

91
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS



**INVESTIGACION DE LAS PROPIEDADES
RADIOPROTECTORAS DE LA CLOROFI-
LINA ANTE LOS RAYOS GAMMA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :

MARIA EUGENIA HERNANDEZ GUTIERREZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO	PAG.
RESUMEN	I-II
INTRODUCCION	1-6
I. GENERALIDADES DE LAS RADIACIONES	6-7
II. RADIACIONES	
Clasificación de las radiaciones ionizantes	7-8
Efecto de la radiación ionizante	8-10
Daños celulares causados por radiaciones ionizantes	10-12
III. RADIOPROTECTORES	12-13
Radioprotectores químicos	13-14
Mecanismos de radioprotección	14-15
IV. <u>Drosophila melanogaster</u> COMO SISTEMA DE PRUEBA	16-20
ANTECEDENTES	20-25
OBJETIVO E HIPOTESIS	26
MATERIAL Y METODO	26-30
RESULTADOS	30-32
DISCUSION	32-37
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39-43
APENDICE A	44-53
APENDICE B	54-56

RESUMEN

Desde hace varias décadas fue demostrado que la clorofila y sus derivados solubles en agua, como las clorofilinas, tenían valor terapéutico para el tratamiento de varios malestares; últimamente se observó que también tienen una actividad antimutagénica en diferentes sistemas de prueba.

El objetivo de esta tesis fue investigar si la clorofilina tiene efecto radioprotector ante los rayos gamma. Para este fin, se utilizó la prueba de mutación somática y recombinación (SMART) en el ala de Drosophila. Esta prueba detecta, simultáneamente, mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas y recombinación mitótica.

Para realizar los experimentos se formaron cuatro grupos: el primero se trató con sacarosa al 5%; el segundo con clorofilina al 5%; el tercero con sacarosa al 5% mas 20 Gy de rayos gamma y el cuarto con clorofilina al 5% mas 20 Gy de rayos gamma. Los tratamientos tuvieron una duración de 24 horas.

En los tres experimentos realizados los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en el número de manchas encontradas

ii.

en el grupo pretratado con clorofilina a la irradiación.

Se concluye que la clorofilina tuvo un efecto radioprotector cuando se irradiaron las larvas de *Drosophila* con 20 Gy de rayos gamma.

También se noto disminución significativa de la recombinación mitótica. Este hecho es importante porque los procesos recombinogénicos están relacionados con la inducción de cáncer.

INTRODUCCION

Desde la formación de la Tierra -hace aproximadamente 4 mil 750 millones de años- hasta nuestros días, las radiaciones han estado involucradas en el origen y preservación de la vida (Negrón, 1986).

En la Tierra Primitiva, la síntesis de moléculas biológicamente importantes ocurrió gracias a las condiciones ambientales existentes, donde interactuaban la energía proveniente del sol, las descargas eléctricas, la energía térmica procedente de la actividad volcánica y la radiactividad (Negrón, 1990).

Según evidencias fósiles, la vida microbiana existió desde hace 3 mil millones de años, en un ambiente de tipo reductivo (Brock, 1974).

Stanley L. Miller experimentalmente logró la síntesis de compuestos orgánicos a partir de una mezcla de hidrógeno, amoníaco, metano y vapor de agua, en una atmósfera parecida a la que hubo en la Tierra Primitiva (Junqueira, 1983).

Para la formación de una célula primitiva a partir de una mezcla rica en compuestos orgánicos, tuvo que darse un largo y complicado proceso que dió como resultado células que poseían dos rasgos

básicos: a) la habilidad para acumular, convertir y transformar nutrientes en energía y b) la capacidad para duplicarse y dejar descendencia (Brock, 1974).

Ambas características requirieron del desarrollo de una estructura celular para conservar y proteger el material orgánico y con ello dar origen, después de un largo y complejo proceso, a las primeras células denominadas procariontes, que tienen como rasgo la presencia de una membrana plasmática rodeada de una pared celular. Esta estructura permitió tener un control de las interacciones dinámicas con el medio, protegiendo y albergando los componentes celulares.

Otra particularidad de estos organismos era que el material cromosómico se encontraba en el citoplasma sin una membrana que separara el contenido nuclear del citoplasmático.

Por la presión de selección de su medio, estos organismos sufrían alteraciones en el material genético. Con estos cambios, surgieron paralelamente los primeros intentos de mecanismos de reparación, así como nuevos organismos con capacidad para reparar los daños causados.

La diversidad de la vida en la Tierra dependió, posteriormente, de la aparición de células autotróficas y del paso de una atmósfera reductiva

a una oxidativa (Junqueira, 1983).

Con la generación, acumulación y difusión del oxígeno, se formó la capa de ozono que protegió a la Tierra del daño provocado por las radiaciones provenientes del sol.

La transformación de la atmósfera provocó cambios que permitieron la aparición de células eucariontes, cuya característica principal es una mayor complejidad en sus sistemas: de protección estructural, metabólicos y de reparación.

La sobrevivencia y diversidad de la célula no hubiera sido posible sin los mecanismos de reparación (fotoreactivación, reparación por escisión, reparación posreplicativa, etc.) y los procesos mutacionales.

El mecanismo de fotoreactivación debió ser uno de los primeros que surgieron, pues además de estar presente tanto en procariontes como en eucariontes, es muy específico y repara sólo daños producidos por radiación ultravioleta (Goodenough, 1981).

Paralelamente a los cambios biológicos, los diferentes mecanismos de reparación evolucionaron y adquirieron el perfil que actualmente conocemos. A las radiaciones naturales, que contribuyeron para el origen y evolución de la vida, se han sumado recientemente otras que fueron inducidas por el

hombre.

En las últimas décadas, la energía nuclear ha contribuido significativamente para el desarrollo tecnológico e industrial contemporáneo. En la agricultura, se ha logrado mejorar plantas, produciendo variedades más resistentes a los diferentes agentes físicos, químicos y biológicos a los que están expuestos. En la eliminación de plagas por insectos, se alcanzó éxito con la introducción de machos estériles que hacen disminuir la descendencia de los insectos dañinos. La esterilización se logra con su exposición a la radiación gamma. En la industria alimentaria, se utiliza para conservar alimentos y así alargar su período útil (Díez, 1990).

También se fabrican reactores para fines específicos: los isótopos radiactivos producidos en éstos, son utilizados como nuevos instrumentos de diagnóstico para descubrir algunos procesos metabólicos que habían sido indescifrables con las técnicas químicas y bioquímicas convencionales (Clark, 1979).

Con la fabricación de centrales nucleoelectricas, se pretende hacer frente a la escasez de hidrocarburos, fuente principal de energía en la actualidad (Clark, 1979).

Con este proceso se disminuye la dependencia de los hidrocarburos, pero por otro lado se incrementan los costos biológicos, pues el mal manejo de la energía nuclear puede propiciar grandes tragedias. Los accidentes de Chernobil (1986) y de la Isla de Tres Millas (1979), son muestra de ello (United Press International, PNUMA, 1986).

Este tipo de energía, desgraciadamente ha sido utilizada también con fines bélicos. ¿Quién puede olvidar Hiroshisa y Nagasaki con sus 115 mil muertos y las consecuencias físicas, ecológicas y de otros tipos en la población y el territorio de esa nación asiática?

Los acontecimientos arriba mencionados no han detenido la utilización de la energía atómica con fines militares. Por ejemplo, la ONU reveló recientemente que en la actualidad hay en el mundo más de 50 mil cargas nucleares, equivalentes a un millón de bombas como la lanzada sobre Hiroshisa en 1945 (Herrera, 1985).

Nadie puede subestimar los efectos negativos que causa el mal uso de la energía nuclear, pero tampoco se deben minimizar sus beneficios.

En el área de la medicina, la aplicación de las radiaciones ha permitido avanzar en el tratamiento

del cáncer (Díaz, 1990). Ahora bien, cabe indicar que este proceso no ha sido del todo exitoso, pues se detectó que también puede causar daño a los tejidos adyacentes al tumor, por lo cual una parte de las investigaciones en el área de la radioterapia se dedica a hallar compuestos que minimicen ese tipo de lesiones (Arena, 1971).

A estos compuestos se les denominó radioprotectores de tipo químico que, suministrados antes de la exposición, tienen la capacidad de preservar a las células de las alteraciones inducidas por la radiación.

GENERALIDADES DE LAS RADIACIONES

De 1886 a 1898, Roetgen, Becquerel, Thomson, Pierre y Marie Curie descubrieron, respectivamente, los rayos X, la radiactividad, el electrón y los elementos radiactivos radio y polonio (Selaan, 1983)

Las radiaciones se clasifican en ionizantes y no ionizantes. Las primeras reciben este nombre porque cuando inciden sobre los átomos, su energía es capaz de sacar a los electrones de sus órbitas, ionizándolos. Esta energía oscila desde unos cuantos Kev a cientos de Mev.

Por su parte, las radiaciones no ionizantes se mantienen en un rango de 10^{-2} a 10^2 eV.

CLASIFICACION DE LAS RADIACIONES IONIZANTES

- 1.- Radiación Electromagnética: ondas eléctricas y magnéticas simultáneas con alta frecuencia y corta longitud de onda como los rayos X y gamma (Arena, 1971).
- 2.- Partículas: De alta energía emitidas por el decaimiento radiactivo de ciertos elementos como las alfa, beta, protones y neutrones (Arena, 1971).

Ya, desde la época de Becquerel se comenzó a observar que había efectos adversos causados por la radiación. El físico e ingeniero francés, al transportar radio en un tubo, sufrió accidentalmente irritación en la piel. Posteriormente, Pierre Curie expuso deliberadamente un área de su piel al radio y verificó las observaciones de su colega.

Con los hallazgos anteriores, se descubrió que las radiaciones ionizantes son emitidas espontáneamente por algunos elementos químicos y los efectos que tienen sobre la materia viva. Fue

de particular interés estudiar este tipo de radiación.

Bergonie y Tribondeau expusieron en 1906 testículos de conejo a los rayos X, y con los resultados de sus observaciones formularon una ley que establece: "La radiosensibilidad de las células es directamente proporcional a su actividad reproductiva e inversamente proporcional a su grado de diferenciación" (Selman, 1983).

EFFECTOS DE LA RADIACION IONIZANTE

a) Efecto Directo: los fotones de la radiación interactúan sobre los átomos, liberando electrones de su orbital e ionizándolos.

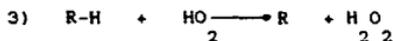
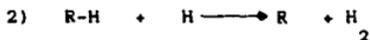
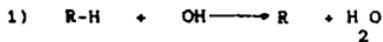
b) Efecto Indirecto: Los radicales libres interactúan con otras moléculas, causando la formación de radicales libres mediante la liberación de electrones, multiplicando así el efecto ionizante en forma indirecta. (Fig. 1, ver Apendice A)

IONIZACION INDIRECTA

Durante la acción de la radiación ionizante, ocurren cambios importantes en el medio acuoso



Reacciones entre radicales libres y moléculas orgánicas:



En virtud de que los radicales libres contienen electrones no apareados, al combinarse con otras moléculas biológicas las reducen o las oxidan, causando disturbios en el metabolismo y la reproducción celular (Arena, 1971).

DAÑOS CELULARES CAUSADOS POR RADIACIONES IONIZANTES

La radiobiología está particularmente interesada en las lesiones producidas por las radiaciones ionizantes. Se sabe que las alteraciones pueden presentarse a nivel

estructural, metabólico y genético; estas últimas son muy importantes por su carácter hereditario a las siguientes generaciones y se pueden agrupar en dos tipos (Goodenough, 1981):

- 1) **Mutaciones Puntuales:** son alteraciones sobre uno o varios nucleótidos de un gene, por sustitución, inserción y delección.
- 2) **Aberraciones Cromosómicas:** estos daños pueden ser de tipo estructural y numéricos. Las primeras se deben a alteraciones cromosómicas, como las inversiones y translocaciones que son rearrreglos de grupos de genes en un mismo cromosoma o de un cromosoma a otro; o por duplicaciones o delecciones en el número de genes de un cromosoma.

Las segundas son el resultado de una alteración en la segregación cromosómica durante la división celular, ocasionada por una no disyunción que produce células monosómicas y trisómicas como, por ejemplo, en mamíferos y Drosophila.

En la célula existe la posibilidad de que durante y después de la exposición a la radiación ocurran los siguientes eventos (Arena, 1971):

- a) Las células mueran durante la irradiación.
- b) El deceso ocurra después de cierto tiempo a la

irradiación.

- c) Las células sobrevivan, pero las mitosis queden permanentemente inhibidas.

- d) Las células sobrevivan y se dividan, pero las primeras mitosis, después de la irradiación, estén retardadas.

Hay daños específicos en función de la fase del ciclo celular en que se irradie. Por ejemplo, en la mitosis se puede inducir muerte reproductiva, en G₁ retardo de la división y daño cromosómico y en G₂ alteración de la síntesis de ADN (Kedar, 1984).

La magnitud del daño está condicionado a una serie de factores que pueden modificar la respuesta a la irradiación, como:

- i) tipo de radiación, ii) mecanismos de reparación celular, iii) etapa de las células en el ciclo reproductivo, iv) oxigenación, v) estado fisiológico, edad-estado nutricional, etc. y vi) uso de modificadores químicos (Arena, 1971).

RADIOPROTECTORES

La respuesta de un organismo a la radiación puede aumentarse, disminuirse y/o inhibirse por

medio de la utilización de modificadores químicos, entre los cuales se encuentran los denominados sensibilizadores y radioprotectores (Pizarello, 1982).

Los radioprotectores químicos son compuestos que protegen a las células del daño causado cuando son administrados antes de la irradiación.

RADIOPROTECTORES QUIMICOS

Los propósitos básicos para la investigación de radioprotectores químicos son dos (Pizarello, 1982):

- 1.- Proteger al tejido normal, sobre todo durante las terapias de irradiación de tejidos malignos (radioterapia).
- 2.- Obtener conocimiento de los mecanismos del daño radioinducido.

Estos agentes radioprotectores se han dividido en los siguientes grupos:

- a) Aminotioles: dentro de este grupo encontramos a la cisteína, 2 mercaptoetilamina (cisteamina), cistamina, aminoetil isotiourea dihidrobromuro y 2-mercapto etilguanidina.

- b) Agentes Farmacológicos: la morfina y la heroína, así como tranquilizadores, drogas colinérgicas, dopamina, serotonina, hormonas, etc.
- c) Otros Agentes: cianuro de sodio y derivados de ácidos nucleicos (como el uracilo, 5-hidroxi-4 metil uracilo, 5-amino-4 metilcitosina).

El estudio de los radioprotectores, cuya eficacia es diferente si se aplica in vivo o in vitro, permitió el descubrimiento de nuevos compuestos, así como dilucidar los posibles mecanismos mediante los cuales se logra la protección de la célula.

El mecanismo implicado en la disminución de los efectos de la irradiación, ha sido objeto de numerosas discusiones en los últimos años y generó algunas teorías que son punto de debate en el presente (Arena, 1971 y Pizarello, 1982).

MECANISMOS DE RADIOPROTECCION

Algunas de las hipótesis planteadas para explicar el efecto de los radioprotectores son: a) por medio de captación de radicales libres; b) por transferencia de energía; c) por reparación inmediata de las moléculas dañadas; d) por formación de mezclas bisulfuro. De estas cuatro

suposiciones, la primera es la que cuenta con una mayor aceptación.

Captación de radicales libres:

En una solución in vitro o en el protoplasma, los aminotioles, por ejemplo, son oxidados por los radicales libres producidos por la radiolisis del agua. De esta manera, las moléculas de importancia biológica están protegidas del ataque de algunos radicales, lo que equivale a la remoción de radicales libres de la solución, registrándose el efecto radioprotector de dichas moléculas. Los aminotioles y sus derivados tienen una marcada afinidad por los radicales libres HO y HO₂ su configuración particular.

Hay organismos que pueden ser muy útiles en la investigación de las propiedades radioprotectoras de compuestos químicos; entre éstos se encuentra Drosophila. Con los estudios sobre su genética, realizados desde 1911 por el profesor T. H. Morgan, se valora su utilización para investigaciones in vivo en diferentes campos en laboratorios de todo el mundo.

DROSOPHILA COMO SISTEMA DE PRUEBA

Drosophila es un insecto holometábolo que ha jugado un papel muy significativo en los estudios de mutagénesis. (Fig. 2, ver Apéndice A)

Fue el primer organismo en que se detectaron mutaciones inducidas por rayos X en células germinales, obteniéndose una curva de radiosensibilidad en las diferentes etapas de la espermatogénesis que permitió descubrir que la exposición a un agente químico producía mutaciones que eran transmitidas a generaciones sucesivas (Auerbach y Robson, 1944 y Sankaranarayanan, 1982)

Las ventajas de Drosophila como sistema de prueba son numerosas: es un organismo eucariótico con ciclo de vida de 9-10 días en condiciones de laboratorio a 25°C y tiene además un proceso de activación metabólica similar al de los mamíferos (Vogel, 1975).

Por otra parte, es fácil de cultivar y debido a su fecundidad pueden obtenerse progenies numerosas a partir de unos pocos progenitores, lo que permite recoger muestras de tamaño conveniente para su análisis estadístico. Asimismo, se cuenta con el número de ensayos adecuados que permiten detectar un amplio espectro de daños genéticos, como

mutaciones génicas, deleciones, duplicaciones, translocaciones, recombinación y efectos de elementos transponesables (Würgler, 1986).

Lo anterior puede realizarse en células germinales y somáticas. En la búsqueda de pruebas que sean más rápidas y sensibles, varios investigadores han desarrollado la prueba de mutaciones somáticas y recombinación mitótica (SMART).

La expresión fenotípica de la mutación somática es detectable cuando ocurre en un tejido de alta actividad mitótica; por ejemplo, en epidermis y médula ósea y, particularmente, en tejidos embrionarios y larvales (Bruce, et. al., 1983).

Para llevar a cabo la prueba SMART, es necesario utilizar marcadores específicos que, al momento de exponer a los organismos a un mutágeno, evidencien las mutaciones provocadas por éste en forma de clones.

En virtud de que Drosophila sufre metamorfosis, el adulto posee una estructura muy diferente a las larvas. Algunos tejidos de la mosca adulta surgen de ciertos grupos de células de la larva, denominados discos imagales (Bruce, et. al., 1983).

Los discos son bolsas epiteliales aplanadas que durante la metamorfosis se evaginan y diferencian formando la epidermis de la mosca, así como ciertos tejidos internos. A medida que crece la larva, también lo hacen los discos imagales, sus células proliferan pero permanecen indiferenciadas. Finalmente, una alteración de los niveles de hormona circulante hace que la larva entre en fase de pupa y sufra el cambio para completar su ciclo vital.

Hay 19 discos, dispuestos en nueve pares a cada lado de la larva, más uno en la línea media. A partir de un par de discos se desarrollan los ojos y las antenas, de otros surgen las alas y parte del tórax y de uno más el primer par de patas, etc. (Bruce, et. al., 1983).

La prueba SMART cuenta con dos variantes: el ensayo de mancha en el ala y el de mancha en el ojo. En este ensayo se requiere sólo de una generación para obtener los resultados, lo que disminuye los costos para su ejecución, además se tienen numerosas células blanco (28 mil para el ensayo del ala y 800 omatídias para el de ojo). Por otra parte, detecta mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas y recombinación mitótica (Würgler, 1986 y Würgler, et. al., 1984).

Se ha propuesto que la recombinación mitótica

podría estar involucrada en la carcinogénesis y que ciertos compuestos químicos pueden promover los tumores que dan como resultado cáncer por incremento de la frecuencia de mutantes espontáneos por esta recombinación (Würgler, 1986).

Con los ensayos de mutaciones somáticas en Drosophila, se han probado una gran variedad de compuestos y los resultados sugieren que pueda ser una prueba de rutina en laboratorios de Toxicología, Genética Molecular, Radiobiología, etc. (Würgler, et. al., 1984).

Por medio de la prueba Salmonella/microsoma-mamífero, se identificó a las aminas heterocíclicas presentes en los alimentos cocinados como compuestos mutagénicos. Con la prueba de la mancha en el ojo, fueron utilizadas nueve aminas (Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, IQ Me IQ, MeIQx, AaC, MeAaC) y todas resultaron ser positivas. Además, se había reportado que siete de ellas tenían potencial carcinógeno en el ensayo de ratón (Yoo, et. al., 1985).

La prueba SMART demostró tener mayor sensibilidad al utilizarse los carcinógenos 2-naphtilamina, 3-metilcolantreno, 9,10-dimetilantraceno, y 7,12-dimetilbenzoantraceno, además de mutágenos de acción directa como el

beomicin, metilmetanosulfonato y etilmetanosulfonato. Todos presentaron una actividad mutagénica y recombinogénica; sólo el segundo dió una respuesta parcial (Vogel y Zijlstra, 1987).

Hasta 1985, el ensayo SMART, buscando ser validado, había probado 130 compuestos, en los cuales se obtuvieron resultados positivos en un 80% (Würgler, 1986 y Graf y Würgler, 1988).

Estos hechos indican claramente que la identificación de compuestos con actividad recombinogénica y el estudio de sus efectos en eucariontes superiores es de suma importancia en la Genética Toxicológica.

ANTECEDENTES

La clorofilina es un derivado de la clorofila a y b, uno de los principales pigmentos vegetales verdes, junto con los caroténos y xantofilas. Cuando se realiza una hidrólisis de la clorofila regulada por un alcali, se sustituyen por metales los grupos metilo y fitilo; las sales que se forman, que aún contienen magnesio, se denominan clorofilinas. Estos compuestos son inestables y para su estabilización se reemplaza el magnesio de

los núcleos con metales pesados (Kirk-Othmer, 1962).

Hay diversas clorofilinas como la potásica, la sódica, la cúprica y la cuprisódica. Esta última se utiliza para fines medicinales y es una sustancia microcristalina azul oscura que presenta una banda de absorción característica de 630 μ m cuando se prepara por el método propuesto por Schertz y Tospher (Fig. 3, ver Apéndice A).

La clorofila y sus derivados tienen múltiples usos y las investigaciones que los sustentan han validado su utilización en diversos campos (Kirk-Othmer, 1962).

El Dr. Emil Burgi fue uno de los primeros en descubrir el valor terapéutico de la clorofila y sus derivados. Inicialmente, trató conejos que padecían anemia con hierro o con clorofila y observó que la regeneración de glóbulos rojos se llevaba a cabo en cuestión de semanas; sin embargo, cuando combinó la clorofila con el hierro, la restauración se realizó en días.

Con base en estos resultados, trató a pacientes humanos con clorofila-hierro y a uno de éstos los registró como casos de anemia secundaria y a otros con deficiencias nutricionales. En todos el beneficio del tratamiento fue evidente, tanto a

nivel sanguíneo como en las condiciones generales del paciente (Burgi, 1918-1932; citado en Kephart, 1955).

En 1944, Smith publicó sus registros sobre las propiedades antibacterianas de los derivados de la clorofila solubles en agua y propuso que la respuesta de reparación propiciada por la clorofila lograba controlar la infección (Smith y Sano , 1944, en Kephart, op. cit.).

Smith y Livingston encontraron que los derivados de clorofila solubles en agua aceleraban la curación de animales con heridas y quemaduras, lo cual fue apoyado por las observaciones de Combes en pacientes afectados por varias dermatosis y heridas de piel (Combes, 1952).

Se encontró un desarrollo del tejido de granulación y epitelización al aplicar el tratamiento con los derivados solubles en agua de clorofila. También se observó un efecto bacteriostático (Smith y Livingston, 1945; citado en Kephart, 1955).

A pacientes afectados de hipertensión asociados con arteriosclerosis se les administró clorofila soluble en agua por un periodo de algunas semanas, obteniéndose la normalización de la presión sanguínea. Estos resultados fueron

reforzados por Angelo, quien en sus investigaciones observó una recuperación notable de la presión sanguínea en pacientes hipertensos, al tratarlos con clorofilina (Angelo, 1931; citado en Kephart, 1955).

Se ha observado que la epidermis que circunda a heridas juega un papel activo en la regeneración durante el periodo de epitelización de éstas. Se encontró un incremento de cuatro a cinco veces en el índice mitótico y, por lo tanto, la regeneración celular de las heridas (Krasnikova, 1973).

En cultivos in vitro de fibroblastos, la clorofilina ha incrementado, además, notablemente su proliferación (Smith, et. al., 1944).

Se ha considerado como una alternativa el uso de la clorofilina en pacientes de edad avanzada que presentan un estreñimiento crónico y/o exceso de gases. Gran parte de esos malestares desaparece cuando se administran tabletas de clorofilina en dosis de 100 mg tres veces al día (Young y Beregi, 1980).

A una concentración de 20 µg, la clorofilina disminuyó la presencia, el diámetro y el desarrollo de cristales de oxalato de calcio en orina normal. Esta actividad inhibitoria sugiere que pueda utilizarse la clorofilina como colorante de alimentos y para prevenir este tipo de trastornos

(Tawashi, et. al., 1982).

Trabajos recientemente publicados demostraron que la clorofilina tiene un efecto antimutagénico en presencia de potentes agentes químicos.

Se determinaron efectos inhibidores de hemín y otros compuestos relacionados sobre la mutagenicidad del benzo(a)pireno. Para ello se utilizaron células V79 de criseto Chino y se cultivaron con células embrionarias irradiadas con rayos X. La frecuencia de mutación inducida por este compuesto fue sustancialmente inhibida en una relación dependiente a la hemina; sin embargo, los compuestos relacionados como la clorofilina la disminuyeron en un 85% (Kato, et. al., 1983).

Por otro lado, la clorofilina se utilizó para la inhibición de la actividad mutagénica de una variedad de mezclas complejas -extractos de carne frita, jugo de uva, vino rojo, humo de cigarro, goma de tabaco, partículas de aire, polvo de carbón, emisión de partículas diésel- utilizando para ello la cepa T298 de Salmonella typhimurium.

La clorofilina inhibió entre el 90% y 100% de la mutagenicidad de ocho de las diez mezclas probadas; en las otras dos, las redujo de un 75% a un 80%, al ser utilizadas a una mayor concentración (Ong, et. al., 1986).

No se conoce el mecanismo por medio del cual la clorofilina logra un efecto antimutagénico; sin embargo, se le reconoce como un antioxidante, ya que atrapa radicales libres o interactúa con los grupos activos de los compuestos mutagénicos (Hartman y Shankel, 1990, y Lai, 1979).

En otras investigaciones, extractos acuosos y de acetona de algunos vegetales comunes inhibieron la activación de 3-metilcolantrano y benzo(a)pireno con la prueba de Salmonella, encontrándose una relación directa entre la disminución de la actividad mutagénica y el contenido de la clorofila de los extractos (Lai, et. al., 1980).

El humo del cigarro, productos pirolizados de pescado y carne han sido registrados como compuestos con un contenido de mutágenos de alta actividad. Se probó en estas investigaciones si extractos de vegetales como coles y rabanos reducían la actividad mutagénica del triptofano pirolizado. Al agregarse estos jugos a las muestras de triptofano, se obtuvo una inactivación marcada de la misma (Terwel y Van der Hoeven, 1985).

Los usos anteriormente citados de la clorofila y sus derivados no son los únicos; en el área industrial también tiene múltiples aplicaciones (Kirk-Othmer, 1962).

OBJETIVO

Investigar las propiedades radioprotectoras de la clorofilina ante los rayos gamma, en Drosophila melanogaster.

HIPOTESIS

Si la clorofilina es un poderoso antimutágeno químico, entonces, administrándola antes de la exposición, disminuirá las alteraciones genéticas inducidas por la radiación gamma en Drosophila melanogaster.

MATERIAL Y METODO

En esta investigación se utilizaron los individuos de dos cepas diferentes de Drosophila melanogaster para realizar la prueba SMART en el ala.

La primer cepa estaba compuesta por hembras mwh/mwh. El marcador mwh determina que las células que lo portan presenten tres o más cerdas en lugar de una que lleva el tipo silvestre (Lindsley, 1960).

Esta mutación está localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 en posición (3-0.0), y

fenotípicamente son moscas con ojos redondos y rojos, cuerpo oscuro, pero con la mutación *mwh* en el ala, que sólo se expresa en condición homociga.

La segunda cepa fueron los machos *f1r3/TM3;Ser*. El marcador *f1r3* determina que las células que lo portan en condición homociga presenten las cerdas modificadas en forma de flama; la cepa se mantiene en condición heterociga, ya que en forma homociga es letal, por lo cual presenta el balanceador *TM3*, así como el marcador *Ser*, que da una forma aserrada a la parte posterior del ala. Fenotípicamente son moscas de ojos redondos y rojos, cuerpo oscuro, pero con el ala aserrada (Lindaley, 1960 y Graf, et. al., 1984).

CRUZA

$$\text{♀♀ } mwh / mwh \times \text{♂♂ } f1r^3 / TM3;Ser$$

F
1

$$1) \frac{mwh}{+} + 3 \text{ Organismos con alas no aserradas}$$

+ f1r

$$2) \frac{mwh}{TM3;Ser} + \text{Organismos con alas aserradas}$$

Se aislaron hembras vírgenes y posteriormente se cruzaron durante 24 horas; luego fueron puestas a ovipositar en cajas de Petri con medio de cultivo fresco y se incubaron durante 72 ± 4 horas, para obtener larvas del segundo estadio.

Se formaron cuatro grupos con 300 larvas cada uno, a los cuales se les aplicaron los siguientes tratamientos crónicos:

GRUPO	TRATAMIENTO	DURACION
1	Sol. de sacarosa al 5% (Testigo)	24 horas
2	Sol. de clorofilina al 5% *	24 horas
3	Sol. de sacarosa al 5% + 20 Gy de rayos gamma	24 horas
4	Sol. de clorofilina al 5% + 20 Gy de rayos gamma	24 horas

* La clorofilina, adquirida de la Compañía Sigma Chemical St. Louis, MO, USA, fue disuelta en sacarosa al 5%.

Las larvas de los grupos 3 y 4 fueron irradiadas en un aparato experimental Vick. rad. (Vick rad 2000, Vicker Radiation Division England).

Una vez finalizado el tratamiento, se sembraron 50 larvas en tubos homeopáticos con medio de cultivo fresco para que completaran su

desarrollo a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1\text{C}$.

Cuando las moscas emergieron, se separaron las que presentaban alas no aserradas y se pusieron en una solución de alcohol al 70%. Posteriormente, se lavaron las moscas en agua y fueron embebidas en una solución Fauré (30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de hidrato de cloral y 50ml de agua), para después disectar las alas y ser montadas en preparaciones permanentes.

Se procedió a analizar las alas a 400 aumentos. La forma de hacerlo fue recorriendo las siete regiones (Graf, et. al., 1984) en que está dividida. (Fig. 4, ver Apendice A)

La clasificación de las manchas se realizó de la siguiente manera:

Tipo de Mancha: a) mancha simple mwh, aquellas donde se presentan más de tres cerdas en una célula (Fig. 5 y 6, ver Apendice A); b) mancha simple fir³, donde el pelo está modificado usualmente en forma de flama (Fig. 7, ver Apendice A), y c) mancha gemela, cuando están presentes células mwh y fir³ (Fig. 8, ver Apendice A).

Tamaño de mancha: a) mancha chica si afecta de 1 a 2 células y b) mancha grande si afecta a más de dos células. (Fig. 9, ver Apendice A)

La distancia que debe haber entre una mancha

y otra para ser considerada como dos manchas es de más de tres hileras de células normales. (Würgler, 1986)

A los resultados obtenidos se les aplicó la prueba estadística χ^2 con un nivel de significancia de $p < 0.001$.

RESULTADOS

En las tablas 1, 2 y 3 (Ver Apéndice B) se muestran los resultados de los tres experimentos que se realizaron. Los símbolos usados son: TM para el número total de manchas observadas y NM/A para la frecuencia de manchas por ala.

El total de alas examinadas fue de 98 en el primer experimento y de 40 para el segundo y tercero, respectivamente.

En la tabla 1, en el segundo grupo, puede observarse que la clorofilina no disminuyó la frecuencia de manchas chicas, grandes y gemelas con respecto al grupo testigo.

En el tercer grupo hubo un incremento que va de 0.40% registrado en el primer grupo a 8.93% para el número total de manchas observadas.

La frecuencia de los tres tipos de manchas en el cuarto grupo también aumentó considerablemente,

de 0.40% a 3.77%.

Al aplicar la prueba estadística ji-cuadrada al primero y segundo grupo no hubo diferencia significativa para cada tipo de mancha, pero cuando se hizo con el tercero y cuarto sí la hubo, para una $p < 0.001$.

En la tabla 2 la frecuencia de manchas chicas y grandes aumentó en el segundo grupo con respecto al testigo, pero al aplicar la ji-cuadrada no hubo diferencia significativa.

En el tercer grupo la frecuencia de manchas chicas se incrementó de 0.17% en el primer grupo a 32.22% ; en las grandes de 0.08% a 14.57% y en las gemelas fue de 7.18%, aunque en el primer grupo no se encontró este tipo de manchas.

También en el cuarto grupo hubo un incremento notable: de 0.17% registrado en el primer grupo para manchas chicas, aumentó a 26.65% ;para grandes de 0.08% a 15.60%, y para gemelas de 4.18%.

Cuando se aplicó la ji-cuadrada al tercer y cuarto grupos se obtuvo una diferencia significativa para $p < 0.001$ en manchas chicas y gemelas; en las grandes fue diferente y en el cuarto grupo se registró un mayor porcentaje de manchas que en el tercero.

En la tabla 3 se observó para el primero y

segundo grupo sólo manchas chicas y grandes; se registró una disminución de las mismas en el grupo de clorofilina, de 0.38% en el primer grupo a 0.05%.

Para el tercer grupo aumentó la frecuencia de manchas chicas con respecto al testigo, de 0.30% a 0.38% ; para manchas grandes de 0.08% a 1.30% y finalmente se obtuvo un valor para las de tipo gemelas de 0.08%.

Cuando se aplicó la ji-cuadrada a los grupos primero y segundo no presentaron diferencia significativa con relación a las manchas chicas. Las grandes sí fueron significativamente diferentes para una $p < 0.001$. En los grupos tercero y cuarto, tanto en las manchas chicas como en las grandes se encontró diferencia significativa.

DISCUSION

El ensayo de mancha en el ala está basado en la utilización de larvas transheterocigas de ³
Drosophila para los marcadores *mwh* y *fir* (Würgler, et. al., 1984),

Las manchas *mwh* pueden originarse por los siguientes mecanismos: a) por una delección terminal

en el cromosoma portador de $f1r^3$, b) por una una mutación puntual en el locus del cromosoma portador de anh o $f1r^3$ y c) por una recombinación entre la región anh y $f1r^3$. (Fig 10 y 11, ver Apendice A)

En el caso del marcador $f1r^3$, éste presenta baja viabilidad por la condición homóciga letal provocando la muerte de las células que lo portan, por lo cual sólo se han registrado manchas con un mínimo de cuatro células, aunque en esta investigación se encontraron de 2 y 3 células (Szabad, 1984).

Las manchas *geselas* son el resultado de la recombinación entre $f1r^3$ y el centrómero, dando lugar a una célula homóciga para $f1r^3$ y otra para anh , adyacente una a la otra (Würgler, 1986). (Fig. 10, ver Apendice A)

En los tres experimentos, el primer grupo registró una frecuencia de manchas chicas y *geselas* dentro del rango reportado en otros laboratorios; sin embargo, en las manchas grandes del segundo experimento se encontró el doble de la frecuencia de 0.07% a 0.14% (Vogel, 1985).

Al aplicar la prueba ji-cuadrada al primero y segundo grupo del primero y segundo experimento, no se encontró diferencia significativa, pero en el tercero sí para una $p < 0.001$.

Estos resultados no son suficientes para definir qué sucede en relación al posible efecto de la clorofilina sobre las manchas que se originan espontáneamente.

Negishi reportó en 1989 que, a una concentración mayor de clorofilina, la frecuencia de manchas se acerca a los valores alcanzados en el grupo testigo utilizando la prueba de la mancha en el ala.

En el cuarto grupo de los experimentos primero y tercero, se encontró una disminución de la frecuencia de manchas chicas, grandes y gemelas con respecto al tercer grupo; en el segundo experimento, disminuyeron las de tipo chico y gemelas, mientras que las grandes se incrementaron.

En el experimento 1 y 3, el tercero y, cuarto grupo aumentó la frecuencia de cada tipo de mancha en relación al testigo (las manchas chicas fueron las más frecuentes); pero fue menor la frecuencia de manchas en el cuarto grupo con respecto al tercero, lo cual puede tener las siguientes explicaciones: a) la clorofilina protegió y el daño no fue tan severo como en el tercer grupo y b) algunas células murieron durante la irradiación y las células no dañadas completaron el

número de células que forman el ala, originando a la vez una presencia mayor de manchas chicas.

Se ha demostrado que los rayos X producen muerte celular en los discos del ala y que éstos se regeneran posteriormente (Würgler, et. al., 1986, y Bryant, 1975).

El origen de la mancha grande se debió a la sobrevivencia, y posterior reproducción, de células mutadas por la radiación.

Las manchas gemelas son producidas, como ya se mencionó, por recombinación mitótica. En esta investigación se encontró una gran actividad recombinogénica, la cual disminuyó casi por completo con el pretratamiento con clorofilina.

Se ha propuesto que la recombinación mitótica puede estar involucrada en los procesos de carcinogénesis, aunados a otros cambios genéticos (Würgler, 1986).

Hay evidencia de que la clorofila absorbe los rayos ultravioleta, protegiendo la piel hasta en un 90% (Vidal, 1946).

Negishi reportó que disminuyó la actividad autogénica del Trp-P-2 al utilizar la clorofilina. En la prueba de la mancha en el ala, en Drosophila, no sólo redujo las manchas chicas y grandes, sino también las gemelas en un 80%.

El segundo experimento se comportó diferente del primero y tercero; en éste, las manchas grandes aumentaron en lugar de disminuir cuando se aplicó clorofilina antes de la irradiación. El incremento generalmente encontrado en todos los tipos de manchas (la frecuencia fue 30 veces por arriba de los otros experimentos, aproximadamente), indica que la dosis de irradiación provocó la aparición de un mayor número de manchas; sin embargo, la tendencia fue similar al disminuir las manchas chicas y gemelas.

Se desconoce el mecanismo de acción de la clorofilina para producir este efecto; sin embargo, se han propuesto los siguientes mecanismos, utilizando potentes mutágenos químicos, y más o menos han logrado definir su modo de acción.

En Salmonella typhimurium TA98 se encontró que la clorofilina inhibió la mutagenicidad del triptofano dos, formando un complejo con este compuesto, lo cual parece indicar que es el modo por el cual lo inactiva (Negishi, 1989).

En otro experimento se reportó que la clorofilina disminuyó la peroxidación de lípidos en la membrana de las mitocondrias y los microsomas de hígado de rata. Se obtuvo una disminución de ésta en ambas. Los hallazgos sugieren que la

clorofilina actúa como un agente antioxidante (Sato, et. al., 1984).

La radiación ionizante está caracterizada como un mutágeno oxidativo, siendo éste una de las mayores causas de mutaciones. Especies reactivas de oxígeno, como el radical hidróxilo, peróxido de hidrógeno y superperóxidos, son generados en vivo normalmente como una consecuencia del metabolismo celular; sin embargo, estas especies reactivas se incrementan cuando la célula es irradiada, por lo cual los mecanismos de defensa naturales, como los enzimáticos, pueden dejar de funcionar y producir daño a las cadenas de ADN por rompimientos e iniciar el proceso de peroxidación de lípidos (Ames, 1986).

La oxidación de ciertos componentes celulares por las especies reactivas del oxígeno anteriormente mencionadas, pueden contribuir al envejecimiento y disturbios de edad como sucede con algunos cánceres (Ames, 1986).

De acuerdo con lo expuesto arriba, se puede proponer que la característica antioxidativa de la clorofilina disminuye las oxidaciones generadas por la radiación mediante la captación de radicales libres.

CONCLUSIONES

- Con los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que la clorofilina actuó como radioprotector ante una dosis de 20 Gy de rayos gamma.
- La clorofilina disminuyó significativamente la recombinación mitótica, indicando también una propiedad anticarcinogénica.
- Los mecanismos de acción que se proponen para el efecto radioprotector de la clorofilina son: captación de radicales libres y formación de un complejo con el ADN.
- Se propone determinar la dosis umbral que desencadena el efecto radioprotector de la clorofilina, e investigar si este efecto se presenta también cuando se utilizan otros tipos de radiación.

BIBLIOGRAFIA

- Ames, B. N. 1986. Overview: Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. Progress in Clinical and Biological Research. Vol. 206. Genetic Toxicology of the diet. Ed. Ib Knudse. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 3-32
- Angelo, L. 1931. Clinical studies on chlorophyll. La Reforma Medica. 47: 83.
- Arena, V. 1971. Ionizing Radiation and Life. The C.V. Mosby Company. Sant. Louis. U.S.A.
- Auerbach, C. y Robson J. 1944. Production of mutations of allyl isothiocyanate. Nature (London) 154:81
- Brock, T. D. 1974. Biology of microorganisms. 2a. Ed. Prentice-Hall. U.S.A.
- Bruce, A., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1983. Molecular Biology of the Cell. Gerland Publishias, Inc. New York y Landan. 3a. Edición.
- Bryant, P. J. 1975. Pattern formation in the imaginal wing disc of Drosophila melanogaster: fate map, regeneration and duplication. Dev. Biol. 26: 637-651.
- Burgi, E. 1932. Chlorophyll als Pharmakon.
- Clark, R. 1979. La revolución nuclear. Ciencia y Desarrollo. Nov. - Dic. pp. 125-146. Mexico.
- Combes, F. C., et. al. 1952. Chlorophyll in topical therapy. N. Y. State Jour. Med. 52:1025.
- Díaz, R. 1990. La radiación y la medicina. ICYT. Jun. Vol. 12, Num. 165, pp. 35-42.
- Díaz, N. 1990. Irradiación de alimentos. ICYT. Jun. Vol. 12, Num. 165, pp. 43-46.
- Goodenough, U. 1981. Genética. Ed. Omega. Barcelona, Espana.

- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G. 1984. Somatic Mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. Environmental Mutagenesis. 9: 153-188.
- Graf, W. y Würgler, F. E. 1988. The sex-linked recessive lethal assay and somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. J. Ashby, F. J. de Serres, M. D. Shelby and et. al. (Eds.) Evaluation of short-term tests for carcinogens. International Programme on chemical safety's collaborative study on in vivo assays. 2. Cambridge University Press/WHO, Cambridge. pp. 2.301-2.309.
- Hartman, P. E. y Shankel, D. M. 1990. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. Environmental and Molecular Mutagenesis 15: 145-182.
- Herrera, N. 1985. Cuarenta años después. ICYT. Sep. 7(8) pp. 5-6. Mexico.
- Junqueira, L. C. y Carneiro, J. 1983. Biología Celular. Instituto de Ciencias Biomedicas. Universidad de Sao Paulo, Brasil.
- Katoh, Y., Nemoto, N., Tanaka, M. y Takayama, S. 1983. Inhibition of benzo(a)pyrene induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. Mut. Res. 121: 153-157.
- Kedar, N. 1984. Handbook of Radiobiology. CRC Press. In. J. Boca, Florida.
- Kephart, J. C. 1955. Chlorophyll Derivatives, Their Chemistry. Commercial preparation and uses. Econ. Bot. 9: 3-38.
- Kirk-Othmer. 1962. Enciclopedia de Tecnología Química. Tomo IV. U.T.E.H. A. México, pp. 899-907.
- Krasnikova, N. A. 1973. Proliferation of epithelium surrounding a skin wound in hairless mice treated with sodium chlorophyllin. Byulleten' Eksperimental' noi Biologii in Meditsiny. 76(10): 99-102.

- Lai, C. N. 1979. Chlorophyll: The active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens in vitro. *Nutrition and Cancer*, 1, 19-21.
- Lai, C. N., Butler, M. y Matney, T. S. 1980. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mut. Res.* 77: 245-250.
- Lindsley, D. L. 1960. Genetic variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Inst. Wash. Publ.
- Negishi, T., Arimoto, S., Chiharu, N. y Hikoya, H. 1989. Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-metil-5H-pyrido (4,3-b)indole(Trp-P-2). *Carcinogenesis*. 10(1): 145-149.
- Negrón, A. 1990. La radiación: fuente de vida. ICYT. Jun. Vol. 12 pp. 29-34.
- Negrón, A. 1986. Evolución química y síntesis abiótica. *Ciencias. Número Especial*. pp. 4-12.
- Ong, T., Whong, W. Z., Stewart, J. y Brockman, H. E. 1986. Chlorophyllin: A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mut. Res.* 173: 111-115.
- Pizarello, D. J. 1982. *Radiation Biology*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Informe Anual, Nueva York. 1986
- Sanders, Ch. y Kathren, R. 1982. *Ionizing Radiation. Tumorigenic and Effects*. Battelle Press. New York.
- Sankaranarayanan, K. 1982. Genetic effects of ionizing radiation in multicellular eukaryotes and the assessment of genetic radiation hazards in man. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- Sato, M., Imai, K., Kimura, R. y Murata, T. 1984. Effect of Sodium Copper Chlorophyllin on Lipid Peroxidation. VI. Effect of Its Administration on Mitochondrial and Microsomal Lipid Peroxidation in Rat Liver. *Chem. Pharm. Bull.* 32 (2) 716-722.

- Selman, J. 1983. Elements of Radiobiology. Charles C. Thomas. Publisher. Springfield. Illinois. U.S.A.
- Smith, L. W. y Sano, M. E. 1944. Chlorophyll: an experimental study of its water soluble derivatives. IV. The effect of water soluble chlorophyll derivatives and other agents upon fibroblasts in tissue culture. Jour. Lab. Clin. Med. 29: 241.
- Smith, L. W., and Livingston, A. E. 1945. Wound healing, an experimental study of water soluble chlorophyll derivatives in conjunction with various antibacterial agents. Am. Jour. Surg. 67:30.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. y Hajja, G. 1983. Testing the Mutagenicity of Malondialdehyde by the Drosophila mosaic and the sex-linked recessive lethal test. Mut. Res. 113. pp. 117-133.
- Tawashi, R., Cousineau, M. y Denis, G. 1982. Crystallisation of calcium oxalate dihydrate in normal urine in presence of sodium copper chlorophyllin. Urological Research. 10: 173-176.
- Terwel, L. y Van der Hoeven, C. M. 1985. Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo(a)pyrene in the Salmonella/microsome assay. Mut. Res. 152: 1-4.
- United Press International "Los mas grandes accidentes ocurridos en plantas nucleares en los ultimos 34 anos". Excelsior 30-04-1986. pp. 12A.
- Vidal, A. 1946. Medicamentos fotosensibilizadores y fotoprotectores. Trabajos del Instituto Nacional de Ciencias Químicas. Tomo VI. Madrid, Espana. pp. 465-475.
- Vogel, E. 1975. Some Aspects of the detection of potential mutagenic agents in Drosophila. Mut. Res. 29: 241-250.
- Vogel, E. 1985. Summary report on the Drosophila assays. Progress in Mutation Research. Vol. 5. Elsevier Science, Publishers, Amsterdam.

- Vogel, E. y Zijlstra, J. A. 1987. Somatic cell mutagenicity in Drosophila melanogaster in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. Mut. Res. 180: 189-200.
- Vogel, E. 1989. Evaluation of potential mammalian genotoxins using Drosophila: The need for a change in test strategy. Mutagenesis, 2: 161-171.
- Würgler, F. E., Sobels, F. H. y Vogel, E. 1984. Drosophila as an assay system for detecting genetic changes. Handbook of mutagenicity test procedures. Chapter 26. 2a. ed. Edit. Elsevier Science Publishers. B. P. pp. 556-601.
- Würgler, F. E. 1986. Mutagenicity assays detecting recombination. Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part. B: Effects and applied mutagenesis. pp. 85-90. Alan and Liss. Inc.
- Würgler, F. E., et. al. 1986 International agency for research on cancer. Programme on Chemical Safety (UNEP/WHO). Commission of the European Communities Long term on Short term assay for carcinogens: a critical appraisal. Assays for genetic activity in Drosophila melanogaster. Report. 12. IARC Scientific Publications. No. 83, pp. 351-393. Lyon.
- Yoo, M. A., Haruko, R., Takeshi, T. y Sohei, K. 1985. Mutagenic Potency of heterocyclic amines in the Drosophila wing spot test and its correlation to carcinogenic potency. Jpn. J. Cancer Res. (6 ann.) 76: 468-473.
- Young, R. W. y Beregi, J. S. 1980. Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. Journal of the American Geriatrics Society. Vol. 28(1):

APENDICE A

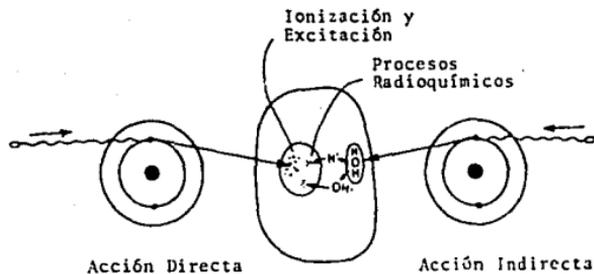


Fig. 1. Esquema de la acción directa e indirecta de la radiación ionizante en la célula.

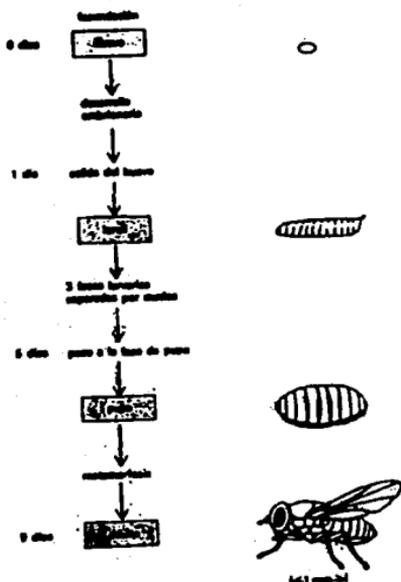
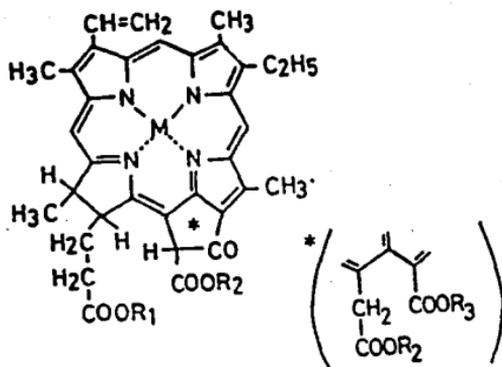
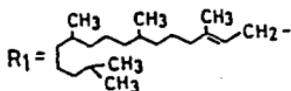


Fig .2. Esquema del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.



Clorofila a : M = Mg



R₂ = -CH₃

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

Fig. 3. Estructura de la clorofila a y de la clorofilina.

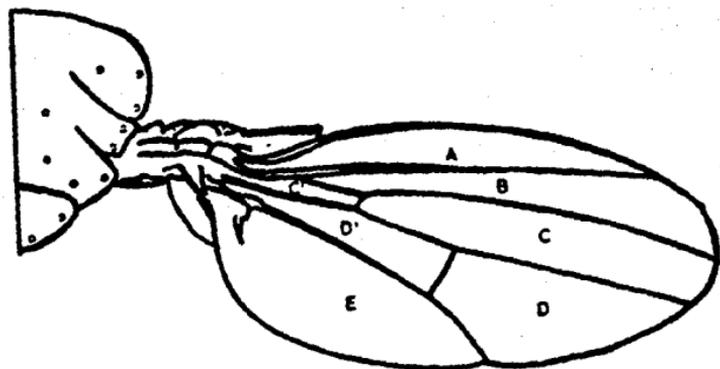


Fig. 4. Esquema del ala de Drosophila melanogaster y las regiones en que se divide para su observación.

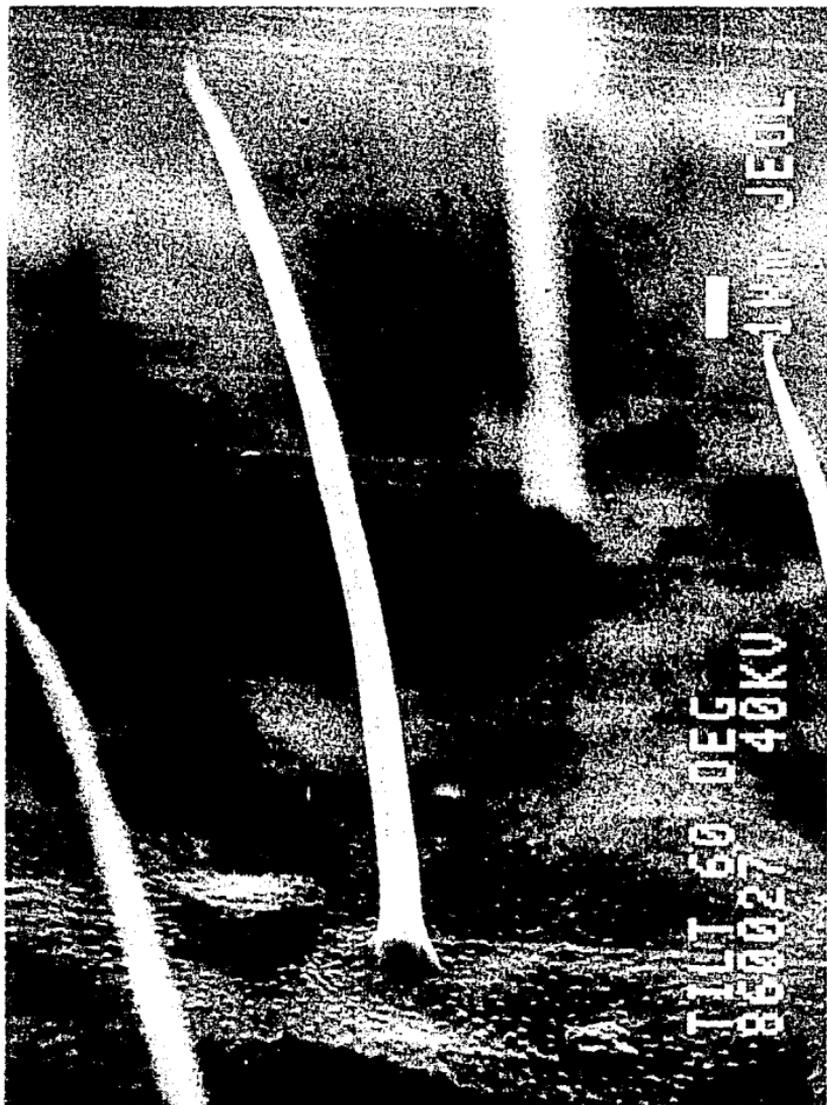


Fig. 5. Microfotografía de un pelo normal en el ala de Drosophila melanogaster.

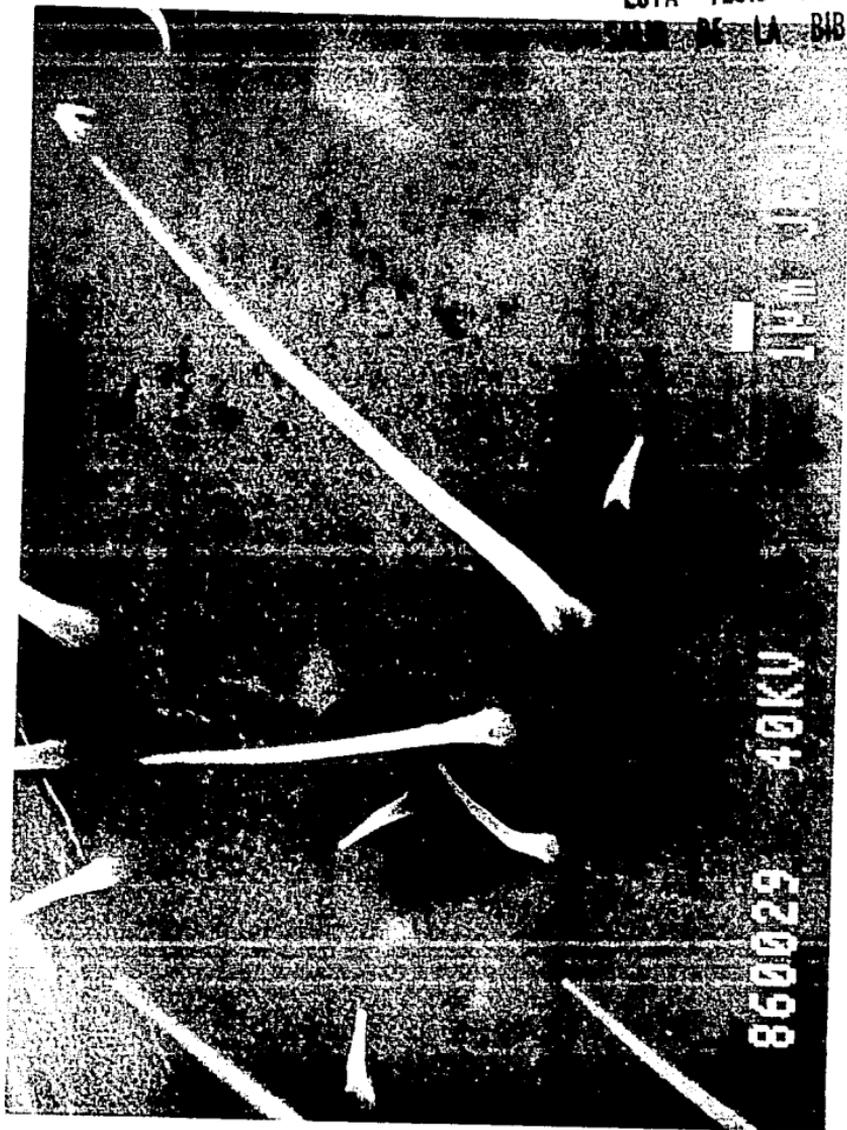


Fig. 6. Microfotografía de una mutación *msh*, donde se observan los múltiples pelos en una célula.

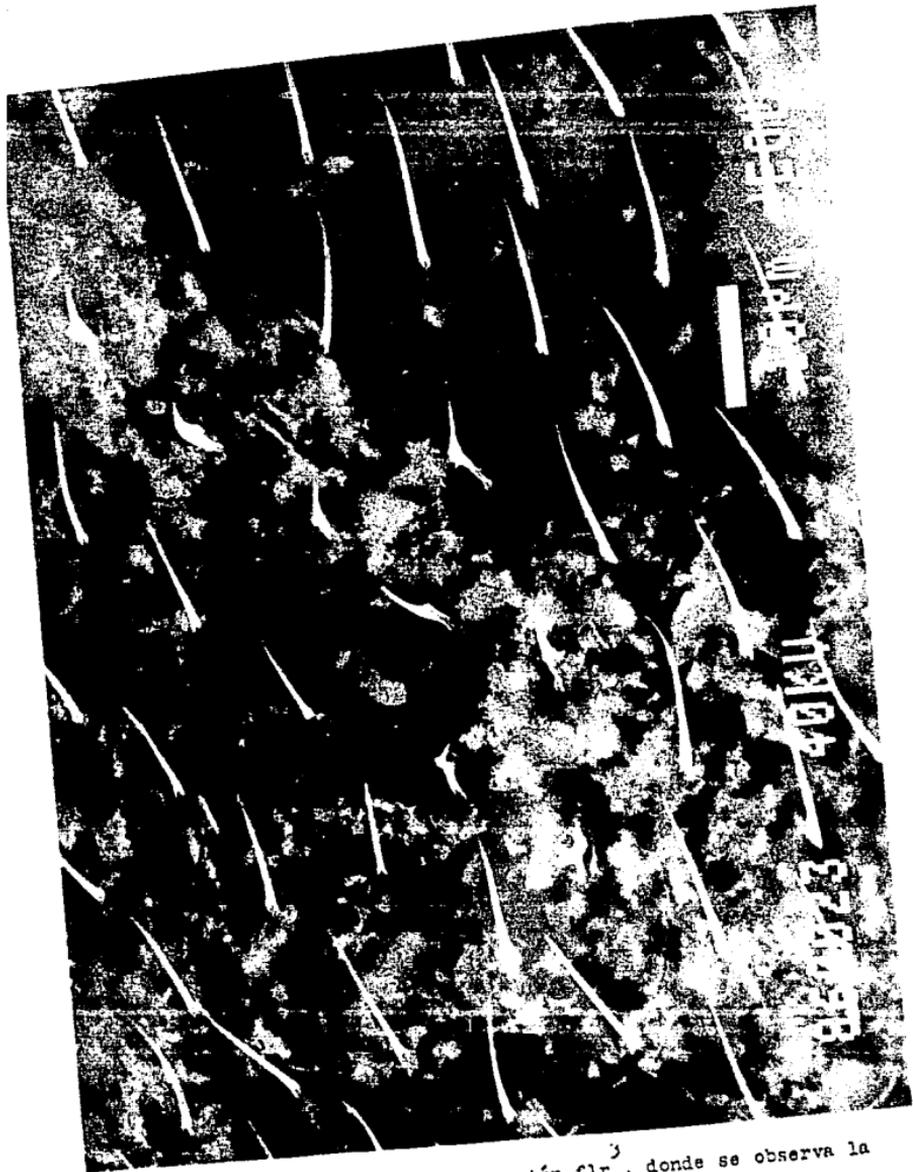


Fig. 7. Microfotografía de una mutación flr³, donde se observa la modificación del pelo en forma de flaza.

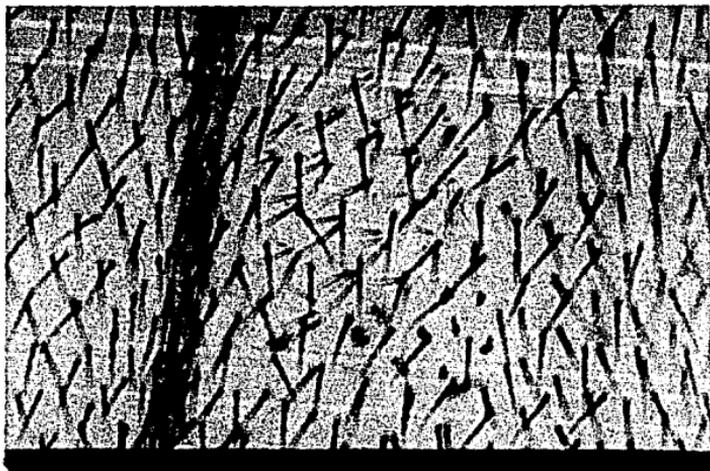


Fig. 8. Mancha gemela a 400X.

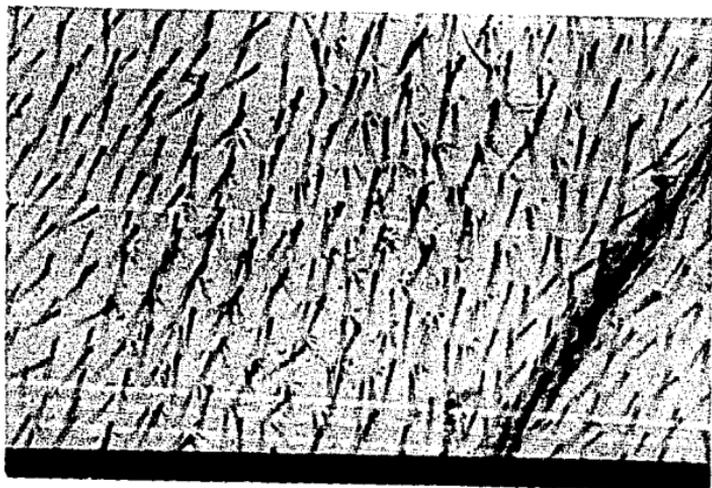


Fig. 9. Mancha grande pwh a 400X.

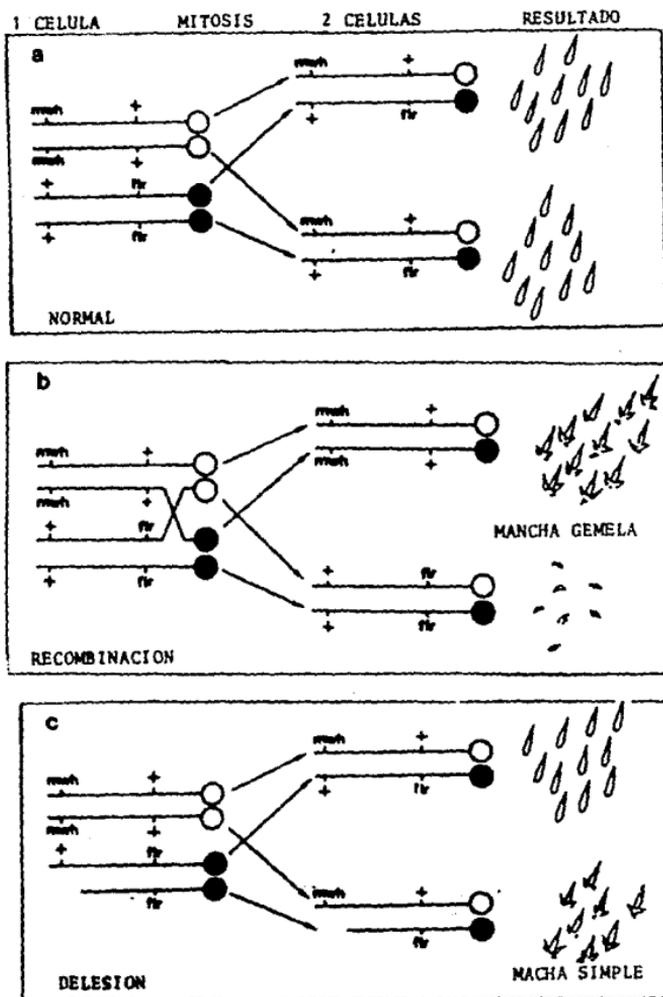


Fig. 10. Esquemas de los mecanismos genéticos en la formación de los diferentes tipos de manchas. a) Normal, b) Recombinación: mancha gemela, c) Delección: mancha simple muh.

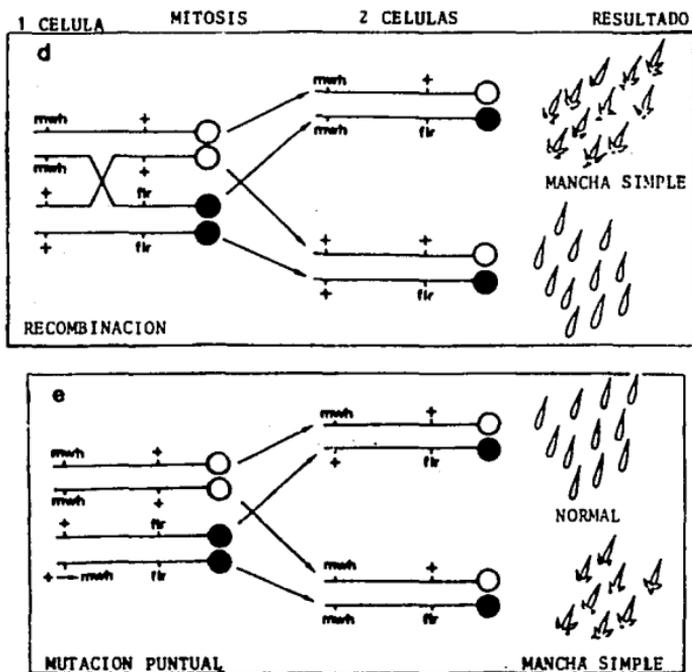


Fig. 11. Esquemas de los mecanismos genéticos en la formación de los diferentes tipos de manchas. d) Recombinación: mancha simple mwh. e) Mutación puntual: mancha simple mwh

APENDICE B

TABLA 1. Efecto de la clorofilina ante 20 Gy de rayos gamma en larvas mwh +/- flr3 de Drosophila melanogaster

GRUPO	TRATAMIENTO	No. DE ALAS	NM/A CHICAS	NM/A GRANDES	NM/A GEMEAS	TM
1	TESTIGO	98	22 (.23)	13 (.14)	5 (.05)	38 (.40)
2	CLOROFILINA	98	33 (.34)	10 (.10)	2 (.02)	44 (.45)
3	20 Gy DE RAYOS GAMMA	98	390 (3.98) A	347 (3.54) B	138 (1.41) C	875 (8.93)
4	CLOROFILINA MAS 20 Gy RAYOS GAMMA	98	202 (2.06) A'	163 (1.66) B'	4 (.04) C'	369 (3.77)

NM/A: Frecuencia de manchas por ala,

TM: Numero total de manchas observadas.

Diferencias entre A y A', entre B y B' y entre C y C' son significativas para $p < 0.001$.

TABLA 2. Efecto de la clorofilina ante 20 Gy de rayos gamma en larvas
 suh +/- flr3 de Drosophila melanogaster.

GRUPO	TRATAMIENTO	No. DE ALAS	NM/A CHICAS	NM/A GRANDES	NM/A GEMELAS	TM
1	TESTIGO	40	7 (.17)	35 (.08)	0 (0)	10 (.25)
2	CLOROFILINA	40	14 (.35)	7 (.17)	0 (0)	21 (.52)
3	20 Gy DE RAYOS GAMMA	40	1289 (32.22) A	583 (14.57) B	287 (7.18) C	2159 (53.97)
4	CLOROFILINA MAS 20 Gy RAYOS GAMMA	40	1066 (26.65) A'	634 (15.60) B'	167 (4.18) C'	1857 (46.42)

NM/A: Frecuencia de manchas por ala.
 TM: Numero total de manchas observadas.
 Diferencias entre A y A', entre B y B' y entre C y C' son significativas para $p < 0.001$.

TABLA 3. Efecto de la clorofilina ante 20 Gy de rayos gamma en larvas
 mh +/- fir3 de Drosophila melanogaster.

GRUPO	TRATAMIENTO	No. DE ALAS	NM/A CHICAS	NM/A GRANDES	NM/A GEMELAS	TM
1	TESTIGO	40	12 (.30)	3 (.08)	0 (0)	15 (.38)
2	CLOROFILINA	40	1 (.03)	3 (.03)	0 (0)	2 (.05)
3	20 Gy DE RAYOS GAMMA	40	15 (.38) A	52 (1.30) B	3 (.08) C	70 (1.75)
4	CLOROFILINA MAS 20 Gy RAYOS GAMMA	40	11 (.28) A'	21 (.52) B'	1 (0) C'	33 (.08)

NM/A: Frecuencia de manchas por ala.

TM: Numero total de manchas observadas.

Diferencias entre A y A' y entre B y B' son significativas para $p < 0.001$; y para C y C' son significativas para $p < 0.005$.