

## **Acción Inhibidora de la Clorofilina de Letales Recesivos Autosómicos Inducidos por Irradiación**

*Salceda, V.M., Pimentel, P.A.E. y Cruces, M.P.*  
*Departamento de Biología,*  
*Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.*  
[vmss@nuclear.inin.mx](mailto:vmss@nuclear.inin.mx)

### **Resumen**

La clorofilina es una sal sódica de la clorofila que tiene una fuerte acción protectora del daño inducido por diferentes agentes tanto físicos como químicos. En *Drosophila* se ha reportado este efecto en células somáticas. En contraste, en células germinales utilizando pruebas con los cromosomas sexuales no se ha encontrado tal acción inhibidora. Por esta razón, en esta ocasión nos referiremos al efecto de la letalidad inducida en cromosomas autosómicos, en particular al cromosoma II de esta especie. Para tal efecto grupos de machos de la línea Canton-S fueron pre-tratados por 24h con o sin 69 mM de CCS y posteriormente tratados con o sin 40 Gy de irradiación gamma. Los machos fueron entonces sometidos a la técnica Cy L / Pm para la detección de letales recesivos. En la tercera generación se hicieron los conteos respectivos de la descendencia de cada uno de ellos para determinar las categorías correspondientes para cada cromosoma extraído. Por tratarse de cruzas mendelianas se espera para un cromosoma normal una proporción 2:1 de individuos con genotipo Cy L/+ : +/+. La ausencia de individuos +/+ es indicativo de un gen letal, hasta un 10 % de estos individuos de la descendencia total de cada macho, se considera que es portador de un gen semiletal. La suma de letales y semiletales constituye la categoría detrimental. Los resultados obtenidos indicaron que el pre-tratamiento con CCS reduce de manera significativa la frecuencia de letales inducidos por 40 Gy de rayos gamma. El hecho de que no se haya observado un efecto inhibidor en la prueba de letales recesivos ligados al sexo obtenidos previamente, contrasta con el efecto observado en el cromosoma II, resultados de este estudio y con el observado en el cromosoma III en células somáticas. Lo anterior pone de manifiesto una acción diferencial de la CCS entre cromosomas sexuales y autosómicos ante el efecto de la radiación gamma. Por el momento no contamos con una explicación a estas evidencias. Para evaluar la acción de la clorofilina sobre el daño causado por la radiación, se tomó en cuenta la presencia de letales y semiletales autosómicos. Así se observó que aún sin el empleo de la radiación la frecuencia de semiletales se ve disminuida cuando se aplica la clorofilina, en este caso la disminución fue significativa y aunque hubo disminución en el caso del grupo irradiado este no fue significativo; en el caso de los letales ocurrió lo contrario no fue significativo en ausencia de radiación al contrario elevó la frecuencia de este tipo de genes, sin embargo, ante la radiación y con pre-tratamiento con clorofilina esta redujo la frecuencia de letales recesivos autosómicos significativamente. Esto es importante pues en el caso de letales recesivos ligados al sexo esto no ocurre.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde hace más de una década en el Laboratorio de *Drosophila* del ININ se vienen realizando estudios dirigidos hacia la evaluación de la acción modificadora de la clorofilina cupro sódica (CCS) sobre la mutagenicidad de la radiación ionizante. La CCS es un compuesto que presenta una fuerte acción protectora del daño inducido por diferentes agentes tanto químicos como físicos y ha sido evaluada en diferentes sistemas biológicos. A nosotros nos interesa el efecto que tiene en varios ensayos de *Drosophila melanogaster*. Así Graf *et al.* [1] evaluaron su efecto mediante el ensayo de mutación y recombinación somática. Zimmering *et al.* [2] encontraron que suministrada a concentraciones de 69 mM como pre-tratamiento reducía significativamente la frecuencia de mutación y rompimiento cromosómico inducido por radiación gamma. A esa misma concentración y por 24 horas de pre-tratamiento durante la etapa larvaria fue capaz de proteger del daño inducido por radiación gamma (Pimentel *et al.*, 1999). Basados en que los rayos-X o gamma, inducen recombinación somática con una relación dosis respuesta cuadrática o un fenómeno de dos golpes (Merriam y Fyffe, 1972) y que teóricamente esto debe ser válido para todas las células somáticas; con los resultados de esta investigación se sugirió que la CCS inhibe en menor grado los eventos relacionados con rupturas en comparación con los relacionados con mutaciones (Pimentel *et al.* 2000). Con relación a la acción de la CCS contra el daño inducido por agentes químicos directos se encontró que protege contra el daño inducido por el trióxido de cromo (Olvera *et al.* 1997) sin embargo, sólo lo hace durante los dos primeros días posteriormente el efecto se invierte y la frecuencia de mutación aumenta (Cruces *et al.* 2003); el mismo resultado se obtuvo contra el daño inducido por la etil nitroso urea (ENU) (Pimentel *et al.* 2003) y el daño inducido por la dimetil hidrazina, después de este tiempo se comportó como un promotor de daño (Guerrero, 2004). Adicionalmente es importante hacer notar, que hay muy pocos estudios sobre la inhibición o promoción del daño genético inducido de la CCS en células germinales. Por supuesto la trascendencia del daño inducido en éste tipo de células es mayor, debido a que puede transmitirse a través de las generaciones, a este respecto se han hecho estudios para detectar el efecto de la CCS en ensayos con y sin radiación mediante la prueba de letales recesivos ligados al sexo (Pimentel y colaboradores, datos sin publicar), quienes no observaron ningún efecto protector de la CCS ante la radiación. Con estos antecedentes nos propusimos determinar el efecto de la CCS ante la radiación gamma considerando el daño que causa esta al segundo cromosoma de *D.melanogaster*.

## 2. MATERIAL Y METODOS

Se emplearon dos cepas de *D. melanogaster*, la Canton-S que fungió como cepa tratada y la Cy L / Pm; H / Sb como marcadora. Grupos de machos de la línea Canton-S de 3-5 días de edad fueron pre-tratados por 24 horas de la siguiente manera: dos grupos testigo uno alimentado con sacarosa al 5 % y otro con la solución de clorofilina al 69 mM y dos grupos experimentales que recibieron el mismo pre-tratamiento pero después del mismo fueron sometidos a radiación gamma con una dosis de 40 Gy, suministrada en el Gamma Cell del Instituto. Tanto la clorofilina como la sacarosa fueron suministradas vía oral. Después del tratamiento los machos fueron cruzados en forma individual, según se especifica en la técnica descrita por Wallace (1956) para la detección de letales recesivos del segundo cromosoma de esta especie, con 2-3 hembras vírgenes de la cepa Cy L / Pm; H / Sb de 2-5 días de edad. De la descendencia de esta cruce, de cada uno de los cultivos se extrajo un macho de constitución Cy L / + y se retrocruzó con 2-3

hembras vírgenes de la cepa materna Cy L / Pm; H / Sb. Al emerger los hijos de esta crusa se seleccionaron por cada cultivo cinco hembras vírgenes, ya que en la crusa surgen también individuos Cy L / Pm y + /+, y cinco machos de constitución Cy L / + los que se cruzaron entre sí. Esta serie de cruza nos permite rastrear un cromosoma II de cada macho tratado, representado en estas cruza como +. Al nacimiento de los hijos de esta última crusa se realizaron los conteos respectivos de cada cultivo. Por tratarse de cruza mendelianas se espera que la descendencia esté constituida por dos tipos de individuos: Cy L / + (alas curvadas y ojos reducidos parcialmente) y +/+ (silvestres) en proporción 2:1. Cultivos con esta proporción son considerados como normales es decir aquellos en que el cromosoma no sufrió daño, en tanto que desviaciones de esta proporción son indicativas de la presencia de genes dañados. Cuando la clase +/+ no aparece se tienen cromosomas portadores de un gen letal y si la clase +/- esta representada hasta un 10 % de individuos, de fenotipo y genotipo silvestre +/+ se dice que porta un gen semiletal. La suma de letales y semiletales constituye la categoría de genes detrimentales. Todas las cruza se condujeron a  $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$  y 60 % de humedad relativa. El medio suministrado fue el de uso común en el laboratorio a base de harina de maíz, azúcar, levadura de cerveza y agar-agar. Los datos obtenidos se sometieron a una prueba de  $X^2$  para definir diferencias.

### 3. RESULTADOS

Se analizaron un total de 609 cromosomas, de ellos 187 fueron tratados sólo con sacarosa; 176 con clorofilina; 144 con sacarosa y radiación y 102 con clorofilina y radiación, como se observa en la Tabla 1, en ella se indica también el número y frecuencia de cada categoría de genes: normales, semiletales, letales y detrimentales, calculados a partir de los conteos de cada cultivo. Si consideramos como base las frecuencias observadas en el tratamiento con sacarosa vemos que en tres de las cuatro posibles comparaciones, que nos interesan, la clorofilina por si misma disminuye las frecuencias de las diferentes categorías de genes, la comparación que no disminuyó fue la de letales en el caso de los tratamientos sin irradiación, sin embargo, al considerar la categoría de detrimentales esta diferencia sí se manifiesta. Las diferencias encontradas varían según el caso desde 0.005 hasta 0.063 por ciento a favor de un efecto supresor del daño debido a la ingestión de CCS. Las diferencias en frecuencia fueron para los diferentes pares como sigue: semiletales sacarosa vs. semiletales clorofilina 0.063; semiletales sacarosa mas radiación vs. semiletales clorofilina mas radiación 0.005; letales sacarosa vs. letales clorofilina esta no fue favorable tuvo un valor de - 0.012; letales sacarosa con radiación vs. letales clorofilina con radiación 0.03. Como se indicó, si sumamos letales con semiletales y consideramos la categoría detrimental la primera comparación sacarosa vs. clorofilina cambia de ser una respuesta negativa a positiva con un valor de 0.051 y para el caso de la comparación entre detrimentales con radiación el valor obtenido fue de 0.04.

**Tabla I.- Frecuencias relativas de genes normales, semiletales y letales obtenidos mediante tratamientos con sacarosa, CCS con y sin 40Gy de radiación Gamma.**

	Sacarosa	Clorofilina	Dif.	Sacarosa +radiación	Clorofilina +radiación	Dif.
Normal	169	168		122	90	
Semiletal	15 f=0.08	3 f=0.017	0.063**	12 f=0.083	8 f=0.078	0.005
Letal	3	5	-0.012	10 f=0.069	4	0.03*

	f=0.016	f=0.028			f=0.039	
Detrimental	18 f= 0.096	8 f= 0.045	0.051	22 f= 0.15	12 f= 0.11	0.04
n	187	176		144	102	

\*\* significativo a una  $P \leq 0.01$ ; \*  $P \leq 0.05$

Ahora bien, lo que nos interesa saber es que tan significativas son estas diferencias, para lo cual se aplicó par por par una prueba de  $X^2$ , cuyos resultados manifestaron diferencias significativas en el caso de semiletals sin irradiar y en el de letales con tratamiento de irradiación.

#### 4. DISCUSION

El efecto inhibitor o promotor de la clorofilina ante la radiación varía según el sistema que se use; dentro de los diferentes sistemas utilizando *Drosophila*, destacan los realizados por Zimmering y col. (1990) quienes obtienen evidencias de que actúa como sustancia radio protectora y Pimentel y col. (1999) confirma su persistencia como agente radio protector a la vez que indica evidencias de actuar como agente inhibitor o promotor (Pimentel y col. 2000); por su parte Olvera y col. (1997) la consideran como un agente antimutágeno. También se la considera como agente promotor o inhibitor del daño genético cuando se ha visto su efecto ante agentes químicos como el  $Cr O_3$  (Cruces y col. 2003) o ante la 1,2-dimetil hidrazina (Guerrero, 2004), en todos los casos anteriores se ha tratado con efectos somáticos pues fundamentalmente las pruebas fueron hechas con el ensayo de mutación y recombinación somática en el ala de *Drosophila*. Cuando se trata de células germinales la prueba clásica es la de letales recesivos ligados al sexo y en este caso Pimentel y colaboradores en datos sin publicar nos comunicó no haber encontrado un efecto protector o inhibitor de la CCS ante la radiación al aplicar esta prueba. El hecho de que no se haya observado un efecto inhibitor en la prueba de letales recesivos ligados al sexo (Pimentel y col. sin publicar) nos llevó a analizar el efecto de la CCS sobre el daño producido por la radiación gamma mediante la prueba de letales recesivos del segundo cromosoma de esta especie.

Los resultados que se muestran en la Tabla 1 nos indican que en la categoría de genes semiletals cuando son producto exclusivamente del pre-tratamiento con sacarosa o con CCS el efecto de esta última es inhibir la aparición de semiletals en este caso la diferencia es significativo  $P \leq 0.01$ , sin embargo al comparar ambos pre-tratamientos mas la irradiación este efecto no se manifestó. Ahora bien, en el caso del empleo de solo CCS no disminuyó la frecuencia de letales observados, sin embargo cuando existió además de la CCS la exposición a radiación el efecto es claramente inhibitor pues la diferencia también es significativa al  $P \leq 0.05$ . en el resto de las posibles comparaciones para ver el efecto de la clorofilina no se encontraron diferencias significativas.

El hecho de que no se haya observado un efecto inhibitor en la prueba de letales recesivos ligados al sexo obtenidos previamente, contrasta con el efecto observado por nosotros en el cromosoma II, como resultado de este estudio y con el observado en el cromosoma III en células somáticas. Lo anterior pone de manifiesto una acción diferencial de la CCS entre cromosomas sexuales y autosómicos ante el efecto de la radiación gamma. Por el momento no contamos con una explicación a estas evidencias.

## 5. CONCLUSION

Lo anterior pone de manifiesto una acción diferencial de la clorofilina entre cromosomas sexuales y autosómicos ante el efecto de la radiación gamma. Por el momento no contamos con una explicación a estas evidencias.

## REFERENCIAS

1. Graf U., Würgler E. y Katz A. (1984). "Somatic Mutation and Recombination test in *Drosophila*". Environ. Mutagen. 6:153-188.
2. Zimmering S., Olvera O., Hernández M.E., Cruces M.P., Arceo, C. y E. Pimentel. (1990). "Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*". Mutation Res. 245: 47-49.
3. Cruces M.P., Pimentel E. y Zimmering S. (2003). "Evidence suggesting that chlorophyllin (CHLN) may act as an inhibitor or a promoter of genetic damage induced by chromium (VI) oxide ( $\text{CrO}_3$ ) in somatic cells of *Drosophila*". Mutation Res. 536: 139-144.
4. Guerrero, L. (2004). "Actividad de la clorofilina protectora o promotora del daño genético inducido por la 1,2-dimetilhidrazina. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
5. Merriam J. y Fyffe W. (1972). "The kinetics of X-ray induced somatic crossing-over in *Drosophila melanogaster* and the effect of dose fractionation". Mutation Res. 14:309-314.
6. Olvera O, Zimmering S., Cruces M.P., Pimentel E. Arceo C. Guzmán J. y 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. 567-571.
7. Pimentel E., Cruces M.P. y Zimmering. (1999). "On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cells of *Drosophila*". Mutation Res. 446:189-192.
8. Pimentel E., Cruces M.P. y Zimmering. (2000). "Evidence that chlorophyllin (CHLN) may behave as an inhibitor or a promoter of radiation-induced genetic damage in somatic cells of *Drosophila*". Mutation Res. 472:71-74.
9. Wallace B, "Studies on irradiated populations of *Drosophila melanogaster*", *J. Genet*, **54**, p. 280-293 (1956).