



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



## FACULTAD DE QUÍMICA

Modulación del daño genético inducido por  
diferentes razones de dosis de radiación  
ionizante mediante protoporfirina, clorofilina o  
bilirrubina en *Drosophila melanogaster*

## TESIS

Que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Químicas

## PRESENTA

*M. en C.Q. Elizabeth Regina Jiménez Vega*

Dirigido por:

Dra. en C. Araceli Amaya Chávez (UAEMéx)

Dr. A. Emilio Pimentel Peñaloza (ININ)

Dra. Martha Patricia Cruces Martínez (ININ)



**ININ**

Toluca, Estado de México, 2020

Esta Tesis fue realizada en su totalidad en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y formó parte de las actividades del proyecto titulado “Modulación del Daño Genético por Quelatos de Cobre y Derivados CONACyT” Proyecto de Investigación de Ciencia Básica No. 167461”

Modulación del daño genético inducido por diferentes razones de dosis de radiación ionizante mediante protoporfirina, clorofilina o bilirrubina en *Drosophila melanogaster*

Elizabeth Regina Jiménez Vega

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca asignada para la realización de este proyecto. CVU: 626995 Este apoyo fue fundamental.

Al **Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares** por permitirme la ad, la cual fue pieza clave para concretar esta tesis.

Al **Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza** y a la **Dra. Martha Patricia Cruces Martínez**, porque son parte esencial de este trabajo, les agradezco por haberme aceptado como parte del laboratorio. Sobre todo, por compartir sus conocimientos y experiencia científica conmigo, por su confianza, disposición, paciencia, y sobre todo su enorme calidad humana. Gracias por haberme permitido formarme con Ustedes y por brindarme su amistad y apoyo. Siempre serán mi ejemplo incluso más allá de lo académico.

Al **Dr Jorge Humberto Serment Guerrero** y la **Dra. Araceli Amaya**, por su apoyo, disposición y compartir sus conocimientos y experiencias profesionales conmigo.

A **mi comité sinodal** y **tutorial** por su tiempo y sus invaluable comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al biólogo **Hugo Suárez Contreras** y a la **Dra. Luz María Vidal** por su gran ayuda técnica en el laboratorio, por compartir sus conocimientos y por brindarme su amistad.

Hay muchas personas y amigos a quien quiero agradecer, pero no tengo el espacio suficiente para todos. Así que agradezco en general todos mis compañeros del **laboratorio de *Drosophila*** con los que he compartido tanto y que me han ayudado tanto. ¡Gracias!

Al Ing. **Cesar Canchola**, gracias mejor amigo y compañero de mi vida por apoyarme tanto.

# ÍNDICE

I.	RESUMEN .....	1
II.	ABSTRACT .....	2
III.	INTRODUCCIÓN.....	3
IV.	ANTECEDENTES .....	4
	<b>4.1. Radiación Ionizante.....</b>	<b>4</b>
	4.1.1 Efectos biológicos de la RI.....	4
	4.1.1. Tasa o razón de dosis (RD).....	7
	<b>4.2. Estrés oxidante.....</b>	<b>9</b>
	<b>4.3. Radioprotectores.....</b>	<b>11</b>
	4.3.1. Amifostina (AMF®).....	12
	<b>4.4. Antioxidantes .....</b>	<b>14</b>
	4.4.1. Antioxidantes exógenos.....	15
	<b>4.4. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio.....</b>	<b>21</b>
V.	JUSTIFICACIÓN.....	23
VI.	HIPÓTESIS .....	23
VII.	OBJETIVO GENERAL .....	24
	<b>7.1 Objetivos particulares .....</b>	<b>24</b>
VIII.	METODOLOGÍA.....	25
IX.	RESULTADOS .....	30
	<b>9.1. Artículo I .....</b>	<b>30</b>
	<b>9.2. Resultados no publicados.....</b>	<b>42</b>
X.	DISCUSIÓN.....	48
XI.	CONCLUSIÓN .....	53
XII.	REFERENCIAS .....	54

## I. RESUMEN

El efecto de la radiación ionizante (RI) sobre los organismos depende significativamente de la cantidad de energía depositada en la materia por unidad de tiempo, o de la razón de dosis (RD). En el campo de la radiobiología es de especial interés estudiar los efectos biológicos que produce la RI, particularmente cuando ésta es administrada a RD bajas, situación que es relevante para la mayoría de las exposiciones ambientales o en la práctica de la terapia contra el cáncer. Los estudios reportados al respecto aún son controversiales, por ello uno de los propósitos de la presente investigación fue evaluar la relación directa entre la viabilidad y la genotoxicidad inducida en *Drosophila melanogaster* por rayos gamma en un rango de dosis de 2 a 35 Gy administradas a tres RD diferentes: 5.1, 32.9 ó 860.9 Gy/h. Los resultados indicaron que la viabilidad larva-adulto se redujo en relación con la dosis, pero no con la RD, ya que no se encontraron diferencias en la  $DL_{50}$  calculada para las tres RD. Las frecuencias de mutación somática y recombinación aumentaron en relación directa con dosis y RD. Con la prueba SMART, se determinaron las frecuencias de mutación y recombinación somáticas; los resultados indicaron que éstas aumentaron en relación directa con la dosis y la RD. Estos resultados confirman el efecto directo de la RD, resaltando la importancia de evaluar diferentes efectos en un mismo individuo causados por la RD para relevancia de estudios toxicológicos y de radioprotección. Por otra parte, una vez que determinamos las relaciones dosis respuesta entre la viabilidad y daño genético inducido con las diferentes RD, probamos el posible efecto radioprotector de algunas porfirinas de anillo abierto o cerrado contra los efectos genotóxicos de la RD más alta ya que la identificación de sustancias que eviten o minimicen los efectos deletéreos de la RI es tarea indispensable en términos de radioprotección. Los tetrapirroles evaluados fueron la clorofilina cupro-sódica (CCS), la bilirrubina (BRB) y la protoporfirina-IX (PP-IX) y también se comparó su eficiencia con la amifostina (AMF®) único radioprotector aprobado por la Agencia de Medicamentos y Alimentación, por sus siglas en inglés, FDA. Los resultados revelaron que los pretratamientos de 1 a 9 horas con cualquiera de las porfirinas o AMF® por sí solos no afectaron la viabilidad larva-adulto o la frecuencia de la mutación basal, sin embargo causaron la disminución de la frecuencia de mutación y recombinación somática inducida por 20 Gy de rayos gamma, con la siguiente relación: BRB (69.3 %) > CSC (40.0 %) > PPIX (39.0 %) > AMF® (19.7%). La bilirrubina causó un aumento del 16% en la viabilidad larva-adulto con 3 h de pretratamiento, en comparación con la causada con 20 Gy. La AMF® aunque causó reducción del daño genético después de 1 y 3 h de pre-tratamiento, no fue significativa. Las porfirinas parecen ser más eficientes para reducir el daño genético inducido por 20 Gy de rayos gamma comparado con la AMF®, lo que sugiere que la PPIX, CCS y BRB son excelentes candidatos para continuar probando su eficacia como potenciales radioprotectores.

## II. ABSTRACT

The impact of ionizing radiation (IR) upon organisms depends significantly on the amount of energy deposited on matter per time unit, in other words, the effect of dose rate (DR). In radiobiology, it is of special interest to study the effects of IR, particularly when it is administered at low DR, situation that is relevant for most environmental exposures or in cancer radiotherapy. previous reports about DR are still controversial. The objective of the present study was to evaluate the modulation of genetic damage induced by different dose rate of gamma radiation by some porphyrins compared to AMF® in *Drosophila melanogaster*. First, we evaluated the larval-adult viability and genotoxicity in larvae of 48 h caused by gamma rays, in a dose range of 0 to 35 Gy administered in three different DRs: 5.1, 32.9 or 860.9 Gy/h. Larval-adult viability was reduced in relation to dose, but not with DR, as there were no significant differences in the calculated lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) for the three DR. With the SMART test, somatic mutation and recombination frequencies were determined; the results indicated that they increased in direct relation to dose and DR. These results confirm the direct effect of DR, highlighting the importance of evaluating different effects on the same individual caused by DR, for relevance of toxicological and radioprotection studies. On the other hand, the identification of substances that prevent or minimize the deleterious effects of IR is an indispensable task. In a second stage we evaluate the radioprotective potential of some closed or open ring porphyrins, such as: chlorophyllin (CCS), protoporphyrin-XI (PPIX) and bilirubin (BRB) and compare it with amifostine AMF® a radioprotective agent approved by FDA, with the SMART test. The results indicated that porphyrins or AMF alone do not affect larva-adult viability or basal mutation frequency. Pretreatments of 1 to 9 hours with any e porphyrins plus 20 Gy of gamma rays (PT+ 20 Gy) caused the somatic mutation and recombination frequency induced by 20 Gy to decrease significantly and with the following relationship: BRB (69.3 %) > CSC (40.0 %) > PPIX (39.0 %) > AMF® (19.7 %). Bilirubin stood out with a higher average percentage (74.4 %) of antimutagenic capacity and caused an increase in adult larval viability of 16% with 3 h of pretreatment with respect to viability caused by 20 Gy. Although AMF®, caused a reduction in genetic damage after 1 and 3 h of pre-treatment but it was not significant. Porphyrins were shown to be more efficient in reducing genetic damage induced by 20 Gy of gamma rays compared to AMF®, demonstrating that PPIX, CCS and BRB are excellent candidates for further testing of their efficacy as potential radioprotectors.

### III. INTRODUCCIÓN

El ser humano siempre ha estado expuesto a la radiación ionizante proveniente del espacio exterior o de otras fuentes naturales. Actualmente se agregan a estas fuentes las producidas artificialmente por el hombre, como los aparatos de rayos X, los aceleradores de partículas y los reactores nucleares. Se sabe que, si una persona se expone a una cierta dosis de radiación, ya sea accidentalmente, por realizar actividades que involucren su uso, o por tratamiento médico, pueden causarse daños a su salud.

Se ha estimado que el uso de la radiación para el diagnóstico y tratamiento médico, contribuyen con el 35 % de la dosis anual, de ahí la importancia de proteger a los seres humanos de los efectos indeseados de exposiciones, tanto en condiciones normales como accidentales (UNSCEAR, 2012). Los avances científicos han permitido conocer y comprender los efectos biológicos de las radiaciones y a partir de ahí desarrollar experimentos encaminados a la búsqueda de agentes con efecto radioprotector (Painuli y Kumar, 2016).

En el campo de la radiobiología es de especial interés estudiar los efectos biológicos causados por la variación del tiempo en la administración de una determinada dosis de radiación. Los resultados publicados sobre este tema son inconsistentes, mientras algunos autores afirman que hay una relación directa entre la razón de dosis y la inducción de daño biológico, otras investigaciones mencionan que entre menor sea la razón de dosis mayor será el daño provocado por la radiación (Tang *et al.*, 2017), denotando el efecto directo e inverso de la RD, respectivamente. Por lo anterior mencionando, si existe alguna diferencia en la inducción de daño genético dependiendo de la intensidad con la que se aplique la radiación, el efecto observado puede ser consecuencia de la interacción de la radiación con la materia y la capacidad de respuesta del organismo ante el daño provocado.

El presente estudio contribuye en el conocimiento de la acción de diferentes razones de dosis de radiación ionizante en la modulación de daño genético y el papel antioxidante de algunas porfirinas tales como la protoporfirina (PP-IX), la clorofilina (CCS) ó bilirrubina (BRB) en comparación con la Amisfostina (AMF®) en *Drosophila melanogaster*.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1. Radiación Ionizante

La radiación es un fenómeno que consiste en la emisión y propagación de energía en forma de ondas electromagnéticas, fotones o partículas subatómicas a través del espacio y la materia. La radiación ionizante (RI) es aquella que tiene energía suficiente para producir cambios en la materia al eliminar o añadir electrones a los átomos que la componen e incluye a las partículas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y a los rayos cósmicos, X y  $\gamma$  (Painuli y Kumar, 2016).

Todos los seres vivos en el planeta estamos expuestos a la radiación natural, que proviene de los rayos cósmicos y de elementos radiactivos o radionúclidos que están en la corteza terrestre desde la formación del planeta. Aunque es variable para la superficie terrestre, se ha calculado que el fondo natural de radiación es de 0,39 mSv al año, oscilando entre 0,3 y 1 mSv (CSN, 2013), sin embargo, en los últimos años algunas actividades humanas, como los viajes espaciales o el uso de la radiación en diferentes industrias como la generación de energía, el diagnóstico y tratamiento médico, han contribuido a incrementar la dosis de radiación que recibe un individuo. Como muchos otros agentes físicos, químicos o biológicos, las radiaciones ionizantes son capaces de producir daños en la materia orgánica que incluyen: inducción de muerte celular, mutaciones genéticas y carcinogénesis (Smith *et al.*, 2017).

#### 4.1.1 Efectos biológicos de la RI

Los efectos biológicos de la radiación ionizante proceden del daño que ésta causa a los componentes de la célula ya sea de manera directa o indirecta (Figura 1). En el primer caso, la RI puede interactuar con cualquier molécula biológica alterando su estructura atómica en un lapso de tiempo de femtosegundos ( $1 \cdot 10^{-15}$ ), proceso que se denomina ionización. En el efecto indirecto, la radiación puede ionizar a todas las moléculas, principalmente las del agua, formando especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante un proceso denominado radiólisis del agua; a su vez las ERO pueden causar alteraciones a todas las estructuras y moléculas de la célula (Smith *et al.*, 2017). Se ha estimado que alrededor del 40% de daño al ADN se debe a interacciones directas y entre un 60%-70% a los radicales libres (Saha, 2013).



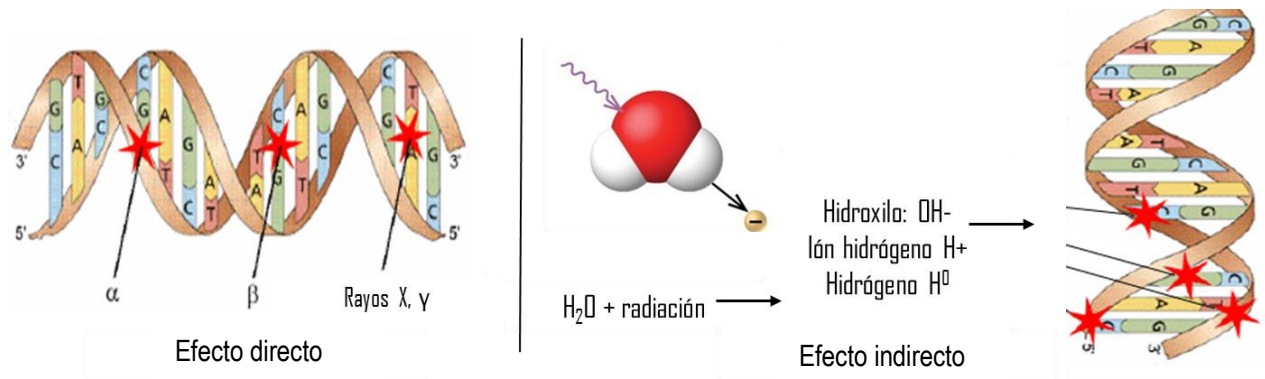


Figura 1. Efecto directo e indirecto de la radiación ionizante.

Se conocen aproximadamente 12 radicales libres (RL) que se originan a partir de la radiólisis del agua, de los cuales los más reactivos son: el hidroxilo ( $HO^\cdot$ ), el hidrogeno libre ( $H^\cdot$ ) y el anión superóxido ( $O_2^\cdot^-$ ). La formación de cada producto depende de la naturaleza de la RI utilizada ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o X) de las condiciones experimentales durante la irradiación y del grado de pureza del agua (del Cura *et al.*, 2009).

Entre las alteraciones provocadas por la RI están: la peroxidación lipídica en las membranas, la fragmentación y desnaturalización proteica, así como la oxidación en los hidratos de carbono (Desouky *et al.*, 2015). Debido a su importancia, en la transmisión de la información genética necesaria para todos los procesos celulares, el ADN es la molécula más importante cuando se estudia el efecto de la RI. El daño que provoca la radiación al ADN puede ser la sustitución o pérdida de bases, el rompimiento de una o ambas cadenas, aberraciones cromosómicas y entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas (Dizdaroglu, y Jaruga, 2012).

Las lesiones de cadena sencilla se reparan en la mayoría de los casos por las enzimas celulares. La magnitud de la alteración dependerá en última instancia de la eficiencia del proceso de reparación y de la naturaleza del daño inicial. Los efectos de una lesión no reparada, o mal reparada en una molécula de ADN pueden multiplicarse durante los procesos de transcripción o traducción, que pueden dar como resultado la alteración de la expresión e inestabilidad del genoma, la modificación de proteínas, retraso en el ciclo celular, transformación neoplásica y/o muerte de la célula irradiada; o bien, la mutación puede transmitirse a innumerables células hijas lo que puede desencadenar enfermedades hereditarias o la muerte del organismo (Painuli y Kumar, 2016).

Otro factor que modifica la respuesta celular ante el efecto de la radiación es la cantidad de energía de RI cedida o transferida a la materia por unidad de longitud o transferencia lineal de energía (TLE) las

partículas subatómicas como  $\alpha$ , neutrones y protones, que ionizan a la materia, poseen una TLE alta mientras que los rayos X y gamma depositan su energía en una distancia más larga. Se sabe que la RI con una TLE baja de radiación es menos eficiente que una TLE alta al producir más ionizaciones por unidad de área que derivan en un mayor daño biológico (UNSCEAR, 2012).

La dosis de radiación es la cantidad de energía absorbida por unidad de masa y es otro factor que modifica la respuesta celular. Esta cantidad se expresa en julios por kilogramo, que toma el nombre especial de Gray (Gy) (González, 1994). Se ha establecido que cuando la exposición es a dosis bajas la respuesta celular a la RI, se presenta en tres fases: En la primera, se observa un incremento en la transformación celular; en la segunda, conforme va aumentando la exposición, hay una meseta (o constante) producto de la reparación celular y en la tercera, al aumentar la dosis de radiación se incrementa nuevamente la transformación celular (Spilka *et al.*, 2013). Los efectos post-irradiación a dosis bajas provocan alteraciones en la comunicación celular, en la vía de la transducción de señales y en la respuesta del daño al ADN, también se han observado cambios transcripcionales y modificación de proteínas, así como una respuesta adaptativa (Spilka *et al.*, 2013). En un estudio donde se comparaban los cambios en la expresión génica inducidos por la RI a dosis de 2 cGy y 4 Gy de rayos X en fibroblastos humanos (HSF42) se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas en la respuesta celular. Con la dosis de 2 cGy hubo un cambio en la expresión de 425 genes, involucrados principalmente en la comunicación celular; mientras que la dosis alta alteró la expresión de 2158 genes y hubo un incremento en los genes involucrados en la apoptosis y la proliferación celular (Ding *et al.*, 2005).

Los efectos deletéreos de la radiación, en particular el incremento en las mutaciones, se han asociado al proceso de carcinogénesis. Este proceso, generalmente se divide (aunque en forma imprecisa) en tres fases: la iniciación, la promoción del tumor y la progresión maligna. Se supone que la radiación es más un iniciador que un promotor o un agente progresivo. El término dosis baja de radiación, hace referencia a exposiciones en las que resulta muy improbable que ocurra más de un caso de absorción de energía de la radiación en las partes críticas de una célula (y que la dañe) durante el tiempo en que pueden actuar en ella sus mecanismos de reparación. Por lo tanto, la probabilidad de que se induzcan mutaciones es proporcional a la dosis, y la probabilidad de carcinogénesis también debería ser proporcional a la dosis (UNSCEAR, 2012).

Algunos de los efectos biológicos ante dosis bajas de radiación descritos anteriormente, resultan no ser nocivos para las células. Se demostrado que exposiciones a dosis bajas pueden suprimir el proceso de

carcinogénesis e incrementar la cantidad de antioxidantes y la capacidad de reparación del ADN lo que reduce la cantidad de lesiones al ADN con potencial carcinogénico. Además, se estimula el mecanismo de apoptosis que descarta células malignas y la activación del sistema inmune que elimina a las células tumorales (Feinendegen y Cuttler, 2018). Sin embargo, cuando un organismo está expuesto a radiación, el tipo y la magnitud del efecto que se produzca, depende del tipo de radiación, de su energía, de la dosis (energía absorbida), del tiempo de exposición y de la razón de dosis.

#### 4.1.1. Tasa o razón de dosis (RD)

La RD se puede definir como el tiempo en el que se aplica una determinada dosis de radiación (Gy/h) (Tanarro y Tanarro, 2008). Existen evidencias que indican que las respuestas celulares son diferentes cuando la dosis de radiación se administra en un lapso de tiempo corto que cuando se dan lentamente.

Como se mencionó anteriormente, los efectos biológicos de la RI, tienen una relación directa con la RD (Erixon y Cedervall 1995) a una RD alta el efecto biológico será mucho mayor comparado con el inducido por una RD baja (Brooks *et al.*, 2016) a este fenómeno se le denomina “efecto esperado de la razón de dosis” (Bedford y Mitchell, 1973, Hall y Giaccia, 2012). Este efecto se ha observado con fibroblastos de rata al exponerlos a dosis de 0.0, 3.9, 7.4 y 11.3 Gy durante 4 ó 67 h encontrando un incremento en el número de aberraciones cromosómicas en relación a la dosis y a la RD (Brooks *et al.* 1995). Cuando se midió el daño al ADN después de exponer fibroblastos humanos a diferentes dosis (0-5Gy) a 1.8 ó 0.3 Gy/min usando una fuente de  $^{137}\text{Cs}$ , se encontró que sólo con la RD alta hubo un incremento en la formación del complejo histona fosforilada ( $\gamma\text{H2AX}$ ) en sitios de rupturas de doble banda, este efecto aumentó en relación a la dosis y RD (Ishizaki *et al.*, 2004). En otro estudio donde se expusieron ratones de la cepa C57BL6/FYDR/FYDR a una dosis 400 veces mayor que la de fondo ( $\sim 10.5$  cGy) a una RD baja de 0.00017 cGy/min no se detectó aumento de daño al ADN, pero con una RD más alta de 7.1 cGy/min se incrementó el índice de bases oxidadas del ADN, la formación de micronúcleos, la recombinación homóloga y la expresión de genes sensibles a la radiación (Olipitz *et al.*, 2012). También se ha reportado que el ciclo celular puede descontrolarse cuando las células se exponen a dosis y RD altas provocando alteraciones en el recambio celular, un efecto que se ha reconocido como un mecanismo importante en la incidencia de cáncer producido por RI radiación (Brooks *et al.*, 2016).

Es bien sabido que el efecto biológico incrementa con altas dosis de radiación, pero los efectos ante la exposición a dosis y RD bajas no se ha establecido del todo; sólo se estiman extrapolando los efectos en el modelo lineal sin umbral basados en exposiciones con dosis altas de radiación (Brenner, 2003). Sin embargo, en un estudio pionero Mitchell y colaboradores (1979) encontraron que la reducción en la RD de 1.54 a 0.37 Gy/h en células HeLa expuestas radiación, resultó en mayor muerte celular para una determinada dosis absorbida y concluyeron que este efecto puede estar asociado a al proceso de carcinogénesis (efecto indirecto de la RD). En contraste, diversos estudios han revelado que dosis y RD bajas causan efectos biológicos benéficos. De Toledo *et al.* (2006) expusieron a fibroblastos humanos de forma aguda o crónica a dosis de entre 1 a 10 cGy a 6 cGy/min o 3.3 Gy/min) y encontraron un incremento en la formación de micronúcleos en relación directa a la dosis y RD, mientras que con la dosis más alta administrada a la RD baja, hubo una reducción en este efecto a un nivel similar o menor que el basal y la viabilidad de los linfocitos fue igual cuando se expusieron a las dos RD. Con células mieloides (ML-1), se ha encontrado que en un rango de exposición de 0.28-290 cGy/m se producen cambios en el genoma relacionados con la RD, sin embargo, aunque se inhibió la inducción de la apoptosis con la RD más baja, hubo un continuo incremento lineal en la expresión de los genes regulados por el P53, involucrados en el control del ciclo celular y la apoptosis (Amundson *et al.*, 2003).

Las técnicas de matrices de expresión de genoma completo de células de ratón y humanas, han permitido medir el patrón de expresión génica después de una exposición a una dosis neta de radiación administrada a una RD baja o alta; se ha demostrado que éste cambia marcadamente si el estudio es *in vitro* o *in vivo*; que hay genes que son exclusivos de exposiciones a una RD alta y otros a una baja o genes que modulan su expresión con ambas RD. Los genes inducidos que se han detectado, están involucrados en las vías de apoptosis, en la síntesis de proteínas, en el choque térmico, en la respuesta inmune, en la reparación de ADN, en el control del ciclo celular y por supuesto en la respuesta al estrés oxidante (Paul *et al.*, 2015 y Gandhi *et al.*, 2015). Algunos de ellos tienen efectos benéficos (Tang *et al.*, 2017) como la reducción de la tumorigénesis (Sakai *et al.*, 2006), el incremento en la longevidad y en la respuesta inmunológica (Ina y Sakai, 2004).

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (Genética de *Drosophila* de ININ), demuestran que la capacidad radioprotectora de un compuesto depende de la RD; el ácido ascórbico reduce el daño genético inducido por 20 Gy de rayos gamma sólo si esta dosis es administrada a una RD de 36 Gy/h, mientras que, cuando la misma dosis es administrada a 960 Gy/h sólo las concentraciones bajas de ácido

ascórbico disminuyeron el daño genético, por lo tanto el efecto radioprotector del ácido ascórbico depende de la RD más que de la dosis administrada (González *et al.*, 2018). En otro estudio se encontró que 0.5 o 1 Gy de rayos gamma administrados a 5.4 o 34.3 Gy /h son capaces de inducir radio y quimio-protección contra el daño inducido por 20 Gy o 1 mM de trióxido de cromo (Vidal *et al.*, 2018). Posteriormente, en otro estudio se evaluó el daño genético inducido por 20 Gy de rayos gamma, administrados a diferentes razones de dosis (6.659 Gy/h y 1111.42 Gy/h) en larvas de *Drosophila melanogaster* usando el ensayo SMART. Los resultados demostraron que la RD más baja fue capaz de inducir frecuencias más altas de daño genético y esto se debe probablemente a una inducción diferencial de radicales libres a razones de dosis distintas (Alcaide, 2016). Lo anterior pone de manifiesto que falta mucha investigación que relacione los efectos biológicos de distintas RD con el daño producido, ya que la respuesta celular a una dosis alta o baja es distinta.

#### 4.2. Estrés oxidante

El estrés oxidante (EOx) es un estado celular en el que la homeostasis óxido-reducción intracelular se encuentra alterada debido a un desequilibrio entre la producción de RL y la capacidad de un sistema biológico de eliminar o desintoxicar los reactivos intermedios o de reparar el daño resultante causado por los RL; esto debido a la disminución en los niveles de las defensas antioxidantes celulares, el aumento en la tasa de producción de las especies reactivas o por la combinación de ambas condiciones (Halliwell, 2011).

Un RL es una especie química extremadamente inestable y reactiva debido a la pérdida de un electrón en su último orbital de energía. El término de RL abarca muchas especies reactivas, entre las que se encuentran las especies ERO y las de nitrógeno (ERN). Las ERO incluyen  $O_2^-$ , el radical hidroxilo (-OH), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los singuletes de oxígeno ( $^1O_2$ ), entre otros. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo del oxígeno ya que el 2% del  $O_2$  que se inhala es reducido de forma incompleta (Figura 2), mediante procesos como la respiración celular, el transporte de electrones en la mitocondria, la vía metabólica del citocromo P450, las respuestas inflamatorias y las reacciones dependientes de oxígeno de diferentes enzimas (Sisein, 2014 ). Cuando el RL entra en contacto con las diferentes moléculas que integran la estructura celular, la molécula cede un electrón convirtiéndose ahora en un RL, de esta manera se inicia una reacción en cadena que pone en peligro la homeostasis celular (Nimse y Pal, 2015).

Entre las fuentes externas de producción de RL se encuentran: derivados de la combustión del tabaco, compuestos químicos, agentes físicos (radiaciones ultravioletas, la radiación ionizante), gases, agentes orgánicos y metabólicos, dieta hipercalórica, procesos inflamatorios, traumatismos, etc. (Phaniendra *et al.*, 2015) El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aunque no es un RL, es muy tóxico para las células porque en presencia de un metal de transición como Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup> genera al <sup>-</sup>OH mediante las reacciones de Fenton o de Haber-Weiss (Sisen, 2014) (Figura 2). Sin embargo, la capacidad prooxidante de cada RL está determinada por factores como: reactividad, especificidad, selectividad y capacidad de difusión (Nimse y Pal, 2015). A pesar de su potencial oxidante y de las consecuencias que desencadenan, los RL están implicados en diferentes procesos fisiológicos celulares como la fertilización del óvulo, la fagocitosis, la señalización, regulación y función de varias vías de señalización celular, quimiotaxis, etc. (Halliwell, 2011).

El EOx puede causar efectos nocivos mediante mecanismos directos o indirectos; de manera general las alteraciones producidas a las biomoléculas son: peroxidación lipídica, oxidación y fragmentación proteica, así como cambios en los hidratos de carbono, que a su vez causan citotoxicidad y genotoxicidad celular. Actualmente el estudio de los efectos del EOx es de especial interés porque está relacionado con algunas condiciones patológicas como enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, envejecimiento celular, desórdenes neurológicos, diabetes, cáncer etc., y también es el mecanismo por el cual la radiación produce daños de manera indirecta a los organismos (Halliwell, 2011).

El daño indirecto provocado por la RI está influenciado por el estatus antioxidante de la célula y el aumento y disponibilidad de la activación de mecanismos de reparación celular. La respuesta biológica a la radiación puede estar modulada por alteraciones que afectan a esos sistemas antioxidantes y en consecuencia provocan daño a la célula. Bajo condiciones de EO, la célula recurre a respuestas genómicas que involucran cambios en la expresión de genes cuyos productos proporcionan protección en contra del daño oxidante. Sin embargo, cuando el nivel de ERO excede las defensas celulares, la célula sufrirá daños (de manera dependiente de la dosis) que puede conducir a carcinogénesis, necrosis o apoptosis (del Cura *et al.*, 2009 y Smith *et al.*, 2017).

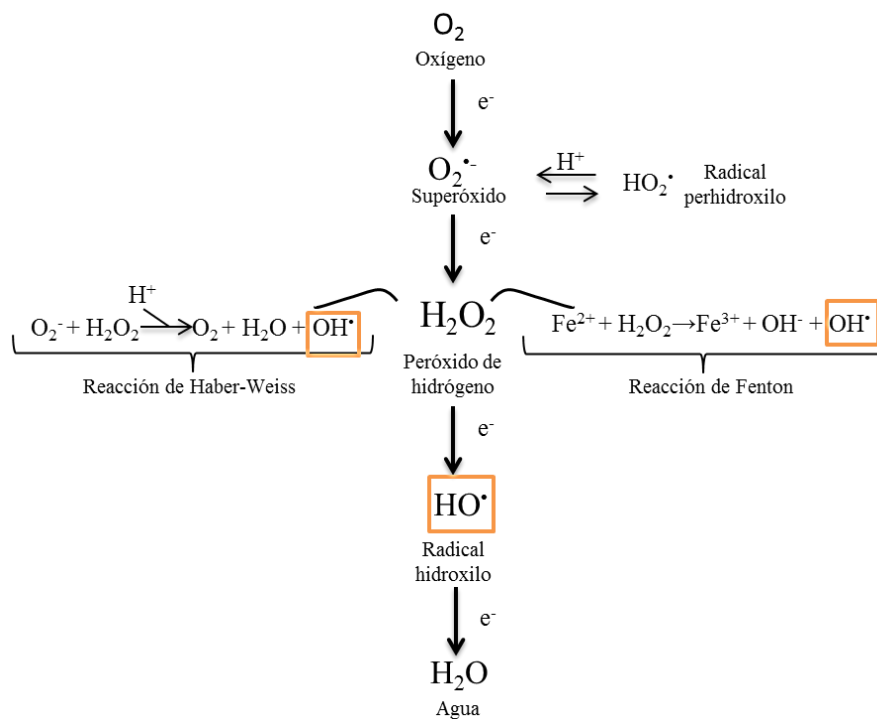


Figura 2. Etapas de la reducción del oxígeno que conducen a la formación de ERO. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss para la formación del radical hidroxilo. Tomado de Jiménez, 2015.

### 4.3. Radioprotectores

Actualmente, el incremento en el uso de la RI en áreas como el diagnóstico y tratamiento médico, la generación de energía, el peligro de los accidentes nucleares, etc., han aumentado los riesgos que conlleva la exposición a la misma, por ello es imperante buscar alternativas para evitar o minimizar los efectos adversos de la radiación ionizante procedente de diversas fuentes (Kamran *et al.*, 2016). En ese sentido, una estrategia que actualmente recibe atención importante por su impacto en la salud humana, es la investigación en el desarrollo de radioprotectores. Un radioprotector es un agente químico que reduce los efectos nocivos de la radiación antes de la exposición a la misma (Arora, 2008). Un radioprotector por excelencia debería de cumplir con las siguientes características:

1. Protección significativa contra los efectos de la radiación.
2. Amplio espectro de protección sobre tejidos y órganos sanos.

3. Si es utilizado en la terapia antitumoral, debe preservar su eficacia, permitiendo que no se observen efectos positivos sobre la masa tumoral.
4. No debe ser tóxico
5. Largo tiempo de protección.

De acuerdo con el Consejo de Seguridad Nuclear (CSN, 2013) actualmente no existe ningún compuesto que cumpla con todos los requisitos, no obstante, en una revisión reciente sobre los mecanismos de acción, Smith y colaboradores (2017), reportan que la actividad radioprotectora de algunos compuestos, se debe principalmente a los siguientes mecanismos:

1. *Supresión de la formación de especies reactivas:* Se refiere a la capacidad de algunos agentes farmacológicos de inducir hipoxia celular, disminuyendo así la formación de RL ya que el O<sub>2</sub> es necesario para la formación de ERO. Los compuestos sulfhidrilos (RSH), sufren una reacción de oxidación con el O<sub>2</sub> que produce un consumo químico o bioquímico del mismo.
2. *Inactivación de las especies reactivas inducidas por la radiación:* Algunas sustancias pueden estabilizar a los radicales  $\cdot\text{OH}$  y O<sub>2</sub><sup>-</sup>, responsables del daño radio-inducido provocado de manera indirecta. También, los compuestos RSH pueden interactuar con los RL y presentan afinidad química por los grupos OH-, produciéndose la siguiente reacción:  $\text{RSH} + \cdot\text{OH} = \text{RS} + \text{H}_2\text{O}$ . Otras sustancias que producen este efecto son las enzimas antioxidantes.
3. *Estabilización del blanco:* Los radioprotectores también pueden interactuar con blancos celulares como el ADN. Tras esta interacción se forman disulfuros combinados, lo que estabiliza la molécula de ADN y previene el daño de la RI. Este es el mecanismo de acción de algunos aminotioles como la cisteamina y la espermidina, que también se ha determinado que pueden estar involucrados en la reparación de las roturas de ADN de cadena simple.

#### 4.3.1. Amifostina (AMF®)

Los primeros compuestos en ser estudiados como candidatos a radioprotectores fueron los tioles sintéticos como la cisteamina (Johnke *et al.*, 2014), debido a que este tipo de compuestos son buenos confiriendo radioprotección a los tejidos sanos, sin embargo, poseen alta o moderada toxicidad (CSN, 2013). La Amifostina® (AMF®) pertenece a esta familia de compuestos y es el único radioprotector que ha sido clínicamente aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration,



FDA) para mitigar los efectos adversos en pacientes sometidos a quimio y/o radioterapia (Joshi *et al.*, 2010). La AMF® [ácido-S-2-(3-aminopropilamino) etiofosforotioico], conocida como WR 2721, es un profármaco que no tiene actividad hasta que es desfosforilado a su metabolito activo (WR-1065) por la enzima fosfatasa alcalina, presente en la membrana plasmática (Sasse *et al.*, 2006). La AMF® es un agente selectivo al proteger a los tejidos normales de los efectos citotóxicos de algunos compuestos quimioterapéuticos y de la terapia de radiación, debido a que en tejidos sanos hay mayor acumulación del metabolito WR-1065 y de fosfatasa alcalina (Kouvaris *et al.*, 2007). Una vez en el interior de la célula el WR-1065 elimina a los radicales libres producto de la radiación y confiere protección a las membranas celulares y del daño al ADN (Figura 3) (Joshi *et al.*, 2010).

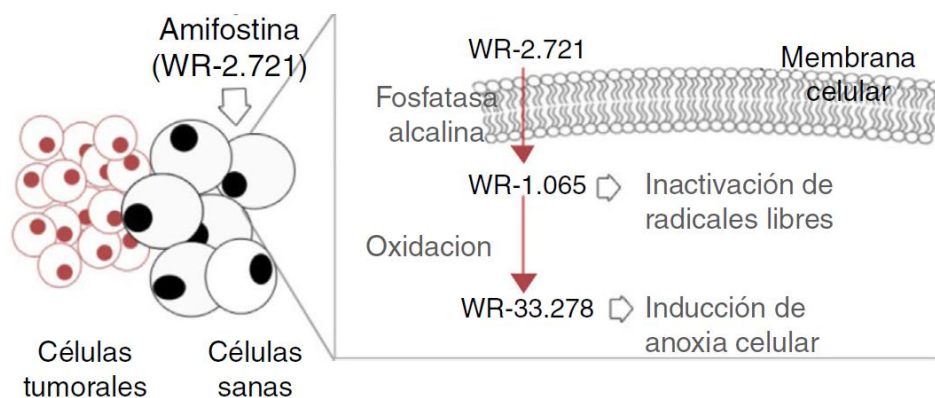


Figura 3. Mecanismo de acción de la AMF® en células sanas. Tomado de: Vives-Soler *et al.* (2017).

Estudios farmacocinéticos han demostrado que la AMF® se elimina rápidamente del compartimento plasmático, tiene una vida media de un minuto y su aclaramiento cercano al 90% se lleva a cabo en seis minutos. Una hora después de su administración por vía intravenosa, muy poco de la AMF®, o los metabolitos WR-1065 y WR-33278 se excretan en la orina (Shaw *et al.*, 1994 y Feng *et al.*, 2012). Para una terapia óptima, la administración de AMF® debe ser 30 minutos antes de la terapia de quimio y/o radiación (Feng *et al.*, 2012). En solución, es estable a temperatura ambiente por seis horas (Bukowski, 1996). En los estudios de Fase I sobre la AMF® no se pudo establecer la dosis máxima tolerada en el humano, pero si, la dosis tolerable que va de un rango de 740 a 910 mg/m<sup>2</sup> para su uso en Fase 2. No obstante, algunos estudios preclínicos indican que puede proteger no sólo a las células normales sino a las cancerosas y producir efectos secundarios tras su administración como hipotensión, náuseas y reacciones alérgicas, por ello se debe de administrar con precaución (Kouvaris, 2007).

Dado que la AMF® puede ser un buen radioprotector se ha tomado como referente para realizar estudios de otros compuestos candidatos a radioprotectores. En un estudio, donde se pretendía comparar la eficacia del pre-tratamiento con el fulereno C<sub>60</sub> (OH)<sub>24</sub> (10 y 100 mg / kg) o AMF® (300 mg / kg) en la protección de los efectos nocivos de rayos X, en ratones irradiados a cuerpo entero a una dosis 8 Gy (dosis letal), se encontró que 100 mg / kg de fulereno, confirió mayor radioprotección que la dosis de 10 mg / kg, este efecto fue comparable con el de la AMF®. A esta dosis también se observó que el fulereno disminuyó el daño a nivel hematológico de manera más eficiente que la AMF®. No obstante, la AMF® confirió mayor protección al corazón, el hígado y el riñón (Trajković *et al.*, 2007).

Debido a los efectos secundarios de los compuestos utilizados actualmente y principalmente a su toxicidad asociada, se está evaluando el potencial radioprotector de compuestos de origen natural porque podrían ser menos tóxicos (Kamran *et al.*, 2016). Algunas de las sustancias que han mostrado potencial radioprotector, de acuerdo a una lista de 37 compuestos publicada por el Consejo de Seguridad Nuclear (2013), son: la cafeína (Farooqui y Kesavan, 1992), la clorofilina (Zimmering *et al.*, 1990), el β-caroteno (Seifter, 1984), la curcumina (Shishodia, 2012), la genisteína (Landauer, 2003), el resveratrol (Sebastià, 2011), la superóxido dismutasa (Archana 2011), entre otros. Los resultados sobre los efectos radioprotectores de estos compuestos y muchos otros son muy contrastantes en cuanto a la dosis de administración, dosis de radiación evaluada, modo de acción, efectos adversos y tipo de ensayo *in vitro* o *in vivo*.

#### 4.4. Antioxidantes

Un antioxidante se define como una sustancia que, en concentraciones muy pequeñas comparadas con las del sustrato, disminuye o evita la oxidación del mismo. El término “sustrato oxidable” incluye a todo tipo de especies químicas presentes en la célula. Desde el punto de vista bioquímico, un antioxidante es capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción, actuando como donador de electrones y previendo así el daño que pueden causar los RLs (Sisein, 2014).

Cuando un organismo se expone a niveles altos de RI, la célula puede contrarrestar su efecto nocivo, incrementando sus defensas antioxidantes. Sin embargo, cuando el nivel de ERO aumentan en relación a las defensas celulares, puede conducir a la célula a un desequilibrio homeostático. Se ha propuesto la administración de agentes radioprotectores con capacidad antioxidante, como una forma de disminuir los

efectos nocivos relacionados con la radiación en las células. Los antioxidantes tienen el potencial de actuar como eliminadores o estabilizadores de radicales libres y por lo tanto reducir el daño al ADN causado por la radiación ionizante (Holley *et al.*, 2014). Teóricamente, esta intervención, permitiría a las defensas celulares mantener el equilibrio de los radicales libres generados por la exposición a la radiación, suponiendo que el nivel intracelular de antioxidantes sea suficiente en el momento de la exposición a la radiación.

Por su origen y presencia en el organismo, los antioxidantes pueden clasificarse en endógenos y exógenos. Los primeros comprenden a un conjunto de compuestos enzimáticos y no enzimáticos sintetizados por las células, que evitan la reducción univalente del oxígeno; entre los más importantes se encuentran la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), entre otras. Las SOD catalizan la dismutación del anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, previniendo así la formación del radical hidroxilo, que posiblemente es el radical más dañino por su alto poder reactivo (Hall y Giaccia, 2012). El peróxido de hidrógeno no es considerado como un radical libre, pero es la ERO más abundante. Actúa como segundo mensajero en rutas de transducción de señales y es capaz de atravesar la membrana celular por difusión pasiva (Zamocký *et al.*, 2012). Tanto el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su producto de descomposición, el radical OH<sup>-</sup>, son perjudiciales para los componentes celulares, por esto, su eliminación rápida y eficaz es esencial para todos los organismos aeróbicos (Zamocký *et al.*, 2012). Unas de las enzimas encargadas de descomponer al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son las catalasas y la GPx (Klotz y Loewen, 2003, Sisen, 2014).

#### 4.4.1. Antioxidantes exógenos

Además de las defensas antioxidantes endógenas, las células pueden contener antioxidantes exógenos, que son aportados principalmente por la dieta y son generalmente eficaces contra una amplia gama de mutágenos como la RI y sustancias carcinogénicas (Pisoschi y Pop, 2015). Dentro de los compuestos antioxidantes de origen natural se encuentran los carotenoides, tocoferoles, la vitamina C, compuestos fenólicos, polifenoles, minerales (selenio-cobre) y algunas porfirinas (Kumar, 2006).

#### 4.4.2.1 Porfirinas

Las porfirinas son un grupo de pigmentos naturales ampliamente distribuidos en la naturaleza que desempeñan un papel importante en las rutas metabólicas. Estructuralmente, la molécula se compone por cuatro anillos de pirrol unidos entre sí por grupos metilo formando un compuesto macrocíclico. El anillo de porfirina es aromático y el centro es un ligando tetradentado que posee un espacio disponible para un metal de transición (Figura 4a). En la naturaleza el anillo porfirínico constituye el grupo prostético de un amplio número de moléculas como hemoproteínas, clorofilas (Figura 4b) citocromos (Figura 4c), etc. (Biesaga *et al.*, 2000).

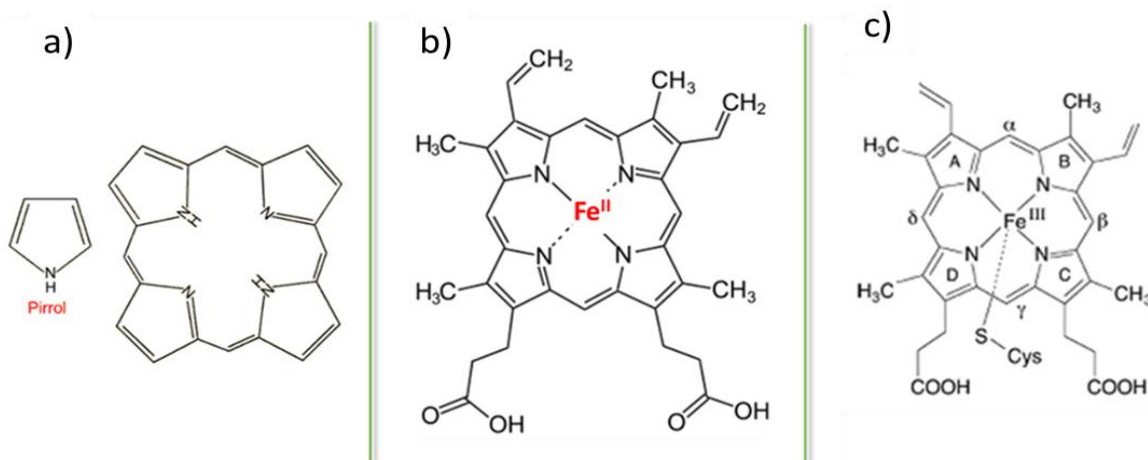


Figura 4. Estructura química de: a) Anillo de porfirínico y un pirrol, b) Grupo hemo y c) A-Ferro (III) protoporfirina IX, grupo prostético do citocromo P450.

#### Clorofilina

La clorofila (CL) es el pigmento principal de las plantas verdes, estructuralmente posee cuatro anillos de pirrol, un átomo de Mg<sup>2+</sup> al centro y una cola de fitol que le confiere hidrofobicidad y limita su biodisponibilidad y eficacia de unión con carcinógenos y mutágenos (Greer *et al.*, 2018). La CL es inestable y se oxida fácilmente en contacto con ácidos, el calor y la luz; además la extracción de la CL es un proceso costoso, lo que dificulta su uso en el laboratorio por lo que se han utilizado derivados más estables para reemplazar el pigmento natural (Ferruzzi *et al.*, 2001).

La Clorofilina cupro sódica (CCS) es una mezcla semisintética de sales de cobre y sodio derivadas de la clorofila; para su síntesis el átomo de magnesio en el centro del anillo y el éster de fitol de la clorofila son reemplazados por cobre y sodio respectivamente (Figura 5); la fórmula química condensada es  $C_{34}H_{31}N_4Na_3CuO_8$  (Bronzetti, 1990). Como resultado de estos cambios, la CCS es más estable y soluble que la clorofila (Sarkar *et al.*, 1995).

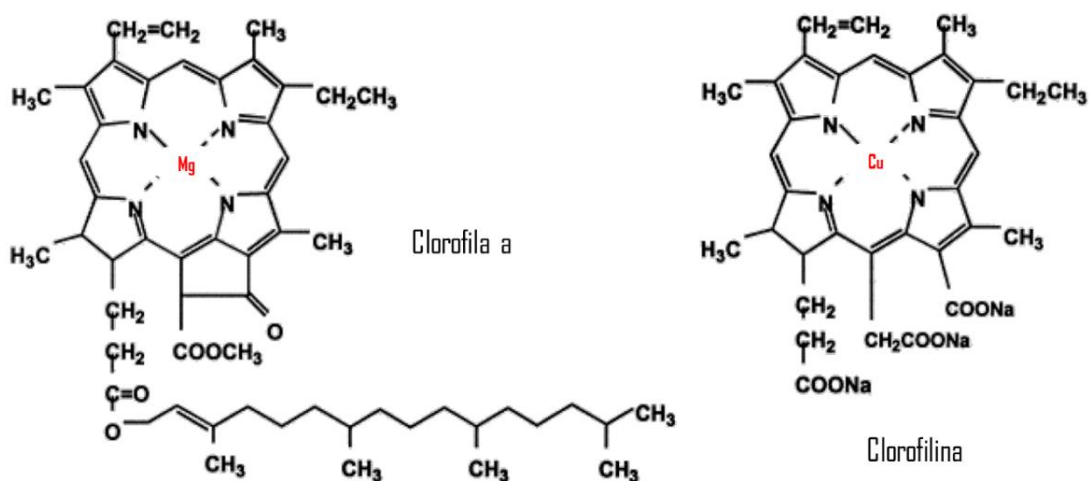


Figura 5. Estructura química de la clorofila a y la clorofilina (Chung *et al.*, 2000)

Dada la semejanza estructural de la CCS con el grupo prostético de la hemoglobina, algunos de los primeros usos fueron en la medicina alternativa para tratar a pacientes con anemia y para disminuir el tiempo de coagulación en los sangrados. En la actualidad la CCS ha sido ampliamente estudiada y se ha encontrado que exhibe propiedades antimutagénica, anticarcinogénica, anticlastogénica y antioxidante contra una gran variedad de compuestos y sistemas (Tumolo y Lanfer-Marquez 2012). Entre los compuestos probados están el dibenzo [ $\alpha,$ ] pireno (Hayatsu *et al.*, 1999); la aflatoxina B (Breinholt *et al.*, 1995 y Egner *et al.*, 2001); el trióxido de cromo ( $CrO_3$ ) (Cruces *et al.*, 2003); algunos agentes alquilantes como la dietil nitrosamina, metil nitrosourea, metil metano sulfonato y etil nitrosourea (Olvera *et al.*, 2000). En cuanto a agentes físicos, Zimmering *et al.*, (1990) reportaron la primera evidencia de actividad radioprotectora de la CCS en *D. melanogaster* con la prueba de mutación y recombinación somática y encontraron que un pre-tratamiento de 69 mM de CCS redujo significativamente la frecuencia de mutaciones en células somáticas inducidas por 20 Gy de rayos gamma. Pimentel *et al.*, (1999) demostraron que este efecto radioprotector persistía hasta por 72 h en el mismo sistema de prueba. Suryavanshi, *et al.*, (2015) encontraron que la administración de CCS por vía oral o intramuscular antes de una exposición de

7 Gy, mitiga los síntomas del síndrome hematopoyético al aumentar la cantidad de células madre hematopoyéticas, en la médula ósea de ratón *in vivo* después de la irradiación. Recientemente se demostró que un pre-tratamiento con CCS (100, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) durante dos horas redujo la genotoxicidad, citotoxicidad y la lipoperoxidación de células sanguíneas humanas expuestas a una dosis de 5 Gy de rayos gamma (Gerić *et al.*, 2019). Con base en estos estudios se ha planteado que la CCS puede actuar; atrapando los radicales libres/ actividad antioxidante; suprimiendo la activación metabólica de algunos mutágenos o carcinógenos o formando complejos con los promutágenos o sus especies reactivas (Nagini *et al.*, 2015).

### *Protoporfirina-IX*

La protoporfirina IX (PP-IX) forma parte de la biosíntesis del grupo hemo y de la mayoría de los citocromos y de las clorofilas, proviene del ácido 5-aminolevulínico (ALA) el penúltimo compuesto de la síntesis (Greer *et al.*, 2018). La PP-IX y el ALA se usan para fines médicos en la terapia fotodinámica (TFD). La porfirina excitada puede reaccionar directamente con estructuras celulares o con el oxígeno, en particular el oxígeno singlete, y es precisamente esta acción la que causa el efecto terapéutico de la TFD (Afonso *et al.*, 1999; Sil *et al.*, 2004). De igual forma, se puede provocar una acumulación selectiva de PP-IX con la aplicación del ALA (Rick *et al.*, 1997).

La PP-IX, es un tetrapirról plano que carece de metal de transición al centro (Figura 6). Se conocen quince isómeros de la protoporfirina, pero la PP-IX es el único que posee actividad biológica y que se encuentra en la naturaleza (Greer *et al.*, 2018).

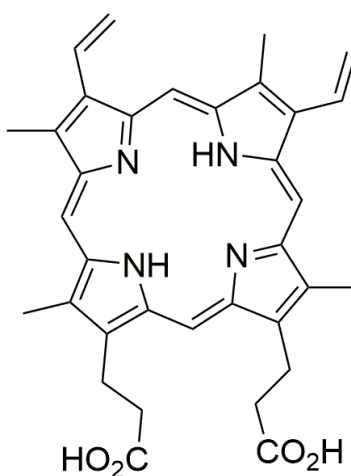


Figura 6. Estructura de la Protoporfirina IX. Tomado de (Gomes *et al.*, 2018).

Las propiedades antioxidantes de la PP-IX están pobremente caracterizadas (Mölzer *et al.*, 2012). Se ha evidenciado que bajo condiciones de obscuridad pose actividad antioxidante, inactivando a los radicales peroxilo e inhibiendo la actividad del sistema del citocromo P-450 en los microsomas de hígado de rata (Williams *et al.*, 1994). En dos estudios usando el ensayo de Ames, se demostró que un tratamiento de PPIX a las concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{mol/placa}$  redujo la actividad prooxidante del hidroperóxido de butilo terciario a una concentración de  $0.75 \times 10^{-6}$  moles/placa impidiendo la reducción en el número de colonias mutantes de *Salmonella* de forma dosis dependiente (Mölzer *et al.*, 2012) y también, del sulfo metil benzo [ $\alpha$ ] pireno entre el 24.8% y el 19.1% respectivamente (Cho *et al.*, 2000). En un estudio *in vivo* se encontró que la PP-IX posee actividad antimutagénica frente al  $\text{CrO}_3$  en *D. melanogaster* (Vidal *et al.*, 2014) e incrementó significativamente la longevidad de los organismos; este hallazgo sugiere que la PP-IX brinda protección contra el estrés oxidante, evitando la acción del radical superóxido (Pimentel *et al.*, 2013).

### *Bilirrubina*

La bilirrubina (BRB) es uno de los productos del catabolismo del grupo hemo, proveniente de los eritrocitos senescentes y de las hemoproteínas en los mamíferos, por lo que se consideraba un producto de desecho potencialmente citotóxico (Mancuso, 2017). De hecho, una alta producción o exceso en el plasma origina provoca ictericia (Stillman, 1990).

La transformación del hemo en BRB ocurre en dos pasos: 1) formación biliverdina (BV) a partir del grupo hemo, en esta fase se rompe el anillo tetrapirrólico por la enzima hemo oxigenasa y 2) conversión de la BV a BRB (Mancuso, 2017). La fórmula química de la BRB es  $\text{C}_{33} \text{H}_{36} \text{N}_4 \text{O}_6$ . Estructuralmente es un compuesto lineal formado por cuatro anillos pirrólicos unidos por tres enlaces de carbono (Figura 7). Posee dos grupos de propionato y éstos son los responsables de la unión de la molécula con otras, de su solubilidad y transporte (Bulmer *et al.*, 2008). La BRB es hidrofóbica e incluso en solventes lipídicos su solubilidad es limitada, los solventes como el dimetil sulfóxido rompen sus puentes de hidrógeno y facilitan su solubilidad (Valášková y Muchová, 2016). Existen varios isómeros de la BRB pero la forma más común es la IXa. Cuando la BRB se expone a la luz, se transforma en productos más hidrosolubles que pueden ser excretados en la bilis; esta propiedad de la BRB también es utilizada en la TFD (Mancuso, 2017).

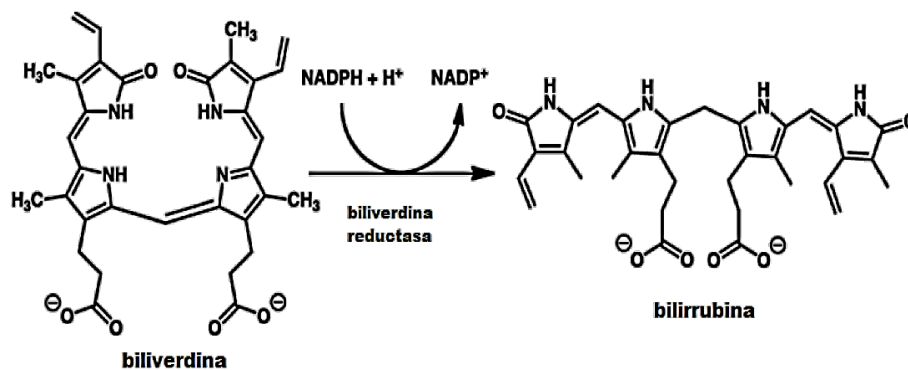


Figura 7. Formación y estructura química de la bilirrubina (Gubskiy *et al.*, 2015).

Se pensaba que los pigmentos biliares eran sólo productos de desecho del metabolismo, sin ninguna función. Sin embargo, actualmente varios estudios han confirmado que la BRB y la BV tienen gran capacidad para evitar la oxidación de lípidos y proteínas (Tomaro y Batlle, 2002; Bulmer *et al.*, 2011). Stocker *et al.*, (1987a) observaron por primera vez que la BRB eliminaba los radicales peroxilo ( $\text{ROO}\bullet$ ) evitando la peroxidación de los lípidos de las membranas, lo que los hizo proponerla como una molécula antioxidante. Estudios posteriores *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la BRB puede inactivar algunas ERO como el hidropoxilo ( $\text{HO}_2\bullet$ ),  $\text{O}_2^-$ , al hidroxilo  $\text{OH}\cdot$ , (Neuzil y Stocker, 1994; Stocker *et al.*, 1987b) y al óxido nítrico (NO) (Mancuso *et al.*, 2003 y Barone *et al.*, 2009). La BRB previene la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y membranas biológicas (Neuzil y Stocker, 1994), por esta razón se ha calculado que su actividad antioxidante es más eficiente ( $> 20$  veces) que la del Trolox o a la de la vitamina C (Wu *et al.*, 1994). Su efecto antioxidante es a través de la donación de electrones del anillo pirrólico ( $\text{NH}^+$ ) (Mölzer *et al.*, 2012). Por todo ello se ha propuesto a la BRB como un importante citoprotector y neuroprotector (Sedlak *et al.*, 2009, Kitamura *et al.*, 2003), además de tener propiedades quelantes (Adhikari *et al.*, 1998), antiinflamatorias e inmuno-modulante (Lakatos y Balla, 2017).

En base a la información anterior, la presente investigación evaluará la capacidad radioprotectora de algunas porfirinas, como PPIX, la CCS y la BRB.



#### 4.4. *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

Durante la última década, la disponibilidad de herramientas y sofisticadas técnicas de investigación en organismos modelo en el campo de las ciencias médicas y farmacéuticas ha avanzado extraordinariamente, mejorado nuestra comprensión sobre la etiología de las enfermedades y sus mecanismos de acción a nivel celular y molecular, impulsando el descubrimiento de nuevos fármacos efectivos para tratarlas. Estos estudios en investigación básica, pueden llevarse a cabo mediante el uso de organismos modelo adecuados, antes de realizar pruebas con humanos (Nainu *et al.*, 2019).

Sin embargo, los modelos en animales tradicionales incluyen ratones, ratas, gatos, perros y otros mamíferos como ovejas, cerdos y primates. Filogenéticamente, estos animales comparten similitudes con los humanos y pueden proporcionar información suficiente y precisa sobre la patogénesis de enfermedades a nivel celular y molecular (Vogel y Vogel, 2013). No obstante, algunos de estos protocolos se han desechado debido al creciente interés público en los conflictos éticos que representa el uso de animales de laboratorio; lo que ha originado la necesidad de incluir modelos animales alternativos. La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, representa entonces una excelente alternativa para realizar diferentes estudios entre ellos los de genotoxicidad un organismo. La historia del uso de *D. melanogaster* en las ciencias biológicas y en la genética moderna abarca más de 100 años, por lo que no es posible hacerle justicia completa en este apartado. *Drosophila*, se convirtió en un ícono en los estudios genéticos desde el nacimiento de esta disciplina a través de los trabajos de Thomas Morgan y actualmente ya se ha utilizado ampliamente para generar modelos para varios tipos de enfermedades humanas y para probar la genotoxicidad de nuevos fármacos (Nainu *et al.*, 2019 y Pandey y Nichols, 2011).

Se sabe que el genoma de *Drosophila* está compuesto por 18 millones de pares de bases que codifican para 14 mil genes y que el 75% de los genes que provocan enfermedades en los seres humanos tienen homólogos en la mosca (Adams *et al.*, 2000). Experimentalmente, la mosca de la fruta tiene varias ventajas: la primera, es muy fácil de mantener y requiere costos relativamente bajos en comparación con otros organismos modelo, incluidos el pez cebra, los ratones y las ratas (Jennings, 2011; Pandey y Nichols, 2011; Strange, 2016). Este punto es beneficioso para los investigadores que tienen fondos limitados para la investigación. *Drosophila* tiene una alta tasa de fertilidad, una mosca hembra puede producir 30-50 huevos cada día y cada huevo se convierte en una mosca adulta en 10 días (Panchal y Tiwari, 2017). Por lo tanto, el uso de *Drosophila* facilita la obtención resultados experimentales confiables utilizando

tamaños de muestra grandes a en un período de tiempo relativamente corto. Tercero, *Drosophila* tiene una vida útil corta, 2-3 meses, esta es una gran ventaja para los estudios de varios procesos biológicos, como el mecanismo del envejecimiento o la investigación de los efectos secundarios de alguna sustancia sobre el periodo de vida (He y Jasper, 2014). Otra gran ventaja del sistema es que posee enzimas dependientes del citocromo P450 necesarias para activar metabólicamente gran cantidad de promutágenos y procarcinógenos, estas funciones enzimáticas son equivalentes a las que efectúa la fracción microsomal del hígado humano (Panchal y Tiwari, 2017). Además, este modelo permite emplear varias vías de administración de las sustancias como la inhalación, inyección y principalmente la vía oral, además se pueden combinar diferentes protocolos de administración como pre-tratamientos y post-tratamientos (Würgler *et al.*, 1984). Por lo anterior, el uso de *Drosophila* en el laboratorio es una herramienta valiosa y puede ser aún más útil de lo que se consideraba, para estudiar los procesos celulares y moleculares fundamentales en los padecimientos humanos tales como el cáncer, el efecto de la radiación ionizante así como la investigación básica en el descubrimiento de radioprotectores como es el caso de este estudio, mediante el uso de experimentos con animales completos e *in vivo*.(Pandey y Nichols, 2011; Ugur *et al.*2016, Nainu *et al.*, 2019).

## V. JUSTIFICACIÓN

Existen controversias sobre los efectos biológicos que causa la radiación gamma cuando es administrada a diferentes RD. Estudios recientes llevados a cabo en el laboratorio de *Drosophila* del ININ demostraron que la radio-protección del ácido ascórbico depende de la RD (González *et al.*, 2018). Por otro lado, las dosis de 0.5 ó 1 Gy administradas a 5.4 ó 34.3 Gy/h inducen radio-adaptación en células somáticas de *Drosophila* independientemente de la RD (Vidal *et al.*, 2018). Estos resultados indican que es importante continuar con la investigación para evaluar *in vivo* el efecto de la RD sobre la inducción de daño genético, propósito del presente estudio. Una vez que determinamos las relaciones dosis-respuesta entre la viabilidad y daño genético inducido con las diferentes RD, probamos el efecto radioprotector de diferentes porfirinas (PPIX, CCS, BRB) contra los efectos de la radiación a la RD más alta. El efecto de las porfirinas se comparó con el de la AMF®, ya que es el único compuesto radioprotector que ha sido aprobado por la FDA.

## VI. HIPÓTESIS

Una dosis de radiación neta administrada a una razón de dosis alta producirá mayor cantidad de daño genético comparado con una razón de dosis baja y será modulado por la protoporfirina-IX, la clorofilina o la bilirrubina con mayor o igual efectividad que la amifostina®.

## VII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la modulación del daño genético inducido por diferentes razones de dosis de radiación gamma mediante algunas porfirinas en comparación con la AMF® en *Drosophila melanogaster*.

### 7.1 Objetivos particulares

1. Determinar la dosis efectiva (DE) de radiación gamma administrada a diferentes razones de dosis con el ensayo de mutación y recombinación somáticas.
2. Comparar el potencial antimutagénico de la AMF® con el de la CCS, BRB o PPIX.

## VIII. METODOLOGÍA

**Material biológico:** Se utilizaron las cepas de genotipo *mwh* +/ *mwh* + y *flr*<sup>3</sup>/*In* (3LR) TM3; *Ser* de *Drosophila melanogaster*. Ambas cepas tienen marcadores genéticos que modifican los tricomas del ala. El marcador *mwh* (*multiple wing hair*) se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma 3 en posición distal 3-0.3. El marcador *flr*<sup>3</sup>/TM3, *Ser* se encuentra también en el brazo izquierdo del cromosoma 3 en posición 3-39. El balanceador TM3 es necesario ya que el alelo *flr*<sup>3</sup> es letal en condición homocigota, la presencia del gen se confirma con *Ser* (*Serratia*) un gen marcador dominante. Se pueden encontrar descripciones más detalladas de los marcadores genéticos en Lindsley y Zimm (2012).

**Compuestos químicos:** La CCS [CAS: 11006-34-1]; la PP-IX, [CAS: 5865-01-5], la BRB [CAS: 635-65-4] fueron adquiridos de Sigma-Aldrich ST. Louis Missouri. La AMF® (Ethyol®, 500 mg. WR-2721; Schering Plough, Levallois-Perret, France, [CAS No. 20537-88-6].

**Preparación de soluciones:** Las concentraciones para cada porfirina fueron seleccionadas con base a publicaciones previamente reportadas para la CCS (Pimentel *et al.*, 1999, 2000). En este estudio se usaron concentraciones basadas en ensayos previos de viabilidad larva-adulto y la concentración más apropiada fue: CCS 69 mM; para la BRB 6.9 mM (Jiménez, 2013) y para la PPIX 0.69 (Vidal *et al.*, 2014), en el caso de AMF® fue de 32 µM (Aydemir *et al.*, 2009). Todos los compuestos se disolvieron en una solución de sacarosa al 5%. La BRB, fue emulsionada con una solución de sacarosa al 5% en condiciones de oscuridad en un sonicador durante 20 min.

**Propagación:** De cada una de las cepas se aumentó el número de individuos mediante dos trasvases cada dos días, en frascos lecheros de 1/4 L con medio regular (sacarosa, dextrosa, agar, harina de maíz y levadura) y se mantuvieron en un cuarto de cultivo a 25°C y 60% de humedad relativa. Completado el ciclo de vida se utilizaron los adultos.

**Cruza de cepas y colecta de larvas:** Para tal efecto se aislaron hembras vírgenes de la cepa *mwh* +/+ *mwh* y machos de la cepa *flr*<sup>3</sup>/*In* (3LR), TM3, *Ser*. Ambos se dejaron madurar de 4 a 5 días. Para homogeneizar la edad de los individuos utilizados para el estudio, las parejas de moscas se cruzaron durante 2 h, después se pusieron a ovipositar en frascos lecheros de 250 mL con medio de cultivo regular, en grupos de 50 parejas por frasco. Los huevos depositados se dejaron desarrollar en un cuarto de cultivo

bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, durante 3 días hasta obtener larvas heterocigotas de 48 h de edad. Éstas fueron colectadas por diferencia de densidad con una solución de sacarosa al 20%.

Para el cumplimiento de los objetivos particulares la metodología es la siguiente y en la Figura 8 puede observarse de manera esquematizada.

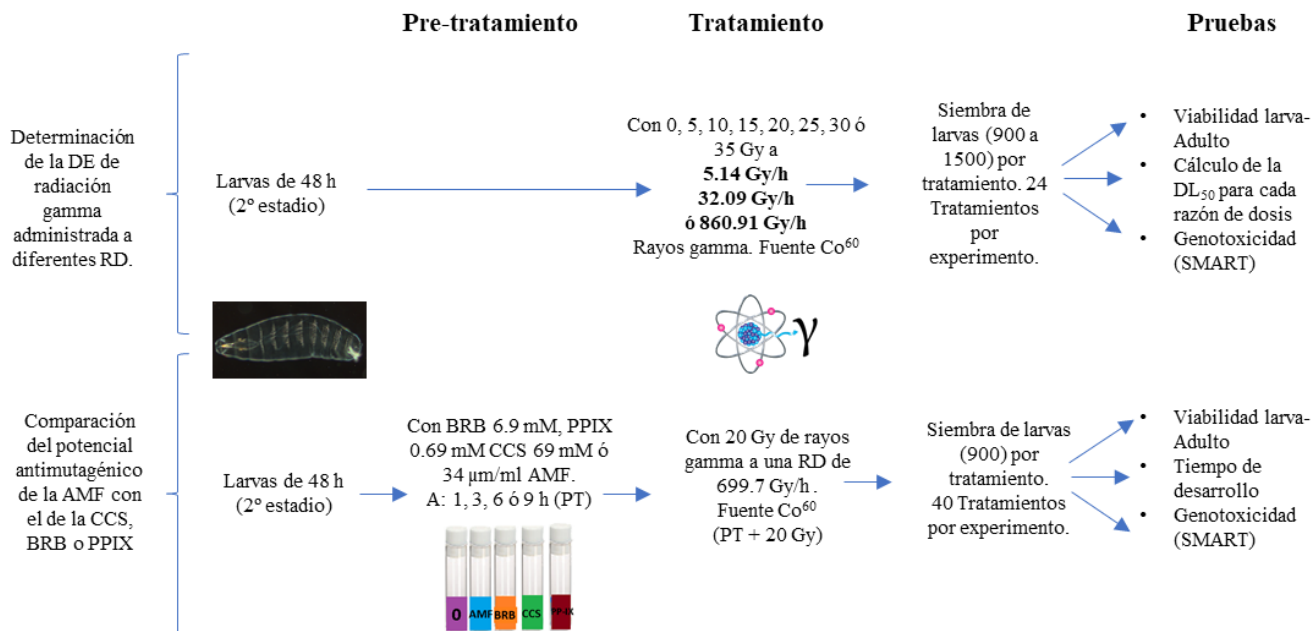


Figura 8. Diagrama general de la metodología seguida en este estudio. Cada experimento se realizó por triplicado.

### Determinación la dosis efectiva (DE) de radiación gamma administrada a diferentes razones de dosis:

Las larvas colectadas se dividieron en ocho grupos para irradiarlo con: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ó 35 Gy de rayos gamma, administradas a tres razones de dosis 5.14, 32.88 y 860.91 Gy/h. Como la fuente de radiación tiene un decaimiento aproximado del 1% mensual, se hicieron tres experimentos independientes en un lapso de seis meses. Esto fue tomado en cuenta para calcular la dosis neta requerida. El criterio que se siguió para irradiar a las larvas con las diferentes RD fue iniciar en las mismas condiciones de alimentación hasta el momento de la exposición a la radiación. Después de la irradiación las larvas se sembraron en grupos de 100 individuos por tubo homeopático con 0.8 g de medio sintético (*Drosophila* Medium® Formula 4-24 Carolina™ Co.) e hidratado con 2.5 mL de agua destilada. En total se utilizaron entre 900 a 1500 larvas por dosis y RD. Las larvas irradiadas concluyeron su desarrollo en el cuarto de cultivo en condiciones óptimas de temperatura y humedad y se realizaron las pruebas de viabilidad larva-adulto y genotoxicidad. Con estos resultados, se determinó la dosis de radiación a la cual se incrementó

considerablemente la frecuencia de mutación y recombinación somáticas con respecto al nivel basal, sin que disminuyera la viabilidad-larva adulto en más de un 20%, esta dosis fue 20 Gy (DE) administrada a las tres RD.

**Comparación el potencial antimutagénico de la AMF® con el de la CCS, BRB o PPIX:** Las larvas recolectadas de 48 h, fueron se colocaron en un pre-tratamiento (PT) en frascos de ¼ L que contenía un papel filtro humedecido con 3.5 ml de la solución correspondiente: sacarosa al 5% como control negativo y las soluciones con porfirinas: 69 mM CCS; 0,69 mM PPIX; BRB 6,9 mM; o 32 µM de AMF® durante 1, 3, 6 o 9 h bajo condiciones controladas de laboratorio y en oscuridad total. Terminado el tiempo de PT se tomó una alícuota de larvas de cada PT como control y otra alícuota se expuso a 20 Gy de rayos gamma (PT + 20 Gy), administrados a una RD de 699.7 Gy / h en un irradiador Transelektro LGI-01 con fuente de Co<sup>60</sup>. Después de la irradiación, se usaron 300 larvas por cada agente y tiempo de exposición. Las larvas se sembraron en grupos de 100 individuos por tubo homeopático con medio regular y fueron mantenidas en un cuarto de cultivo bajo condiciones de laboratorio hasta completar su desarrollo. Se realizaron al menos dos experimentos y para cada agente y tiempo de exposición se estableció un control negativo (0, sacarosa 5%); control de agente (porfirina o AMF®); control de radiación (20 Gy de rayos gamma) y los diferentes PT +20 Gy de cada compuesto. Las larvas tratadas concluyeron su desarrollo en un cuarto de cultivo en condiciones óptimas de temperatura y humedad para realizar las pruebas de viabilidad larva- adulto, velocidad de desarrollo y genotoxicidad.

**Viabilidad larva- Adulto:** Para ambos protocolos, este índice se midió como la relación entre el número total de adultos emergidos del total de larvas colocadas en cada vial, multiplicado por cien. Diariamente se contó el número de adultos emergidos, hembras y machos por separado de cada uno de los tratamientos. Con este resultado se calculó el porcentaje de emergencia diario o tiempo de desarrollo (TD). Para la determinación la dosis efectiva (DE) de radiación gamma, con los datos de toxicidad se calculó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de cada RD.

**Prueba de genotoxicidad:** Para evaluar el potencial mutagénico de las diferentes RD y la comparación del potencial antimutagénico de las porfirinas o AMF® en combinación con radiación gamma, se usó la prueba de mutación y recombinación somáticas por sus siglas en inglés (SMART) en el ala de *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1984). Después de cada uno de los tratamientos, los individuos viables se fijaron en etanol al 70% para hacer preparaciones permanentes con las alas de los organismos de genotipo *mwh*

+ / +  $flr^3$  para ambos protocolos y adicionalmente en el protocolo de la determinación de la DE de radiación, también se montaron las alas de los individuos *mwh + / TM3, Ser*. Posteriormente, se analizó el número de manchas (daño genético) inducido, a 400X usando un microscopio compuesto, por cada tratamiento se analizaron 40 alas (20 hembras y 20 machos). Cada experimento se realizó por triplicado. En la Figura 9 puede apreciarse el fundamento genético de este ensayo y ejemplos de los tipos de manchas. El ensayo SMART en ala se ha empleado en numerosos estudios para evaluar la genotoxicidad de diversos agentes (físicos, químicos), extractos y mezclas complejas (Rodrigues *et al.*, 2007)).

**Análisis estadístico:** Para establecer diferencias entre los tratamientos, los resultados de viabilidad larva-adulto se analizó con una prueba de *t de Student* a un nivel de confianza de  $p \leq 0.05$ . La toxicidad se obtuvo mediante curvas dosis-respuesta, dividiendo el total de adultos viables entre el número de larvas sembradas multiplicando por cien. El cálculo de la  $DL_{50}$  para las diferentes razones de dosis se realizó mediante el método PROBIT (*Log probit analysis by maximum likelihood*) a un nivel de confianza de  $p \leq 0.05$ . Los datos de la prueba de genotoxicidad se evaluaron de acuerdo con el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988), que permite obtener cuatro resultados diferentes: negativo (-), débilmente positivo (w), positivo (+) y no concluyente (i). El procedimiento se basa en dos hipótesis: (1) no hay diferencia en la frecuencia de mutación entre las series de control y tratamiento y (2) los resultados del pre-tratamiento tienen una frecuencia de mutación decreciente,  $n$  veces mayor que la inducida en controles positivos (20 Gy). Ambas hipótesis se prueban a un nivel de significancia del 5%. Para probar contra las hipótesis, se puede aplicar la prueba binomial condicional según Kastenbaum y Bowman o la prueba de  $X^2$  para proporciones (Frei y Würgler 1988).



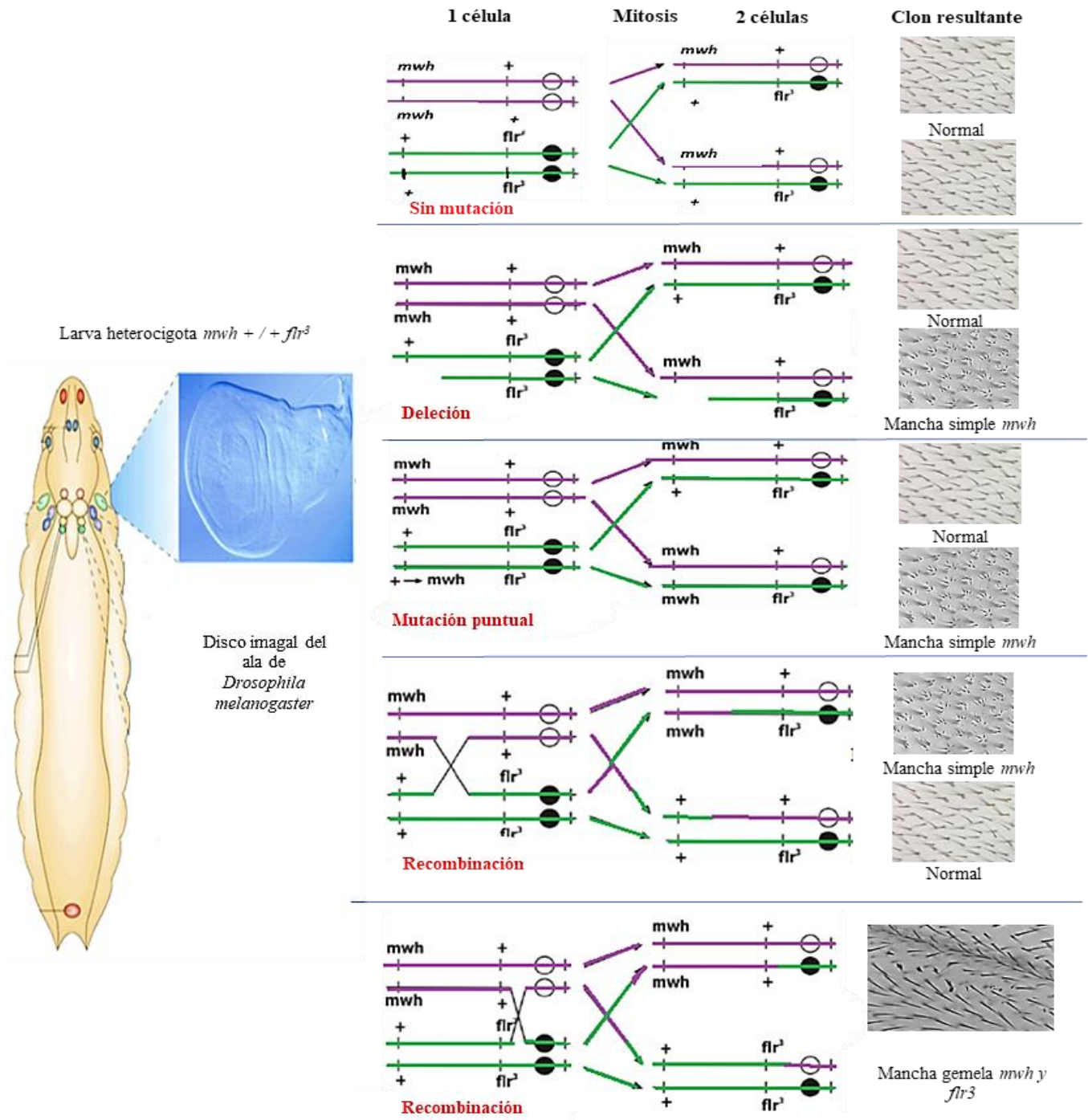


Figura 9. La prueba SMART es un ensayo *in vivo* a corto plazo, eficiente y versátil que detecta varios tipos de mutación, así como la recombinación somática en células del disco imaginal de las larvas. Esta prueba se basa principalmente en la inducción de pérdida de heterocigosidad de dos marcadores recesivos que codifican para la forma del tricoma en las células del ala de *D. melanogaster*: es decir, tricomas múltiples en el ala (*mwh* = multiple wing hair) y tricoma en forma de flama (*flr*<sup>3</sup> = flare). Al perder la heterocigosidad, los marcadores recesivos permiten la formación de grupos mutantes de células que se expresan como clones el ala. Las manchas simples (grandes o pequeñas) se pueden producir por mutación puntual, delección o recombinación mitótica; las manchas gemelas se originan exclusivamente por recombinación mitótica (Graf *et al.*, 1984).

## IX. RESULTADOS

Algunos de los resultados de esta investigación están contenidos en el siguiente artículo.

### 9.1. Artículo I

**Jiménez, E.**, Pimentel, E., Cruces, M. P., y Amaya-Chavez, A. (2019). Relationship between viability and genotoxic effect of gamma rays delivered at different dose rates in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 82(13), 741-751. article: **doi:** 10.1080/15287394.2019.1646681.



Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A  
Current Issues



ISSN: 1528-7394 (Print) 1087-2620 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/uteh20>

## Relationship between viability and genotoxic effect of gamma rays delivered at different dose rates in somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Elizabeth Jiménez, Emilio Pimentel, Martha P. Cruces & Araceli Amaya-Chavez

To cite this article: Elizabeth Jiménez, Emilio Pimentel, Martha P. Cruces & Araceli Amaya-Chavez (2019): Relationship between viability and genotoxic effect of gamma rays delivered at different dose rates in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, DOI: [10.1080/15287394.2019.1646681](https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1646681)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1646681>



Published online: 28 Jul 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## Relationship between viability and genotoxic effect of gamma rays delivered at different dose rates in somatic cells of *Drosophila melanogaster*

Elizabeth Jiménez<sup>a</sup>, Emilio Pimentel<sup>b</sup>, Martha P. Cruces<sup>a</sup>, and Araceli Amaya-Chavez<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, México; <sup>b</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Toluca, México

### ABSTRACT

The role of dose rate (DR) on biological effects of ionizing radiation is an area of significant research focus and relevant to environmental exposures. The present investigation was aimed to examine the direct relationship between viability and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*, induced by gamma rays in a range of doses from 2 to 35 Gy administered at three different DR. Results indicated that larval-adult viability was reduced in relation to dose but not DR. No marked differences were found in the LD<sub>50</sub> produced by differing DR tested. Frequencies of somatic mutation and recombination increased in direct correlation with dose and DR. Data demonstrate the importance of determination of the relationship between viability and genotoxicity induced by DR in *in vivo* systems for toxicological and radioprotection studies.

### KEYWORDS

Somatic mutation;  
*D. melanogaster*; Radiation  
dose rate; larvae-viability;  
Gamma rays

### Introduction

The growing use of nuclear power increases occupational exposures and risk of industrial accidents. It is well known that ionizing radiation produces lesions in DNA, diminished reproductive capacity, reduced somatic growth, inhibition of bone marrow stromal cells and genotoxic effects correlated with an increasing dose rate (DR) (Lecomte-Pradines et al. 2017; Zhang et al. 2010; Zuo et al. 2012). Based upon these observations there is a growing interest examining the role of different factors such as DR in the biological consequences attributed to ionizing radiation, particularly when delivery of a low-DR occurs, a situation which is environmentally relevant (Brenner et al. 2003). As with other organisms such as *Caenorhabditis elegans* or mouse (Lecomte-Pradines et al. 2017; Zhang et al. 2010), radiation may exert either acute or lethal and sublethal effects on *Drosophila* induced by high or low doses of radiation, respectively (Hall and Giaccia 2012).

Ionizing radiation might induce direct breakage on the chemical bonds of biological macromolecules when it is absorbed by cells (Kam and Banati 2013). Ionizing radiation might also affect proteins, nucleic acids, and complex lipids as a result of the generation

of reactive oxygen species (ROS) via radiolysis of water or alterations in mitochondrial functions (Kam and Banati 2013). Numerous studies showed that the amount of genetic damage produced by radiation, increases in direct relation to DR (Bedford and Mitchell 1973; Brooks, Hoel, and Preston 2016; Hall and Giaccia 2012; Tanarro and Tanarro 2008). This expected effect of DR was observed in different systems and assays. In rat fibroblasts irradiated at 0.0, 3.9, 7.4 and 11.3 Gy for 4 or 67 hr, the number of chromosomal aberrations rose in relation to dose and DR (Brooks et al. 1995). When DNA damage was measured after exposing human fibroblasts at different doses (0–5 Gy) at 0.3 or 1.8 Gy/min from a <sup>137</sup>Cs source, Ishizaki et al. (2004) found that high DR enhanced the formation of phosphorylated histone complex (γH2AX). Further, at sites of double strand breaks, this effect increased in relation to dose; however, no marked response was noted with low DR (Ishizaki et al. 2004). In another study, mice of strain C57BL6/FYDR/FYDR were exposed to a cumulative dose 400-fold greater than background level (approximately 10.5 cGy) at a low DR of 0.00017 cGy/min, no marked alteration in DNA damage was detected, but at a DR of 7.1 cGy/min the number of oxidized bases,

**CONTACT** Emilio Pimentel  emilio.pimentel@inin.gob.mx  Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México, Toluca S/N, Ocoyoacac 52750, México

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at [www.tandfonline.com/uteh](http://www.tandfonline.com/uteh).

© 2019 Taylor & Francis

micronucleus (MN) formation, homologous recombination, and gene expression increased (Olipitz et al. 2012). Brooks, Hoel, and Preston (2016) also reported that control of the cell cycle becomes dysfunctional when cells are exposed to high doses and DR that induce alterations in cell replacement which constitutes an important mechanism that has been linked to the incidence of cancer development.

Although it is well known that the biological consequences increase at higher radiation doses the influence of low dose and low-DR radiation exposures on health is not well understood. The definition of low dose is controversial Mosse, 2012, because there is no universal agreement to this categorization. It is now well-known that extrapolating data generated from cell lines cultured as monolayers to health risks in humans may be unrealistic. At present extrapolation of the effects of high-dose exposures based upon the linear no-threshold (LNT) model are employed to determine low dose and low-DR radiation exposures (Brenner et al. 2003). The linear non-threshold (LNT) model has been widely accepted as a basis for the estimation of radiation risks to humans (Koana et al. 2007). However, Mitchell, Bedford, and Bailey (1979) found that reducing the DR from 1.54 to 0.37 Gy/hr in HeLa cells resulted in more cell death for a given absorbed dose. In contrast, several investigators noted that low doses and DR induce beneficial biological effects. de Toledo et al. (2006) exposed acute or chronically fibroblasts at doses between 1 and 10 cGy at 6 cGy/min or 3.3 Gy/min and reported that the frequency of MN increased in direct relation to dose at higher DR, whereas the highest dose at the lowest DR reduced MN frequency to a level similar or lower than baseline, yet lymphocyte viability was the same when exposed at both DR. With myeloid cells (ML-1), Amundson et al. (2003) demonstrated that radiation doses at a range of 0.28–290 cGy/min, there were changes in the genome correlated with DR. It is of interest that inhibition of apoptotic induction detected with the lowest radiation dose was accompanied by enhancement in expression of genes regulated by P53, involved in the control of the cell cycle and apoptosis (Amundson et al. 2003).

The genome-wide expression techniques of mouse and human cells enabled measurement of gene expression patterns after exposure to a net dose of radiation at low or high DR. It is well-known shown

that the gene expression pattern are markedly altered *in vitro* or *in vivo* (Abend et al. 2016) There are genes that response to a high DR exposures, (Amundson et al. 2003) while others are altered by a low DR (Bong et al. 2013). The induced genes that have been detected are involved in apoptosis pathways, protein synthesis, heat shock, immune response, DNA repair, cell cycle control and oxidative stress response (Paul et al. 2015; Ghandhi et al. 2015). These genes conduced to beneficial effects (Tang, Loke, and Khoo 2016) such as reduction of tumorigenesis (Sakai, Nomura, and Ina 2006), increasing longevity and improving immune responses (Ina and Sakai 2004).

Experiments in *in vivo* systems are fundamental in estimating the risk of exposure to artificial sources of ionizing radiation due to the increase use of sources for medical and industrial purposes. As human studies are not feasible there has been a shift to biological systems such as invertebrates or animal models to extrapolate observations in these models to correlate to humans with respect the role of radiation dose and DR (Morgan and Bair 2013). *Drosophila melanogaster*, the fruit fly, is an excellent *in vivo* model, essential to provide a mechanistic basis for understanding the radiation biological effects in areas of significant research focus such as dose (Gy) and DR (Gy/hr) (Zhikrevetskaya et al. 2015)

The dose–response relationship between ionizing radiation and induced mutation frequency was reported using a sex-linked recessive lethal assay in mature sperm of *D. melanogaster* and confirmed by successive studies using bacteria, yeast, mammalian cells cultures and mice (Koana et al. 2007). The use of *D. melanogaster* in scientific investigations has several advantages: this species is inexpensive, provides information on processes such as mutagenesis, somatic recombination and lethal gene induction (Würgler, Sobels, and Vogel 1977; Vogel et al. 1999; Pandey and Nichols 2011; Alaraby et al. 2016). Previously *Drosophila* was employed to study radiation-induced oxidative stress and the role of radioprotective agents (Cruces, Pimentel, and Zimmering 2003; Pimentel, Cruces, and Zimmering 2000; Zimmering et al. 1990). It is now known that 75% of the genes that produce diseases in humans have homologs in the fruit fly (Adams et al. 2000). These genes are associated with the development of human diseases such as cancer (Pandey and Nichols

2011; Vogel et al. 1999; Würzler, Sobels, and Vogel 1977). To contribute with testable and predictive models of human health effects following exposure to ionizing radiation, the purpose of this study was to (1) examine the direct relationship between viability and genotoxicity induced by three different DR of gamma rays *in vivo* and (2) provide potential reference information for genotoxic and radioprotection investigations.

## Materials and methods

### Biological material

Strains from *Drosophila melanogaster* with genotype *mwh* +/*mwh* + and *flr*<sup>3</sup>/*In* (3LR) TM3, *Ser* were used. Both strains possess genetic markers that modify wing trichomes. The *mwh* marker (multiple wing hair) is located on the left arm of chromosome 3 in position 3–0.3. The *flr*<sup>3</sup>/TM3 marker, *Ser* is situated on the left arm of chromosome 3 in position 3–39. The TM3 balancer is necessary since the *flr*<sup>3</sup> allele is lethal in a homozygous condition.

### Larvae collection

For this purpose, virgin females *mwh* +/+ *mwh* were crossed with males *flr*<sup>3</sup>/*In* (3LR), TM3, *Ser*, from 4 to 5 days old. It was necessary to homogenize larvae at a specific age (48-hr-old), the parents were crossed for 2 hr, immediately after placed to oviposit in 250 ml flasks with regular culture medium consisting of agar, corn flour, sucrose, dextrose, yeast and propionic acid and nipagine as antibiotics, in groups of 100 couples per bottle. Eggs laid were restricted to a two hr period to obtain more homogeneous samples and then allowed to develop in a culture room at 25 ± 1°C and 60% relative humidity for 3 days to obtain 48-hr-old larvae. Larvae possess groups of undifferentiated dividing cells which transform during metamorphosis into the adult fly structures: legs, antennae, and wings (Klebes et al. 2002). These larvae were collected by density difference with a 20% sucrose solution (Graf et al. 1984).

### Radiation treatment

The collected larvae were divided into 9 groups where 7 were irradiated with sublethal doses: 5, 10,

15, 20, 25, 30 or 35 Gy of gamma rays, one without radiation as negative control and the last one with 1 mM CrO<sub>3</sub> as a positive control. Larvae were irradiated in glass tubes (2.5 cm diameter and 3 cm height) containing a wet filter paper. The doses were delivered using three different DR: 5.1, 32.9 and 860.9 Gy/hr. Three independent experiments were performed with three replicates each and for each DR in a span of 6 months and each experiment for each DR was conducted simultaneously. After irradiation, between 900 and 1500 larvae were tested per dose and DR, and were placed in groups of 100 per homeopathic vial with 0.8 g of synthetic medium (Formula 4–24 *Drosophila* Medium\* Carolina Biological Supply, Co. USA) hydrated with 2.5 ml distilled water. Larvae were irradiated with a Co<sup>60</sup> source: 5.1 Gy/hr in a Vick-Rad 2000 (Vickers Radiation Company, Swindon, England); 32.9 Gy/hr in a Gammacell (MDS Nordion, Canada) and 860.9 Gy/hr in a Transelektro LGI-01 irradiator.

### Larval-adult viability test

The treated larvae terminated development in a culture room under optimal conditions of temperature and humidity. The number of emerged adults, females and males from each of the treatments was counted daily, separately. The larval-adult viability was calculated and plotted from the number of emerged individuals to determine the LD<sub>50</sub> and dose–response relationship for each DR tested.

### Genotoxicity test

The SMART test (somatic mutation and recombination test) was used in the wing of *D. melanogaster* (Graf et al. 1984). Briefly, the SMART employed with *D. melanogaster* is an efficient and versatile short-term eukaryotic *in vivo* assay which detects several types of mutation as well as somatic recombination in cells of the imaginal disc of the larvae. This test is mainly based upon induction of loss of heterozygosity of two recessive markers that code for the shape of the trichome in *D. melanogaster* wing cells: i.e. multiple wing hair (*mwh*) and flare (*flr*<sup>3</sup>). These enable the formation of mutant cell groups (clones) which are expressed as mutant cell spots on the wing

(Graf et al. 1984). The wing somatic mutation assay was employed in numerous studies to assess genotoxicity of various agents (physical, chemical), extracts and complex mixtures (de Andrade, Reguly, and Lehmann 2004). After treatment, the viable individuals were fixed in alcohol at 70% to make permanent slides with the wings of the *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* genotype organisms. Subsequently, the number of spots – genetic damage – induced was analyzed at 400X using a compound microscope from 40 wings (20 females and 20 males) from each experiment.

### Statistical analysis

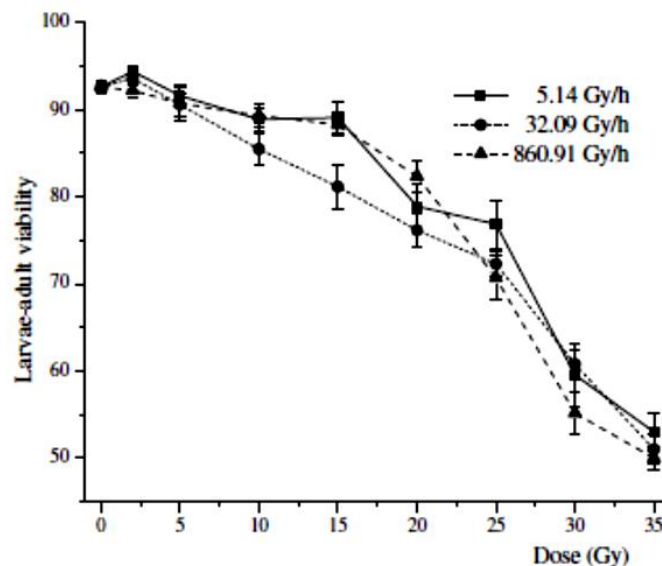
To establish differences between treatments, the larval-adult viability results were analyzed with a Student's *t*-test at 0.05 probability level. The toxicity was obtained dividing the total of viable adults by the number of larvae tested. The LD<sub>50</sub> was calculated for different DR using the PROBIT method (Log probit analysis by maximum likelihood at CI 95%). The linear regression fitted was undertaken by least squares in order to obtain the dose relationship for each DR tested. Data of mutations and recombination were analyzed using the SMART computer program which is based upon the multiple-decision procedure of Frei and Würigler (1988), which enables

to obtain four different diagnoses: negative (-), weakly positive (w), positive (+) and inconclusive (i). The procedure was based upon two hypotheses: (1) there is no difference in the mutation frequency between control and treatment series; (2) radiation treatment results have an increasing mutation frequency *n* times the induced in negative controls. Because small single spots and total spots have a comparatively high spontaneous frequency, *m* is fixed at a value of 2 (testing for a doubling of the spontaneous frequency to define a negative results). For the large single spots and the twin spots, which have a lower spontaneous frequency, *m* = 5 is used. Both hypotheses are tested at 5% significance level. To test against the hypotheses, the conditional binomial test according to Kastenbaum and Bowman or Chi-Square test for proportions may be applied (Frei and Würigler 1988).

## Results

### Larval-adult viability

Figure 1 illustrates the larval-adult viability plotted from the mean number of emerged individuals from three independent experiments. The curves indicated that larval-adult viability of irradiated individuals decreased indirect relationship with net dose but not with DR. The LD<sub>50</sub> calculated from the dose-



**Figure 1.** Larval-adult viability of *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* individuals of *Drosophila*, after being irradiated with different doses and DR of gamma rays. Data represent the results from three independent experiments performed with three replicates each one for each DR.

response relationship curves for each DR tested were:  $41.83 \pm 1.4$ ,  $38.92 \pm 1.5$ ,  $40.51 \pm 2.6$  Gy with 5.1, 32.9 y 860.9 Gy/hr, respectively, with no significant differences between them. Although 10 and 15 Gy to the intermediate DR (32.9 Gy/hr) resulted in a significant fall in viability of the larvae, the dose of LD<sub>50</sub> did not change markedly.

**Genotoxicity**

Wing cells blades were analyzed to identify small single spots (one to two cells) of either *mwh* or *flr*, large single spots (>2 cells) of either *mwh* or *flr*, and *mwh-flr* twin spots. Briefly (a) single *mwh* spots are inferred to arise from a separation between *mwh* and *flr* as from an interchange or from mutation/deletion at the *mwh+* locus; (b) single *flr* spots from mutation/deletion at the *flr+* locus or double exchange; and (c) twin spots following interchange between *flr* and the centromere. Since *flr* may behave as a cell

semi-lethal in some tissues, the possibility cannot be excluded that some fraction of large *mwh* spots originated as twin spots, which then lost *flr*-bearing cells.

Table 1 provides results from three independent experiments for the frequency of somatic mutations and recombination induced in *D. melanogaster* after exposure to different doses and DR of gamma radiation. A significant rise in the three categories of spots: small, large and twin over the all tested dose range (+) and for each DR was detected. It is important to note that with 2 and 5 Gy, the frequencies of total-induced spots was similar for the DR of 5.1 and 32.9 Gy/hr and was increased significantly with respect to control with 5 Gy at the three DR tested.

The size of the induced clone showed a relationship between dose and DR. The slopes calculated by the regression analysis for twin spots frequency (Table 1) induced by each RD tested, were: 5.1 and 860.9 Gy/hr = 0.002

**Table 1.** Somatic mutation frequency induced in the *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* flies of *D. melanogaster* after treatment in larvae stage of 48 h age with different net doses of gamma rays at three DR.

DR Gy/h	Net		Spots								Frequency of clone formation x 10 <sup>-5</sup> cells	
	dose Gy	No. of wings	Small (1-2 cells), m = 2		Large (>2 cells), m = 5		Twin m = 5		Total m = 2		observed	corrected
			n	s/w	n	s/w	n	s/w	n	s/w		
1mMCR <sub>02</sub>		120	95	0.79	273	2.28	182	1.52	550	4.58	12.9	4.8
Control	0	120	27	0.22	6	0.05	3	0.03	36	0.30	1.6	1.7
5.1	2	120	44	0.37 -	17	0.14 i	2	0.02 i	63	0.52 -	2.3	2.1
	5	120	58	0.48 +	50	0.42 +	6	0.05 i	114	0.95 +	8.9	9.6
	10	120	56	0.47 +	94	0.78 +	5	0.04 i	155	1.29 +	17.6	20.0
	15	120	63	0.52 +	96	0.80 +	4	0.03 i	163	1.36 +	26.5	32.8
	20	120	83	0.69 +	91	0.76 +	11	0.09 +	185	1.54 +	20.5	22.5
	25	120	63	0.52 +	174	1.45 +	15	0.12 +	252	2.10 +	33.1	36.4
	30	120	105	0.88 +	141	1.20 +	11	0.09 +	257	2.14 +	37.7	47.3
32.9	35	120	72	0.60 +	230	1.92 +	7	0.06 i	309	2.58 +	82.7	96.4
	2	120	43	0.36 -	12	0.10 -	5	0.04 i	60	0.50 -	2.4	2.1
	5	120	56	0.47 +	92	0.77 +	6	0.05 i	154	1.28 +	21.5	26.3
	10	120	73	0.61 +	121	1.01 +	12	0.10 +	206	1.72 +	26.0	29.5
	15	120	83	0.69 +	174	1.45 +	10	0.08 +	267	2.23 +	49.0	55.8
	20	120	128	1.07 +	168	1.40 +	13	0.12 +	314	2.62 +	36.1	38.6
	25	120	56	0.47 +	294	2.45 +	20	0.17 +	370	3.08 +	77.1	84.0
860.9	30	120	130	1.08 +	256	2.13 +	15	0.12 +	401	3.34 +	107.2	115.9
	35	120	123	1.02 +	355	2.96 +	16	0.13 +	494	4.12 +	108.4	126.0
	2	120	60	0.50 i	44	0.37 +	4	0.03 i	108	0.90 +	3.2	3.7
	5	120	105	0.87 +	119	0.99 +	22	0.18 +	246	2.05 +	26.9	28.5
	10	120	85	0.71 +	161	1.34 +	12	0.10 +	258	2.15 +	38.9	43.6
	15	120	75	0.62 +	236	1.97 +	26	0.22 +	337	2.81 +	83.7	96.3
	20	120	66	0.55 +	341	2.84 +	11	0.09 +	418	3.48 +	112.8	126.5
	25	80	66	0.83 +	218	2.73 +	11	0.11 +	295	3.68 +	146.0	168.2
	30	80	53	0.66 +	258	3.23 +	11	0.11 +	322	4.02 +	151.3	168.6
	35	120	76	0.63 +	519	4.32 +	23	0.19 +	618	5.15 +	242.3	266.6

Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988): +: positive; -: negative; w: weak positive; i: inconclusive, respect to control; m: multiplication factor. Probability levels: alpha = beta = 0.05. One-side statistical test. DR: Doses rate; s/w: spot per wing. Data represent the results from three independent experiments performed with three replicates each one for each DR.

**Table 2.** Somatic mutation frequency induced in the *mwh/TM3, Ser* flies of *D. melanogaster* after treatment in larvae stage of 48 h age with different net doses of gamma rays at three DR.

DR Gy/h	Net Gy	No. of wings	Spots						M %	R %	
			Small (1–2 cells), m = 2		Large (>2 cells), m = 5		Total m = 2				Mutation frequency
			n	s/w	n	s/w	n	s/w	Corrected <sup>a</sup>		
<b>1mMCrO<sub>2</sub></b>		120	68	0.56	8	0.06	76	0.63	0.72	15.7	82.3
<b>Control</b>	0	120	35	0.29	2	0.02	37	0.31	0.35	96.7	3.3
5.1	5	120	26	0.22-	7	0.06i	33	0.27-	0.31	32.6	67.4
	15	120	36	0.30-	7	0.06i	43	0.36-	0.41	30.1	69.8
	25	120	56	0.46+	15	0.12+	71	0.59+	0.59	28.1	71.9
	35	120	42	0.35-	20	0.17+	62	0.52+	0.58	22.5	77.5
<b>32.9</b>	<b>5</b>	<b>120</b>	<b>25</b>	<b>0.21-</b>	<b>7</b>	<b>0.06i</b>	<b>32</b>	<b>0.27-</b>	<b>0.30</b>	<b>23.4</b>	<b>76.6</b>
	<b>15</b>	<b>120</b>	<b>38</b>	<b>0.32-</b>	<b>18</b>	<b>0.15+</b>	<b>56</b>	<b>0.47+</b>	<b>0.53</b>	<b>23.8</b>	<b>76.2</b>
	<b>25</b>	<b>120</b>	<b>39</b>	<b>0.33-</b>	<b>17</b>	<b>0.14+</b>	<b>56</b>	<b>0.47+</b>	<b>0.51</b>	<b>16.6</b>	<b>83.4</b>
	<b>35</b>	<b>120</b>	<b>32</b>	<b>0.32-</b>	<b>14</b>	<b>0.12+</b>	<b>53</b>	<b>0.44i</b>	<b>0.50</b>	<b>12.1</b>	<b>87.9</b>
861.9	5	120	37	0.32-	4	0.03i	41	0.34-	0.39	19.0	81.0
	15	120	48	0.40i	10	0.08+	58	0.48+	0.63	22.4	77.6
	25	120	55	0.46+	28	0.23+	83	0.69+	0.85	23.1	76.9
	35	160	53	0.44+	29	0.24+	82	0.68+	0.76	14.8	85.2

Statistical diagnoses according to Frøi and Würzler (1988): +: positive; -: negative; w: weak positive; i: inconclusive, respect to control; m: multiplication factor. Probability levels: alpha = beta = 0.05. One-side statistical test. DR: Doses rate; s/w: spot per wing; M: mutation and R: recombination. Data represent the results from three independent experiments performed with three replicates each one for each DR.

and 32.9 Gy/hr = 0.004 and correlation coefficients ( $r^2$ ) 5.1 Gy/hr = 0.49, and 860.9 Gy/hr = 0.06 which were low with the exception of intermediate DR (32.9 Gy/hr = 0.79). However, to obtain recombination frequency that includes exchanges occurred between *mwh* and *f1r* markers, producing two daughter cells with *mwh* phenotype, the spot frequencies induced in the *mwh/TM3, Ser* wings irradiated with 5, 15, 25 or 35 Gy were counted (Table 2), and subtracted from the total frequency of mutation and recombination induced in the *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* wings. The frequencies were corrected taking into account the 14% decrease in the area of the *mwh/TM3, Ser* wing (Table 3) provoked by serratia character (Table 2 and Figure 3), the total area of the wings was measured (Vidal et al. 2017) using the Image

program J 1.46 (Collins 2007). The recombination data were plotted (Figure 4). The linear regression results demonstrated slope significant to 5.1 DR ( $F < 0.02$ ); for 32.9 Gy/hr ( $F = 0.058$ ) and regression coefficient ( $r^2$ ) for 5.1 and 32.9 Gy/hr showed good linear correlation but not for 860.9 Gy/hr ( $-0.25$ ) (Figure 4).

## Discussion

Health risks associated with exposure to low-DR were estimated by extrapolating empirical linear fits for data on humans exposed to relatively high doses (BEIR, National Research Council 2006; Kim et al. 2015); however, the biological effects of radiation depend upon several factors such as DR. Although radiation effects were examined extensively, the biological consequences of low-DR exposure are controversial (Kim et al. 2015). In this study, *D. melanogaster* was employed as a multicellular model organism to investigate the correlation between viability and genetic damage induced directly in the same individuals treated with different DR gamma rays. Recently González et al. (2018) showed that ascorbic acid (Aa) reduced the genetic damage induced by 20 Gy of gamma rays and effectiveness was dependent upon the DR with which the 20 Gy were administered. Only the lowest dose of Aa decreased the frequency of somatic mutations with the high-DR tested

**Table 3.** Wing area of *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* and *mwh/TM3, Ser* individuals treated with 15 Gy of gamma rays.

Genotype	n	♀		♂	
		Wing size (mm <sup>2</sup> ) ± SEM	n	Wing size (mm <sup>2</sup> ) ± SEM	n
<i>mwh +/+ flr<sup>3</sup></i>	40	3.76 ± 0.04	40	2.92 ± 0.02	
<i>mwh/TM3, Ser</i>	40	3.16 ± 0.03	40	2.59 ± 0.03	
Reduction in area in <i>mwh/TM3, Ser</i>		0.61		0.33	

n: represents 20 wings from flies treated with 15 at 5.14 Gy/h plus 20 wings from individuals treated with 15 Gy at 860.91 Gy/h, from three independent experiments.



(González et al. 2018). Vidal et al. (2018) also demonstrated that 0.5 or 1 Gy of gamma rays at 5.4 or 36 Gy/hr induced radio- and chemo-protection against damage induced by 20 Gy or 1 mM of chromium trioxide. Both studies support the theory of the direct effects of DR on *D. melanogaster*.

The fact that the larval-adult viability decreased in direct correlation with dose but not with DR (Figure 1) contrasts with the postulation of a direct effect of DR, which indicated that if radiation dose is administered at a high-DR the biological effect is expected to be higher, and if it is exposure to low-DR the biological effect is expected to be lower (Brooks, Hoel, and Preston 2016; Tanarro and

Tanarro 2008). This result puts this study in another perspective if one considers that cell toxicity mediated by radiation doses are an important criterion for cancer treatments with radiotherapy; however genetic damage, induced directly in the same exposed individuals, demonstrated that the induction was associated with the dose and DR. Our findings are in agreement with the phenomenon termed “expected effect of the dose rate” (Bedford and Mitchell 1973; Hall and Giaccia 2012) and this was revealed by slope ( $m$ ) and the regression coefficient  $r^2$  calculated by linear regression from plotting total frequency of spots induced by the three different DRs (Figure 2). It is feasible

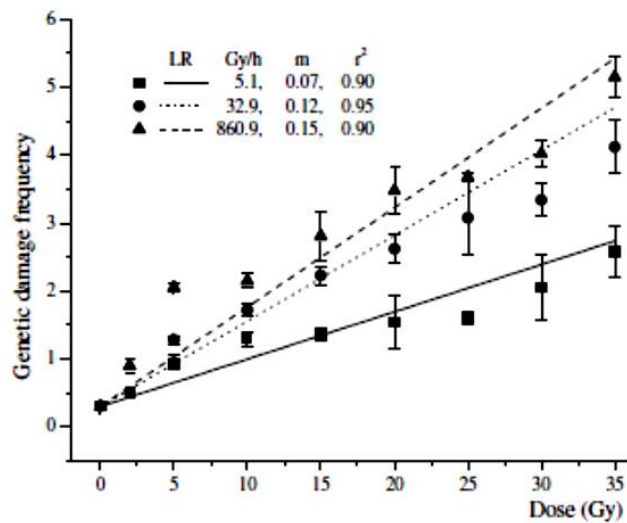
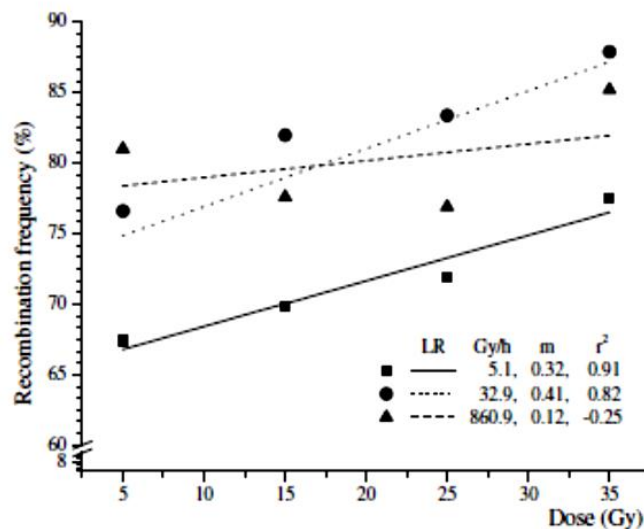


Figure 2. Frequency of genetic damage of individuals *mwh*  $+/+$  *flr*<sup>3</sup> of *Drosophila*, after being irradiated with different doses and DR of gamma rays. The slope ( $m$ ) and regression coefficient ( $r^2$ ) are results of the linear regression fitted by least-square (regression equation). Data represent the results from three independent experiments performed with three replicates each one for each DR.



Figure 3. Shows the wings form and size: (a) *mwh*/*flr*<sup>3</sup> and (b) *mwh*/*TM3*, *Ser*, where the line shows size 14% less average area between females and males than the *mwh*/*flr*<sup>3</sup> wings.



**Figure 4.** Dose relationship of the recombination induced by the different DR in a dose range from 5 to 35 Gy. The slope ( $m$ ) and regression coefficient ( $r^2$ ) are results of the linear regression (LR) fitted by least-square (regression equation). Data represent the results from three independent experiments performed with three replicates each one for each DR.

that the results of genetic damage induced by low-DR in this study may be due to repair mechanisms which reverse the damage produced by radiation. This was previously seen using *Drosophila* strains with defects in repair mechanisms such as *mei* or *mus*, where these strains even at low doses at low-DR generated a higher level of genetic damage, compared to that in wild type strains (Iushkova, Zaïnullin, and Startseva 2011). Kim et al. (2015) found that the sex-linked recessive lethal mutation frequency in *D. melanogaster* with a low dose at low-DR exposure was significantly lower in immature spermatocytes and spermatogonia compared to sham-irradiated group, whereas irradiation with a higher dose resulted in a significant elevation in mutation frequency. If low-DR produced induction of repair enzymes activities as reported by Ishizaki et al. (2004), it is conceivable that a dose administered to low-DR may exert cell toxicity equivalent to a high dose. However, less genetic damage induction was found.

Somatic recombination has important implications in the estimation of the risk of developing cancer (Ramel et al. 1996). In the SMART test, if recombination takes place in the region of the chromosome between *mwh* and *flr* markers, two daughter cells arise: one expressing *mwh* phenotype and the other expressing the wild type phenotype are formed, these *mwh* spots are indistinguishable from those

originating from point mutation or deletions. The method to estimate the proportion of induced *mwh* singles ascribable to mutation vs. recombination, is to compare the frequency of *mwh* singles in the *mwh* *+/+ flr* with *mwh* *+/+ TM3, Ser* individuals. The latter is taken as a measure of mutations, because, the products of mitotic recombination between the *TM3* chromosome bearing multiple inversions and its structurally normal homolog are not viable (Zimmering et al. 1997). For this reason and in order to exclude the % of *mwh* spots resulting from mutation events, the wings of the *mwh/TM3, Ser* individuals were analyzed. Results from linear regression analysis (Figure 3), showed that the rate of somatic recombination-induction was significant dose-dependent increases with 5.1 and 32.9 Gy/hr. However somatic recombination-induction by 860.9 Gy/hr was not. Some investigators using doses at low DR found -reverse effects (Marin et al. 1991; Russell and Kelly 1981); however, results obtained in this investigation were contradictory.

## Conclusions

Data obtained in this study demonstrated directly the relationship between viability and genotoxicity induced by three dose rates (DR) of gamma rays *in vivo* and indicated that larval-adult viability was reduced in relation to dose but not DR; however,

somatic mutation frequencies and recombination increased in direct association with both dose and DR. The applied radiation, within the tested DR, confirmed a direct effect of DR of gamma rays.

### Acknowledgments

The work was supported by a grant No. 167461 to Cruces M. P. from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico, and it involved some research by Jiménez E. to obtain the Ph.D. in Chemical Sciences at the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) supported by CONACyT scholarship No. 334422. The authors wish to acknowledge the splendid technical assistance provided by Hugo Suárez Contreras, Luz Ma. Vidal Escobar and Elena González Herrera.

### Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [167461].

### References

- Abend, M., C. Badie, R. Quintens, R. Kriehuber, G. Manning, E. Macaeva, M. Macaevac, D. Njmad, S. Oskampe, S. Strunz, et al. 2016. Examining radiation-induced *in vivo* and *in vitro* gene expression changes of the peripheral blood in different laboratories for biodosimetry purposes: First RENEb gene expression study. *Radiat. Res.* 185:109–23. doi:10.1667/RR14221.1.
- Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–95. doi:10.1126/science.287.5461.2185.
- Alaraby, M., B. Annangi, R. Marcos, and A. Hernández. 2016. *Drosophila melanogaster* as a suitable *in vivo* model to determine potential side effects of nanomaterials: A review. *J. Toxicol. Environ. Health B.* 19:65–104. doi:10.1080/10937404.2016.1166466.
- Amundson, S. A., R. A. Lee, C. A. Koch-Paiz, M. L. Bittner, P. Meltzer, J. M. Trent, and A. J. Fornace. 2003. Differential responses of stress genes to low dose-rate  $\gamma$  irradiation I DOE Grant ER62683. *Mol. Cancer. Res.* 1:445–52.
- Bedford, J. S., and J. B. Mitchell. 1973. Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiat. Res.* 54:316–27. doi:10.2307/3573709.
- BEIR, National Research Council. 2006. *Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation: BEIR VII Phase 2*. Washington, DC: The National Academies Press. doi:10.17226/11340.
- Bong, J. J., Y. M. Kang, S. C. Shin, S. J. Choi, K. M. Lee, and H. S. Kim. 2013. Differential expression of thymic DNA repair genes in low-dose-rate irradiated AKR/J mice. *J. Vet. Sci.* 14:271–79. doi:10.4142/jvs.2013.14.3.271.
- Brenner, D. J., R. Doll, D. T. Goodhead, E. J. Hall, C. E. Land, J. B. Little, J. H. Lubin, D. L. Preston, R. J. Preston, J. S. Puskin, et al. 2003. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:13761–66. doi:10.1073/pnas.2235592100.
- Brooks, A., D. Hoel, and J. Preston. 2016. The role of dose rate in radiation cancer risk: Evaluating the effect of dose rate at the molecular, cellular and tissue levels using key events in critical pathways following exposure to low LET radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 92:405–26. doi:10.1080/09553002.2016.1186301.
- Brooks, A. L., R. Miick, R. L. Buschbom, M. K. Murphy, and M. A. Khan. 1995. The role of dose rate in the induction of micronuclei in deep-lung fibroblasts *in vivo* after exposure to cobalt-60 gamma rays. *Radiat. Res.* 144:114–18.
- Collins, J. T. 2007. Image J for microscopy. *Biotechniques* 43:525–30. doi:10.2144/000112594.
- Cruces, M. P., E. Pimentel, and S. Zimmering. 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* 536:139–44. doi:10.1016/s1383-5718(03)00043-3.
- de Andrade, H. H. R., M. L. Reguly, and M. Lehmann. 2004. Wing Somatic Mutation and Recombination test: Henderson D.S. (eds) *Drosophila Cytogenetics Protocols*. Vol 247 of Methods in Molecular Biology. Totowa: Humana Press.
- de Toledo, S. M., N. Asaad, P. Venkatachalam, L. Li, R. W. Howell, D. R. Spitz, and E. I. Azzam. 2006. Adaptive responses to low-dose/low-dose-rate gamma rays in normal human fibroblasts: The role of growth architecture and oxidative metabolism. *Radiat. Res.* 166:849–57. doi:10.1667/RR0640.1.
- Frei, H., and F. E. Würzler. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res./ Environ. Mutagen. Related Subject.* 203:297–308. doi:10.1016/0165-1161(88)90019-2.
- Ghandji, S. A., L. B. Smilenov, C. D. Elliston, M. Chowdhury, and S. A. Amundson. 2015. Radiation dose-rate effects on gene expression for human biodosimetry. *BMC Med Genom.* 8:22–32. doi:10.1186/s12920-015-0097-x.
- González, E., M. P. Cruces, E. Pimentel, and P. Sánchez. 2018. Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 62:210–14. doi:10.1016/j.etap.2018.07.015.
- Graf, U., F. E. Würzler, A. J. Katz, H. Frei, F. Juon, C. B. Hall, and P. G. Kale. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6:153–88. doi:10.1002/em.2860060206.

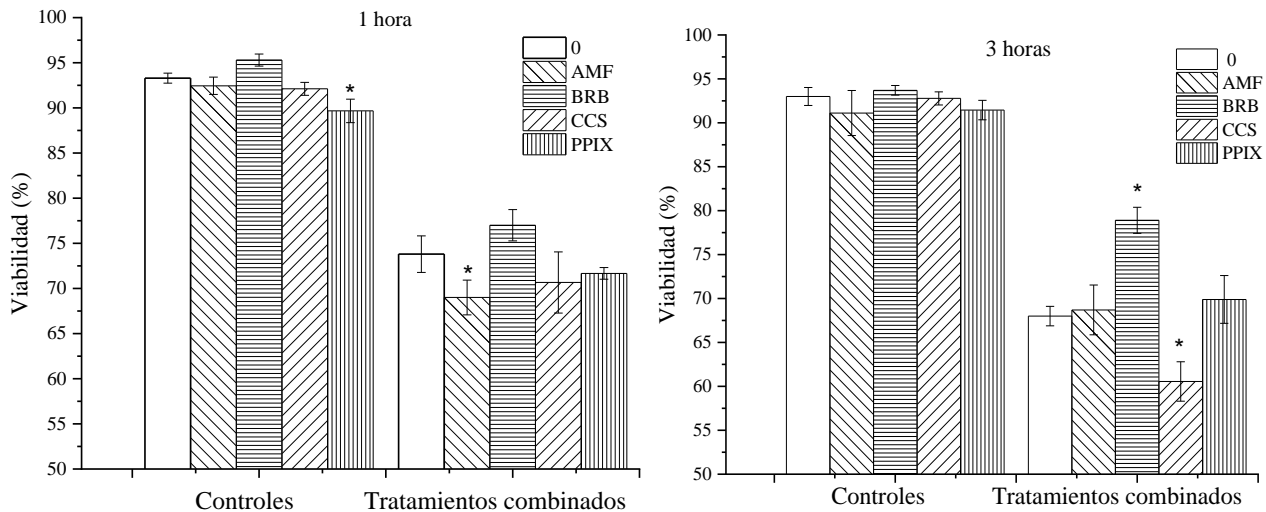
- Hall, E. J., and A. J. Giaccia. 2012. *Fractionated radiation and the dose-rate effect. Radiobiology for the Radiologist*, 67–85. 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Ina, Y., and K. Sakai. 2004. Prolongation of life span associated with immunological modification by chronic low-dose-rate irradiation in MRL-lpr/lpr mice. *Radiat Res* 161:168–73. doi:10.1667/RR3120.
- Ishizaki, K., Y. Hayashi, H. Nakamura, Y. Yasui, K. Komatsu, and A. Tachibana. 2004. No indication of p53 phosphorylation and few focus formation of phosphorylated H2AX suggest efficient repair of DNA damage during chronic low-dose-rate irradiation in human cells. *J. Radiat. Res.* 45:521–25. doi:10.1269/jrr.45.521.
- Ishkova, E. A., V. G. Zaĭnullin, and O. A. Startseva. 2011. Evaluation of effects of gamma-irradiation at low doses on repair and meiotic recombination mutants of *Drosophila melanogaster*. *Radiat. Biol. Radioecol* 51:698–704.
- Kam, W. W. Y., and R. B. Banati. 2013. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 65:607–19. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.024.
- Kim, C. S., K. M. Seong, B. S. Lee, I. K. Lee, K. H. Yang, J. Y. Kim, and S. Y. Nam. 2015. Chronic low-dose  $\gamma$ -irradiation of *Drosophila melanogaster* larvae induces gene expression changes and enhances locomotive behavior. *J. Radiat. Res.* 56:475–84. doi:10.1093/jrr/rru128.
- Klebes, A., B. Biehs, F. Cifuentes, and T. B. Komberg. 2002. Expression profiling of *Drosophila* imaginal discs. *Genome Biol* 3:research0038–1. doi:10.1186/gb-2002-3-8-research0038.
- Koana, T., M. O. Okada, K. Ogura, H. Tsujimura, and K. Sakai. 2007. Reduction of background mutations by low-dose X irradiation of *Drosophila* spermatocytes at a low dose rate. *Radiat. Res.* 167:217–21.
- Lecomte-Pradines, C., T. Hertel-Aas, C. Coutris, R. Gilbin, D. Oughton, and F. Alonzo. 2017. A dynamic energy-based model to analyze sublethal effects of chronic gamma irradiation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 80:830–44. doi:10.1080/15287394.2017.1352194.
- Marin, L. A., C. E. Smith, M. Y. Langston, D. Quashie, and L. E. Dillehay. 1991. Response of glioblastoma cell lines to low dose rate irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol.* 21:397–402. doi:10.1016/0360-3016(91)90788-6.
- Mitchell, J. B., J. S. Bedford, and S. M. Bailey. 1979. Dose-rate effects in plateau-phase cultures of S3 HeLa and V79 cells. *Radiat. Res.* 79:552–67.
- Morgan, W. F., and W. J. Bair. 2013. Issues in low dose radiation biology: The controversy continues. A perspective. *Radiat. Res.* 179:501–10. doi:10.1667/RR3306.1.
- Mosse, I. B. 2012. Genetic effects of ionizing radiation – Some questions with no answers. *J. Environ. Radioact.* 112:70–75. doi:10.1016/j.jenvrad.2012.05.009.
- Olipitz, W., D. Wiktor-Brown, J. Shuga, B. Pang, J. McFaline, P. Lonkar, A. Thomas, J. T. Mutamba, J. S. Greenberger, L. D. Sampson, et al. 2012. Integrated molecular analysis indicates undetectable DNA damage in mice after continuous irradiation at ~400-fold natural background radiation. *Environ. Health. Perspect.* 120:1130–35. doi:10.1289/ehp.1104294.
- Pandey, U. B., and C. D. Nichols. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63:411–36. doi:10.1124/pr.110.003293.
- Paul, S., L. B. Smilenov, C. D. Elliston, and S. A. Amundson. 2015. Radiation dose-rate effects on gene expression in mouse biodosimetry model. *Radiat. Res.* 184:24–32. doi:10.1667/RR14044.1.
- Pimentel, E., M. P. Cruces, and S. Zimmering. 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. doi:10.1016/s1383-5718(00)00125-x.
- Ramel, C., H. Cederberg, J. Magnusson, E. Vogel, A. T. Natarajan, L. H. Mullender, J. M. Nivard, J. M. Parry, A. Leyson, M. A. Comendador, et al. 1996. Somatic recombination, gene amplification and cancer. *Mutat. Res.* 353:85–107. doi:10.1016/0027-5107(95)00243-x.
- Russell, W. L., and E. M. Kelly. 1981. Specific-locus mutation frequencies in mouse stem-cell spermatogonia at very low radiation dose rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:539–41. doi:10.1073/pnas.79.2.539.
- Sakai, K., T. Nomura, and Y. Ina. 2006. Enhancement of bio-protective functions by low dose/dose-rate radiation. *Dose Response* 4:327–32. doi:10.2203/dose-response.06-115.Sakai.
- Tanarro, S. A., and A. Tanarro. 2008. *Diccionario Inglés-español sobre tecnología nuclear*. 2nd ed. Madrid: Tecnatom.
- Tang, F. R., W. K. Loke, and B. C. Khoo. 2016. Low-dose or low-dose-rate ionizing radiation-Induced bioeffects in animal models. *J. Radiat. Res.* 58:165–82.
- Vidal, L. M., E. Pimentel, M. P. Cruces, and J. C. Sánchez-Meza. 2017. Cytotoxic and genotoxic actions of Casiopeina III-Ea (Cas III-Ea) in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 80:365–73. doi:10.1080/15287394.2017.1326072.
- Vidal, L. M., E. Pimentel, M. P. Cruces, and J. C. Sánchez-Meza. 2018. Different radiation dose rate as radioprotection and the cross effect with chromium using *in vivo* somatic cells of *Drosophila*. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 63:16–20. doi:10.1016/j.etap.2018.08.008.
- Vogel, E. W., U. Graf, H. J. Frei, and M. M. Nivard. 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC. Sci. Publ.* 146:427.
- Würgler, F. E., F. H. Sobels, and E. W. Vogel. 1977. *Drosophila as assay system for detecting genetic changes. Handbook of mutagenicity test procedures*, 335–73. Amsterdam: Elsevier.
- Zhang, Z., H. Zhang, F. Liu, M. Qiu, and J. Tong. 2010. Effects of gamma radiation on bone marrow stromal cells. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 73:514–19. doi:10.1080/15287390903523477.
- Zhikrevetskaya, S., D. Peregudova, A. Danilov, E. Plyusnina, G. Krasnov, A. Dmitriev, A. Kudryavtseva,

- M. Shaposhnikov, and A. Moskalev. 2015. Effect of low doses (5–40 cGy) of gamma-irradiation on lifespan and stress-related genes expression profile in *Drosophila melanogaster*. *Plos One* 10:e0133840. doi:10.1371/journal.pone.0133840.
- Zimmering, S., M. P. Cruces, E. Pimentel, C. Arceo, G. Carrasco, and O. Olvera. 1997. On the recovery of single spots with the flr phenotype in the wing spot test. *Drosophila. Mutat. Res.* 379:77–82. doi:10.1016/S0027-5107(97)00110-3.
- Zimmering, S., O. Olvera, M. E. Hernandez, M. P. Cruces, C. Arceo, and E. Pimentel. 1990. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutat Res.* 245:47–49. doi:10.1016/0165-7992(90)90024-E.
- Zuo, Y.-H., X.-H. Dang, H.-F. Zhang, J.-G. Liu, Z.-K. Duan, Z.-W. Wang, and J. Tong. 2012. Genomic instability induced by ionizing radiation in human hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 75:700–06. doi:10.1080/15287394.2012.690087.

## 9.2. Resultados no publicados

Los resultados aún no publicados se incluyen en otro artículo que lleva por nombre: “Radioprotective effect of protoporphyrin-XI, chlorophyllin and bilirubin compared with amifostine in *Drosophila melanogaster*” que fue enviado a la revista Environmental Toxicology and Pharmacology el 25 de abril de 2020.

Viabilidad larva adulto: La Figura 10, muestra de manera comparada los valores de la viabilidad larva-adulto, después de los PT y PT más 20 Gy de rayos gamma (PT+20Gy) con las distintas porfirinas o AMF®. Cada barra representa el porcentaje de viabilidad de tres experimentos independientes. Cuando se compararon los porcentajes de viabilidad de los individuos PT con el control de sacarosa (0), no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de exposición probados, excepto con PPIX a una hora de exposición que redujo 3.9 % la viabilidad ( $p \leq 0.05$ ). Cuando se compararon los PT+20Gy con el control de 20 Gy se encontró que la AMF® causó una reducción de la viabilidad de 6.5 % ( $p < 0.05$ ) con PT de una hora; por su parte la BRB causó un incremento de 16 % ( $p \leq 0.05$ ) cuando las larvas se expusieron 3 horas. CCS provocó una disminución de 10.9 % ( $p \leq 0.05$ ) a 3h y del 6.8% ( $p \leq 0.05$ ) con 6 h de exposición al pigmento.



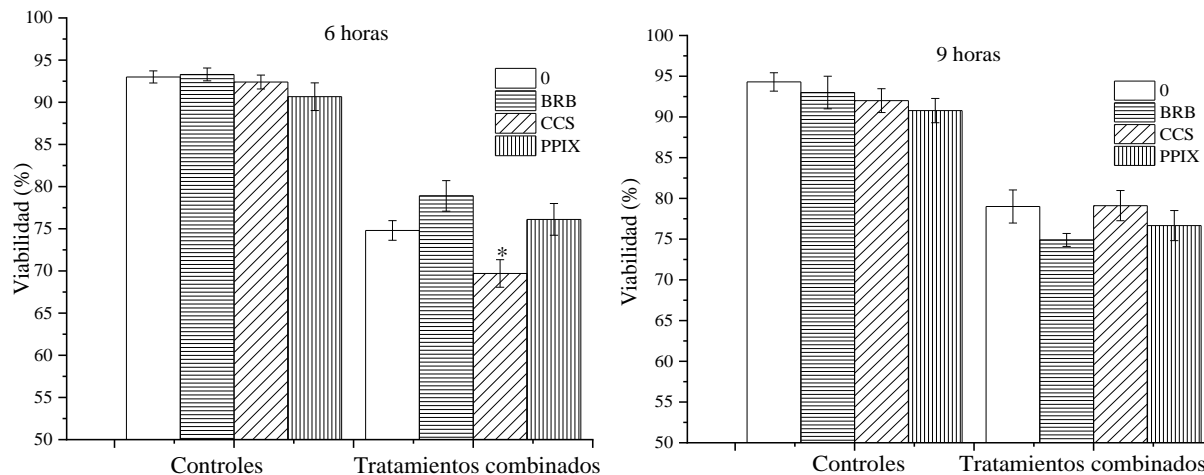


Figura 10. Viabilidad larva-adulto de individuos *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* de *Drosophila*, después de ser pre-tratados con Sac (0), AMF®, BRB, CCS o PPIX (Controles) a distintos tiempos de exposición: 1, 3, 6 y 9 horas e irradiados con 20 Gy de rayos gamma (tratamientos combinados). Cada barra representa los resultados de tres experimentos independientes con tres réplicas. El análisis estadístico fue realizado con una *t de Student*: \*  $p \leq 0.05$ .

**Tiempo de desarrollo:** El TD o la emergencia diaria de individuos está representado en la Figura 11. Puede observarse que en el caso de los PT (Figuras, A, B, C y D), los individuos comienzan a emerger en el día 10 del ciclo de vida y también es el día en donde se registró el mayor porcentaje de emergencia para todos los tiempos de exposición probados. El patrón de desarrollo para los individuos con PT es similar al del control negativo, no así con PPIX ya que los individuos retrasaron su desarrollo un día, efecto que es consistente en todos los tiempos probados.

Por otro lado, las figuras 2 (a, b, c y d), muestran que la radiación por sí sola o los PT +20 Gy retrasan el tiempo de desarrollo de los individuos un día. Los individuos comienzan a emerger en el día 11 y en el día 12 se registró el porcentaje de mayor emergencia para todos los compuestos probados.

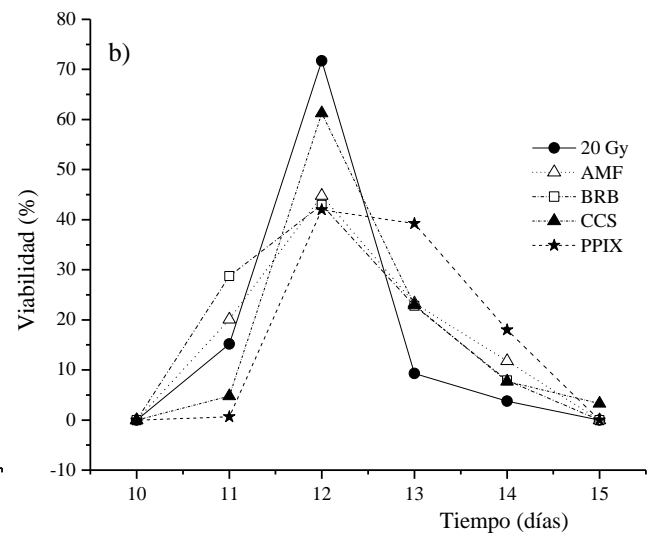
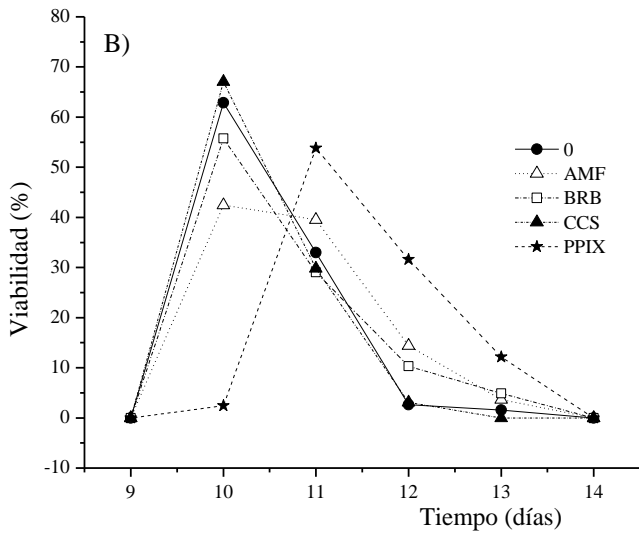
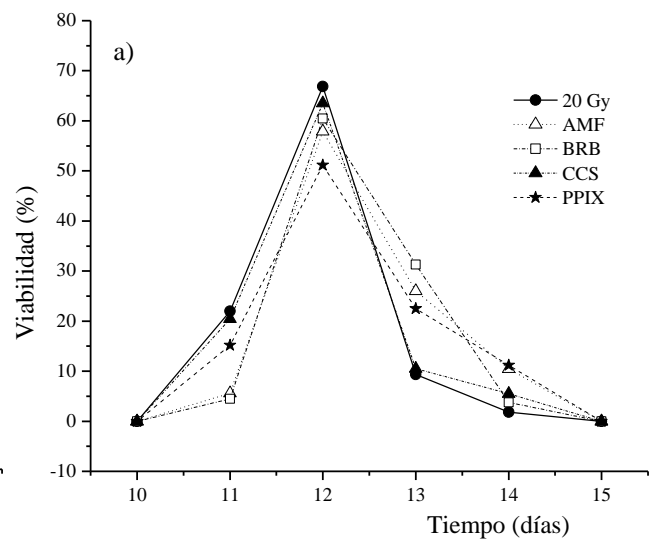
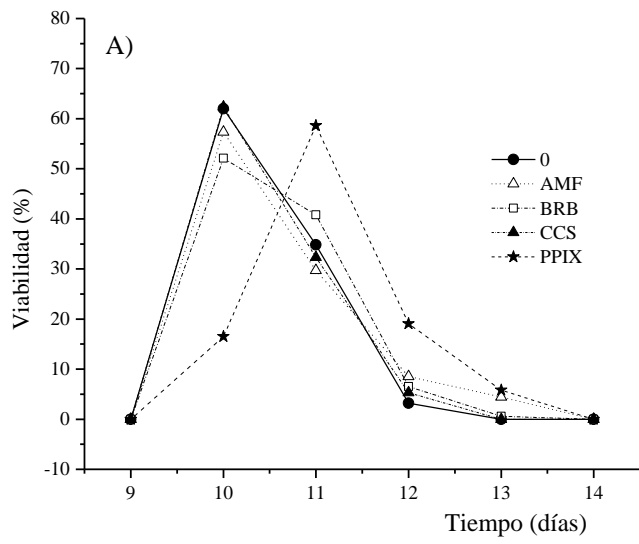
El tiempo de desarrollo es importante porque la muestra de individuos para realizar el análisis de genotoxicidad, se eligieron los individuos que emergieron en el día de mayor porcentaje de emergencia.

**Genotoxicidad:** Los individuos emergidos en el doceavo día se utilizaron para evaluar la frecuencia de mutación y recombinación somáticas. En la Tabla 1 están los resultados obtenidos después de 1, 3, 6 ó 9 horas de PT con las diferentes porfirinas o AMF®, y de los PT+20Gy con rayos gamma. Los resultados revelaron que los PT con las porfirinas o AMF® por sí solas, no provocaron cambios en las frecuencias de ninguna de las categorías de las manchas respecto al control en ninguno de los tiempos de exposición probados.

El análisis estadístico para los diferentes tipos de manchas indicó que los PT+ 20 Gy disminuyeron significativamente las manchas chicas (+) respecto al control de 20 Gy, excepto con el tratamiento PPIX+20 Gy después de 9 horas. En contraste, no se encontró que los PT+20 Gy disminuyeran las manchas grandes (-), excepto con el de BRB+20 Gy a los 4 tiempos probados, y débilmente (w) con la CCS o la PP-IX a 9 horas de PT. Con relación a las manchas gemelas los PT+20Gy, el análisis estadístico indicó que la disminución no fue concluyente (i) o no la hubo (-) en cualquiera de los PT y tiempos de pre-exposición a los pigmentos probados. La BRB con 9h de PT fue el único que provocó disminución (+) de las manchas gemelas.

Los PT+20 Gy respecto al control de 20 Gy el diagnóstico estadístico indicó que la AMF® provocó disminución de las manchas totales inducidas por 20Gy con 1 y 2 h de PT pero no significativamente. En comparación la CCS, PP-IX y BRB redujeron las manchas totales significativamente (+), con todos los tiempos de PT. Es importante destacar que el mayor porcentaje de reducción (59.4 %) de manchas totales en los cuatro tiempos probados fue provocada por el PT con la BRB (+). Por su parte la CCS y la PP-IX provocaron una débil reducción de manchas con PTs de 3 y 6 h pero todos lo PT de 9h para los tres pigmentos (CCS, PP-IX o BRB) provocaron una disminución significativa (+) del total de manchas inducidas por 20 Gy de rayos gamma.





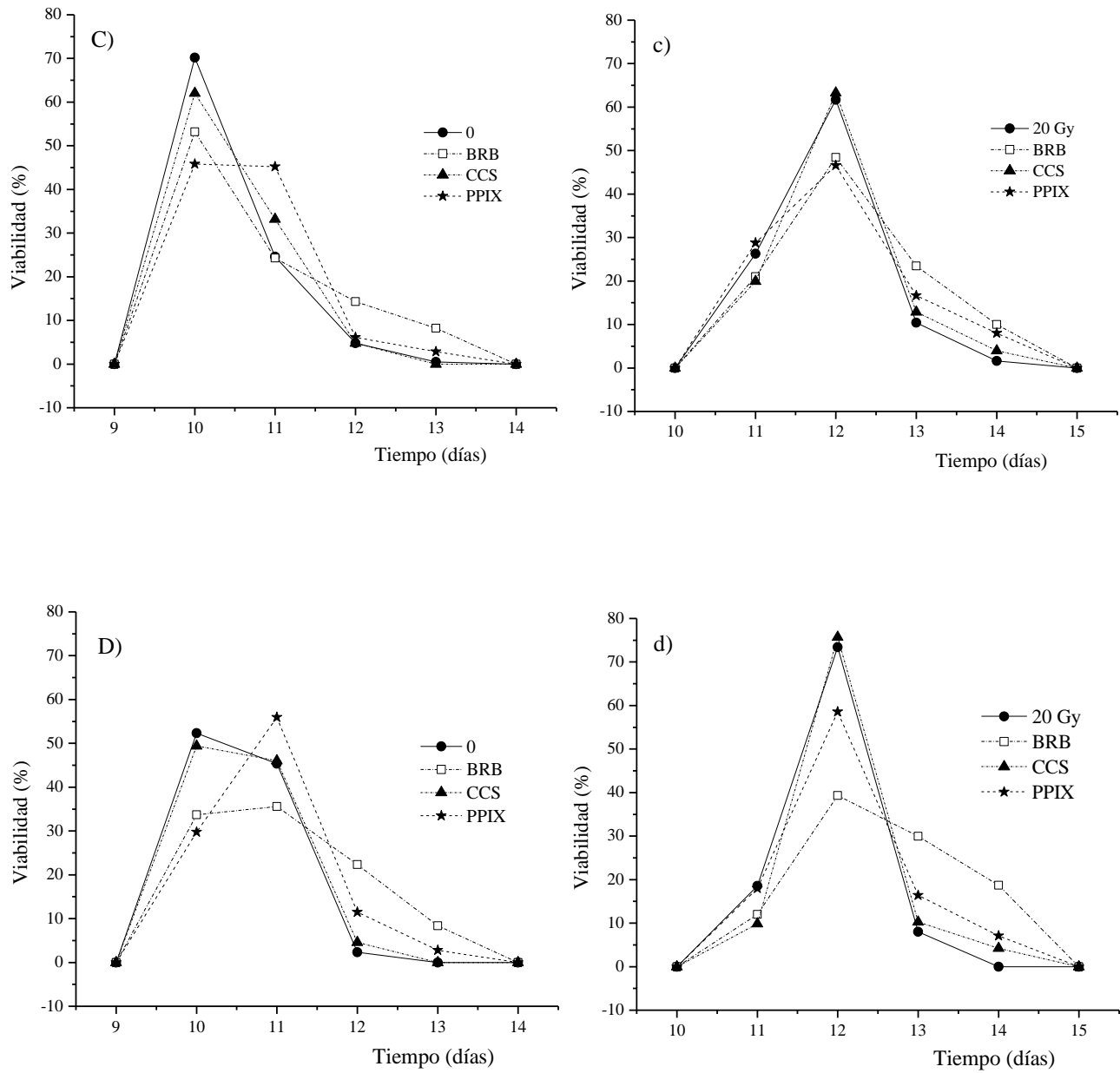


Figura 11. Tiempo de desarrollo de individuos *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* de *Drosophila*, después de los PT a 1, 3, 6 y 9 horas con Sac (0), AMF®, BRB, CCS o PPIX: (A, B, C y D); y los PT + 20 Gy de rayos gamma (a, b, c y d).

Tabla 1. Frecuencia de mutación somática inducida en individuos *mwh +/+flr<sup>3</sup>* de *D. melanogaster* después de un pre-tratamiento en larvas con diferentes porfirinas o AMF® e irradiadas con 20 Gy de rayos gamma.

Tiempo	Pre- Pre- Trata.	Pre- Trata.	Manchas								RM	RD
		<i>n</i>	Pequeñas		Grandes		Gemelas		Totales		(%)	(%)
		w	#	m/a	#	m/a	#	m/a	#	m/a		
	0	80	27	0.34	6	0.07	1	0.01	34	0.42		
	AMF®	80	18	0.22	13	0.16	0	0	31	0.39		
	CCS	80	22	0.27	4	0.05	2	0.025	28	0.35		
	PPIX	80	24	0.3	1	0.01	0	0	25	0.31		
	BRB	80	19	0.24	5	0.06	2	0.03	26	0.33		
<b>1h</b>	20 Gy	80	65	0.81	62	0.77	3	0.04	130	1.62		
	AMF®*	80	19	0.24 +	85	1.06 -	1	0.01 i	105	1.31 -	19.1	15.3
	CCS*	80	17	0.21 +	54	0.68 -	2	0.03 i	73	0.91 +	43.8	35.1
	PPIX*	80	23	0.29 +	62	0.77 -	1	0.01 i	86	1.08 w	33.3	26.6
	BRB*	80	17	0.21 +	25	0.31 +	0	0.00 i	42	0.52 +	67.9	54.3
	0	80	12	0.15	11	0.14	1	0.01	24	0.30		
	AMF®	80	18	0.22	4	0.05	1	0.01	23	0.29		
	CCS	80	27	0.34+	8	0.10	3	0.04	38	0.47 i		
	PPIX	80	25	0.31	2	0.03	2	0.03	29	0.36		
	BRB	80	18	0.22	5	0.06	0	0	23	0.29		
<b>3h</b>	20 Gy	80	58	0.73	80	1.00	4	0.05	142	1.77		
	AMF®*	80	20	0.25 +	84	1.05 -	9	0.11 -	113	1.41 -	20.3	16.2
	CCS*	80	31	0.39 +	66	0.82 -	1	0.01 i	98	1.23 w	30.5	24.4
	PPIX*	80	18	0.22 +	73	0.91 -	2	0.03 i	93	1.16 w	34.5	27.6
	BRB*	80	18	0.22 +	20	0.25 +	2	0.03 i	40	0.50 +	71.7	57.4
	0	80	24	0.30	8	0.09	0	0	32	0.40		
	CCS	80	35	0.44	8	0.10	1	0.01	44	0.55 i		
	PPIX	80	18	0.23	7	0.09	1	0.01	26	0.32		
	BRB	80	20	0.25	5	0.06	1	0.01	26	0.32		
<b>6h</b>	20 Gy	80	72	0.9	58	0.73	2	0.03	132	1.65		
	CCS*	80	32	0.40 +	56	0.70 -	3	0.04 -	91	1.14 w	30.9	24.7
	PPIX*	80	20	0.25 +	60	0.75 -	2	0.03 -	82	1.02 w	38.2	30.6
	BRB*	80	21	0.26 +	31	0.39 w	1	0.01 i	53	0.66 +	60.0	48.0
	0	80	17	0.21	2	0.02	3	0.04	22	0.27		
	CCS	80	22	0.27	5	0.06	2	0.02	29	0.36		
	PPIX	80	23	0.29	2	0.02	0	0	25	0.31		
	BRB	80	15	0.19	8	0.10	0	0	23	0.29		
<b>9h</b>	20 Gy	80	46	0.57	134	1.67	7	0.09	187	2.34		
	CCS*	80	19	0.24 +	63	0.79 w	3	0.04 i	85	1.06 +	54.7	43.8
	PPIX*	80	42	0.52 -	47	0.59 w	4	0.05 i	93	1.16 +	50.4	40.3
	BRB*	80	13	0.16 +	28	0.35 +	1	0.01 +	42	0.52 +	77.8	62.2

Tabla 1. Diagnósticos estadísticos según Frei y Würigler (1988): + = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = inconcluso, respeto al control; m = factor de multiplicación; Niveles de probabilidad:  $\alpha = \beta = 0.05$ . Prueba estadística de una cola. n: número de alas; \*: tratamientos combinados, m / a: manchas por ala; RM = Reducción de mutación respecto al control de 20 Gy. RD = reducción de recombinación respecto al control de 20 Gy según Jiménez *et al.* (2019).

## X. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que altas dosis de RI generan riesgos significativos para la salud. Sin embargo, los riesgos asociados con la exposición a dosis bajas se han estimado en función de modelos empíricos lineales basados en los resultados de seres humanos que fueron expuestos a dosis relativamente altas de radiación (BEIR VII, 2006; Kim *et al.*, 2015). La respuesta y los efectos biológicos de la RI, dependen de varios factores entre ellos la RD. Aunque los efectos de la radiación han sido estudiados ampliamente, los efectos biológicos de la radiación administrada a RD bajas son controvertidos (Kim *et al.*, 2015). Algunos autores han encontrado que entre menor sea la razón de dosis mayor será el daño provocado, lo que se conoce como efecto inverso de la razón de dosis (Russell y Kelly, 1981 y Marin *et al.*, 1991). En ese sentido, el primer objetivo del presente estudio fue investigar la correlación entre la viabilidad y el daño genético en los mismos individuos tratados con diferentes RD de rayos gamma, usando a *D. melanogaster* como un modelo multicelular.

Los primeros resultados (que ya fueron publicados) demostraron que la viabilidad larva-adulto, disminuyó en relación directa con la dosis pero no así con la RD empleada. El análisis estadístico reveló que a partir de 5 Gy la viabilidad disminuyó ( $p < 0.5$ ) con la RD de 32.88 Gy/h y a partir de 10 Gy ( $p < 0.001$ ) con 5.14 y 860.91 Gy/h. La  $DL_{50}$  calculada fue de  $41.83 \pm 1.4$ ,  $38.92 \pm 1.5$ ,  $40.51 \pm 2.6$  Gy con 5.14, 32.89 y 860.91 Gy/h respectivamente, por lo tanto, la  $DL_{50}$  no fue estadísticamente diferente entre las tres RD probadas. Estos resultados no apoyan la teoría del efecto esperado de la RD, que postula que cuando se administra una dosis de radiación a una RD alta, el efecto biológico será mayor en comparación con una exposición a una RD baja (Brooks *et al.*, 2016), y por ende, la viabilidad de los individuos en este estudio debería ser menor al aumentar la RD. Este resultado puede deberse a que los mecanismos de reparación presentes en los organismos pueden revertir el daño causado por la exposición a RD bajas. Amundson y colaboradores, (20039, tras exponer células mieloides a diferentes razones de dosis (0.28-290 cGy/m) encontraron que cuando la RD es baja, hay cambios en la expresión de genes involucrados en la reparación celular, aunque se inhibió la inducción de la apoptosis, hay un continuo incremento lineal en la expresión de genes regulados por el P53, involucrados en el control del ciclo celular. En otro estudio usando a cepas de *D. melanogaster* con mecanismos deficientes en reparación de ADN se comprobó que con dosis y RD bajas hay un incremento de daño genético en comparación con la cepa silvestre (Iushkova *et al.*, 2011).

Por otro lado, los resultados de genotoxicidad de este estudio demostraron que el daño genético inducido incrementa con la dosis y la RD y apoyan la teoría del efecto esperado de la razón de dosis (Bedford y

Mitchell, 1973, Hall y Giaccia, 2012). Adicionalmente con la prueba SMART es posible evidenciar la recombinación mitótica (Graf *et al.*, 1984); evento genético que está asociado al riesgo de desarrollar cáncer (Ramel *et al.*, 1996). Al analizar las alas de los individuos *mwh / TM3, Ser*, se pueden obtener la frecuencia de manchas debida exclusivamente a eventos mutacionales, esto porque las inversiones múltiples del cromosoma *TM3, Ser*, impiden el reconocimiento entre cromosomas homólogos y por lo tanto no hay posibilidad de recombinación (Graf *et al.*, 1984; Zakharenko y Perepelkina, 2009). Una vez que se obtuvo la frecuencia de mutación inducida en las alas de estos organismos inducida por 15, 25 y 35 Gy, ésta fue corregida considerando que son en promedio 15.98 y 11.45% de más pequeñas en las hembras y machos respectivamente, en relación a los individuos *mwh + / + flr<sup>3</sup>*. Posteriormente, se restó de la frecuencia de mutación y recombinación inducida en la descendencia *mwh + / + flr<sup>3</sup>*. Este análisis reveló que los porcentajes de recombinación inducidos por las RD de 860.9 y 5.1 Gy / h fueron de 80% y 66.5%, respectivamente. Este resultado es congruente con las observaciones hechas por Zakharenko y Perepelkina (2009) quienes concluyeron que gran parte de las mutaciones detectadas por la prueba SMART en individuos de genotipo *mwh + / + flr<sup>3</sup>* son resultado de eventos de recombinación. Con este dato se demostró que la inducción de recombinación también se relaciona con la dosis y la RD.

A partir de estos resultados y para el cumplimiento del segundo objetivo de la presente investigación se utilizará la DE de 20 Gy administrada a la RD más alta (699.7 Gy / h) ya que puede inducir una frecuencia de daño genético lo suficientemente grande para poder evidenciar el efecto de las porfirinas y es la RD que tiene el mayor índice de daño genético en comparación con las otras dos, además la viabilidad está por debajo de la  $DL_{50}$  calculada.

En ese sentido, nuestro segundo objetivo tuvo como fin probar el potencial radioprotector de un pretratamiento de tres porfirinas: la CCS, la PPIX y la BRB en *Drosophila melanogaster*, un sistema *in vivo* que permite analizar de manera directa la relación entre varios índices como el TD, la viabilidad larva-adulto y la genotoxicidad en un mismo individuo tratado.

Los resultados de la viabilidad larva-adulto, encontramos que ni los PT ni los PT+20 Gy de rayos gamma provocaron cambios en la viabilidad de los organismos tratados en comparación con sus respectivos controles, sólo se encontró que 1 h de exposición a la PPIX provocó una reducción de 3.9 % de viabilidad y con los PT+20 Gy se encontró que la CCS provocó una reducción de la viabilidad de 10.9 % y 6.8 con 3h y 6h de exposición respectivamente, pero con la BRB se incrementó 16 % (Figura 10) Estos resultados

son congruentes con lo descrito por Cruces *et al.*, (2009) para la CSC (0.03-69 mM) y Zibera *et al.* (2016) para BRB (0.5 - 100 nM). En ambos estudios se menciona que por sí solos y a las concentraciones probadas los compuestos no fueron tóxicos para el sistema de prueba (*D. melanogaster* y linfocitos humanos, respectivamente). En un estudio reciente se demostró que una concentración de BRB no conjugada a 50mmol/L, 100mmol/L, y 200mmol/L administrada a tejido hepático humano, provocó un incremento significativo en la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos, proponiendo a la BRB como un eficaz crioprotector para futuros trasplantes (Galbiati *et al.*, 2010). El hecho de que los compuestos no fueran tóxicos a las concentraciones a las que redujeron la frecuencia de daño genético, los hace buenos candidatos para seguir probando su efecto en otros sistemas de prueba. El pretratamiento con PPIX a una hora fue el único en el que disminuyó la viabilidad de los organismos ( $p < 0.05$ ), sin embargo, el porcentaje de disminución es de apenas del 3.8%. De hecho, la capacidad citoprotectora de la PPIX ya ha sido probada, en un estudio usando el ensayo de Ames, se demostró que la PP-IX fue más eficiente para inhibir la acción prooxidante del hidroperóxido de butilo terciario en comparación con otros tetrapirroles, entre ellos la bilirrubina (BRB); biliverdina (BVR) y CCS (Mölzer *et al.*, 2012).

El TD representa el porcentaje de individuos que emergió cada día. Los resultados de este índice (Figura 11) revelan que el TD de los individuos PT + 20Gy fue igual que el TD de los individuos tratados sólo con 20 Gy y fue en el doceavo día el mayor porcentaje de emergencia de adultos, estos individuos fueron los que se utilizaron para evaluar el potencial de inhibición de daño genético de los pigmentos probados empleando el ensayo SMART en el ala de *Drosophila*. Ninguna de las porfirinas probadas o la AMF® por sí solas provocaron cambios en las frecuencias basales de mutación ni recombinación a ninguno de los tiempos de exposición probados (Tabla 1). Estos hallazgos las coloca en buena posición para evaluar su potencial radio-protector y compararlo con la AMF®.

Aunque se ha demostrado que algunas porfirinas como la CCS tienen propiedades anti-mutagénicas, particularmente reduciendo el daño genético inducido por la RI, existen otras como la BRB y la PPIX que por su estructura parecida a la de la CCS pueden ser buenos radioprotectores pero su actividad ha sido poco estudiada. La actividad protectora de la CCS se debe a que tienen la habilidad de acomplejarse directamente con mutágenos (Bulmer *et al.*, 2008, Egner *et al.*, 2003) o/y puede intercalarse en el ADN evitando que el mutágeno interactúe con él (Tajmir-Riahi *et al.*, 2004). Se ha encontrado que es un antimutágeno eficaz con propiedades químico y radioprotectoras (Zimmering *et al.*, 1990; Pimentel *et al.*, 1999, 2000; Cruces *et al.*, 2003; Pimentel *et al.*, 2011). En el presente estudio se encontró que la CCS

redujo la mutagenicidad producida por 20 Gy entre el 32 y 54% cuando las larvas fueron pre-tratadas con 69 mM. Este efecto concuerda en un rango reportado en estudios anteriores del mismo laboratorio (30.5 a 54.7% de inhibición) pero con una exposición sólo de 1 a 9 horas a 69 mM.

La PPIX (0.69 mM) fue capaz de inhibir entre el 33.3 al 50.4% el daño genético inducido por 20 Gy de rayos gamma con un tiempo de pre-exposición de 1 a 9h, comparable al encontrado con CCS. Este efecto protector ha sido probado en un estudio usando la prueba SMART en *D. melanogaster*; se encontró que es capaz de reducir el daño genético generado por el CrO<sub>3</sub> (un radiomimético). Un pretratamiento con 0.69mM de PP-IX durante 24 h seguido por un tratamiento con diferentes concentraciones de CrO<sub>3</sub> redujo significativamente el daño genético. En contraste, 6.9 y 69 mM sólo inhibieron el daño inducido por 2.5 mM de CrO<sub>3</sub>. Sin embargo, ninguna de las dosis utilizadas redujo el daño radioinducido. Estos hallazgos sugirieron que la PPIX actúa principalmente formando complejos con el CrO<sub>3</sub> en dosis bajas, impidiendo su acción genotóxica, en lugar de capturar o inactivar las especies reactivas de oxígeno generadas por el CrO<sub>3</sub> (Vidal *et al.*, 2014).

En cuanto a la BRB, los PT de 1, 3, 6 ó 9h de BRB inhibieron: 67.9; 71.7; 60.0 y 77.8% respectivamente el daño genético inducido por 20 Gy de rayos gamma. En experimentos anteriores se encontró que 24h de pre-tratamiento con 69 mM de BRB disminuyó el daño genético ocasionado por 20 Gy de rayos gamma en más del 50 % en *D. melanogaster* y que el efecto inhibitor persiste hasta 72 h después del tratamiento (Bailón, 2007).

En el presente se encontró que la AMF® disminuye la viabilidad larva-adulto después de una hora de pre-tratamiento en combinación con 20 Gy de rayos gamma y fue en el tiempo en donde presentó su mayor porcentaje de inhibición de daño genético (19.1%) y con 3h de pre-tratamiento no alteró el porcentaje de viabilidad y la reducción de daño fue de 16.2%. No obstante, en ninguno de los dos tiempos de pretratamiento la reducción fue significativa. Se sabe que la AMF® protege selectivamente una amplia gama de tejidos contra la citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos como la ciclofosfamida (Wasserman y Brizel, 2001). Sin embargo, su papel como inhibidor de daño genético inducido por los rayos gamma no fue significativo comparado con los pigmentos probados. Se tiene evidencia de la que la AMF® reduce los efectos mutagénicos y recombinogénicos de la ftemustina (agente alquilante) a concentraciones de 1 a 4 µg/ml (Aydemir *et al.*, 2009); esta acción puede deberse a su acomplejamiento con la ftemustina más que a una acción antioxidante. El hecho de que nuestros resultados no concuerden con lo anterior puede deberse a que la AMF® tiene muy baja biodisponibilidad en nuestro sistema debido

al pH del intestino de la larva, su carga iónica positiva vuelve muy difícil su absorción por vía oral (Pimentel *et al.*, 2011). Existe evidencia basada en el uso de colorantes especiales que muestra que el contenido alimenticio del intestino medio de *Drosophila* es fuertemente ácido (pH <2.3), especialmente en la región de las células de cobre y en la región del estómago (Dubreuil, 2004). Una desventaja que tiene la AMF® es su reducido tiempo de radioprotección; de hecho, en la práctica clínica para ser efectiva debe ser administrada de 15 minutos a media hora antes de la quimio o radioterapia una vez que se administra, debido a su rápido aclaramiento. Solamente cuando este fármaco está presente en el momento de la irradiación es capaz de reducir la mortalidad de un modo significativo (Wasserman y Brizel, 2001). En este estudio, los resultados promedio de viabilidad larva-adulto, obtenidos en los tiempos probados indican una relación: BRB (93.8%) > CSC (92.3%) > AMF® (91.8%) > PPIX (90.6), el control positivo tuvo una viabilidad promedio de 93.4 %. Al comparar el efecto de la AMF® con las porfirinas probadas en este estudio muestran que éstas son más eficientes para reducir el daño genético inducido por los rayos gamma que la AMF® con 1 y 3 horas de PT, y guardan la siguiente relación en la reducción del daño genético inducido por 20 Gy de rayos gamma: BRB (69.3 %) > CSC (40.0 %) > PPIX (39.0 %) > AMF® (19.7%).

Finalmente, dado que la RI provoca daño al ADN directo (40%) y entre 60 y 70% indirecto a través de la formación de RL (Saha, 2013), el mecanismo de acción de las porfirinas probadas, muy probablemente fue a través de la inactivación de estos, lo cual coloca como radioprotector potenciales por su capacidad antioxidante. Se ha propuesto que la BRB puede inhabilitar a los radicales peroxilo, mediante un mecanismo de acción basado en la donación de un protón del anillo pirrólico, transformándose la BRB en un radical centrado en el carbono (BR\*) con estabilización de resonancia que se extiende sobre toda la molécula (Mancuso *et al.*, 2003). En cuanto a la CCS se ha sugerido que su capacidad antioxidante se debe a que puede inhabilitar a varias especies reactivas incluyendo al superóxido y al radical hidroxilo, por medio de reacciones de óxido reducción donando H<sup>+</sup> (Kumar *et al.*, 1999). El efecto radioprotector de la PPIX puede ser debido a que en la oscuridad la PP-IX (no excitada) inhabilita a los RL como el peroxilo (Williams *et al.*, 1994).



## XI. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos en este estudio demostraron la relación entre viabilidad y genotoxicidad inducida por tres RD de rayos gamma *in vivo*. La viabilidad larva adulto se redujo en relación a la dosis, pero no así con la RD. Por otro lado, las frecuencias de mutación somática y recombinación aumentaron en relación la dosis y RD. Con estos resultados, confirmamos el efecto directo de la RD, resaltando la importancia de evaluar diferentes efectos en un mismo individuo causados por la RD para relevancia de estudios toxicológicos y de radioprotección.

Los pretratamientos de 1 a 9 horas con cualquiera de las porfirinas más 20 Gy de rayos gamma administrados a una RD alta, provocaron que la frecuencia de mutación y recombinación somáticas inducida por 20 Gy disminuyera significativamente con la siguiente relación: BRB (69.3 %) > CSC (40.0 %) > PPIX (39.0 %) > AMF® (19.7%). La BRB destacó con un porcentaje en promedio mayor (74.4 %) de capacidad antimutagénica. Demostrando que las porfirinas son más eficientes reduciendo daño genético inducido por 20 Gy de rayos gamma comparado con la AMF®, lo que indica que la PPIX, CCS y BRB son excelentes candidatos para continuar probando su eficacia como radioprotectores potenciales.

## XII. REFERENCIAS

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., ... y George, R. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
- Adhikari, S., Joshi, R. y Gopinathan, C. (1998). Bilirubin as an anti precipitant against copper mediated denaturation of bovine serum albumin: formation of copper–bilirubin complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1380(1), 109-114.
- Afonso, S., Vanore, G. y Batlle, A. (1999). Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(3), 161-170.
- Alcaide, F. J.A. (2016). Evaluación del potencial inhibidor de la Protoporfirina IX (PP-IX) del daño genético inducido por rayos gamma administrados a diferentes razones de dosis en *Drosophila melanogaster*. Tesis. Universidad Politécnica del Valle de Toluca. México.
- Amundson, S. A., Lee, R. A., Koch-Paiz, C. A., Bittner, M. L., Meltzer, P., Trent, J. M. y Fornace, A. J. (2003). Differential Responses of Stress Genes to Low Dose-Rate  $\gamma$  Irradiation 1 DOE Grant ER62683. *Molecular Cancer Research*, 1(6), 445-452.
- Archana, P. R., Nageshwar Rao, B. y Satish Rao, B. S. (2011). Modulation of gamma ray–induced genotoxic effect by thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Integrative cancer therapies*, 10(4), 374-383.
- Arora, R. (2008). *Herbal radiomodulators: applications in medicine, homeland defence and space*. CABI.
- Aydemir, N., Sevim, N., Celikler, S., Vatan, O. y Bilaloglu, R. (2009). Antimutagenicity of amifostine against the anticancer drug fotemustine in the *Drosophila* somatic mutation and recombination (SMART) test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 679(1-2), 1-5.
- Bailón R. C. (2007). Efecto de la bilirrubina sobre el daño genético inducido por la radiación gamma en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Toluca, Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias
- Barone, E., Trombino, S., Cassano, R., Sgambato, A., De Paola, B., Stasio, E. D., ... y Mancuso, C. (2009). Characterization of the S-denitrosylating activity of bilirubin. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(8b), 2365-2375.
- Bedford, J. S. y Mitchell, J. B. (1973). Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiation research*, 54(2), 316-327.
- Biesaga, M., Pyrzyńska, K. y Trojanowicz, M. (2000). Porphyrins in analytical chemistry. A review. *Talanta*, 51(2), 209-224.
- Breinholt, V., Schimerlik, M., Dashwood, R. y Bailey, G. (1995). Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chemical research in toxicology*, 8(4), 506-514.
- Brenner, D. J., Doll, R., Goodhead, D. T., Hall, E. J., Land, C. E., Little, J. B., ... y Ron, E. (2003). Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13761-13766.
- Bronzetti, G., Galli, A. y Della Croce, C. (1990). Antimutagenic effects of chlorophyllin. In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II* (p.p. 463-468). Springer, Boston, MA.
- Brooks, A. L., Hoel, D. G. y Preston, R. J. (2016). The role of dose rate in radiation cancer risk: evaluating the effect of dose rate at the molecular, cellular and tissue levels using key events in critical pathways following exposure to low LET radiation. *International journal of radiation biology*, 92(8), 405-426.
- Brooks, A. L., Miick, R., Buschbom, R. L., Murphy, M. K. y Khan, M. A. (1995). The role of dose rate in the induction of micronuclei in deep-lung fibroblasts *in vivo* after exposure to cobalt-60 gamma rays. *Radiation research*, 144(1), 114-118.

- Bukowski, R. M. (1996). Amifostine (Ethyol®): Dosing, administration and patient management guidelines. *European Journal of Cancer*, 32, S46-S49.
- Bulmer, A. C., Coombes, J. S., Blanchfield, J. T., Toth, I., Fassett, R. G. y Taylor, S. M. (2011). Bile pigment pharmacokinetics and absorption in the rat: therapeutic potential for enteral administration. *British journal of pharmacology*, 164(7), 1857-1870.
- Bulmer, A. C., Ried, K., Blanchfield, J. T. y Wagner, K. H. (2008). The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutation research/Reviews in mutation research*, 658(1-2), 28-41.
- Cho, Y. S., Hong, S. T., Choi, K. H., Chang, Y. H. y Chung, A. S. (2000). Chemopreventive activity of porphyrin derivatives against 6-sulfooxymethylbenzo [a] pyrene mutagenicity. *Asian Pac J Cancer Prev*, 1(4), 311-317.
- Chung, W. Y., Lee, J. M., Lee, W. Y., Surh, Y. J. y Park, K. K. (2000). Protective effects of hemin and tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin on bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis induced by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 472(1-2), 139-145.
- Consejo de Seguridad Nuclear (CSN). 2013. Últimos avances en radioprotectores de origen natural. Disponible en: <https://www.csn.es/images/stories/publicaciones/novedades/radioprotectores.pdf>
- 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 (CrO<sub>3</sub>) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 536(1-2), 139-144.
- Cruces, M. P., Pimentel, E. y Zimmering, S. (2009). Evidence that low concentrations of chlorophyllin (CHLN) increase the genetic damage induced by gamma rays in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 679(1-2), 84-86.
- De Toledo, S. M., Asaad, N., Venkatachalam, P., Li, L., Howell, R. W., Spitz, D. R. y Azzam, E. I. (2006). Adaptive responses to low-dose/low-dose-rate  $\gamma$  rays in normal human fibroblasts: The role of growth architecture and oxidative metabolism. *Radiation research*, 166(6), 849-857.
- del Cura, J., Pedraza, S., y Gayate, A. (2009). Radiología esencial. Tomo I. Madrid. Ed. Médica Panamericana.
- Desouky, O., Ding, N., y Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), 247-254.
- Ding, L. H., Shingyoji, M., Chen, F., Hwang, J. J., Burma, S., Lee, C., y Chen, D. J. (2005). Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiation research*, 164(1), 17-26.
- Dizdaroglu, M., y Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free radical research*, 46(4), 382-419.
- Dubreuil, R. R. (2004). Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. *The international journal of biochemistry y cell biology*, 36(5), 742-752.
- Egner, P. A., Muñoz, A. y Kensler, T. W. (2003). Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 209-216.
- Erixon, K., y Cedervall, B. (1995). Linear induction of DNA double-strand breakage with X-ray dose, as determined from DNA fragment size distribution. *Radiation research*, 142(2), 153-162.
- Farooqi, Z. y Kesavan, P. C. (1992). Radioprotection by caffeine pre-and post-treatment in the bone marrow chromosomes of mice given whole-body  $\gamma$ -irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 269(2), 225-230.
- Feinendegen, L. E., y Cuttler, J. M. (2018). Biological effects from low doses and dose rates of ionizing radiation: science in the service of protecting humans, a synopsis. *Health physics*, 114(6), 623-626.
- Feng, M., Smith, D. E., Normolle, D. P., Knol, J. A., Pan, C. C., Ben-Josef, E., ... y Lawrence, T. S. (2012). A phase I clinical and pharmacology study using amifostine as a radioprotector in dose-escalated whole liver radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 83(5), 1441-1447.

- Ferruzzi, M. G., Failla, M. L. y Schwartz, S. J. (2001). Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vitro* digestion and Caco-2 human cell model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 2082-2089.
- Frei, H., y Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4), 297-308.
- Galbiati, G., Muraca, M., Mitry, R. R., Hughes, R. D., Lehec, S. C., Puppi, J., ... y Dhawan, A. (2010). Bilirubin, a physiological antioxidant, can improve cryopreservation of human hepatocytes. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 50(6), 691-693.
- Gerić, M., Gajski, G., Mihaljević, B., Miljanić, S., Domijan, A. M. y Garaj-Vrhovac, V. (2019). Radioprotective properties of food colorant sodium copper chlorophyllin on human peripheral blood cells *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 845, 403027.
- Ghandhi, S. A., Smilenov, L. B., Elliston, C. D., Chowdhury, M. y Amundson, S. A. (2015). Radiation dose-rate effects on gene expression for human biodosimetry. *BMC medical genomics*, 8(1), 22.
- Gomes, A. T., Neves, M. G. y Cavaleiro, J. A. (2018). Cancer, photodynamic therapy and porphyrin-type derivatives. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1), 993-1026.
- González, A. J. (1994). Los efectos biológicos de las dosis bajas de radiación ionizante. *Boletín OIEA*.
- González, E., Cruces, M. P., Pimentel, E. y Sánchez, P. (2018). Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate. *Environmental toxicology and pharmacology*, 62, 210-214.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. y Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, 6(2), 153-188.
- Greer, J. P., Arber, D. A., Glader, B. E., List, A. F., Means, R. M. y Rodgers, G. M. (2018). *Wintrobe's clinical hematology*. Lippincott Williams y Wilkins.
- Gubskiy, I. L., Sergeeva, O. N., Panov, V., Tyurin, I. E. y Dolgushin, B. (2015). T1 segmental hyperintensity in liver cholestasis on MRI: *in vitro* explanation. In *European Congress of Radiology. Vienna*.
- Hall, E. J. y Giaccia, A. J. (2012). Fractionated radiation and the dose-rate effect. *Radiobiology for the Radiologist*, 67-85.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants—quo vadis?. *Trends in pharmacological sciences*, 32(3), 125-130.
- Hayatsu, H., Sugiyama, C., Arimoto-Kobayashi, S. y Negishi, T. (1999). Porphyrins as possible preventers of heterocyclic amine carcinogenesis. *Cancer letters*, 143(2), 185-187.
- He, Y. y Jasper, H. (2014). Studying aging in *Drosophila*. *Methods*, 68(1), 129-133.
- Holley, A. K., Miao, L., St. Clair, D. K. y St. Clair, W. H. (2014). Redox-modulated phenomena and radiation therapy: the central role of superoxide dismutases. *Antioxidants y redox signaling*, 20(10), 1567-1589.
- Ina, Y. y Sakai, K. (2004). Prolongation of life span associated with immunological modification by chronic low-dose-rate irradiation in MRL-lpr/lpr mice. *Radiation research*, 161(2), 168-173.
- Ishizaki, K., Hayashi, Y., Nakamura, H., Yasui, Y., Komatsu, K. y Tachibana, A. (2004). No induction of p53 phosphorylation and few focus formation of phosphorylated H2AX suggest efficient repair of DNA damage during chronic low-dose-rate irradiation in human cells. *Journal of radiation research*, 45(4), 521-525.
- Iushkova, E. A., Zaĭnullin, V. G. y Startseva, O. A. (2011). Evaluation of effects of gamma-irradiation at low doses on repair and meiotic recombination mutants of *Drosophila melanogaster*. *Radiatsionnaia biologiya, radioecologiya*, 51(6), 698-704.
- Jennings, B. H. (2011). *Drosophila*—a versatile model in biology y medicine. *Materials today*, 14(5), 190-195.

- Jiménez, V. (2013). Evaluation of the oxidative stress modulation in *Drosophila melanogaster* strains deficient in endogenous antioxidants and with chronic exposure to casiopeina Cas II-gly and gamma radiation. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de Mexico.
- Johnke, R. M., Sattler, J. A., y Allison, R. R. (2014). Radioprotective agents for radiation therapy: future trends. *Future oncology*, 10(15), 2345-2357.
- Joshi, Y., Jadhav, T. y Kadam, V. (2010). Radioprotective-A pharmacological intervention for protection against ionizing radiations: A review. *The Internet Journal of Internal Medicine*, 8(2), 101-105.
- Kamran, M. Z., Ranjan, A., Kaur, N., Sur, S., y Tandon, V. (2016). Radioprotective agents: strategies and translational advances. *Medicinal research reviews*, 36(3), 461-493.
- Kim, C. S., Seong, K. M., Lee, B. S., Lee, I. K., Yang, K. H., Kim, J. Y. y Nam, S. Y. (2015). Chronic low-dose  $\gamma$ -irradiation of *Drosophila melanogaster* larvae induces gene expression changes and enhances locomotive behavior. *Journal of radiation research*, 56(3), 475-484.
- Kitamura, Y., Ishida, Y., Takata, K., Mizutani, H., Kakimura, J. I., Inden, M., ... y Shimohama, S. (2003). Hyperbilirubinemia protects against focal ischemia in rats. *Journal of neuroscience research*, 71(4), 544-550.
- Kouvaris, J. R., Kouloulias, V. E. y Vlahos, L. J. (2007). Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist*, 12(6).
- Kumar, R., Misra, R. y Chandrashekar, T. K. (2006). Effect of meso aryl substituents on the synthesis of core-modified expanded porphyrins. *Organic letters*, 8(21), 4847-4850.
- Lakatos, L., y Balla, G. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis: Treatment with Unconjugated Bilirubin. *EC Neurology*, 4, 92-98.
- Landauer, M. R., Srinivasan, V. y Seed, T. M. (2003). Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 23(6), 379-385.
- Lindsley, D. L., y Zimm, G. G. (2012). *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic press.
- Mancuso, C. (2017). Bilirubin and brain: A pharmacological approach. *Neuropharmacology*, 118, 113-123.
- Mancuso, C., Bonsignore, A., Di Stasio, E., Mordente, A. y Motterlini, R. (2003). Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochemical pharmacology*, 66(12), 2355-2363.
- Marin, L. A., Smith, C. E., Langston, M. Y., Quashie, D. y Dillehay, L. E. (1991). Response of glioblastoma cell lines to low dose rate irradiation. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 21(2), 397-402.
- Mitchell, J. B., Bedford, J. S., y Bailey, S. M. (1979). Dose-rate effects on the cell cycle and survival of S3 HeLa and V79 cells. *Radiation research*, 79(3), 520-536.
- Mölzer, C., Huber, H., Steyrer, A., Ziesel, G., Ertl, A., Plavotic, Wallner A., M., Bulmer A. C. y Wagner, K. H. (2012). *In vitro* antioxidant capacity and antigenotoxic properties of protoporphyrin and structurally related tetrapyrroles. *Free radical research*, 46(11), 1369-1377.
- Nagini, S., Palitti, F. y Natarajan, A. T. (2015). Chemopreventive potential of chlorophyllin: a review of the mechanisms of action and molecular targets. *Nutrition and cancer*, 67(2), 203-211.
- Nainu, F., Nakanishi, Y. y Shiratsuchi, A. (2019). Fruit fly as a model organism in the study of human diseases and drug discovery. *医療人育成センター紀要*, (10), 21-32.
- National Research Council. (2006). *Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation: BEIR VII phase 2* (Vol. 7). National Academies Press.
- Neuzil, J. y Stocker, R. (1994). Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(24), 16712-16719.
- Nimse, S. B., y Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.
- Olipitz, W., Wiktor-Brown, D., Shuga, J., Pang, B., McFaline, J., Lonkar, P., ... y Dedon, P. C. (2012). Integrated molecular analysis indicates undetectable change in DNA damage in mice after continuous

irradiation at~ 400-fold natural background radiation. *Environmental health perspectives*, 120(8), 1130-1136.

- Olvera, O., Arceo, C. y 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. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2), 113-117.
- Painuli, S. y Kumar, N. (2016). Prospects in the development of natural radioprotective therapeutics with anti-cancer properties from the plants of Uttarakhand region of India. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 7(1), 62-68.
- Panchal, K. y Tiwari, A. K. (2017). *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 89, 1331-1345.
- Pandey, U. B. y Nichols, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, 63(2), 411-436.
- Paul, S., Smilenov, L. B., Elliston, C. D. y Amundson, S. A. (2015). Radiation dose-rate effects on gene expression in a mouse biodosimetry model. *Radiation research*, 184(1), 24-32.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., y Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Pimentel, E., Cruces, M. P. y Zimmering, S. (1999). On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 446(2), 189-192.
- Pimentel, E., Cruces, M. P. y 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*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 472(1-2), 71-74.
- Pimentel, E., Cruces, M. P. y Zimmering, S. (2011). A study of the inhibition/promotion effects of sodium-copper chlorophyllin (SCC)-mediated mutagenesis in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 722(1), 52-55.
- Pimentel, E., Vidal, L. M., Cruces, M. P. y Janczur, M. K. (2013). Action of protoporphyrin-IX (PP-IX) in the lifespan of *Drosophila melanogaster* deficient in endogenous antioxidants, Sod and Cat. *Open Journal of Animal Sciences*, 3(04), 1.
- Pisoschi, A. M., y Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Ramel, C., Cederberg, H., Magnusson, J., Vogel, E., Natarajan, A. T., Mullender, L. H., ... y Sierra, L. M. (1996). Somatic recombination, gene amplification and cancer. *Mutation research*, 353(1-2), 85-107.
- Rick, K., Sroka, R., Stepp, H., Kriegmair, M., Huber, R. M., Jacob, K. y Baumgartner, R. (1997). Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 40(3), 313-319.
- Rodrigues, F., Lehmann, M., do Amaral, V. S., Reguly, M. L., y de Andrade, H. H. R. (2007). Genotoxicity of three mouthwash products, Cepacol®, Periogard®, and Plax®, in the *Drosophila* wing-spot test. *Environmental and molecular mutagenesis*, 48(8), 644-649.
- Russell, W. L. y Kelly, E. M. (1982). Specific-locus mutation frequencies in mouse stem-cell spermatogonia at very low radiation dose rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(2), 539-541.
- Saha, G. B. (2012). *Physics and radiobiology of nuclear medicine*. Springer Science y Business Media.
- Sakai, K., Nomura, T. y Ina, Y. (2006). Enhancement of bio-protective functions by low dose/dose-rate radiation. *Dose-Response*, 4(4).
- Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G. (1995). Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium (VI) oxide in mice *in vivo*. *Phytotherapy Research*, 9(3), 199-202.

- Sasse, A. D., de Oliveira Clark, L. G., Sasse, E. C. y Clark, O. A. C. (2006). Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: results of a meta-analysis. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 64(3), 784-791.
- Sebastià, N., Montoro, A., Almonacid, M., Villaescusa, J. I., Cervera, J., ... y Soriano, J. M. (2011). Assessment *in vitro* of radioprotective efficacy of curcumin and resveratrol. *Radiation measurements*, 46(9), 962-966.
- Sedlak, T. W., Saleh, M., Higginson, D. S., Paul, B. D., Juluri, K. R. y Snyder, S. H. (2009). Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(13), 5171-5176.
- Seifter, E., Rettura, G., Padawer, J., Stratford, F., Weinzwieg, J., Demetriou, A. A. y Levenson, S. M. (1984). Morbidity and mortality reduction by supplemental vitamin A or  $\beta$ -carotene in CBA mice given total-body  $\gamma$ -radiation. *Journal of the National Cancer Institute*, 73(5), 1167-1177.
- Shaw, L. M., Bonner, H. S. y Brown, D. Q. (1994). Metabolic pathways of WR-2721 (ethiol, amifostine) in the BALB/c mouse. *Drug metabolism and disposition*, 22(6), 895-902.
- Shishodia, S. (2013). Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. *Biofactors*, 39(1), 37-55.
- Sil, S., Bose, T., Roy, D. y Chakraborti, A. S. (2004). Protoporphyrin IX-induced structural and functional changes in human red blood cells, haemoglobin and myoglobin. *Journal of biosciences*, 29(3), 281-291.
- Sisein, E. A. (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2(2), 110-118.
- Smith, T. A., Kirkpatrick, D. R., Smith, S., Smith, T. K., Pearson, T., Kailasam, A. y Agrawal, D. K. (2017). Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *Journal of translational medicine*, 15(1), 232.
- Spilka, R., Ernst, C., Mehta, A. K., y Haybaeck, J. (2013). Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer letters*, 340(1), 9-21.
- Stillman, A. E. (1990). Jaundice. In *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Butterworths.
- Stocker, R., Glazer, A. N. y Ames, B. N. (1987b). Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), 5918-5922.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. y Ames, B. N. (1987a). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235(4792), 1043-1046.
- Strange, K. (2016). Drug discovery in fish, flies, and worms. *ILAR journal*, 57(2), 133-143.
- Suryavanshi, S., Sharma, D., Checker, R., Thoh, M., Gota, V., Sandur, S. K. y Sainis, K. B. (2015). Amelioration of radiation-induced hematopoietic syndrome by an antioxidant chlorophyllin through increased stem cell activity and modulation of hematopoiesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 56-70.
- Tajmir-Riahi, H. A., Neault, J. F., y Diamantoglou, S. (2004). DNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin as antimutagenic agents. In *Photosynthesis Research Protocols* (pp. 159-171). Humana Press.
- Tanarro S.A y Tanarro A. 2008. Diccionario Inglés-español sobre tecnología nuclear. 2ed. Madrid Foro Nuclear.
- Tang, F. R., Loke, W. K. y Khoo, B. C. (2017). Low-dose or low-dose-rate ionizing radiation-induced bioeffects in animal models. *Journal of radiation research*, 58(2), 165-182.
- Tomaro, M. L. y del C Batlle, A. M. (2002). Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *The international journal of biochemistry y cell biology*, 34(3), 216-220.
- Trajković, S., Dobrić, S., Jačević, V., Dragojević-Simić, V., Milovanović, Z. y Đorđević, A. (2007). Tissue-protective effects of fullereneol C<sub>60</sub> (OH)<sub>24</sub> and amifostine in irradiated rats. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), 39-43.
- Tumolo, T. y Lanfer-Marquez, U. M. (2012). Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties?. *Food Research International*, 46(2), 451-459.

- Ugur, B., Chen, K. y Bellen, H. J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Disease models y mechanisms*, 9(3), 235-244.
- United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation UNSCEAR (2012). Source, effects and risks of ionizing radiation disponible en <http://www.unscear.org/unscear/en/publications/2012.html> visitado el 20 de febrero de 2020.
- Valášková, P., y Muchová, L. (2016). Metabolism of bilirubin and its biological properties. *Klinická biochemie a metabolismus*, 24(4).
- Vidal, L. M., Pimentel, E., Cruces, M. P. y Sánchez-Meza, J. C. (2018). Different radiation dose rate as radioprotection and the cross effect with chromium using *in vivo* somatic cells of *Drosophila*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 63, 16-20.
- Vidal, L.M.E., Pimentel, E.P., Cruces, M.P. y Sánchez, J.C.M. (2014) Genetic damage induced by CrO<sub>3</sub> can be reduced by low doses of Protoporphyrin-IX in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Reports*, 1, 894–899.
- Vives-Soler, A., López-López, J. y Jané-Salas, E. (2017). Xerostomía y radioterapia de cabeza y cuello: actualización. *Revista Colombiana de Cancerología*, 21(1), 26-32.
- Vogel, H. G. y Vogel, W. H. (Eds.). (2013). *Drug discovery and evaluation: pharmacological assays*. Springer Science y Business Media.
- Wasserman, T. H. y Brizel, D. M. (2001). The role of amifostine as a radioprotector. *Oncology-Williston Park Then Huntington-*, 15(10), 1349-1356.
- Williams, M., Krootjes, B. B., van Steveninck, J. y van Der Zee, J. (1994). The pro-and antioxidant properties of protoporphyrin IX. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1211(3), 310-316.
- Wu, T. W., Fung, K. P. y Yang, C. C. (1994). Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox. *Life sciences*, 54(25), PL477-PL481.
- Würgler, F. E., Sobels, F. H. y Vogel, E. W. (1984). *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. *Handbook of mutagenicity test procedures/edited by BJ Kilbey*.
- Wurgler, F. E., Sobels, F. H., y Vogel, E. W. (1984). *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. *Handbook of mutagenicity test procedures/edited by BJ Kilbey*.
- Zakharenko, L. y Perepelkina, M. (2009). The possible effect of transposons on the *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 670(1-2), 1-5.
- Zámocký, M., Gasselhuber, B., Furtmüller, P. G., y Obinger, C. (2012). Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 525(2), 131-144.
- Ziberna, L., Martelanc, M., Franko, M. y Passamonti, S. (2016). Bilirubin is an endogenous antioxidant in human vascular endothelial cells. *Scientific reports*, 6, 29240.