplo de introducción de un agente del que no se

tenía evidencia en ningún sistema de prueba sobre su efecto para disminuir la frecuencia de ningún tipo de cáncer (Lippman *et al.*, 1998; Lippman y Hong, 2002). El interés por utilizarlo en los humanos surgió de los estudios epidemiológicos. Los resultados de las pruebas piloto en los seres humanos fueron mucho más que desalentadores, ya que el agente no sólo no previno del cáncer de pulmón sino que lo incrementó significativamente (Lippman y Hong 2002; Lee y Park 2003).

Por lo anterior, es claro que los estudios clínicos no aportan las bases suficientes para recomendar el uso de un agente. El uso apropiado de un agente quimio-preventivo depende del conocimiento exacto de su mecanismo de acción a todos los niveles. Los modelos animales son particularmente útiles para evaluar la eficacia de los mutágenos para inhibir alguna (s) etapas de la carcinogénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

Abraham S. K., Sarma L., Kesavan P. C. (1994), "Role of chlorophyllin as in vivo clastogen: protection against gamma-radiation and chemical clastogens". *Mut. Res* 322: 209-212.

Arimoto S., Hayatsu H. (1989), "Role of hemin in the inhibition of mutagenic activity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) and other aminoazarenes". *Mutat Res* 213: 217-26.

Bankson D. D., Kestin M., Rifai N. (1993), "Role of free radicals in cancer and atherosclerosis". *Clin Lab Med* 13 (2): 463-480.

Cruces M. P., Pimentel A. E., Zimmering S. (2003), "Evidence suggesting that chlorophyllinb (CCS) may act as an inhibitor or a promoter of genetic damage induced by chromium (VI) oxide (CrO<sub>3</sub>) in somatic cells of *Drosophila*". *Mut. Res* 536: 139-144.

Dashwood R., Guo D. (1992), "Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation". *Carcinogenesis* 13 (7): 1121-6.

Dashwood R. H., (1992), "Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo-(4-5-f)-quinolein (IQ) to rat liver DNA", *Carcinogenesis* 13: 113-118.

Dashwood R. (1997), "Chlorophylls as anticarcinogens" (Review). *Int. J. Oncol* 10: 721-727.



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

De Flora S., Izzoti A., D' Agostini F., Balansky R. M., Noonan D., Albini A. (2002), "Multiple points of intervention of cancer and other mutation-related diseases". *Mutation Research* 480: 9-22.

Fahey J. W., Stephenson K., Albena T., Dinkova-Kostova H., Egner P., Kensler T., Talalay P. (2005), "Chlorophyll, Chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes". *Carcinogenesis* 17: 1247-1255.

Ferruzzi M. G., Failla M. L., Schwartz S. J. (2000), "Sodium copper chlorophyllin: in vitro digestive stability and accumulation by Caco-2 human intestinal cells". *J Agric Food Chem* 50 (7): 2173-9.

García-Rodríguez M. C., Lopez-Santiago V., Altamirano-Lozano M. (2001), "Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood". *Mutat. Res* 496 (1,2): 145-51.

García-Rodríguez M. C., Morales-Ramirez P., Altamirano-Lozano M. (2002), "Effects of chlorophyllin on mouse embryonic and fetal development in vivo". *Teratog. Carcinog. Mutagen* 22 (6): 461-71.

Guo D., Schut H. A., Davis C. D., Snyderwine E. G., Bailey G. S., Dashwood R. H. (1995), "Protection by chlorophyllin and indole-3-carbinol against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat". *Carcinogenesis* 16 (12): 2931-7.

Guerrero G. (2004), *Actividad de la clorofilina protectora o promotora del daño genético inducido por la 1, 2 dimetil hidrazina*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Graf U., Würgler E., Katz A. (1984), "Somatic Mutation and Recombination test in *Drosophila*". *Environ. Mutagen* 6: 153-188.

Graf U., Heo O. S., Ramírez O. O. (1992), "The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination". *Mutat Res* 266 (2): 197-203.

Hall E. J. (1988), "Radiobiology for the radiologist". 4<sup>a</sup> Ed. J.B. Lippincott Company Philadelphia, pp. 183-190.

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". *Toxicol. Appl. Pharmacol* 158: 132-140.

Hecht S. S. (1997), "Tobacco and cancer: approaches using carcinogen biomarkers and chemoprevention". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 883: 91-111.

Kumar, S. S., Chaubey R. B., Desagayam T. P. A., Priyadarsini, K. I., Chauhan P. S. (1999), "Inhibition of radiation-induced DNA in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism of action". *Mut. Res* 425: 71-79.

Lai C. (1979), "Chlorophyll: The active factors in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*". *Nutrition and Cancer* 1: 19-21.

Lee W. R., Abrahamson S., Valencia R., Von Halle E. S., Wurgler F. E., Zimmering S. (1983), "The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program". *Mutat Res* 123(2): 183-279.

Lee B. M., Park K. K. (2003), "Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents". *Mutat. Res* 523: 265-278.

Linares Y. (1998), *Efecto de la clorofilina sobre la genotoxicidad de la ciclofosfamida*. Tesis de Licenciatura Facultad de de Estudios Superiores de Zaragoza. Asesor: M. en C. Martha Patricia Cruces Martínez.

Lippman S. M., Lee J. J., Sabichi A. L. (1998), "Cancer Chemoprevention: Progress and Promise". *Journal of National Cancer Institute* 90: 1515-1528.

Lippman S. M., Hong W. K. (2002), "Cancer prevention science and practice". *Cancer Research* 62: 5119-5125.

Madrigal-Bujaidar E., Velazquez-Guadarrama N., Diaz-Barriga S. (1997), "Inhibitory effect of chlorophyllin on the frequency of sister chromatid exchanges produced by benzo[a]pyrene *in vivo*". *Mutat Res* 388 (1): 79-83.

Marty R., Ouameur A. A., Neault J. F., Tajmir-Riahi H. A. (2004), "RNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin: stability and structural features". *J Biomol Struct Dyn* 22(1): 45-50.

Morales-Ramírez P., García-Rodríguez M. C. (1994), "In vivo effect of chlorophyllin on  $\gamma$ - ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells". *Mut. Res* 320: 329-334.

Morales-Ramírez P., Mendiola-Cruz, M. T. (1995), In vivo radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells", *Mutation Res* 344: 73-78.

Moreno A. (2005), *Acción de la Clorofilina (CCS) sobre los dobles rompimientos inducidos por radiación gamma en células germinales de Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Tecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan.

Moreno R. (2004), *Acción de la clorofilina ante el daño genético inducido por radiación gamma en células germinales de Drosophila*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UAEM.

Negishi T., Arimoto S., Nishizake C., Hayatsu H. (1989), "Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1methyl-5hpyrido[4,3-b]indole (Trp-p-2)". *Carcinogenesis* 376: 97-100.

Odin A. (1997), "Antimutagenicity of porphyrins and non-enzyme porphyrin-containing proteins". *Mut. Res* 387: 55-68.

Olvera O., Arceo C., Cruces M. P., Zimmering S. (1993), "The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of Drosophila". *Mut. Res* 301: 201-204.

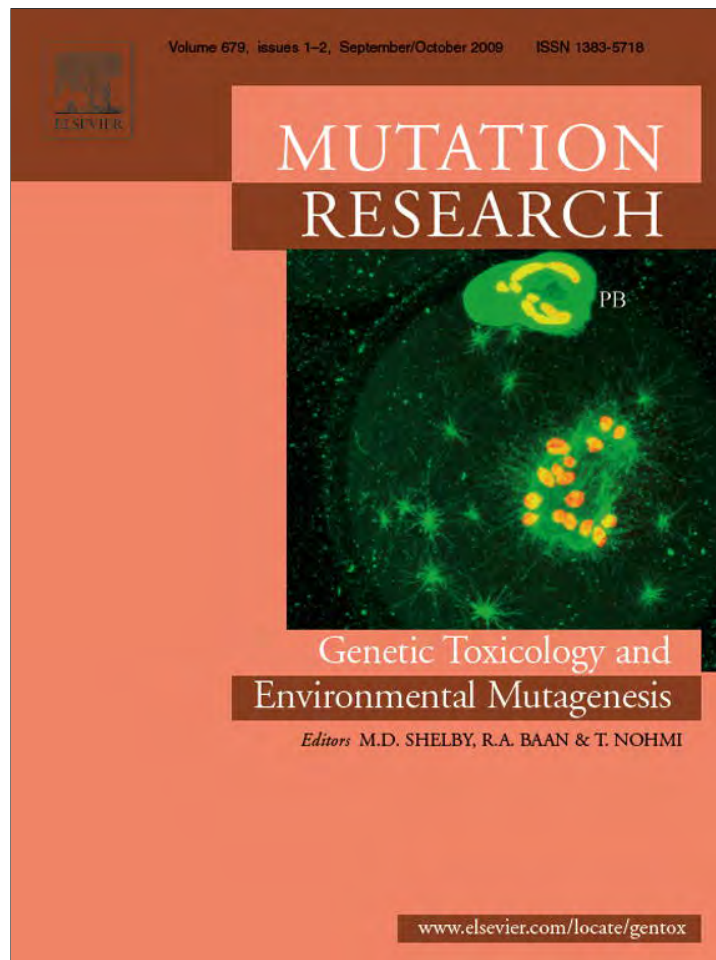
Olvera O., Zimmering S., Cruces M. P., Pimentel E., Arceo C., Guzmán J., De la Rosa M. (1997), "Antimutagenesis in somatic cells of Drosophila as Monitored in the wing spot test", en *Food Factors for Cancer Prevention*. Eds. Ohigasshi, Osawa T. Terao J. Watanabe S. y Yoshikawa T., Ed. Springer-Verla, Tokio, pp. 567-571.

Olvera O., Arceo C., Zimmering S. (2000), "Chlorophyllin (CCS) and the mutagenicity of monofunctional alkylating agent in Drosophila: the action of CCS need not include an influence on metabolic activation". *Mut. Res* 467: 113-117.

Olvera O., Arceo C., Zimmering S. (2003), "The effect of treating Drosophila females with chlorophyllin on the yield of dominant lethals recovered from irradiated sperm". *Mutat Res* 534(1-2): 201-2.

- Ong T., Wong W., Stewart J., Brockman H. E. (1986), "Chlorophyllin: a potent antimutagen against of environmental and dietary complex mixtures". *Mutation Res* 173: 111-115.
- Ong T., Wong W., Stewart J., Brockman H. E. (1989), "Comparative antimutagenicity of complex mixtures in *Salmonella typhimurium* TA 98". *Mutation Res* 222: 19-25.
- Pimentel E., Cruces M. P., Zimmering S. (1999), "On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CCS) in somatic cells of *Drosophila*". *Mutation Res* 446: 189-192.
- Pimentel E., Cruces M. P., Zimmering S. (2000), "Evidence that chlorophyllin (CCS) may behave as an inhibitor or a promoter of radiation-induced genetic damage in somatic cells of *Drosophila*". *Mutation Res* 472: 71-74.
- Ramel C., Cederberg H., Magnusson J., Vogel E., Natarajan A. T., Mullender L. H., Nivard J. M., Parry J. M., Leyson A., Comendador M. A., Sierra L. M., Ferreiro J. A., Consuegra S. (1996), "Somatic recombination, gene amplification and cancer". *Mutat Res* 353: 85-107.
- Romert L. M., Curval M., Jennssen D. (1992), "Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenesis". *Mutagenesis* 7(2): 349-355.
- Sandler R. S. (1996), "Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory agents in the prevention of colorectal cancer". *Important. Adv. Oncol* 123-37.
- Tajmir-Riahi H. A., Neault J. F., Diamantoglou S. (2004), "DNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin as antimutagenic agents: synthesis, stability, and structural features". *Methods Mol Biol* 274: 159-171.
- Würgler F. E. (1992), "Recombination and Gene conversion". *Mutat Res* 250: 275-290.
- Würgler F. E., Sobels, F. H. and Vogel, E. (1984), "*Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes". *Handbook of mutagenicity test procedures*. Eds. Kilbey B. J., Legator M., Nichols W. and Ramel C. Elsevier Science Publishers B.V. pp. 35-42.
- Zimmering S., Olvera O., Hernández M. E., Cruces M. P., Arceo C., Pimentel E. (1990). "Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*". *Mutation. Res* 245: 47-49.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

## Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gentox](http://www.elsevier.com/locate/gentox)  
 Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)



Short communication

# Evidence that low concentrations of chlorophyllin (CHLN) increase the genetic damage induced by gamma rays in somatic cells of *Drosophila*

M.P. Cruces<sup>a,\*</sup>, E. Pimentel<sup>a</sup>, S. Zimmering<sup>b</sup><sup>a</sup> Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). Carretera Mexico-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, P.O. Box 18-1027, 11801, Mexico<sup>b</sup> Program in Biology, Brown University, Providence, RI 02912, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 May 2009

Received in revised form 26 June 2009

Accepted 9 July 2009

Available online 16 July 2009

## Keywords:

*Drosophila*

Chlorophyllin

Mutagenesis

Low concentrations

Inhibition

Promotion

## ABSTRACT

It was first demonstrated in *Salmonella* that higher and lower concentrations of chlorophyllin (CHLN) may have effects in opposite directions, higher doses inhibiting and lower doses promoting the mutagenic activity of certain tobacco-related nitrosamines. Previous work of our group demonstrated that CHLN may have both a promoter and an inhibitory effect on mutagenesis in *Drosophila*. The present paper reviews the evidence obtained in our laboratory using gamma rays as the mutagenic agent, that higher and lower pretreatment concentrations of CHLN are associated with inhibitory and promoting effects, respectively, as in *Salmonella*.

Employing the wing spot test, 48 h larvae were pretreated with various concentrations of CHLN from 0 to 69 mM and then treated with 10 Gy gamma rays. With the highest concentration of CHLN, an approximate 54% reduction in mutagenesis was observed. At 35 mM a remnant of this inhibitory effect was found in that a significant decrease was limited to the twin spot category. Evidence of promotion was first seen at 4.3 mM CHLN, an effect which persisted for the remaining five lower concentrations, the most pronounced evidence of promotion being found at the four lowest concentrations, 0.03–1.1 mM CHLN. It should be noted that no evidence of genotoxicity was found for CHLN alone, an observation consistent with the several reports in the literature. The results are taken as strong evidence that pretreatment with low concentrations of CHLN promotes DNA damage induced by gamma rays in somatic cells of *Drosophila*.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

CHLN has been demonstrated to act as an inhibitor [1–6] or, under certain circumstances, as both an inhibitor and a promoter [7–9] of mutagenic and carcinogenic activity of a variety of agents in diverse organisms. For example, it was reported in *Salmonella* [7] that a concentration of 0.05  $\mu\text{mol}$  of CHLN per plate doubled the mutagenicity of the tobacco-specific nitrosamines, *N*-nitrosornicotine (NNN) and 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosoamino)-1-(3-pyridinyl)-2 butanone (NNK), whereas higher concentrations, i.e. 2  $\mu\text{mol}$  per plate, reduced the mutagenic effect of both compounds. In rats [8], a concentration of CHLN of 0.01% resulted in reduction in the number of colonic crypts whereas when the concentration was ten times lower an increase was found. In our earlier work [9] evidence was found that CHLN can act as an inhibitor or a promoter of DNA damage induced in somatic cells by the radiomimetic agent chromium trioxide. In this study, if use of the mutagenic agent was delayed for 0 or 1 day after completion of the CHLN pretreatment, a highly significant reduction in DNA damage

was found. Contrarily, a delay of 2 or 3 days was associated with a strong promotion rather than an inhibitory effect. This finding suggested the possibility that the concentration of CHLN was progressively reduced [4] and in this way initiated the promoter effect.

The current work was carried out to determine, in a series of CHLN pretreatment concentrations in the range 0.03–69 mM, if lower concentrations promote DNA damage induced by gamma rays in somatic cells of *Drosophila*. (In earlier works [5,6,9] in this field, the 69 mM concentration was referred to as a 5% solution).

## 2. Materials and methods

The wing spot test [10] was used to evaluate the effect of high and low concentrations of CHLN on the mutagenic action of gamma rays. Tests of all 11 CHLN concentrations were carried out at the same time. Three-day-old multiple wing hair (*mwh*) females and *flare*<sup>3</sup>/*Serratia* (*flr*<sup>3</sup>/*Ser*) males were permitted to mate for 2 h and then transferred to an egg-laying surface. Oviposition was restricted to a 2 h period in order to obtain more homogeneous samples in the ages of individuals under test. Then, 48 h old larvae were collected into a separation funnel using a 20% sucrose solution in tap water. After having allowed the larvae to float to the top, the sucrose solution was drained out of the funnel and the larvae subsequently washed out with tap water (24  $\pm$  1 °C) and collected using a fine nylon mesh.

Pretreatment consisted of placing a small mass of larvae in 250 ml culture bottles containing a filter paper (Whatman No.2) with 4 ml of a given CHLN concentration from 0 to 69 mM and allowed to feed for 24 h. CHLN was dissolved in 5% sucrose solved in distilled water.

\* Corresponding author. Tel.: +55 53 29 72 30; fax: +55 53 29 7387.  
 E-mail address: [marthapatricia.cruces@inin.gob.mx](mailto:marthapatricia.cruces@inin.gob.mx) (M.P. Cruces).

**Table 1**  
Results of the treatment of 48 h-old *mwh* +/- *flr*<sup>3</sup> *Drosophila* larvae with various concentrations of CHLN. Combined results of at least three experiments.

Treatment CHLN (mM)	No. wings	Spots								P values			
		Small singles ( <i>mwh</i> + <i>flr</i> <sup>3</sup> )		Large singles ( <i>mwh</i> + <i>flr</i> <sup>3</sup> )		Twin spots		Total spots		Small S.	Large S.	Twin S.	Total S.
		#	s/w	#	s/w	#	s/w	#	s/w				
0.00	480	106	0.22	14	0.03	1	0.002	121	0.25				
0.03	240	57	0.24	5	0.02	4	0.02	66	0.27	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0.12	240	43	0.18	13	0.05	0	0.00	56	0.23	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0.25	240	43	0.18	4	0.02	5	0.02	52	0.22	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1.1	240	46	0.19	1	0.04	0	0.00	47	0.20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2.2	240	41	0.17	6	0.02	0	0.00	47	0.20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
4.3	240	43	0.18	3	0.01	1	0.001	47	0.20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
8.6	240	50	0.21	2	0.01	0	0.00	52	0.22	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
17	240	46	0.19	5	0.02	1	0.004	52	0.22	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
35	240	50	0.21	6	0.02	0	0.00	56	0.23	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
69	240	41	0.17	7	0.03	1	0.004	49	0.20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

The symbols '#' and 's/w' stand for the number of spots and the frequency of spots per wing, respectively. The four columns headed by P values refer to the probability of the difference in s/w values between each of the experimental CHLN concentrations and the control.

All experiments were carried out in a Cole–Palmer incubator at 25 ± 0.5 °C and 60% relative humidity. Upon termination of the pretreatment period, larvae from each CHLN concentration were washed with tap water in order to eliminate excess CHLN and immediately treated or not with 10 Gy gamma rays to establish two groups: an irradiated group with a range of CHLN concentrations and a non-irradiated group with the same range of concentrations. Irradiation was carried out placing the larvae in small vials (2.5 cm diameter and 3 cm high) containing a paper filter (Whatman No.2) covered with a polyurethane cap using the experimental source Gamma-Cell Co<sup>60</sup> (Nordion, Canada); the dose rate at the time the irradiations were carried out was 121.127 Gy/h. After irradiation, the larvae were placed in vials with 1.5 g of instant food (Formula 4-24 Carolina Biol. Supply Co.) dissolved in 5 ml distilled water, and incubated until the conclusion of development. Experiments were carried out in triplicate. Upon eclosion, adults of the genetic composition *mwh* +/- *flr*<sup>3</sup> (i.e., non-*Ser*) were collected from each treatment and fixed in 70% alcohol. The wings of the adults were mounted on slides for analysis in a 400× microscope. Genetic changes induced in the larval wing disc cells produce groups of mutant cells (spots) in the adult wing blade. Tricomes derived from the imaginal mutant cells were examined to identify small single spots (one or two cells) of *mwh* or *flr*<sup>3</sup>, large single spots (greater than 2 cells) of either *mwh* or *flr*<sup>3</sup>, and *mwh*-*flr*<sup>3</sup> twin spots. Single spots (either *mwh* or *flr*<sup>3</sup>) arise from point mutations or deletions at the wild type allele of each locus or for *mwh*, mitotic recombination in the chromosomal region between *mwh* and *flr*<sup>3</sup>. Twin spots arise following a recombination event between *flr*<sup>3</sup> and the centromere. See Lindsley and Zimm for a description of mutants [11].

The chi-square test for proportions was used to identify significant differences between the results of the 10 Gy gamma group in the absence of CHLN and the remaining 10 Gy groups in the presence of the various concentrations of CHLN. The compound, chlorophyllin-trisodium salt (C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>CuN<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>6</sub>) CAS: 11006-34-1 was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

### 3. Results and discussion

Table 1 shows the genotoxic effects of the different CHLN concentrations without irradiation. Inspection of the table provides no evidence that CHLN alone is genotoxic. This response is similar to that reported in the literature in cases where it was studied *in vitro* in the micronucleus test in V79 cells [12,13], in CHO cells [14,15] and, *in vivo*, by examining for chromosomal aberrations in mouse bone marrow cells [16].

Table 2 provides the results of pretreatment of larvae with different concentrations of CHLN followed by treatment with gamma rays. The last entry in the table, dealing with effects of pretreatment with 69 mM CHLN, reveals a significant reduction (*P* < 0.001) in all categories of spots in agreement with [6]. A remnant of this inhibitory effect may be seen at 35 mM CHLN where a significant decrease is limited to the twin spot category. Evidence of a promotion effect is first seen at 4.3 mM CHLN, an effect which persists for the remaining five lower concentrations, the most pronounced effects being found at the four lowest concentrations, 0.03–1.1 mM CHLN. Romert et al. [7], using the *Salmonella*/microsome assay, found that higher concentrations of CHLN inhibit and lower concentrations increase the mutagenic effects of certain tobacco nitrosamines. At a concentration of CHLN only 10% of that which resulted in inhibition, the incidence of genetic damage was dou-

**Table 2**  
Results of the pretreatment of 48 h-old *mwh* +/- *flr*<sup>3</sup> *Drosophila* larvae with various concentrations of CHLN and its effect on gamma ray mutagenesis. Combined results of at least three experiments.

Treatment CHLN (mM) + 10 Gy	No. wings	Spots								P values			
		Small singles ( <i>mwh</i> + <i>flr</i> <sup>3</sup> )		Large singles ( <i>mwh</i> + <i>flr</i> <sup>3</sup> )		Twin spots		Total spots		Small S.	Large S.	Twin S.	Total S.
		#	s/w	#	s/w	#	s/w	#	s/w				
0.00 +	240	61	0.25	114	0.47	9	0.04	184	0.77				
0.03 +	240	96	0.40	218	0.91	55	0.23	369	1.54	↑ < 0.01	↑ < 0.001	↑ < 0.001	↑ < 0.001
0.12 +	240	103	0.43	182	0.76	41	0.17	326	1.36	↑ < 0.01	↑ < 0.01	↑ < 0.001	↑ < 0.001
0.25 +	240	94	0.39	170	0.71	19	0.08	283	1.18	↑ < 0.02	↑ < 0.01	n.s.	↑ < 0.001
1.1 +	240	108	0.45	161	0.67	24	0.10	293	1.23	↑ < 0.001	↑ < 0.01	↑ < 0.01	↑ < 0.001
2.2 +	240	77	0.32	130	0.54	14	0.06	221	0.92	n.s.	n.s.	n.s.	↑ < 0.05
4.3 +	240	67	0.28	163	0.68	22	0.09	252	1.05	n.s.	↑ < 0.05	↑ < 0.05	↑ < 0.01
8.6 +	240	86	0.36	118	0.49	1	0.004	205	0.85	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
17 +	240	64	0.27	116	0.48	3	0.01	183	0.76	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
35 +	240	79	0.33	115	0.48	0	0.00	194	0.81	n.s.	n.s.	↓ < 0.05	n.s.
69 +	240	27	0.11	57	0.24	1	0.004	85	0.35	↓ < 0.001	↓ < 0.001	↓ < 0.05	↓ < 0.001

The symbols '#' and 's/w' stand for the number of spots and the frequency of spots per wing, respectively. The four columns headed by P values refer to the probability of the difference in s/w values between each concentration of CHLN in the (CHLN + 10 Gy) groups and the control group. Arrows pointing up represent significant increases, those pointing down significant decreases compared with the control.

bled. In the present work, at a CHLN concentration of 69 mM, the spots per wing (s/w) frequency was reduced by 54%. Contrarily, at a CHLN mean concentration of 0.4 mM for the four lowest concentrations which constitute only some 0.58% of that producing strong inhibition, the mutation frequency is increased by 69%. Therefore, since (1) no evidence was found in the current work that CHLN alone is genotoxic and (2) the strongest increase in spot frequency is found at the four lowest concentrations of CHLN, the suggestion may be made that a significant promotion of DNA damage occurs in somatic cells of *Drosophila* when low concentrations of CHLN serve as a pretreatment to gamma irradiation.

As in the case of other antimutagenic agents, CHLN may act by more than one mechanism, e.g. antioxidant activity through scavenging of free radicals [17,18], formation of complexes with mutagens/carcinogens via strong interactions and modulation of xenobiotic metabolizing enzymes [4]. However, these mechanisms may also include adverse effects; any substance that scavenges oxygen or other radicals may also generate or propagate oxygen radicals that could damage DNA eventually. This explanation was offered to account for the ambiguous effect produced by the well known antioxidants such as ascorbic acid and  $\beta$ -carotene [19].

Two final points are worth noting: (1) with regard to the work of Romert et al. [7], Waters et al. [3], suggested that “the potentiating capacity of CHLN at low concentrations could be overwhelmed at higher concentrations by its interaction with activating enzymes and/or by simple complex formation”, an explanation that could account for our current results as well, and (2) the present data suggest that whereas the initial effect of high concentrations of CHLN in combination with mutagenic agent that responds as gamma rays do may be beneficial in that it reduces DNA damage, as the concentrations of CHLN recede with time, the possibility exists that a promotion effect will take place at lower concentrations placing the individual at risk of incurring DNA damage.

#### Conflict of interest

None.

#### Acknowledgements

This work was supported by grant no. 52868-Q from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico, to E. Pimentel and involved in part research carried out by M.P. Cruces to obtain the Ph.D. in the Biological Sciences Post-graduate at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors wish to acknowledge the splendid technical assistance of Dora Luz Barron Manrique. We

deeply appreciate the work of the Lynch and Chavez families for facilitating a smooth exchange of information between Mexico and the US during the course of this investigation.

#### References

- [1] R. Dashwood, Chlorophylls as anticarcinogens, *Int. J. Oncol.* 10 (1997) 721–727.
- [2] A.P. Odin, Antimutagenicity of the porphyrins and non-enzyme porphyrin-containing proteins, *Mutat. Res.* 387 (1997) 55–68.
- [3] M.D. Waters, H.F. Stack, M.A. Jackson, H.E. Brockman, S. De Flora, Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data, *Mutat. Res.* 350 (1996) 109–129.
- [4] M. Ferruzzi, J. Blakeslee, Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives, *Nutr. Res.* 27 (2007) 1–12.
- [5] S. Zimmering, O. Olvera, M.E. Hernández, M.P. Cruces, C. Arceo, E. Pimentel, Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*, *Mutat. Res.* 245 (1990) 47–49.
- [6] E. Pimentel, M.P. Cruces, S. Zimmering, On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cells of *Drosophila*, *Mutat. Res.* 446 (1999) 189–192.
- [7] L. Romert, M. Curvall, D. Jenssen, Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity, *Mutagenesis* 7 (1992) 349–355.
- [8] M. Xu, G.A. Orner, G.S. Bailey, G.D. Stoner, D.T. Horio, R.H. Dashwood, Post-initiation effects of chlorophyllin and indole-3-carbinol in rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methyl-imidazo, *Carcinogenesis* 22 (2001) 309–314.
- [9] M.P. Cruces, E. Pimentel, S. Zimmering, Evidence suggesting that chlorophyllin (CHLN) may act as an inhibitor or a promoter of genetic damage induced by chromium (VI) oxide (CrO<sub>3</sub>) in somatic cells of *Drosophila*, *Mutat. Res.* 536 (2003) 139–144.
- [10] U. Graf, F.E. Würzler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, P.G. Kale, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.* 6 (1984) 153–188.
- [11] D. Lindsley, G. Zimm, *The genome of Drosophila melanogaster*, University of California, San Diego, La Jolla, CA, 1985, 92093.
- [12] G.C. Bez, B.Q. Jordão, V.E.P. Vicentini, M.S. Mantovani, Investigation of genotoxic and antigenotoxic activity of chlorophylls and chlorophyllin in culture V79 cells, *Mutat. Res.* 497 (2001) 139–145.
- [13] L.G.L. Rampazo, B.Q. Jordão, V.E.P. Vicentini, M.S. Mantovani, Chlorophyllin antimutagenesis mechanisms under different treatment conditions in the micronucleus assay in V79 cells, *Cytologia* 67 (2002) 323–327.
- [14] P.D. Negraes, B.Q. Jordão, V.E.P. Vincentini, M.S. Mantovani, Investigation of chlorophyllin in CHO-k1 (wild-type) and CHO-xrs5 (repair-deficient) cells by a chromosomal assay, *Cytologia* 68 (2003) 249–253.
- [15] P.D. Negraes, B.Q. Jordão, V.E. Vincentini, M.S. Mantovani, Anticlastogenicity of chlorophyllin in the different cell cycle phases in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.* 557 (2004) 177–182.
- [16] D. Sarkar, A. Sharma, G. Talukder, Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*, *Mutat. Res.* 301 (1993) 33–38.
- [17] K.K. Boloor, J.P. Kamat, T.P. Devasagayam, Chlorophyllin as protector of mitochondrial membranes against gamma-radiation and photosensitization, *Toxicology* 155 (2000) 63–71.
- [18] J.P. Kamat, K.K. Boloor, T.P. Devasagayam, Chlorophyll as an effective antioxidant against the membrane damage *in vitro* and *ex vivo*, *Biochim. Biophys. Acta* 1487 (2000) 113–127.
- [19] B.M. Lee, K.K. Park, Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents, *Mutat. Res.* 523–524 (2003) 265–278.