



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MODULACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO POR LA PROTOPORFIRINA-  
IX EN *D. melanogaster* DEFICIENTE EN Cat y Sod Y TRATADA CON  
CASIOPEINA (Cas III-Ea) Y Cr (VI)”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**PRESENTA:**

**LUZ MARIA VIDAL ESCOBAR**

**DIRIGIDA POR:**

**DR. JUAN CARLOS SÁNCHEZ MEZA**

**DR. ADALBERTO EMILIO PIMENTEL PEÑALOZA**



**TOLUCA, MÉXICO, OCTUBRE DE 2014**



**UAEM** | Universidad Autónoma  
del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)  
OFICIO NO 442/2014

Toluca, México, 24 de septiembre de 2014

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES  
LUZ MARÍA VIDAL ESCOBAR  
FACULTAD DE QUIMICA  
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

**FIRMA**

Dr. Juan Carlos Sánchez Meza  
**PRESIDENTE**

Dra. Gabriela Roa Morales  
**SECRETARIO**

Dra. Araceli Amaya Chávez  
**PRIMER VOCAL**

Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza  
**SEGUNDO VOCAL**

Dra. Martha Patricia Cruces Martínez  
**TERCER VOCAL**

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván  
**SUPLENTE**

Dra. María Dolores Hernández Navarro  
**SUPLENTE**

**ATENTAMENTE  
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO  
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"**

  
**M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ  
DIRECTORA**



**U. A. E. M.  
FACULTAD DE QUIMICA  
DIRECCION**



c.c.p. Archivo

[www.uaemex.mx](http://www.uaemex.mx)

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México  
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • [fquim@uaemex.mx](mailto:fquim@uaemex.mx)

**ESTA TESIS SE REALIZO EN SU TOTALIDAD EN EL INSTITUTO NACIONAL DE  
INVESTIGACIONES NUCLEARES, COMO PARTE DEL PROYECTO CB-306**

**“MODULACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO POR LA PROTOPORFIRINA-IX EN *D.*  
*melanogaster* DEFICIENTE EN Cat y Sod Y TRATADA CON CASIOPEINA (Cas III-Ea)  
Y Cr (VI)”**

**Biol. Luz Maria Vidal Escobar**

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REGISTRADO BAJO EL TÍTULO DE “MODULACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO POR LA PROTOPORFIRINA-IX EN *D. melanogaster* DEFICIENTE EN Cat y Sod Y TRATADA CON CASIOPEINA (Cas III-Ea) Y Cr (VI)”.**

**EL PROYECTO SE INSCRIBE EN LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA EN EL ÁREA DE EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA DE SUSTANCIAS Y SU APLICACIÓN, DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada con número de registro 481415.**

**Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares ININ por la beca otorgada.**

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>3. Antecedentes</b>	
<b>3.1 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Metales pesados como inductores de estrés oxidante</b>	<b>8</b>
<b>3.2.1 Cromo como inductor de daño genético</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Antioxidantes endógenos y exógenos</b>	<b>13</b>
<b>3.3.1 Capacidad antioxidante de las porfirinas</b>	<b>17</b>
<b>3.4 Uso de las casiopeínas® como antineoplásicos</b>	<b>21</b>
<b>3.5 <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba</b>	<b>25</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>32</b>
<b>5. Hipótesis</b>	<b>32</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>7. Material y método</b>	<b>34</b>
<b>8. Resultados</b>	<b>38</b>
<b>9. Discusión</b>	<b>44</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>48</b>
<b>12. Carta de envío de artículo</b>	<b>57</b>
<b>13. Artículo</b>	<b>58</b>

## 1. RESUMEN

La contaminación ambiental se ha asociado con el incremento de enfermedades crónicas degenerativas. Dentro de los contaminantes más peligrosos se encuentran los metales pesados, uno de ellos es el cromo hexavalente, considerado por la FDA como carcinógeno. Ante el incremento de enfermedades relacionadas con la contaminación, surgen estrategias encaminadas a combatirlas, una de ellas es la “quimio-prevención. Dentro de los compuestos con características quimio-preventivas se encuentra la PP-IX, que ha mostrado tener propiedades antioxidantes. Sin embargo el incremento en la incidencia de cáncer ha inducido al desarrollo de nuevos antineoplásicos, uno de ellos son las casiopeínas, que son moléculas que tienen un centro activo de  $\text{Cu}^{2+}$ . El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del pre-tratamiento con PP-IX sobre el daño genético y la productividad inducido por el Cr (VI) y la (Cas III-Ea). Para evaluar la toxicidad de la PP-IX, se cuantificó la viabilidad de larvas pre-tratadas 24 h con: 0.69, 6.9 y 69 mM, para medir su capacidad antimutagénica se siguió el mismo pre-tratamiento, una vez concluido las larvas se trataron con 0.025, 0.25, 1.25, 2.0 y 2.5 mM de  $\text{CrO}_3$ . La mutagenicidad de la Cas III-Ea se midió tratando larvas de 48 h de edad con 0, 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 mM. La toxicidad se evaluó con la concentración 1.0 mM de Cas III-Ea, cuantificando el número de cerdas y el tamaño del ala. La productividad se evaluó en células germinales de machos tratados con 0, 0.1, 0.5 y 1.0 mM de Cas III-Ea. Los resultados aportaron que la concentración de 6.9 mM de PP-IX fue la que presentó menor toxicidad. La concentración de 69 mM de PP-IX fue la única que incremento la frecuencia de mutación basal. Los resultados del efecto de la PP-IX sobre la acción del cromo indicaron que el potencial antimutagénico lo tiene la concentración de 0.69 mM, al reducir el daño inducido por las concentraciones de 0.25, 1.25, 2.0 y 2.5 mM de  $\text{CrO}_3$ , las concentraciones de 6.9 y 69 mM de PP-IX solo disminuyeron el daño inducido por 2.5 mM de  $\text{CrO}_3$ . El tratamiento con Cas III-Ea, mostro que las concentraciones de 0.1, 1.0 y 1.5 mM incrementaron significativamente el daño genético, sin embargo no se mostró relación con dosis. La toxicidad de 1.0 mM de Cas II-Ea indicó que disminuye tanto el número de células como el área del ala. Los tratamientos con Cas III-Ea en las cepas deficientes en *Cat* y *Sod* no afectaron su productividad. Se concluye que la concentración de 0.69 mM es la más eficiente en disminuir el daño genético inducido por el  $\text{CrO}_3$  y que la Cas III-Ea induce daño genético sin mostrar relación con la dosis y la deficiencia en enzimas antioxidantes.

## ABSTRACT

The environmental pollution has been associated with the increase of chronic degenerative diseases. The heavy metals are among the most dangerous pollutants; one of them is hexavalent chromium Cr (VI), which is widely used in industry and it is cataloged as a carcinogenic. Due to this situation the need of establish strategist focused to reduce the occurrence of degenerative diseases arises; one of them is the “chemoprevention” which consist of the consumption of a chemical compound of natural origin that inhibits or reverses the carcinogenic or mutagenic in its pre-malign estate. The porphyrins are among the compounds with chemoprevention properties, one of them is the protoporphyrin-IX (PP-IX) which has been associated with the synthesis of antioxidant enzymes. The increasing number of cancer incidents has promoted the development of new less toxic chemotherapeutics, but that show at the same time higher antitumor capacity, one of them is the casiopeinas. These molecules have an active center of  $2^+$  copper and have shown cytostatic and cytotoxic activity. The objective of this research was to evaluate the inhibitory action of the PP-IX of genetic damages induced by  $\text{CrO}_3$  and elicit the mechanism of action of casiopeina III-Ea. To evaluate the toxicity of PP-IX larvae of 48 h of age for 24 h with 0.69, 6.9 and 69 mM were pretreated. To measure its antimutagenic capacity the same protocol was followed but once the pretreatment was completed, the larvae were treated with 0.025, 0.25, 1.25, 2.0 and 2.5 mM  $\text{CrO}_3$ . The Cas III-Ea mutagenicity was measured by treating larvae of 48 h of age with 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 mM. The preparations with 1.0 Mm treatment were photographed to quantify the number of bristle and wing size. Male with 0, 0.1, 0.5 and 1.0 mM of mutagenic were treated paired with three litters of females for the productivity test. The results provided that the concentration of 69 mM of PP-IX is toxic, and that the potential antimutagenic has the concentration of 0.69 mM. When the induced damage was reduced by the treatment with  $\text{CrO}_3$ , 6.9 and 69 mM of PP-IX it just decreased the damage induced by 2.5 mM of  $\text{CrO}_3$ . The concentration 0.1, 1.0 and 1.5 mM of Cas III-Ea significantly increased the genetic damage without showing doses response, the 1.0 mM concentration decreases both the number of cells as the wing area. Cas III-Ea treatments in strain deficient *Cat* and *Sod* do not affect productivity. We conclude that the concentration of 0.69 Mm is the most efficient in reducing the genetic damage induced by  $\text{CrO}_3$  and that the Cas III-Ea induce genetic damage without showing doses response nor the antioxidants enzymes deficiency.

# **MODULACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO POR LA PROTOPORFIRINA-IX EN *D. melanogaster* DEFICIENTE EN Cat y Sod Y TRATADA CON CASIOPEINA (Cas III-Ea) Y Cr (VI)”**

## **2. INTRODUCCION**

La exposición a contaminantes ambientales, ha traído como consecuencia el incremento de enfermedades crónico degenerativas. Entre los contaminantes ambientales con mayor impacto a la salud se encuentran los metales pesados, que de forma natural están presentes en el ambiente, sin embargo las actividades industriales y mineras incrementan su concentración, lo que constituye un riesgo serio para el medio ambiente y la salud. En particular el cromo hexavalente es un metal que contamina el ambiente de manera severa por su utilización amplia en la industria. Actualmente se sabe que es un elemento peligroso por su capacidad oxido reductora, ya que durante este proceso se generan especies reactivas de oxígeno que dañan macromoléculas e interfieren con el funcionamiento normal de la célula (Téllez *et al.*, 2004; Lauwerys, 2007). El Cr (VI) está catalogado como carcinógeno por la International Agency for Research on Cancer (IARC, 1990), lo que lo coloca dentro de los metales de mayor importancia toxicológica (Edling *et al.*, 1986).

Ante este panorama surge la necesidad de establecer estrategias encaminadas a reducir la ocurrencia de las enfermedades degenerativas provocadas por la exposición. La primera, consiste en evitar la exposición a aquellos agentes que tienen la capacidad de modificar el material genético y por lo tanto incrementar el riesgo de contraer padecimientos como el cáncer. Sin embargo, en la práctica esto es casi imposible, pues muchos de ellos se encuentran de manera natural en la atmósfera (Jakszyn and González, 2006). La segunda alternativa consiste en incrementar el consumo de sustancias, principalmente aquellas de origen natural, capaces inhibir o revertir la mutagénesis o la carcinogénesis en su estado pre-maligno, a esto se le denomina “quimio-prevención”. Este nivel de prevención, está dirigido a los individuos clínicamente sanos con la finalidad de evitar la mutación y la iniciación del cáncer, interceptando o inactivando los mutágenos y/o carcinógenos o incrementando la expresión de las enzimas encargadas de la reparación al ADN o las antioxidantes tales como superóxido dismutasa (Sod), catalasa (Cat) y glutatión peroxidasa (Gpx) (De flora y Ferguson, 2005).

Entre los compuestos naturales con propiedades quimio-preventoras se encuentran las porfirinas, una de ellas es la clorofilina cupro sódica (CCS). Se ha demostrado que la CCS reduce el daño genético inducido por mutágenos químicos, mezclas complejas, componentes de la dieta y radiación (Egner, 2001; Dashwood, 2002; Ferguson y Philpott, 2008). Aunque la mayoría de las investigaciones han aportado evidencia de que la CCS es un excelente antimutágeno y/o anticarcinógeno, algunas otras han demostrado que también puede incrementar el daño al ADN ya sea el espontáneo (Rigonato *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2000) o el inducido por otros agentes (Pimentel *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Cruces *et al.*, 2003; Cruces *et al.*, 2009). Otros resultados han sugerido que la CCS puede actuar como antioxidante (Bolor *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008) u oxidante (Cruces *et al.*, 2003) y que este efecto dual está relacionado con la concentración (Cruces *et al.*, 2009).

Recientemente se estudió la contribución de los dos principales componentes de la CCS, una porfirina sin centro metálico (PP-IX) y el cobre, los resultados de esta investigación sugirieron que el cobre es responsable de prolongar el efecto antimutagénico, mientras que la acumulación en el organismo de la parte orgánica de la molécula (el grupo porfirínico) incrementa el daño genético inducido (Pimentel *et al.*, 2011). Afonso y colaboradores (1999), encontraron que la PP-IX incrementa la actividad de la enzima catalasa y de la enzima superóxido dismutasa después de su administración. Recientemente Pimentel y colaboradores (2013) encontraron que la PP-XI incrementa el periodo de vida de la cepa silvestre Canton-S de *Drosophila melanogaster*, mientras que no lo modifica en la cepa deficiente en catalasa, lo que infiere que la PP-IX brinda protección contra el estrés oxidante en específico contra el radical  $H_2O_2$ .

Una vez que los mecanismos de defensa celular y las acciones de prevención no hayan sido suficientes para evitar el desarrollo del cáncer, se están desarrollando antineoplásicos menos tóxicos pero con mayor capacidad antitumoral para su tratamiento, uno de ellos son las casiopeinas, una gran familia de moléculas que tienen un centro de cobre  $2^+$  y un aminoácido similar que da especificidad tumoral (Mejía y Ruiz, 2008). Hasta el momento se han sintetizado alrededor de 100 casiopeinas, algunas de ellas han mostrado una clara actividad citostática y citotóxica en cultivo de tejidos tanto sanos como cancerosos. Se ha postulado que la posible

capacidad antineoplásica de las casiopeinas se deba a que este compuesto interactúa con el ADN por intercalación de sus compuestos aromáticos, al demostrarse su capacidad de inhibir la proliferación celular y producir muerte celular por apoptosis dependiendo de la dosis (Galindo *et al.*, 2011).

El presente estudio tiene como fin evaluar el efecto del pre-tratamiento con PP-IX, sobre el daño genético y la productividad inducido por el Cr (VI) y la casiopeina (Cas III-Ea).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante

Durante los procesos biológicos y en la constante interacción con el ambiente, se generan especies químicas conocidas como radicales libres. Un radical libre es cualquier especie que se caracteriza por presentar uno o más electrones desapareados y por ser muy reactivos (Halliwell y Gutteridge, 2006). Dentro de los radicales libres se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ERO), que son moléculas cuyos radicales contienen oxígeno.

La mayor parte de las ERO se produce por procesos como: la respiración, 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. De forma exógena las ERO pueden ser producidas por varios xenobióticos tales como: fármacos, compuestos clorados, iones metálicos y la radiación (Valko *et al.*, 2006).

El oxígeno molecular en su forma más estable ( $O_2$ ) se puede considerar como un radical libre por tener dos electrones no apareados, lo que lo hace un potente agente oxidante, sin embargo, para oxidar una molécula no radical y aceptar un par de electrones, estos deben estar paralelos a los electrones del  $O_2$ , esta condición hace que este acepte sólo un electrón a la vez, lo que explica porqué reacciona lentamente con la mayoría de las moléculas no radicales.

La reducción parcial del oxígeno molecular genera otras ERO, que incluyen al anión superóxido ( $O_2^-$ ), al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). El anión superóxido es un radical simple, producido por el complejo uno y tres de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, con la adición de un electrón al oxígeno molecular, el radical  $O_2^-$  puede ser protonado a pH bajo ( $pK_a = 4.8$ ) para formar el radical perhidroxilo ( $HO_2^\cdot$ ). El  $H_2O_2$  es estable y menos reactivo que el  $O_2^-$ , sin embargo, en presencia de metales de transición como el  $Fe^{2+}$ , induce la formación del radical  $OH^\cdot$ . El  $OH^\cdot$  es un oxidante muy fuerte y puede iniciar reacciones en cadena con una gran variedad de moléculas orgánicas, que pueden originar la peroxidación de lípidos, así como la inactivación de enzimas y la degradación de ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 2006) (Fig. 1).

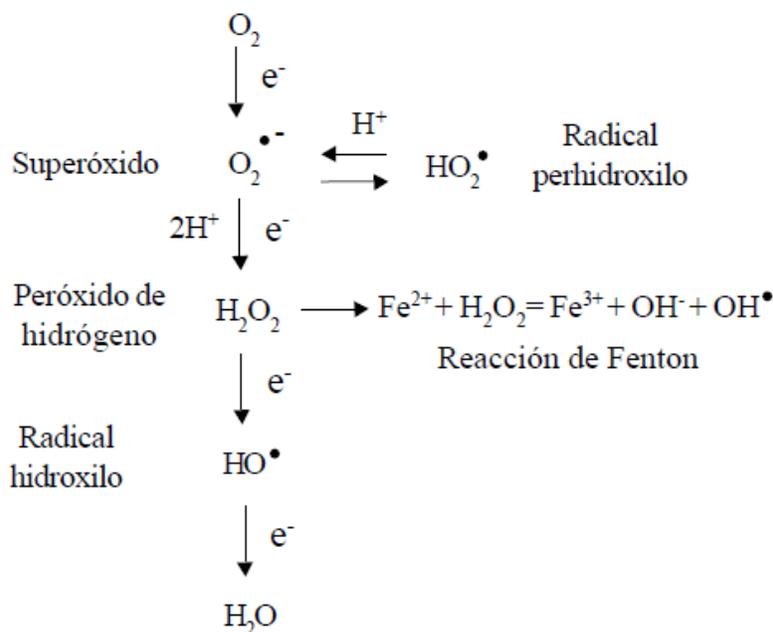


Fig. 1. Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO), (Tomado de Desikan *et al.*, 2005).

Las ERO a concentraciones fisiológicas normales actúan como mensajeros secundarios, que están involucrados en la regulación de la función y la actividad de varias vías de señalización celular (Valko *et al.*, 2007). Sin embargo el desequilibrio homeostático del proceso de oxidoreducción (Redox) de la célula, induce a un estado conocido como estrés oxidante, que se origina cuando los mecanismos de defensa antioxidante son sobrepasados (Martínez, 2005). El estrés oxidante se ha relacionado con varias condiciones patológicas, que incluyen enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, envejecimiento celular, desórdenes neurológicos, diabetes y cáncer (García *et al.*, 1993, Valko *et al.*, 2007).

La exposición a diferentes compuestos, principalmente aquellos de origen antropogénico son responsables de la inducción de estrés oxidante en el hombre. Los individuos con mayor riesgo son los trabajadores ocupacionalmente expuestos a agentes oxidantes. En el área farmacéutica los más comunes son los anestésicos volátiles, que en el personal expuesto a ellos disminuye significativamente la actividad antioxidante de los eritrocitos y los niveles de los elementos trazas, concluyendo que el sistema antioxidante es afectado por el daño de los radicales libres en anestesistas y enfermeros que han estado expuestos crónicamente. Otros compuestos que inducen estrés oxidante por la inhibición del sistema antioxidante son el ozono, el disulfuro de carbono,

los petroquímicos y los plaguicidas. También los metales pesados como el plomo, el cromo, el aluminio, el cobalto, el tungsteno, el níquel, el cadmio y el mercurio que son usados ampliamente en la industria inducen estrés oxidante. (Georgieva *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003).

### **3.2 Los metales pesados como inductores de estrés oxidante**

La contaminación atmosférica ha aumentado notablemente y su acción nociva se ha diseminado sobre el planeta afectando a prácticamente todos los ecosistemas (EPA-600/1-78-023,1978). Dentro de los contaminantes ambientales se encuentran los metales pesados, que tienen efectos negativos en distintas etapas del desarrollo de los individuos, principalmente en el crecimiento y supervivencia, el periodo más vulnerable son las primeras etapas del ciclo de vida. También provocan alteración en el número de descendientes y de eventos reproductivos, así como en la ontogenia y en el periodo de vida (Natale *et al.*, 2000; Boada *et al.*, 2007).

Los metales han sido usados ampliamente en la industria debido a que tienen numerosas aplicaciones comerciales, y en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Sin embargo varios estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición a algunos metales tiene efectos tóxicos y carcinogénicos tanto en animales como en humanos (Valko *et al.*, 2005).

La importancia de los metales en los sistemas vivos estriba en que participan en una gran variedad de procesos biológicos. Se sabe que los metales modulan la expresión genética por acción de varios factores transcripcionales que tienen importancia en el crecimiento, desarrollo y muerte celular (Valko *et al.*, 2006), a su vez la ausencia de los metales altera el crecimiento y diferenciación celular (Evan y Vousden, 2001).

Es importante que los mecanismos encargados del almacenamiento, transporte y secreción de los iones metálicos en la célula se encuentren en homeostasis (Bertini y Cavallero, 2008), ya que su desequilibrio puede inducir a que el ion metálico en exceso se una a diferentes proteínas reemplazando al metal original de su sitio de unión, o inducir estrés oxidante, incrementar la peroxidación lipídica o interactuar con el ADN modificando su estructura (Halliwell y Gutteridge, 2007; Valko *et al.*, 2005).

Algunos estudios se han enfocado en la toxicidad y carcinogenicidad que inducen los metales, enfatizando su participación en la generación de especies reactivas de oxígeno, en la inhibición de las enzimas antioxidantes y en la alteración de la permeabilidad de la membrana celular (Jaime *et al.*, 2007). Los metales tales como el hierro, el cobre, el cromo y el cobalto generan radicales libres en los sistemas vivos, sin embargo se conoce poco de su participación en la activación redox (Rahman, 2007; Mates *et al.*, 2008). Posiblemente influyen en la reacción cíclica durante la transferencia de electrones entre metales y sustrato, interviniendo en el equilibrio homeostático (Lindeque *et al.*, 2010).

### **3.2.1 Cromo como inductor de daño genético**

El Cromo (Cr) es un metal con número atómico 24 y estados de oxidación +2, +3, +6 y peso molecular 51.996, blanco plateado, brillante, duro, quebradizo y resistente a la corrosión (Marrett *et al.*, 1986). Los estados de oxidación del cromo más estables e importantes biológicamente son: III, y VI (US Department of Health, 1993), su efecto benéfico, la toxicidad y la carcinogenicidad están relacionados con el estado de oxidación del metal.

El Cr (III) no es tóxico (Frausto da Silva y Williams, 1991; Gauglhofer y Bainchi, 1991), es esencial para la dieta en dosis bajas y está presente en comida fresca como: pan, carne, vegetales y agua potable (Vincent, 2010). El cromo (III) se requiere para potenciar la insulina y para el metabolismo normal de la glucosa (Singh *et al.*, 1998), colesterol y ácidos grasos (Téllez *et al.*, 2004). La carencia de Cr (III) en tejidos humanos se ha correlacionado con la incidencia de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hiperglicemia, glucosuria, incremento de grasas en el cuerpo y problemas de fertilidad (De Flora *et al.*, 1995). Sin embargo, en concentraciones altas es tóxico (Natale *et al.*, 2000) ya que se ha encontrado que las especies de cromo (III) son capaces de provocar peroxidación lipídica (Shi *et al.*, 1993 b).

El estado hexavalente del cromo es más importante desde el punto de vista de la toxicología, es considerado carcinógeno del grupo I por la International Agency for Research on Cancer (IARC, 1990), por lo tanto todos los compuestos de Cr (VI), independientemente de su grado de

solubilidad, son considerados carcinógenos, dependiendo de la dosis y del tiempo de exposición, el órgano más susceptible a su carcinogenicidad es el pulmón y el riesgo se incrementa cuando las concentraciones de Cr (VI) sobrepasan los mecanismos de defensa celular (Singh *et al.*, 1998; Quievryn *et al.*, 2003).

El Cr (VI) ingresa al ambiente principalmente a través de residuos líquidos, debido a su amplia utilización en la industria (Hamilton y Wheterhan, 1988). Está presente en los cromatos, dicromatos y el ácido crómico (Edling *et al.*, 1986) que se emplean en actividades tan diversas como: la minería, la preservación de la madera, la soldadura, la fabricación de cemento, las industrias del cuero, la fotográfica, la galvánica, la metalúrgica y la producción de acero inoxidable (Casarett, 2001; Téllez *et al.*, 2004), la industria textil, la industrias de papel y cartón, la industria petroquímica, la fabricación de abonos, vidrio, pintura, asbesto, cerámica y fungicidas (Bodar *et al.* 1990, Rengaraj *et al.*, 2001). Todos estos procesos industriales constituyen el 70% de emisión de Cr al ambiente.

Las vías de de exposición al Cr (VI) son: la inhalación, la ingestión y la absorción a través de la piel. Durante la exposición ocupacional las vías respiratorias y la piel son la principal ruta de entrada al cuerpo (De Flora *et al.*, 1995). El mayor riesgo ocupacional es el procesamiento del mineral cromita que se usa para producir cromatos, ya que se encontró que en los trabajadores expuestos a este, la frecuencia de cáncer pulmonar fue muy elevada (Téllez *et al.*, 2004; Sunderman, 2001). Otro riesgo potencial lo constituyen las partículas liberadas por la quema de soldaduras, especialmente de acero inoxidable que tiene entre 14 y 18% más contenido de cromo (Frausto da Silva y Williams, 1991; Gaughofer y Bainchi, 1991). El Cr (VI) se elimina principalmente por vía renal (60%) y en menor grado por las heces, el cabello, las uñas, la leche y el sudor (Can, 1995).

El Cr (VI) es reducido eficientemente por los jugos salivales y gástricos (De Flora, 2000) y absorbido fácilmente por el intestino, posteriormente transportado por la sangre y distribuido a nivel de médula ósea, pulmones, ganglios linfáticos, bazo, riñón, e hígado (ATSDR, 2006; Lauwerys, 2007). El ascorbato es el reductor biológico más importante del Cr (VI) en células bajo condiciones *in vivo* y tiene comportamiento dual en su toxicidad, propiedad antioxidante

fuera y pro-oxidante dentro de la célula (Quievryn *et al.*, 2003). Un aspecto importante descubierto por Standeven y Watterhahn en 1989, es que el cromo (VI) puede ingresar a la célula a través de un canal iónico, impermeable al Cr (III). En este proceso el glutatión favorece la absorción del cromo (VI) formando un aducto glutatión-Cr (VI). La conjugación con el glutatión no siempre conduce a la eliminación del compuesto, contrariamente puede desempeñar un papel importante como mediador de sus efectos adversos, convirtiéndose en el vehículo para el transporte *in vivo* de ciertos metabolitos reactivos desde su sitio de formación a otros distantes (Baillie y Slatter, 1991).

Los intermediarios reactivos que se forman durante su reducción son: Cr (V), Cr (IV) y Cr (III), durante este proceso se generan los radicales hidroxilo, singulet de oxígeno, (ATSDR, 2006; Lauwerys, 2007) y el anión superóxido que han sido detectados usando espectroscopia EPR. También ha sido demostrado que el Cr (III) puede reducirse a Cr (II) por reductores biológicos y generar el radical hidroxilo que se ha detectado por espectroscopia de resonancia de electrón paramagnético y HPLA (Shi *et al.*, 1993 b). Durante la reducción de Cr (VI) a Cr (III), los radicales libres pueden quedar ligados a macromoléculas (ADN o proteínas) o pequeñas moléculas (glutatión, cisteína) interfiriendo en el funcionamiento normal de la célula (Connett y Whetterhahn, 1983) (Fig. 2). Las consecuencias más inminentes de su reducción son: daño o ruptura a la cadena de ADN, formación de aductos cromo-ADN, enlaces cruzados del ADN, enlaces cruzados entre ADN y proteínas, intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (Singh *et al.*, 1998; Téllez *et al.*, 2004; Lauwerys, 2007). El daño al ADN es el responsable de los cambios funcionales observados en la replicación y transcripción, aspectos cruciales en el efecto carcinogénico de los compuestos de cromo (VI) (Standeven y Wetterhahn, 1989) (Fig. 3).

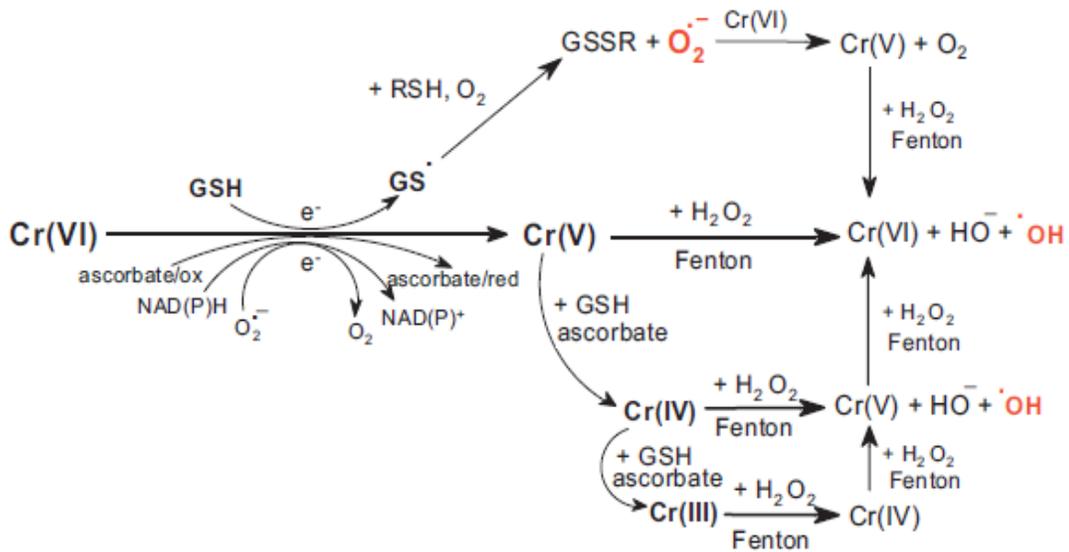


Fig. 2. Reducción biológica del Cr (VI), (Tomado de Jomovaa y Valko, 2011).

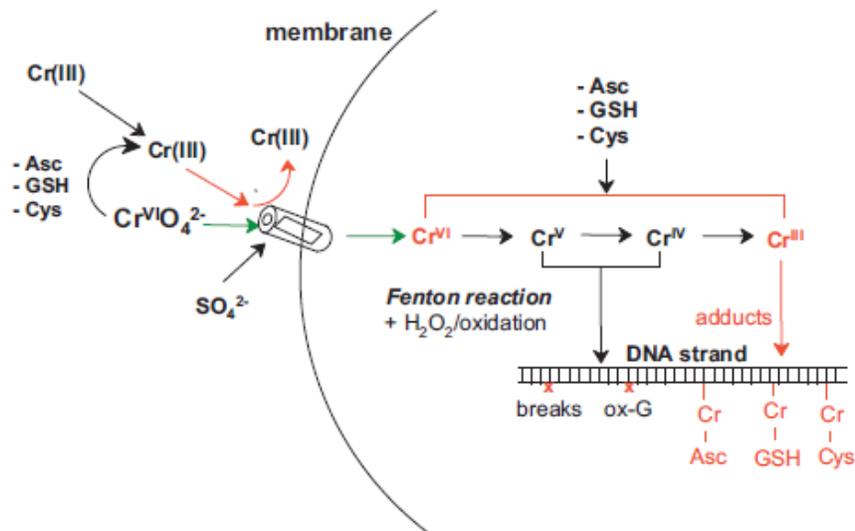


Fig. 3. Entrada del Cr (VI) a la célula y daño al ADN, (Tomado de Jomovaa y Valko, 2011).

Los procesos de reducción intracelular de Cr (VI) por los quelatos disminuyen potencialmente la carcinogenicidad del ion metálico. En los eritrocitos, el proceso de detoxificación del Cr (VI), se debe a que es reducido a estados de oxidación más bajos y forma complejos con proteínas (Kerger *et al.*, 1997), al acomplejarse no puede salir de la célula y dirigirse de nuevo al plasma

(Zhitkovich, 2005; De Flora *et al.*, 1995). El proceso de reducción de cromo Cr (VI) a Cr (III) por quelación no es absolutamente seguro, debido a que durante este proceso se generan varios radicales libres, que pueden ser activados o detoxificados dependiendo del sitio de la reducción intracelular y su proximidad al ADN.

La inhalación de niveles altos de Cr (VI) puede provocar irritación de la cavidad nasal y dificultades para respirar (Izzotti *et al.*, 1998). En la piel, el contacto con cromo puede causar úlceras. También se ha asociado con el incremento en la tasa de tumores estomacales en los humanos y animales por beber agua contaminada con Cr (VI). En organismos de laboratorio se ha observado daño a los espermatozoides y en el sistema reproductor de los machos.

En 1986, Kawanishi y colaboradores estudiaron la reactividad de compuestos de cromo con el ADN y observaron que el cromo inducía rupturas a nivel de las bases nitrogenadas, especialmente en la guanina y provocaba la formación de oligonucleótidos lo que indica la ruptura del esqueleto de desoxi-ribosa fosfato. Un aspecto que cabe destacar es, que como consecuencia de la interacción del cromato de sodio con agua oxigenada, se generan dos especies altamente reactivas: el radical OH que reacciona con mononucleótidos y la desoxi-ribosa-5-fosfato, y el radical O<sub>2</sub> que reacciona con desoxiguanilato. La adición del agua oxigenada al medio de reacción no es arbitraria, sino que responde al hecho de que en el cuerpo existen fuentes de peróxido de hidrógeno.

En México el límite máximo permisible en la concentración de cromo en agua potable es de 0.05 mg/L. En el caso de la concentración en aire un ambiente seguro debe presentar menos de 5 µg de Cr (VI) por m<sup>3</sup>. La academia nacional de ciencia de EU ha establecido como seguro un consumo en adultos de Cr (VI) de 50 a 200 µg por día (Institute of medicine, 2001).

### **3.3 Antioxidantes endógenos y exógenos**

Halliwell y Gutteridge (1998) definieron como antioxidante a toda sustancia que cuando está presente en una concentración menor, respecto a la de un sustrato oxidable, retarda o previene su oxidación. Huang y colaboradores (2005), los definieron como aquellas sustancias que pueden captar especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno, o que tienen la propiedad de bloquear la

reacción redox y de inhibir los oxidantes reactivos que se forman, aparte algunos antioxidantes realizan su función auto-oxidándose, acelerando la iniciación, propagación y terminación de la reacción en cadena dando como resultado un radical antioxidante menos reactivo. Aunque los antioxidantes difieren en su eficacia dependiendo del sustrato, algunos son muy eficaces eliminando radicales libres y otros en formar quelatos (Niki y Noguchi, 2000).

El término antioxidante abarca una amplia gama de sustancias que se clasifican en endógenas y exógenas (Fig. 4). Los primeros son los fabricados por el organismo como mecanismo de protección celular y los exógenos son los que obtenemos de los alimentos.

Los organismos aeróbicos han desarrollado diferentes sustancias para evitar el daño que provoca el estrés oxidante, estos mecanismos antioxidantes son de carácter enzimático y no enzimático. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen: al ácido ascórbico, el tocoferol, los flavonoides, los alcaloides, la bilirrubina y los uratos. Estos eliminan directamente al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno por su capacidad antioxidante intrínseca (Halliwell, 2006). También se encuentra la vitamina E, presente en altas concentraciones en el germen de trigo, la A en la zanahoria o el aceite de hígado de pescado y la C en los cítricos o la guayaba. Los betacarotenos y flavonoides también son potentes antioxidantes exógenos (Potter, 1996).

Los antioxidantes enzimáticos incluyen a las enzimas: superóxido dismutasa (Sod), la ascorbato peroxidasa (AP), la glutatión peroxidasa (Gpx) y la catalasa (Cat), las hemo proteínas y la coenzima Q.

La Sod actúa como la primera línea de defensa en contra de las ERO, dismutando el  $O_2^-$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$ , posteriormente la enzima Cat transforma al  $H_2O_2$  en  $O_2$  y agua, mientras que la enzima Gpx cataliza la reducción de peróxidos (ROOH, inclusive al  $H_2O_2$ ) a alcoholes (ROH). El tripéptido glutatión (GSH, g-L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina), debido a su alta concentración intracelular (5-10 mM), se considera un regulador homeostático del estado de óxido-reducción celular. Otras enzimas, tales como las quinonas reductasa y hemo oxigenasa también pueden prevenir la formación de ERO mediante el intercambio de electrones.

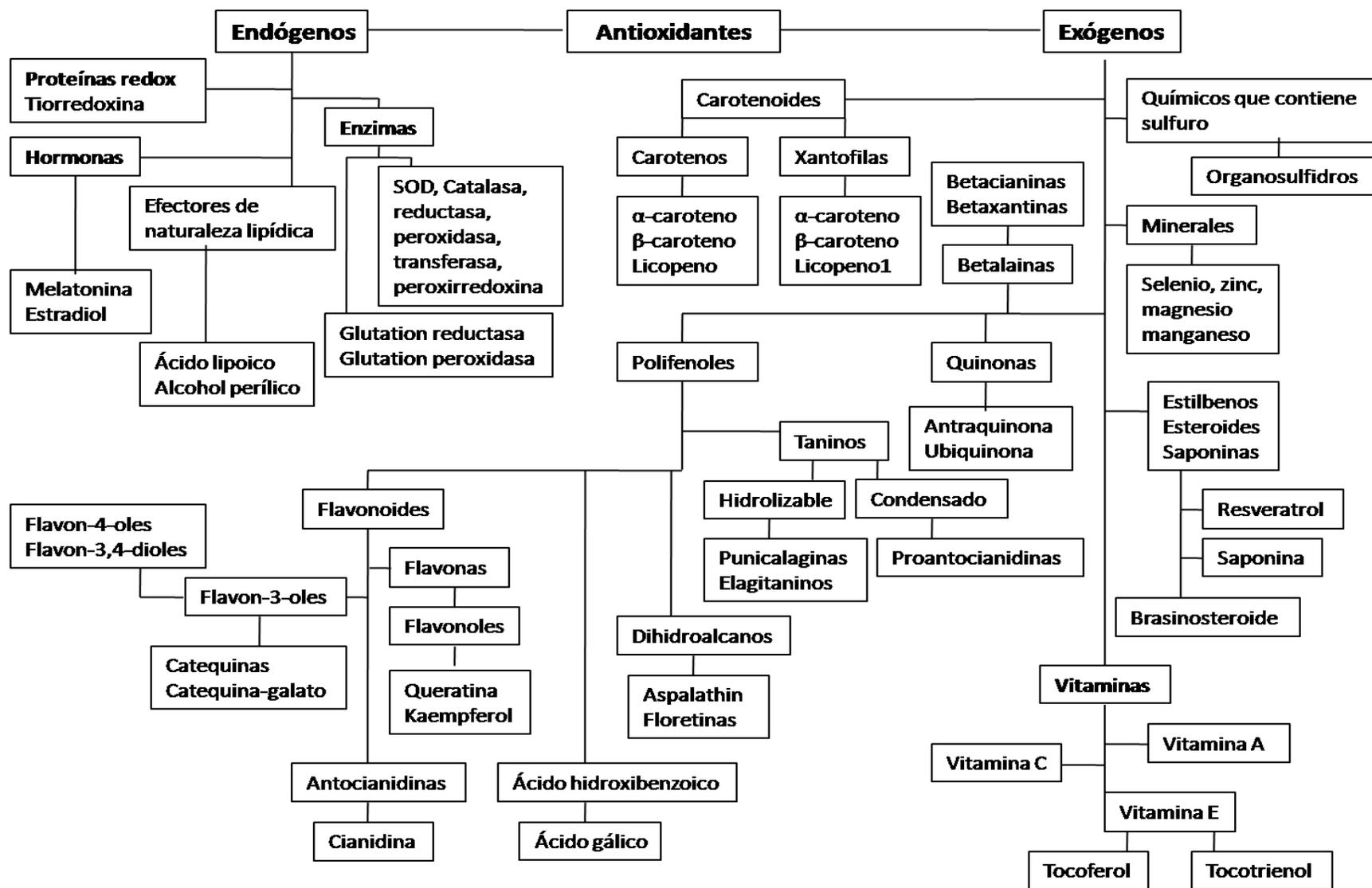


Fig. 4. Compuestos antioxidantes (Tomado de Wootton y Ryan, 2011).

A la familia de la superóxido dismutasa la constituyen la Sod mitocondrial (Mn Sod) y la Sod cobre/zinc (Zn/ Cu- Sod), estas dos enzimas dan cuenta del 100% de la actividad Sod intracelular (Fridovich, 1997). En bacterias se ha identificado a la EC-Sod y la Cu/Zn-Sodp o periplásmica en gram negativas cuya función es proteger a la célula contra el  $O_2^-$  exógeno. La última Sod descrita es una Ni Sod detectada en *Streptomyces*, es homotetramérica y no tiene homología con las Sod antes descritas (Ríos, 2003)

La catalasa es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en los seres humanos, aunque su actividad varía dependiendo del tejido; en el hígado y los riñones está más elevada, que en el tejido conectivo y el epitelial y prácticamente no existe en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas (Chance *et al.*, 1955). Esta enzima es una metaloproteína tetramérica unidas por interacciones no covalentes, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kD. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX, el contenido protohémico y el hierro representan un 1,1 % y 0,09 % respectivamente del peso molecular total de la enzima (Hadju *et al.*, 1977).

Otro compuesto exógeno que ha mostrado capacidad antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro* es la clorofila, así como su derivado semi-sintético la clorofilina cupro-sódica (CCS), que tiene un ión  $Cu^{+2}$  en el centro del anillo tetrapirrólico en lugar de  $Mg^{+2}$  como la clorofila y tiene sustituido el grupo fitol por sodio que la hace más soluble que la clorofila. Ambas moléculas son capaces de disminuir o inhibir el daño al ADN inducido por agentes mutagénicos como la radiación ionizante (Zimmering *et al.*, 1990; Pimentel *et al.*, 1999; Pimentel *et al.*, 2000) la aflatoxina (Dashwood *et al.*, 1991; Breinholt *et al.*, 1995) y las aminas heterocíclicas (Dashwood y Guo, 1995; Hayatsu *et al.*, 1999). Se han propuesto varios mecanismo de acción antioxidante, uno de ellos es que dona electrones a los radicales libres provocando su inactivación (Bloor *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008), otro es mediante el bloqueo de la peroxidación lipídica, o bien al inhibir las enzimas involucradas en la activación de carcinógenos (Waters *et al.*, 1996) y un último es que forma complejos con los mutágenos o carcinógenos antes de que interactúen con el ADN (Chernomorsky *et al.*, 1999).

### 3.3.1 Capacidad antioxidante de las porfirinas

Las porfirinas son compuestos derivados de la porfina con sustituyentes químicos en la periferia de su anillo. Están constituidas por cuatro anillos pirrólicos unidos a través de cuatro puentes metilo para formar un macrociclo altamente conjugado (Fig. 5). (Smith, 1978).

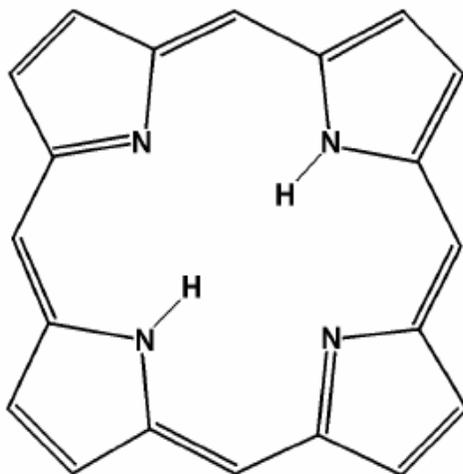


Fig. 5. Estructura básica de las porfirinas

(Tomada de <http://mazzally.wordpress.com/tag/heterociclicos/>)

El diámetro del anillo pirrólico de las porfirinas es limitado y por lo tanto no puede acomodarse fácilmente un metal cuyo radio iónico sea mayor a  $2.01\text{\AA}$ , lo que determina que el ión central se encuentre o no en la molécula (Smith, 1978; Wei *et al.*, 1992).

Las porfirinas desempeñan diferentes funciones metabólicas debido a sus sustituyentes periféricos y al metal que ocupa el centro del macrociclo (Smith, 1978). Por ejemplo: el grupo hemo está formado de un anillo de PP-IX con un ion hierro en el centro. El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación +2 y puede formar cinco o seis enlaces de coordinación dependiendo de la unión del  $\text{O}_2$  (Fig.6) (Lehmann y Carr, 1969).

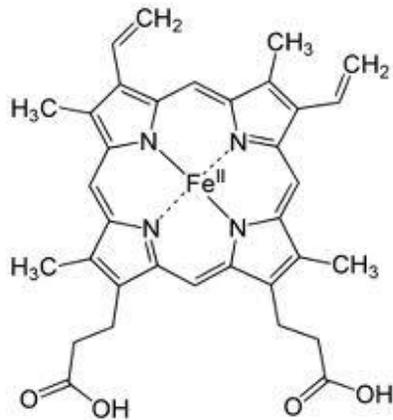


Fig. 6. Molécula del grupo hemo  
(Tomada de <http://es.wikipedia.org/wiki/Hemo>)

La clorofila, desempeña un papel esencial en la fotosíntesis, también contiene el anillo de porfirina pero el ion metálico aquí es el  $Mg^{2+}$  (Fig 7). Su derivado semi-sintético la clorofilina cupro-sódica contiene un ión  $Cu^{+2}$  en lugar de  $Mg^{+2}$  (Lai, 1979).

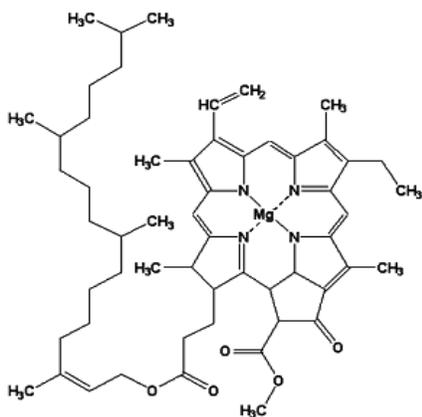


Fig. 7. Molécula de clorofila

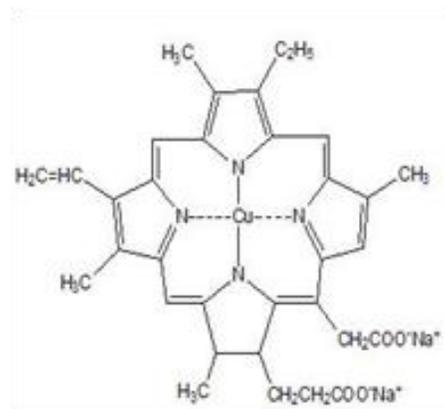


Fig. 8. Molécula de clorofilina

(Tomada de <http://chemicalland21.com/lifescience/foco/CHLOROPHYLL.htm>)

Las porfirinas más abundantes son las protoporfirinas y aunque pueden describirse 15 protoporfirinas isómericas, la protoporfirina-IX (PP-IX), es la única presente en la naturaleza (Domínguez *et al.*, 2003).

La PP-IX (Fig. 4) proviene de la biosíntesis del ácido 5-aminolevulínico (ALA) y es el precursor inmediato del grupo hemo (Tschudy, 1983). Contiene dos grupos de ácido propiónico, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos de la estructura de la porfirina. Su síntesis se lleva a cabo tanto en la mitocondria como en el citosol.

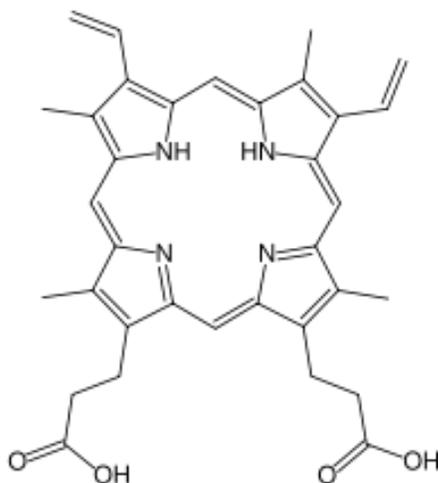


Fig. 9. Estructura de la protoporfirina IX (PP-IX),

(Tomado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Porfirina>)

La protoporfirina-IX, forma complejos quelatos tetra-dentados con iones diversos como el hierro, el zinc, el níquel, el cobalto, el cobre y el magnesio, en los que el metal se une por enlaces coordinados a los cuatro nitrógenos de los anillos pirrólicos (Domínguez *et al.*, 2003).

La principal utilización que se le ha dado a la PP-IX es como fotosensibilizador (Kennedy *et al.*, 1990; Rick *et al.*, 1997). La producción alta de PP-IX, inducida al administrar ALA, se refleja como una fuerte fluorescencia en ciertos tejidos, preferentemente en aquellos con elevada proliferación celular como la piel, la mucosa oral del tracto respiratorio, la mucosa vaginal, la cavidad anal, las glándulas salivales, los conductos biliares, la vejiga y la vesícula seminal (Pottier *et al.*, 1986; Kennedy *et al.*, 1990).

La capacidad fotosensibilizadora de la PP-IX ha llevado al desarrollo de la terapia fotodinámica (TFD), que es usada en los tratamientos contra daños superficiales en la piel, principalmente carcinomas en células basales y escamosas (Kennedy *et al.*, 1990; Fijan *et al.*, 1995). La TFD consiste en fotosensibilizar tejidos tumorales con PP-IX (Berger *et al.*, 2000) y posteriormente irradiarlos con luz de una longitud de onda apropiada, para generar la formación de ERO con efectos citotóxicos, y conducir a la muerte selectiva de células neoplásicas. La principal ventaja de la TFD es que el daño celular queda restringido a la zona irradiada, con la consiguiente disminución de efectos secundarios sobre los tejidos sanos próximos al tumor (Gibson y Hilf, 1985).

La importancia biológica de la PP-IX, radica en que la acumulación de éste pigmento provoca las llamadas porfirias, que son un grupo de enfermedades causadas por anormalidades metabólicas en la biosíntesis del grupo hemo, su efecto tóxico se debe al desequilibrio de los sistemas Redox (Morehouse *et al.*, 1987; van Steveninck *et al.*, 1988), por la sobreproducción de ERO, lo que conlleva a un incremento en la peroxidación lipídica, que es la principal causa de daño al hígado (Comporti, 1985; Tribble *et al.*, 1987; Kennedy *et al.*, 1990).

En ratas de la cepas CF1, la inducción de peroxidación lipídica, originada por la elevada producción de PP-IX, incrementa la actividad de la enzima catalasa (Cat) en un 30% después de 2h de su administración y de la enzima superóxido dismutasa (Sod) en un 70% 24 horas después, no obstante, esta última disminuye después de varias dosis de PP-IX. Este estudio aporta evidencia de que la acumulación de PP-IX en el hígado induce estrés oxidante, e incrementa la actividad de enzimas antioxidantes (Afonso *et al.*, 1999).

La capacidad antioxidante de la PP-IX se probó recientemente en una cepa silvestre de *D. melanogaster*, la PP-IX incrementó el periodo de vida, posiblemente por la capacidad antioxidante del pigmento o por la inducción de enzimas antioxidantes. Mientras que en una cepa deficiente en Sod el periodo de vida disminuyó, esto pudo deberse a la acción prooxidante de la PP-IX por la producción del radical  $O_2^-$ , mientras que una cepa deficiente en

Cat el periodo de vida no se alteró, ya que posiblemente la PP-IX brinda protección contra el estrés oxidante en específico contra el radical  $H_2O_2$  (Pimente *et al.*, 2013).

### **3.4 Las casiopeínas®, antineoplásicos de nueva generación**

La alta incidencia de cáncer en el mundo requiere desarrollar compuestos menos tóxicos, pero con mayor actividad antitumoral (Clarke *et al.*, 1999). Dentro de estas moléculas se encuentran los que contienen metales nobles como el cobre (Marzano *et al.*, 2009).

Las casiopeínas (Cas) son una gran familia de moléculas que tienen como centro activo al cobre  $2^+$  y un aminoácido que las hace tumor específicas (Ruiz, 1994). Estas moléculas fueron desarrolladas en el grupo de la Dra. Lena Ruiz Azuara en la facultad de Química de la UNAM. La fórmula general de estos compuestos es  $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$  y  $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ , donde N-N denota un sustituto de bipyridina o fenantrolina, N-O indica  $\alpha$ -aminoácido o péptido y O-O representa acetilacetato o salicilaldehído. Para el diseño de estas moléculas se consideraron varios factores, tales como: la existencia de un metal esencial para disminuir la toxicidad y la presencia de quelatos hidrofóbicos que favorecen la configuración cis alrededor del ion metálico, lo que las hace más estables y liposolubles (García *et al.*, 2001).

El cobre es un metal esencial en los sistemas vivos, debido a su participación en el metabolismo energético, la respiración y la síntesis del ADN (De Vizcaya, 2003). La actividad biológica del cobre involucra reacciones de óxido-reducción (Redox), provocadas por su reacción directa con moléculas de oxígeno o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que llevan a la producción de radicales libres (Rivero, 2007) y al incremento de ERO. Estas reacciones redox a su vez son las responsables de la toxicidad del cobre (Sissi *et al.*, 2005).

La presencia del átomo de  $Cu^{2+}$  en su estructura, sugiere que su modo de acción puede estar relacionado con la generación de ERO (Trejo *et al.*, 2005), a través de la reducción de Cu (II) a Cu (I) mediante la reacción de Fenton (Bravo *et al.*, 2009) que incluye la generación de los radicales hidroxilo y superóxido (Fig. 10) (Trejo *et al.*, 2005). La interacción de estos radicales con el material genético, son probablemente los principales inductores de la

oxidación de bases y del rompimiento de las cadenas del ADN (Alemon *et al.*, 2007), también se asocian con la disfunción mitocondrial, el daño a la membrana lipídica y la inhibición de la fosforilación oxidativa (Trejo *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2007; Alemon *et al.*, 2008). Las casiopeinas que se han sintetizado se han probado en células *in vitro* y provocan inhibición de la proliferación celular y cambios morfológicos en la célula (Mejia y Ruiz, 2008) que conducen finalmente a su muerte por necrosis (De Vizcacaya *et al.* 2000) apoptosis o por la activación tardía de las vías dependientes o independientes de caspasas (Trejo *et al.*, 2005).

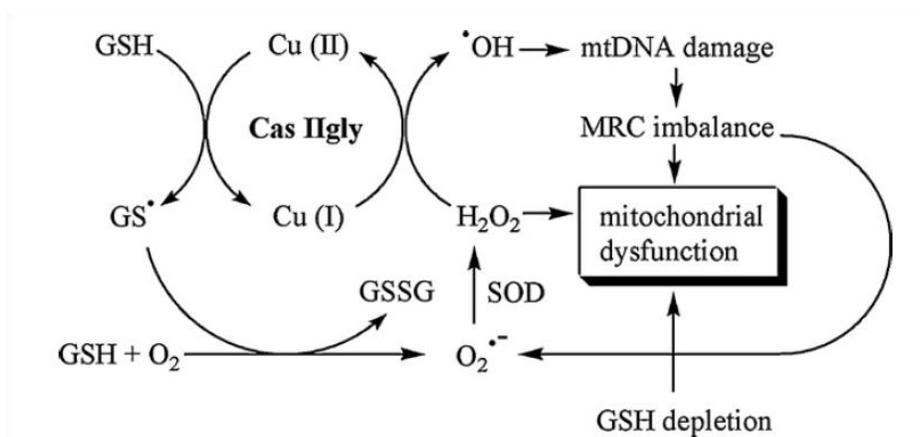


Fig. 10. Acción intracelular de las Casiopeinas, ejemplificado con la Cas IIgly.  
(Tomado de Kachadourian *et al.*, 2010)

Se han llevado a cabo experimentos para conocer los mecanismos de acción de las casiopeinas, uno de ellos evaluó la acción de cuatro casiopeinas: la casiopeina II-gly (Cas II-gly), la casiopeina III-Ea (Cas III-Ea), la casiopeina III-Ha (Cas III-Ha) y la casiopeina III-ia (Cas III-ia) en células HeLa y Linfocitos, y se encontró que por si solas, no producen fragmentación del ADN, pero cuando se les adiciona ácido ascórbico se origina una degradación masiva, probablemente por la reducción del cobre por la generación de radicales. En ambos tipos de células el daño al ADN por la Cas II-gly y la Cas III-ia, fue completamente reparado después de 4 horas al periodo de incubación, las células expuestas a Cas III-Ea tardaron más en repararse y las tratadas con Cas III-Ha no se recuperaron. El efecto oxidante de las casiopeínas probadas se produjo en la siguiente relación: la Cas III-ia muestra poco efectos, la Cas II-gly y Cas III-Ea genera alto porcentaje de oxidación

intracelular mientras que la Cas III-Ha es tan tóxica que no se puede evaluar su efecto. Por medio del ensayo cometa se probó que todas las casiopeinas producen rompimiento en el ADN con una relación dosis respuesta (Serment *et al.*, 2011).

Las casiopeinas, exhiben capacidad antineoplásica, citostática y citotóxica en varias líneas de células tumorales *in vitro*, así como en tumores implantados en ratón (Trejo *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006; Carvallo *et al.*, 2008) teóricamente, debido a que en las células tumorales, los niveles de estrés oxidante están incrementados por su elevada actividad metabólica, en comparación con las células normales por lo tanto, son más sensibles a cambios en el balance redox (Nicco *et al.*, 2005; Schumacker, 2006) se ha sugerido que las casiopeinas pueden traspasar la membrana celular y entrar a la célula sin disociarse moviéndose libremente al núcleo e interactuar con el ADN genómico (Alemon *et al.*, 2007; Serment *et al.*, 2011).

En células de meduloblastoma también se ha documentado que las Cas II-gly y la Cas III-ia produjeron alteraciones morfológicas tales como: contracción celular y formación temprana de cuerpos apoptóticos. Su efecto antineoplásico se produjo por la inhibición de la proliferación celular, por el incremento del número de núcleos con características apoptóticas y a por la reducción de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La elevada inducción de apoptosis que ejercen la Cas II-gly y III-ai, en células de meduloblastoma las convierte en candidatos para el tratamiento del cáncer (Mejia y Ruiz, 2008).

La Cas IIgly (5µM/6 hr) induce la producción de ERO específicamente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a su vez disminuye los niveles intracelulares de GSH y produce daño al ADN mitocondrial en células H157 y A549 de cáncer de pulmón (Kachadourian *et al.*, 2010). Rivero y colaboradores (2007) también reportaron que la Cas II-gly es capaz de degradar el ADN de un plásmido en presencia de ascorbato, dicho daño no es inhibido por la superóxido dismutasa (Sod) ni por la Glutación (GSH), pero si por la Catalasa (Cat) a una concentración de 40µg/ml frente a una concentración de 10µM de Cas II-gly. La combinación de la Sod y la Cat inhiben la degradación del ADN pero muy probablemente se deba únicamente a la participación de la

Cat. Los autores sugieren que el daño al ADN no es causado por la interacción directa de la Cas II-gly con el ADN ya que la producción de ERO se origina cuando la Cas II-gly es reducida por el ascorbato.

La casiopeina III-Ea (Fig. 11) cuya fórmula es  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$ , tiene alto efecto sobre células tumorales (Bravo *et al.*, 2009) y fuerte actividad antineoplásica, se ha reportado que esta casiopeína induce apoptosis y reduce la talla y el volumen de tumores cultivados o implantados (Trejo *et al.*, 2005). También reduce la tasa de replicación e induce el desarrollo de pliegues a lo largo de la membrana plasmática, otro efecto importante que se ha reportado es que la Cas III-Ea afecta el metabolismo respiratorio en las células de mamíferos, al disminuir aproximadamente el 25% de consumo de  $\text{O}_2$ . La Cas III-Ea disminuye la actividad mitocondrial y aparentemente no induce daño en la integridad del ADN mitocondrial, sin embargo provoca disminución en su diámetro (López *et al.*, 2011). La actividad de la Cas III-Ea también ha sido evaluada en ratas con carcinoma hepático AS-30D mostrando actividad antineoplásica a una dosis de 0.8 mg/kg.

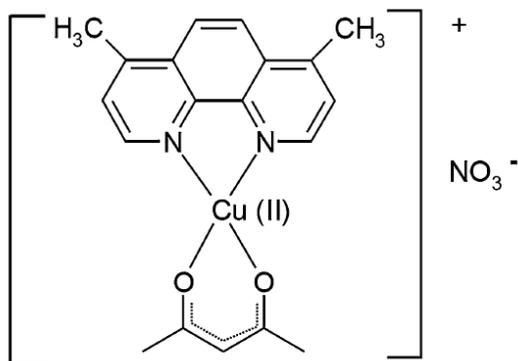


Fig.11. Molécula de Casiopeina III-Ea

(Tomado de Vertiz *et al.*, 2012)

Se ha demostrado que la actividad antineoplásica de las casiopeinas es entre 10 y 100 veces mayor que la otros antineoplásicos conocidos como el cisplatino y que tienen un buen índice terapéutico en tumores en modelos animales (Leal *et al.*, 2007). Todo lo anterior hace de las

casiopeinas buenos candidatos para su utilización en humanos (Ruiz y Bravo, 2010; Trejo *et al.* 2005).

### **3.5 *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba**

*Drosophila melanogaster* conocida también como mosca de la fruta o del vinagre, es un organismo eucarionte, holometábolo, cosmopolita, que comparte los mismos ambientes que el hombre (Vogel, 1987). Posee solamente 4 pares de cromosomas que han sido mapeados. Su genoma fue secuenciado en 1998 y actualmente se sabe que está compuesto por 18 millones de pares de bases que codifican para 14 mil genes y que el 60% de estos, tienen homología con genes que provocan enfermedades genéticas conocidas en el hombre y un 50% de sus secuencias proteicas tienen un análogo con mamíferos (Adams *et al.*, 2000).

El vasto conocimiento de su biología y genética han hecho de este organismo un excelente candidato para realizar estudios en diferentes disciplinas, entre los que destacan procesos celulares, genéticos, biología del desarrollo, así como de genotoxicidad y anti-genotoxicidad (Graf *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2004). Cabe señalar que las primeras evidencias de mutagénesis inducida por agentes física y química en eucariontes, se probaron en *Drosophila melanogaster* (Muller, 1927).

*Drosophila melanogaster* posee una serie de ventajas para la investigación, entre las que destacan: su dimorfismo sexual, su tasa elevada de fecundidad, su tamaño, que permite cultivar un número considerable de individuos en un espacio reducido; además de ser un sistema económico y de fácil manipulación, su ciclo de vida es corto (10-12 días) (Fig. 6) en condiciones controladas (25°C y 60% de humedad relativa) (Würgler *et al.*, 1984). Comparte gran cantidad de genes homólogos con los vertebrados (Bier, 2005). Se cuenta con una gran cantidad de mutantes con los que se pueden diseñar diferentes protocolos. También ofrece la posibilidad de realizar pruebas tanto en células somáticas como germinales (Vogel, 1987). Otra de las ventajas del sistema, es la posibilidad de emplear varias vías de administración de las sustancias: inhalación, inyección y principalmente la vía

oral, además se pueden combinar diferentes protocolos de administración: pre-tratamiento, post-tratamiento, etc. (Würgler *et al.*, 1984).

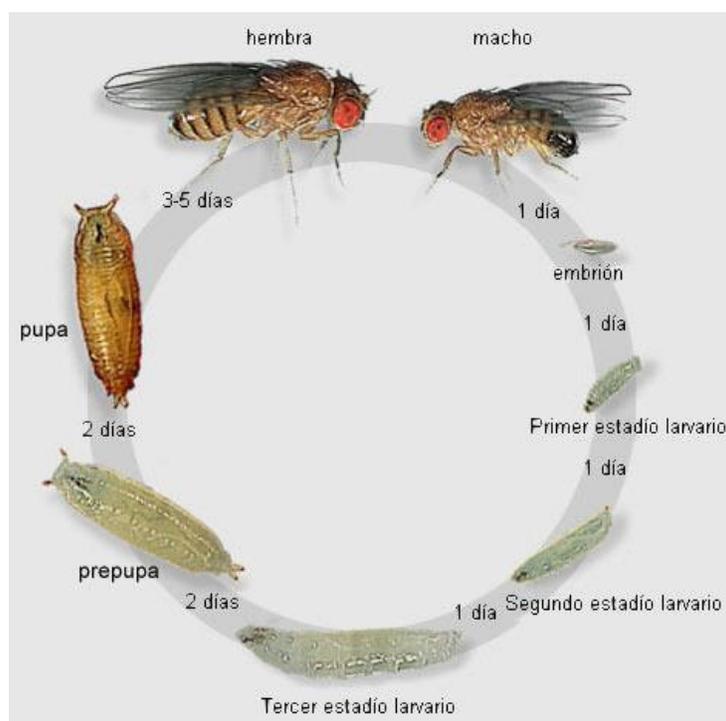


Fig. 6. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, (Tomado de <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>).

*Drosophila melanogaster* permite detectar muchos eventos mutagénicos entre los que destacan: sustitución de pares de bases, mutaciones génicas con efectos deletéreos, mutaciones puntuales, pérdida de cromosomas, deleciones pequeñas que podrían ser transmitidas como amorfas, re-arreglos cromosómicos, como inversiones y translocación; no disyunción, recombinación mitótica, inducción de genes letales etc. (Zijilstra, 1987).

*Drosophila melanogaster* posee las enzimas dependientes de citocromo P450 necesarias para activar metabólicamente una gran cantidad de promutágenos y procarcinógenos; estas funciones enzimáticas son equivalentes a las que efectúa la fracción microsomal del hígado del humano y se ha encontrado que contiene hidroxilasas, dimetilidasas y transferasas. En el sobrenadante mitocondrial se ha encontrado glutatión-S-transferasa y actividad de fosfotransferasas, este proceso de bioactivación se encuentra en algunas regiones del tracto

digestivo, ciertas regiones del tejido gonadal y los tubos de Malpigio (Hodgson y Randy, 1991).

- **Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)**

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en *D. melanogaster* es un ensayo *in vivo* que permite la detección rápida y económica de agentes genotóxicos. Se basan en la detección y cuantificación de eventos mutagénicos y recombinogénicos en células somáticas (Graf *et al.*, 1984; Vogel y Zijlstra 1987a).

Esta prueba fue desarrollada por Graf *et al.*, (1984) y constituye el único ensayo descrito que utiliza marcadores de alas para el estudio de mutación y recombinación somáticas. El ensayo se lleva a cabo con larvas trans-heterocigotas para los marcadores *multiple wing hairs* (*mwh*) y *flare* (*flr*), exponiéndolas al compuesto de prueba por periodos de tiempo de 1-96hr. La prueba se basa en la pérdida de la heterocigocidad de los genes marcadores, dando lugar a las expresiones de los genes recesivos, *mwh* y *flr* (Graf *et al.*, 1992) (Fig. 7).

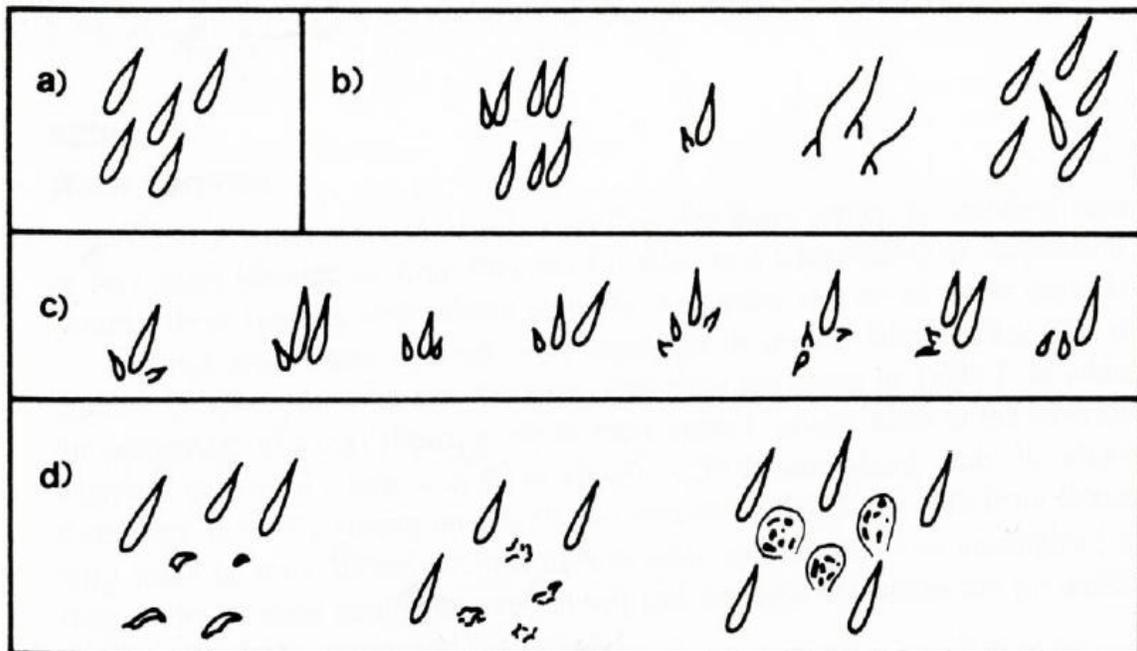


Fig. 7. Fenotipos de los tricomas en la superficie del ala: a) fenotipo normal, b) tricomas no considerados *mwh* o *flr*<sup>3</sup>, c) genotipo *mwh*, d) genotipo *flr*<sup>3</sup> (Tomado de Graf *et al.*, 1984).

Las células blanco utilizadas en este ensayo son los discos imagales, que son las primeras células de la larva que darán origen a las estructuras del adulto: ojos, antenas, alas y patas (Atkins y Mardon, 2009). Si se produce una mutación en una de las células del disco imagal dan lugar a la formación de clones mutantes que se detectan en los organismos adultos como grupo de células o manchas en la superficie del ala.

La mutación *mwh* se ubica en el cromosoma 3, es recesiva, su origen es espontáneo y resulta viable en homocigosis. Su manifestación fenotípica se caracteriza por la presencia de tres o más tricomas en cada célula del ala en lugar de uno por célula, que es el fenotipo normal. Los individuos de esta cepa presentan la siguiente configuración genética *mwh*, *mwh*. Las alteraciones genéticas que pueden originar este fenotipo son las siguientes: mutación puntual, delección, recombinación mitótica entre los loci *mwh* y *flr*.

El gen *flr*<sup>3</sup> está situado también en el cromosoma tres en la región 38.8, es recesivo y es letal en homocigosis en la línea germinal, pero no en células somáticas. El fenotipo es bastante variable ya que se pueden observar desde pelos cortos, gruesos y deformes, hasta pelos amorfos con aspecto globular. En la cepa el gen *flr* presentan la constitución genética *flr/TM3*, *Ser*. El marcador *Ser* da el fenotipo aserrado al borde del ala. El hecho de que las mutaciones sean letales en homocigosis posibilita el mantenimiento de la heterocigosis de la cepa. Este fenotipo se debe, principalmente, a mutación puntual o a la delección del alelo silvestre y el centrómero.

El tamaño y el tipo de una mancha están determinados por el número de células que exhiben el fenotipo *mwh* o *flr*<sup>3</sup>. Teóricamente, el número de células una mancha refleja el número de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del daño genético en la línea celular. Las manchas se clasifican en dos grupos dependiendo de su tamaño: manchas chicas con una o dos células afectadas y manchas grandes con tres o más células afectadas. Dependiendo del fenotipo las manchas pueden ser sencillas: manchas *mwh* (Fig. 8), manchas *flr*<sup>3</sup> (Fig. 9), y manchas gemelas (Fig. 10), estas últimas se caracterizan porque en la misma área tienen el fenotipo *mwh* y *flr*<sup>3</sup> (Graf *et al.*, 1984).

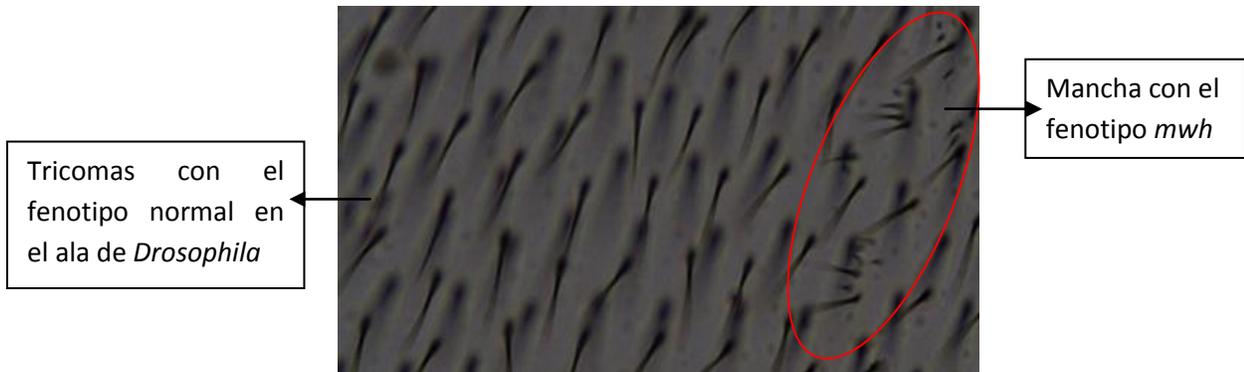


Fig. 8. Muestra los tricomas con el fenotipo normal de la superficie del ala y una mancha con tricomas con el fenotipo *mwh*.

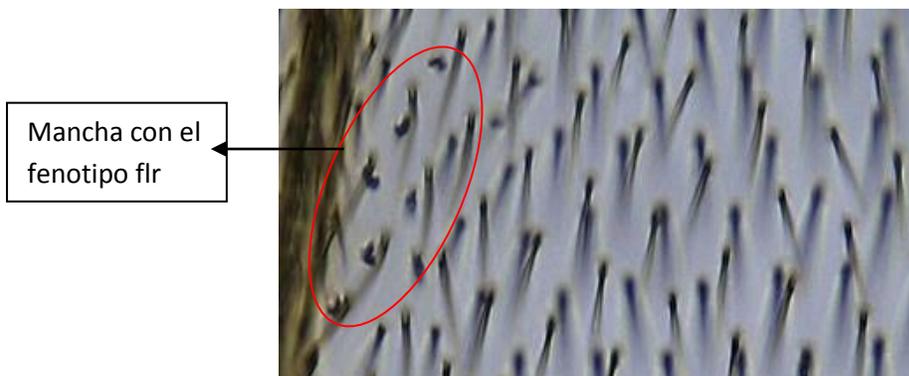


Fig. 9. Tricomas con el fenotipo *flr*<sup>3</sup> en la superficie del ala de *Drosophila melanogaster* (mancha *flr*).



Fig. 10. Mancha gemela, se muestra en la misma área el fenotipo *mwh* y *flr*

Como se ha indicado anteriormente, *D. melanogaster* ofrece un conjunto de ventajas que la hacen un organismo modelo para los estudios de genotoxicidad, habiendo desempeñado un

papel muy importante en el desarrollo de la Toxicología genética. Las ventajas del uso de *D. melanogaster* en la prueba SMART además de las antes descritas son:

- ❖ Al exponer los discos imagales hay literalmente mayor número de células diana que están potencialmente expuestas a los agentes genotóxicos a evaluar.
- ❖ Permite mantener las moscas tratadas en alcohol al 70%, para posteriormente ser montadas.
- ❖ Se hacen preparaciones permanentes de las alas, por lo tanto, la verificación y reconsideración es posible en base al material original.
- ❖ El ensayo SMART es una excelente herramienta, debido a su alta sensibilidad, rapidez y bajo costo.

Estas ventajas han hecho que el ensayo SMART sea ampliamente utilizado para la evaluación genotóxica de un gran número de agentes químicos y físicos, con diferentes mecanismos de acción (Graf *et al.*, 1989). Además dada su alta versatilidad también se ha aplicado para el estudio de los efectos antimutagénicos y otros efectos moduladores de compuestos químicos y de mezclas complejas (Graf *et al.*, 1998).

Se ha postulado que la recombinación es uno de los principales pasos de la carcinogénesis, la cual puede detectarse con esta prueba (Wijnhoven *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006).

- **Prueba de viabilidad huevo-adulto**

Posiblemente entre de los componentes más importantes de la adaptación de los organismos se encuentre la viabilidad y la fertilidad, ya que son indispensables para la sobrevivencia del individuo y de las generaciones siguientes. Algunos factores importantes que influye en la adaptación son las condiciones ambientales ya que de estas depende el tiempo de desarrollo y la productividad de las hembras, (Fisher, 1930). Otro factor son los recursos, debido a que una población en un ambiente limitado está en competencia, lo que afecta características como la fertilidad en la hembra y el apareamiento en los machos (Pimentel *et al.*, 2007; Fong *et al.*, 2008).

Algunos índices que se han medido para evaluar efectos deletéreos provocados al material genético de alguna población, que son inducidos por diferentes alteraciones ambientales o por la influencia de agentes antropogénicos que llegan al medio son: la velocidad de desarrollo, que comprende el periodo de huevo a adulto; la viabilidad, que se define como el porcentaje de individuos que alcanzan la madurez sexual con las características necesarias para la sobrevivencia y la reproducción y la productividad, que se define como el número de prole producida por una hembra (Hiraizumi, 1961).

En una población de *D. melanogaster* se ha visto que la exposición crónica al gas radón, actúa como un factor selectivo aumentando la viabilidad huevo-adulto (Pimentel *et al.*, 2006). Pero la sobrevivencia y la fecundidad no dependen de la densidad, mientras que la viabilidad si depende de la fecundidad de los organismos.

#### **4. Justificación**

Recientemente en *D. melanogaster*, se encontró que la protoporfirina-IX tiene acción dual anti y mutagénica. También se encontró que puede actuar como una molécula Cat mimética ya que incrementa el periodo de vida de individuos deficientes en esta enzima y en individuos sensibles al estrés oxidante. Uno de sus posibles mecanismos de acción, es a través de la inducción de ERO y/o reduciéndolos. Para evaluar esta posibilidad, y basados en que el Cr (VI) y posiblemente la Cas III-Ea ejercen su acción genotóxica y citotóxica a través del aumento de los niveles de ERO, la presente investigación tiene como propósito evaluar el papel de la protoporfirina-IX ante el daño inducido por el Cr (VI) en células somáticas, así como evaluar la inducción de daño genético por la Cas III-Ea y su efecto en la productividad de cepas deficientes en enzimas antioxidantes endógenas. Con el fin de conocer, mediante este sistema de prueba si la PP-IX puede ser una alternativa para utilizarse como tratamiento en individuos laboralmente expuestos a Cr VI, en caso de que la PP-IX actúe como un agente anti-genotóxico y conocer si efectivamente el mecanismo de acción de la Cas III-Ea es por la inducción de ERO al comparar su daño con el provocado por el del Cr VI y asociarlo con la productividad de las cepas deficientes en antioxidantes endógenos.

#### **5. Hipótesis**

El daño genético inducido por el Cr VI en los individuos pre- tratados con PP-IX será menor que en los que no lo recibieron, y el daño genético inducido por la Cas III-Ea será equivalente al de los individuos tratados únicamente con PP-IX y asociado a una baja productividad de las cepas deficientes en antioxidantes endógenos tratadas con Cas III-Ea.

## **6. Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del pre-tratamiento con PP-IX sobre el daño genético y la productividad inducido por el Cr (VI) y la (Cas III-Ea).

### **Objetivos particulares**

- 1.- Evaluar la modulación de la PP-IX del daño genético inducido por el Cr (VI) en células somáticas de *Drosophila*.
- 2.- Evaluar el efecto antioxidante de la PP-IX, sobre los radicales libres inducidos por el Cr (VI).
- 3.- Evaluar el daño genético inducido por la Cas III-Ea en células somáticas de *Drosophila*.
- 4.- Medir la productividad de los individuos tratados con Cas III-Ea en cepas deficientes en enzimas Cat y Sod.

## 7. Materiales y Métodos

### Material biológico

Se utilizaron cepas de *Drosophila melanogaster* tales como: *mwh +/mwh +*; *flr3/An* (3LR) TM3; *Bds*; *Sod [n1] red [1]/TM3*, *Sb [1] Ser [1]* y *Cat [n1]/TM3*, *Sb [1] Ser [1]* y *Canton-S* (C-S). De cada una de ellas se aumentó el número de individuos mediante dos trasvases cada dos días, en frascos lecheros de 1/4 L con medio regular. Se mantuvieron en el cuarto de cultivo a 25°C y 60% de humedad relativa. Completado el ciclo de vida se utilizaron los adultos.

### Prueba de toxicidad de la PP-IX

Se cruzaron hembras vírgenes de la cepa *mwh+ / mwh+* de 4 a 5 días de edad con machos de la cepa *flr3/An* (3LR) TM3; *Bds*; de la misma edad, en frasco lechero de ¼ L con alimento regular. Los huevos depositados durante 2 h de esta cruce se mantuvieron durante tres días en un cuarto de cultivo a 25° C y 60% de humedad relativa. Cumplido el tiempo, se colectaron larvas de segundo estadio mediante diferencia de densidad con una solución de sacarosa al 20%. Con las larvas colectadas se hicieron grupos para pre-tratarse siguiendo la metodología de Pimentel *et al.*, (2011). Las concentraciones de pre-tratamiento de PP-IX fueron: 0, 0.69, 6.9 y 69 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) vía oral durante 24 h en frascos de ¼ L con un papel filtro impregnado con la solución correspondiente y se mantuvieron en obscuridad en una estufa a 25° C y 60% de humedad relativa. Cumplido el tratamiento se enjuagaron con agua corriente y se hicieron 10 grupos de 50 larvas por tratamiento y se colocaron en tubos homeopáticos con 1.5 g de medio de cultivo sintético hidratado. Las larvas concluyeron su desarrollo en el cuarto de cultivo a 25° C y 60% de humedad relativa. Cumplido su desarrollo se conto el numero de adultos emergidos. Las comparaciones entre tratamientos se analizaron con la prueba de  $X^2$ .

## Prueba de genotoxicidad

En el caso de los resultados dudosos, se empleó la prueba de mutación y recombinación somáticas en el ala de *Drosophila*, SMART por sus siglas en inglés (Somatic Mutation and Recombination Test) (Graf *et al.*, 1984).

**Tratamiento con trióxido de cromo (CrO<sub>3</sub>):** Se aislaron hembras vírgenes de la cepa *mwh*<sup>+</sup> / *mwh* + y se dejaron madurar de 4 a 5 días, para cruzarlas con machos de la cepa *flr3*<sup>Δn</sup> (3LR) TM3; *Bds*; de la misma edad, en grupos de 10 parejas por frasco lechero de ¼ L con alimento regular. Los huevos depositados durante 2 h se mantuvieron en un cuarto de cultivo a 25° C y 60% de humedad relativa durante 3 días. Las larvas se colectaron y pre-trataron de la misma forma y con las mismas concentraciones que se emplearon en la prueba de toxicidad, siguiendo el protocolo de Pimentel *et al.*, (2011). Después del pre-tratamiento se enjuagaron con agua corriente y cada grupo se dividió en subgrupos para tratarlos crónicamente con: 0, 0.025, 0.25, 1.25, 2.0 ó 2.5 mM de CrO<sub>3</sub>. El tratamiento con el mutágeno se hizo en tubos homeopáticos con 1.5 g de medio de cultivo sintético hidratado con 5 mL de agua destilada o la solución de Cr (VI) correspondiente y se dejaron desarrollar en condiciones de laboratorio y obscuridad en una incubadora a 25°C y 60% de humedad relativa. Cuando los adultos emergieron se fijaron en alcohol al 70%.

Con las alas de los descendencia *mwh*<sup>+/+</sup> *flr*<sup>3</sup> se hicieron preparaciones permanentes con solución de Faure (goma arábica, glicerol, hidrato de cloral y agua) (Graf *et al.*, 1984). Las alas de las preparaciones, se analizaron bajo un microscopio compuesto a 40X.

**Tratamiento con Casiopeína III-Ea:** Se siguió el mismo procedimiento de cruza y colecta de larvas que en los tratamientos anteriores. De las larvas colectadas se hicieron grupos para tratarlas crónicamente con: 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 mM de Cas III-Ea sintetizada y proporcionado por la Dra. Lena Ruiz de la facultad de Química de la UNAM, y se continuó con el método descrito anteriormente. Se hicieron tres experimentos de cada concentración, tanto de Cr (VI) como de Cas-II-Ea.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa SMART a un nivel de significancia de  $p < 0.05$

### **Prueba de Productividad**

Después de la propagación de las cepas *C-S*, *Sod* y *Cat*, se colectaron 300 machos de 1 día de edad de cada cepa, para hacerles un seguimiento mediante un sistema de camadas, que consiste en monitorear sus células germinales (espermatozoides, espermátidas y espermatogonias).

Los machos de cada cepa se hambreadon durante 6 h. Después de este tiempo se trataron 24 h con: 0, 0.1, 0.5 y 1.0 mM de Cas III-Ea en tubos homeopáticos con medio de cultivo sintético e hidratado con la solución correspondiente. Setenta y cinco machos por experimento fueron probados por cada concentración. Después del tratamiento los machos se aparearon con el mismo número de hembras de la misma edad durante tres días (camada uno, colecta de espermatozoides) en frascos de vidrio de ¼ de L con medio de cultivo regular. Después los machos se transfirieron a un segundo frasco con otro grupo de hembras vírgenes por un periodo de tres días (camada dos, colecta de espermátidas), cumplido el tiempo se transfirieron a un tercer frasco con otro grupo de hembras por tres días (camada tres, colecta de espermatogonias). Los huevos depositados por camada se dejaron desarrollar en condiciones de laboratorio a 25°C y 60% de humedad relativa. Cumplido su desarrollo se conto el numero de descendientes.

El análisis de los resultados se hizo con la prueba de  $X^2$  y *t-test* a un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , para determinar diferencias entre cepas, camadas y tratamientos.

### **Pruebas de toxicidad de la Cas III-Ea**

De las preparaciones permanentes se fotografiaron 40 alas tanto del control como de los individuos tratados con la concentración 1.0 mM de Cas III-Ea, para contar el número de cerdas de la región C' (ver Fig. 11), para calcular el número de cerdas totales. También se calculó el área del ala con ayuda del programa Image J 1.46a (Collins, 2007). Estos datos se

extrapolaron para el cálculo de células y área total del ala. El análisis estadístico de los resultados se hizo con la prueba *t-test* a un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## 8.- Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados de la toxicidad de las diferentes concentraciones de PP-IX. El análisis estadístico indicó que la concentración más baja (0.69 mM) no disminuyó la viabilidad, sin embargo sí disminuyó significativamente los sub-letales. La concentración de 6.9 mM fue la que presentó menor toxicidad y menos letalidad ( $p < 0.05$ ). La concentración de 69 mM, incrementó significativamente los sub-letales ( $p < 0.05$ ), sin disminuir la viabilidad significativamente.

**Tabla 1. Toxicidad de larvas *mwh/flr*<sup>3</sup> de 48 h de edad, tratadas por 24 h con PP-IX.**

Tratamiento PP-IX (Mm)	No. De larvas	No. De larvas viables $\pm$ EE	% de viabilidad	No. de sub- letales $\pm$ EE	% de toxicidad
0	500	387 $\pm$ 0.9	77.4	65 $\pm$ 1.0	22.6
0.69	500	394 $\pm$ 1.7	78.8	14 $\pm$ 0.5	21.2
6.9	500	447 $\pm$ 0.6	89.4*	23 $\pm$ 0.5	10.6
69	500	368 $\pm$ 0.5	73.6	115 $\pm$ 1.2	26.4

\*= significativo con respecto al control

La inducción de daño genético por las diferentes concentraciones de CrO<sub>3</sub> se presenta en la Tabla 2. Se puede observar que únicamente la concentración de 0.025 mM no incrementó el daño genético, no obstante, el resto lo incrementaron con respecto a la dosis ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 2. Frecuencia de manchas chicas, grandes y gemelas inducidas en larvas de 48 h de la cepa *mwh +/+ flr*<sup>3</sup> por diferentes concentraciones de trióxido de cromo (VI).**

Tratamiento CrO <sub>3</sub> (mM)	Número de alas	Número de manchas por ala			
		Manchas pequeñas (1-2 células), m=2	Manchas grandes (>células), m=5	Manchas gemelas m=5	Total de manchas m=2
0	160	0.24 (39)	0.09 (14)	0.01 (1)	0.34 (54)
0.025	120	0.26 (31) -	0.04 (5) -	0.03 (4) i	0.33 (40) -
0.25	150	0.43 (64) +	0.11 (16) -	0.05 (8) +	0.59 (88) +
1.25	118	0.63 (74) +	0.36 (42) +	0.14 (16) +	1.12 (132) +
2.0	40	0.87 (35) +	0.55 (22) +	0.55 (22) +	1.98 (79) +
2.5	94	2.86 (269) +	1.97 (185) +	2.12 (199) +	6.95 (653) +

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei and Wüergler (1988): + = positivo; - = negativo; w = débilmente positivo; i = inconcluso; m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de una cola.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del efecto de la PP-IX (Sección 1 = 0.69 mM; sección 2 = 6.9 mM y sección 3 = 69 mM) sobre la acción del cromo. La comparación del efecto de la PP-IX indicó que solo la concentración de 69 mM incrementó la frecuencia de mutación basal ( $p < 0.05$ ). En cada panel se muestra la acción de la PP-IX contra el daño genético inducido por las diferentes concentraciones de  $\text{CrO}_3$ . El análisis estadístico se hizo comparando los tratamientos combinados con su respectivo control positivo de la Tabla 2. La concentración de 0.69 mM de PP-IX disminuyó significativamente el daño genético inducido por las concentraciones de 0.25, 1.25, 2.0 y 2.5 mM de  $\text{CrO}_3$  ( $p < 0.05$ ). El pretratamiento con 6.9 mM de PP-IX solo redujo la frecuencia de mutaciones inducidas por 2.0 y 2.5 mM de  $\text{CrO}_3$  ( $p < 0.05$ ). La concentración de 69 mM únicamente redujo el daño genético inducido por 2.5 mM de  $\text{CrO}_3$  ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 3. Frecuencia de manchas chicas, grandes y gemelas inducidas por el tratamiento de trióxido de cromo en larvas de 48 h *mwh* +/- *flr*<sup>3</sup> pre-tratadas 24 h con 0.69, 6.9 ó 69 mM de PP-IX.**

Tratamiento (mM)		Número de manchas por ala							
PP-IX (+) CrO <sub>3</sub>	Número de alas	Manchas pequeñas		Manchas grandes		Manchas gemelas		Total de manchas	
		(1-2 células), m=2	(13-23) i	(>células), m=5	(5-11) i	m=5	(11-19) i	m=2	(29-49) i
Pre-tratamiento con PP-IX 0.69 mM (Sección 1)									
<b>0.69</b>	<b>120</b>	<b>0.33</b>	<b>(40) i</b>	<b>0.05</b>	<b>(6) -</b>	<b>0.03</b>	<b>(3) i</b>	<b>0.41</b>	<b>(49) -</b>
+ 0.025	80	0.16	(13) i	0.02 i	(2) i	0.02	(2) i	0.21	(17) i
+ 0.25	76	0.30	(23) i	0.07	(5) -	0.01	(1) i	0.38	(29) +
+ 1.25	80	0.41	(80) +	0.10	(8) +	0.14	(11) -	0.65	(52) +
+ 2.0	40	0.80	(32) -	0.30	(12) -	0.10	(4) +	1.20	(48) +
+ 2.5	120	0.57	(69) +	0.32	(38) +	0.28	(33) +	1.17	(140) +
Pre-tratamiento con PP-IX 6.9 mM (Sección 2)									
<b>6.9</b>	<b>120</b>	<b>0.23</b>	<b>(28) -</b>	<b>0.05</b>	<b>(6) -</b>	<b>0</b>	<b>(0)</b>	<b>0.28</b>	<b>(34) -</b>
+ 0.025	40	0.26	(8) i	0.08 -	(3) -	0	(0)	0.28	(11) i
+ 0.25	80	0.31	(25) i	0.14	(11) -	0.04	(3) i	0.59	(88) -
+ 1.25	78	0.51	(40) -	0.37	(29) -	0.12	(9) -	1.0	(78) -
+ 2.0	40	0.68	(27) i	0.35	(14) i	0.47	(19) -	1.50	(60) w
+ 2.5	120	0.64	(77) +	0.32	(38) +	0.23	(28) +	1.19	(143) +
Pre-tratamiento PP-IX 69 mM (Sección 3)									
<b>69</b>	<b>160</b>	<b>0.51</b>	<b>(81) +</b>	<b>0.14</b>	<b>(23) -</b>	<b>0.01</b>	<b>(2) i</b>	<b>0.66</b>	<b>(106) +</b>
+ 0.025	120	0.37	(45) -	0.08	(10) -	0	(0)	0.46	(55) -
+ 0.25	120	0.32	(39) -	0.08	(9) -	0.02	(2) i	0.42	(50) i
+ 1.25	80	1.51	(121) -	0.56	(45) -	0.40	(32) -	2.47	(198) -
+ 2.0	40	1.0	(40) -	0.68	(24) -	0.55	(22) -	2.15	(86) -
+ 2.5	140	0.92	(129) +	0.46	(64) +	0.4	(56) +	1.78	(249) +

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei and Wüergler (1988): + = positivo; - = negativo; w = débilmente positivo; i = inconcluso; m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de una cola. La comparación se realizó entre cada una de las concentraciones de PP-IX+ CrO<sub>3</sub> con respecto a su control positivo incluido en la tabla 1. Los signos que se indican en la concentración de PP-IX, resultan de la comparación con el control negativo.

Los resultados relacionados con el efecto genotóxico de la Cas III-Ea se muestran en la Tabla 4. Las concentraciones de 0.1, 1.0 y 1.5 mM incrementaron significativamente la frecuencia de daño genético ( $p < 0.05$ ). Aunque no se observa una relación dosis respuesta.

**Tabla 4. Frecuencia de manchas chicas, grandes y gemelas inducidas por diferentes concentraciones de la Cas III-Ea en larvas de *Drosophila melanogaster*.**

Tratamiento Cas III-Ea (Mm)	Número de alas	Manchas por ala (número de manchas)			
		Manchas pequeñas (1-2 células), m=2	Manchas grandes (>células), m=5	Manchas gemelas m=5	Total de manchas m=2
0	184	0.25 (46)	0.08 (15)	0.01 (1)	0.34 (62)
0.01	36	0.33 (12) i	0.06 (2) -	0 (0) i	0.39 (14) -
0.1	239	0.49 (116) +	0.06 (15)-	0.02 (4) i	0.57 (135) +
0.5	158	0.39 (61) +	0.05 (8) -	0.03 (4) i	0.46 (73) -
1	311	0.44 (136) +	0.5 (17) -	0.01 (4) i	0.5 (175) +
1.5	142	0.44 (62) +	0.06 (9)-	0.03 (4) i	0.53 (75) +

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei and Wüergler (1988): + = positivo; - = negativo; w = débilmente positivo; i = inconcluso; m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de una cola.

Los resultados de la productividad en la cepa control C-S y las cepas *Cat* y *Sod* se muestran en la Tabla 5. El efecto de la Cas III-Ea en el desarrollo de las células germinales de los machos, se puede ver con los resultados organizados por camadas. La camada uno corresponde al daño en espermatozoides, la dos en espermátidas y la tres en espermatogonias. En la camada uno de la cepa C-S, las concentraciones 0.5 y 1.0 mM, incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) la productividad de los machos, sin embargo no fue con respecto a la dosis, en la camada dos la concentración de 1.0 mM la disminuyó ( $p < 0.05$ ). Para el caso de las cepas deficientes en *Cat* y *Sod* las diferentes concentraciones de Cas III-Ea no afectaron la productividad.

**Tabla 5. Productividad de los machos de las cepas tratadas con Cas III-Ea.**

Cepa	Tratamiento Cas III-Ea (mM)	Camada I				Camada II				Camada III			
		MT	D	P (D/ MT)	Valor de <i>p</i>	MT	D	P (D/ MT)	Valor de <i>p</i>	MT	D	P (D/ MT)	Valor de <i>p</i>
C-S	0	150	1545	10.3		140	1690	12.07		133	1970	14.81	
	0.1	150	1643	10.95	0.21	143	1351	9.448	0.07	146	1458	9.986	0.17
	0.5	150	1792	11.95	0.02↑	146	1685	11.54	0.49	141	1753	12.43	0.37
	1.0	150	1791	11.94	0.03↑	145	1326	9.145	0.05↓	134	1847	13.78	0.42
Sod	0	150	935	6.233		147	1251	8.51		147	1307	8.891	
	0.1	150	953	6.353	0.4	142	1029	7.246	0.09	142	1391	9.796	0.35
	0.5	145	959	6.614	0.33	137	1178	8.599	0.34	127	1197	9.425	0.31
	1.0	150	1000	6.667	0.17	144	1245	8.646	0.49	139	1415	10.18	0.32
Cat	0	150	839	5.593		138	816	5.913		132	934	7.076	
	0.1	150	824	5.493	0.47	142	755	5.317	0.36	129	946	7.333	0.48
	0.5	150	691	4.607	0.13	143	962	6.727	0.24	132	984	7.455	0.43
	1.0	150	868	5.787	0.41	119	935	7.857	0.3	115	1125	9.783	0.26

\*MT=machos tratados, D= descendencia, P= productividad.

En la Tabla 6, se muestra el efecto de 1.0 mM de Cas III-Ea sobre el número de cerdas por ala y el tamaño de los individuos. La Cas III-Ea disminuyó 10% ( $p < 0.001$ ) el número de cerdas por ala. Las hembras, redujeron su tamaño 19% ( $p < 0.001$ ) y los machos 16.7% ( $p < 0.01$ ) (Fig. 11).

**Tabla 6. Efecto del tratamiento con 1 mM de Cas III-Ea en el tamaño y número de cerdas por ala.**

Tratamiento Cas III-Ea (mM)	No. de alas analizadas	No. de cerdas/ala	No de alas	Tamaño del ala	
				♀	♂
0	40	15461 ± 4.1	42	3.70 ± 0.03	2.79 ± 0.06
1	40	13949 ± 6.3 *↓	42	2.31 ± 0.07*↓	1.75 ± 0.03 *↓

\*=  $p < 0.001$ , ↓= indica disminución en el número de cerdas

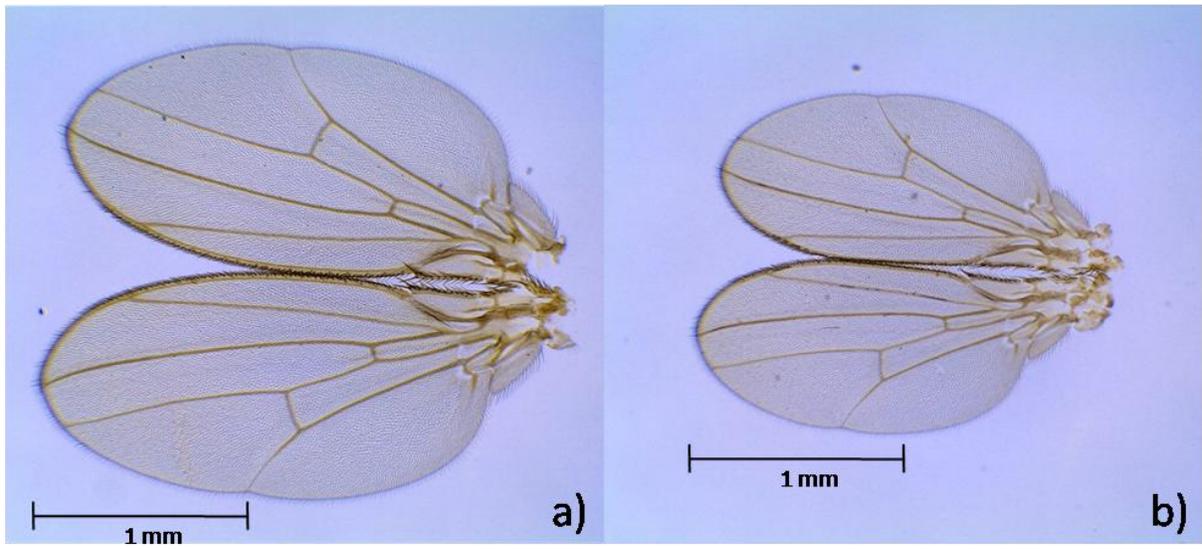


Fig. 11. Muestra la dimensión de las alas de *D. melanogaster* con dos tratamientos: a) control, b) tratamiento con 1mM de Cas III-Ea.

## 9. Discusión

La PP-IX es una molécula esencial para los sistemas vivos, que en homeostasis con el organismo no le provoca efectos adversos. Si embargo se ha reportado que su acumulación en el hígado debido a la incapacidad de eliminarla provoca un grupo de enfermedades llamadas porfirias (Kennedy *et al.*, 1990). Su efecto tóxico se debe al desequilibrio de los sistemas redox por la sobreproducción de ERO, lo que provoca peroxidación lipídica y que constituye la principal causa de daño al hígado (Comporti, 1985; Tribble *et al.*, 1987). Lo anterior podría explicar porque la concentración de 69 mM de PP-XI, en esta investigación, fue la que indujo mayor toxicidad, provocada principalmente por daño genético ya que también provocó un mayor número de subletalidad. En el caso de las concentraciones más bajas, 0.69 y 6.9 mM la toxicidad fue menor comparada con el control aunque no significativamente, sin embargo el número de subletales fue significativamente menor (14 y 23 respectivamente). Se ha reportado que la PP-IX estimula la síntesis de las enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (Afonso *et al.*, 1999). Probablemente las concentraciones bajas de PP-IX están estimulando los sistemas de defensa antioxidante del organismo, lo que podría explicar el incremento en la viabilidad y la disminución de subletales.

La agencia internacional de investigación del cáncer (1990) ha clasificado al Cr (VI) como carcinógeno del grupo I. Los antecedentes indican que uno de los mecanismos por el que inducen daño al material genético, es por la producción de radicales libres durante su reducción de Cr (VI) a Cr (III) (Singh *et al.*, 1998; Téllez *et al.*, 2004; Lauwerys, 2007). Los resultados obtenidos en esta investigación confirman su alto potencial mutagénico; a partir de la concentración de 0.25 mM la frecuencia de daño se incrementó con relación a la dosis.

De las tres concentraciones de PP-IX probadas, la concentración más baja (0.69mM) fue la más eficiente. Es probable que la reducción del daño genético inducido por el CrO<sub>3</sub> se debe a la capacidad de la PP-IX de donar electrones a las ERO generadas por el cromo. Sin embargo, también se ha reportado que la PP-IX al carecer de centro metálico tiene gran capacidad de formar complejos con diversos metales, se sabe que la ferroquelatasa puede

catalizar la incorporación de algunos metales en el centro de la molécula de PP-IX (Smith, 1978).

Otro mecanismo por el que la concentración de 0.69 mM pudiera ejercer mayor efecto antimutagénico puede deberse a que la cantidad de moléculas de PP-IX es equivalente con las de CrO<sub>3</sub> evitando así que el exceso de PP-IX pueda inducir daño oxidante. Los resultados obtenidos con las concentraciones de 6.9 y 69 mM dan evidencia de la explicación anterior, la disminución de daño genético posiblemente no se deba completamente al acomplejamiento de la PP-IX con el cromo, sino que el exceso de PP-IX y la elevada concentración de CrO<sub>3</sub> ejercen un efecto sinérgico incrementando la toxicidad y la ineficiencia para disminuir el daño genético a medida que aumenta la concentración de PP-IX. La baja viabilidad podría indicar muerte celular como se observa con la concentración más alta de 69 mM de PP-IX (ver Tabla 1), no obstante se observó una disminución importante del daño genético lo que confirma la acción inhibidora neta de la PP-IX.

Con relación a los resultados obtenidos con los tratamientos de Cas III-Ea, observamos que las concentraciones de 0.1, 1.0 y 1.5 mM de Cas III-Ea incrementaron significativamente la frecuencia de mutaciones, sin embargo a pesar de que el aumento fue significativo no hubo un efecto mutagénico relacionado con la concentración. Se ha propuesto que uno de los mecanismos de acción de las casiopeinas, es a través de la generación de radicales libres durante el proceso de reducción de Cu (II) a Cu (I) (Trejo *et al.*, 2005), momento en el cual, los radicales al interactuar con el material genético pueden provocar diversos eventos como la oxidación de bases y el rompimiento de la hebras de ADN (Alemon *et al.*, 2007). Para comprobar esta explicación, se midió la productividad de los machos deficientes (hipomorfos) en Sod o Cat tratados con Cas III-Ea. Se observó un cambio mínimo en la productividad de los machos de la cepa C-S, las concentraciones de 0.5 y 1.0 mM de Cas III-Ea, debido a que incrementan significativamente la productividad de los machos, probablemente es el resultado de un aumento de la calidad de los espermatozoides, no obstante, las espermátidas (camada 2), fueron afectadas por la concentración de 1.0 mM ya que disminuyó drásticamente su productividad. En el caso de las cepas deficientes en enzimas antioxidantes, la productividad no se alteró con ninguno de los tratamientos de Cas III-Ea, por lo que podemos sugerir que el daño genético de las casiopeinas es debido a la

inducción de radicales libres aunque no se pudo comprobar con estos resultados. El daño inducido al ADN observado no es producido en su totalidad por daño oxidante, la falta de un efecto relacionado con la dosis tanto en la inducción de daño genético como en la productividad, no permite apoyar que el mecanismo de la Cas III-Ea sea por inducción de estrés oxidante como ha sugerido Alemon *et al.* (2008) y Trejo *et al.* (2005).

A pesar de que los resultados de la mutagenicidad de la Cas III-Ea no fueron concluyentes, resulta interesante el efecto que tuvo el tratamiento de 1 mM. La toxicidad fue muy elevada y los individuos que lograron sobrevivir tuvieron una talla reducida. Tanto los machos como las hembras, presentaron una disminución entre el 16.7 y el 19% respectivamente; el número de cerdas por zona de las alas también disminuyó en un 10% (ver Fig. 11), estos resultados aportan mayor información sobre la toxicidad elevada de la Cas III-Ea. Con la disminución en el número de cerdas de las alas analizadas se confirma su alta citotoxicidad y no solo una reducción en el tamaño celular. Más aún, los individuos que presentaron un menor tamaño y número celular, fueron completamente fértiles y muy productivos. Cabe mencionar que esta es la primera vez que se reporta este efecto de la Cas III-Ea. Con estas observaciones, quedan abiertas muchas preguntas relacionadas con la explicación de estos efectos.

Otros posibles mecanismos de acción de la Cas III-Ea pueden estar relacionados con el daño a la mitocondria, el daño a la membrana lipídica o la inhibición de la fosforilación oxidativa (Trejo *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2007; Alemon *et al.*, 2008), lo que en nuestro sistema no pueden probarse, sin embargo sí se corroboran los resultados reportados por Mejia y Ruiz (2008) quienes encontraron en células *in vitro* que la Cas III-Ea provocan inhibición de la proliferación y cambios morfológicos en la célula.

## 10. Conclusiones

El tratamiento con 0.69 y 6.9 mM de protoporfirina-IX no fueron genotóxicos, mientras que la concentración de 69 mM incrementó dos veces la frecuencia basal de daño genético.

Solo la concentración más baja de PP-IX (0.69 mM) redujo el daño genético inducido por 4 de las cinco concentraciones de cromo (VI) probadas.

La acción antimutagénica de la PP-IX muy probablemente se deba a su capacidad de formar complejos con el  $\text{CrO}_3$ .

La Cas III-Ea provocó daño genético sin mostrar relacionado con la dosis.

La Cas III-Ea provocó la muerte y la disminución del tamaño de las células del ala de los individuos tratados en estado larvario con una concentración de 1 mM. No obstante, fueron viables y su fertilidad no fue afectada.

El hecho de no haber encontrado ninguna afectación en la productividad de los individuos deficientes en enzimas antioxidantes tratados con la Cas III-Ea, no podemos descartar que esta molécula sí induce estrés oxidante, sin embargo, no es el mecanismo principal por el que provoca la genotoxicidad. Estos resultados, no apoyan el mecanismo de acción por estrés oxidante de la Cas III-Ea propuesto por Trejo *et al.* (2005).

## 11. Referencias

- Adams, M. D., Galcom, M. A., Borse, G. F. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287: 2185-2191.
- Afonso, S., Vanore, G., Batlle, E. (1999). Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Rad. Res.* 31: 161-170.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Profile for chromium. Department of Health and Human Services Toxicological. Department of Commerce. 1993. Springfield, VA, USA.
- Agency for Toxic Substances and disease Registry (ATSDR). Chromium Toxicity. Case Studies in Environmental Medicine. 2006. Course: SS3048, U.S.
- Alemon, M. R., Brena, V. M., Muñoz, S. J. L., Gracia, M. I., Ruiz, A. L. (2007). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopinas). *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60: 219–228.
- Alemón, M. R., Muñoz, S. J. L., Ruiz, A. L., Gracia, M. I. (2008). Casiopéina IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicol. In Vitro.* 22: 710–715.
- Andrade, H., Reguly, M. L., Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test: En: *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Henderson Ed. Human Press. pp. 389-412.
- Atkins, M., Mardon, G., (2009). Signaling in the third dimension: the peripodial epithelium in eye disc development. *Dev. Dyn.* 238: 2139–2148.
- Baillie, T., Slatter, G. (1991). Glutathione: A Vehicle for the Transport of Chemically Reactive Metabolites in Vivo. *Acc. Chem. Res.* 24: 264-270.
- Berger, Y., Greppi, A., Siri, O., Neier, R., Juillerat, J. L. (2000). Ethylele Glycol and amino acid derivatives of 5-aminolevulinic acid as new photosensitizing precursors of protoporphyrin IX in cells. *Med. Chem.* 43: 4738-4746.
- Bertini, I., Cavallaro, G. (2008). Metals in the “omics” world: copper homeostasis and cytochrome oxidase assembly in a new light. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13: 3–14.
- Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* 6: 9-23.
- Boada, M., Moreno, M. A., Gil, H., Marcano, J., Maza, J. (2007). Heavy metals (Cu<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>) in muscle and cephalothorax of wild shrimp (*Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *F. notialis* and *F. brasiliensis*) from the Eastern region of Venezuela. *Revista Científica, (Maracaibo).* 17(2): 186-192.
- Bodar, C., van Leeuwen, C., Voogt, P., Zandee, D. (1990). Effect of cadmium on the reproduction strategy of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology.* 12: 301-310.
- Bolloor, K. K., Kamat, J. P., Devasagayam, T. P. (2000). Chlorophyllan as protector of mitochondrial membranes against gamm-radiation and photosensitization. *Toxicol.* 155: 63-71.
- Bravo, G. M. E., García, R. J. C., Gracia, M. I., Ruiz, A. L. (2009). Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N– N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N–N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopinas). *Inorg. Biochem.* 103: 299–309.

- Breinholt, V., Schimerlik, M., Dashwood, R., Bailey, R. (1995). Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chem. Res. Toxicol.* 8 (4): 506-514.
- Can, J. (1995). Nasal cancer in leather workers: an occupational disease. *Journal of Cancer research and clinical Oncology.* 121:1-6.
- Carvalho, C. F., Trejo, S. C., Gómez, R. C., Rodriguez, A. E., Macías, R. L., Cortés, B. E., Peláez, C., Gracia, M. I., Ruiz, A. L., Madrid, M. V., Constantino, C. F. (2008). Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase- dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals* 21:17–28.
- Casarett, D. (2001). *The Basic Science of Poisons. Toxicology.* 6th ed. New York: McGraw-Hill.
- Chance, B., Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology.* New York: Academic. pp. 764-765.
- Chernomorsky, S., Segelman, A., Poretz, R. D. (1999). Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratol. Carcinig. Mutagen.* 19: 313-322.
- Clarke, M. J., Zhu, F., Frasca, D. R. (1999). Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem. Rev.* 99:2511–2533.
- Connett, P. H., Whetterhanh, K. E. (1983). *Structure and Bonding.* 54: 93.
- Comporti, M. (1985). Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory investigation.* 53: 599-623.
- Cruces, M. P., E. Pimentel, 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: 139-144.
- Cruces, M. P., E. Pimentel, S. Zimmering. (2009). Evidence that low concentrations of chlorophyllin (CHLN) increase the genetic damage induced by gamma rays in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 679: 84-86.
- Dashwood, R., Breinholt, V., Bailey, G. (1991). Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA binding in vivo and antimutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis.* 12: 939-942.
- Dashwood, R., Guo, D. (1995). Protective properties of chlorophylls against the covalent binding of heterocyclic amines to DNA in vitro and in vivo. *Princess takamatsu Symp.* 23: 181-189.
- Dashwood, R. (2002). Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an A-to-Z guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutat. Res.* 51: 89-112.
- De Flora, S., Camoirano, A., Bagnasco, M., Zancchi, P., (1995). Chromium and carcinogenesis. In: Berthon, G. (Ed.), *Handbook on Metal Ligand Interactions in Biological Fluids. Bioinorganic Medicine*, vol. 2. Marcel Dekker, New York, pp. 1020–1036.
- De Flora, S. (2000). Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 21: 533–541.
- De Flora, S., Ferguson, L. R. (2005). Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 591: 8-15.

- De Vizcaya, R. A., Rivero, M. A., Ruiz, R. L., Kass, G. E., Kelland, L. R., Orr, R. M. (2000). Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol. In vitro.* 14: 1-5.
- De Vizcaya, R. A., Rivero, M. A., Ruiz, R. L., Howarth J. A., Dobrota, M. (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology.* 194: 103–113.
- Desikan, R., Hancock, J., Neill, S. (2005). Reactive oxygen species as signaling molecules. pp. 169-191. In: N. Smirnoff (ed). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants.* Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 302 p.
- Domínguez, E. F., Pérez, P. A., Turbóm, D., Arroyo, P. E. (2003). ADN antiguo química y aplicaciones. *Anales de la real sociedad española de química. Segunda época julio-septiembre.* p. 27.
- Edling, C., Kling, H., Flodin, U. (1986). Cancer Mortality Leather Tanners. *Ind. Med.* 43: 494-496.
- Egner, P. A., Wang, J. B., Zhu, Y. R., Zhang, B. C., Wu, Y., Zhang, Q. N., Quian, G. S., Kuang, S. Y., Gange, S. J., Jacobson, L. P., Helzlsouer, K. J., Bailey, G. S., Groopman, J. D., Kensler, T. W. (2001). Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 14601-14606.
- Evan, G. I., Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cáncer. *Nature.* 411: 342-348.
- Ferguson, L. R., Philpott, M. (2008). Nutrition and mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr.* 28: 313-329.
- Fisher, R. A. (1930). *The general theory of natural selection.* Clarendon Press. Oxford.
- Fijan, S., Hönigsmann, H., Ortel, B. (1995). Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and desferrioxamine. *Dermatol.* 133: 282-288.
- Fong, C., Díaz, F., Osorio, J., Castaño, L., González, F., Jurado, L., Castillo, K., Cárdenas, H. (2008). Efecto de densidad poblacional de huevos sobre viabilidad y tiempo de desarrollo de *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae). *Acta Biol. Coloma.* 13: 123-132.
- Frausto da Silva, J. J. R., Williams, R. P. J. (1991). *The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life,* Clarendon Press, Oxford. pp. 531-551.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). *Superoxide dismutases and related matters.* 172: 18515-18517.
- Galindo, M., L. Hernandez, R. Gonzáles, G. Cortes, A. Ruíz, E. Moreno. (2011).  $\pi$ -Stacking between CasiopeinasR and DNA bases. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 14510-14515.
- García, M. I., Ruiz, R. L., Gomez, R. C., Tinoco, M. M., Marquez, Q. A., Romero, D. L., Marin, H. A., Madas, R. L., Bravo, G. M. E. (2001). Knight's move in the periodic table, from copper to Platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeinas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs.* 8: 19–28.
- García, J. C., García, B., Morin, M. A., Céspedes, E. M., Clapes, S., Etienne, O. (1993). Radicales libres: impacto médico. *BEB (México).* 13(3): 75-83.
- Gaughhofer, J., Bainchi, V. (1991). *Metals and their compounds in the environment,* VCH, Weinheim Germany.

- Georgieva, T., Michailova, A., Panev, T., Popov, T. (2002). Possibilities to control the health risk of petrochemical workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 75: 21-6.
- Gibson, S. L., Hilf, R. (1985). Interdependence of fluence, drug dose and oxygen of hematoporphyrin derivative induced photosensitisation of tumor mitochondria. *Photochem. Photobiol.* 42: 367-373.
- Graf, U., Wurgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, F., Hall, C. B., Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*. 6: 153-188.
- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A. J., Wurgler, F. E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222: 359-373.
- Graf, U., Heo, O. S., Ramirez, O. O. (1992). The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402: 203-209.
- Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán, J., Friedrich, E., Würzler, R. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402: 203-209.
- Hadju, J., Wyss, S. R., Aebi, H. (1977). Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Biochem.* 80:199-207.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (1998). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Ed. Oxford Science Publications. Oxford. pp. 936.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford University Press. New York, USA. p. 888.
- Hamilton, J. W., Wheterhan, K. E. (1988). *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*, Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 239-250.
- Hayatsu, H., Sugiyama, C., Arimoto, K. S., Negishi, T. (1999). Porphyrins as possible preventers of heterocyclic amine carcinogenesis. *Cancer Lett.* 143: 185-187.
- Hiraizumi, Y. (1961). Negative correlation between rate of development and female fertility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 46: 615-624.
- Hodgson, E., Randy, R. (1991). Insect cytochrome P-450. En molecular aspect of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds. *Plenum Press. Nato Serie.* 75-91.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(6): 1841–1856.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Chromium, Nickel and Welding. Vol. 49. IARC, Lyon, France; 1990.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. (2001). Dietary Reference intake for a vitamin A, vitamin K, arsenic, Boron, Chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. National Academy Press, Washington, DC.
- Izzotti, A., Bagnasco, M., Camoirano, A., Orlando, M., De Flora, S. (1998). DNA fragmentation, DNA-protein crosslinks, postlabeled nucleotidic modifications, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the lung but not in the liver of rats receiving intratracheal instillations of chromium(VI). Chemoprevention by oral N-acetylcysteine. *Mutat. Res.* 400: 233–244.

Jaime, A. N., Gonzales, C. R. M., Diaz, P. H. (2007). Estrés oxidativo asociado a la exposición ocupacional a sustancias químicas. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*. 8(1): 52-57.

Jakszyn, P., González, C.A., 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World J. Gastroenterol*. 12, 4296-4303.

Jomovaa, K., Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283: 65-87.

Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz, A. L., Gracia, M. I., Day, B. J. (2010). Casiopeina IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicol*. 268: 176-183.

Kawanishi, S., Inoue, S., Sano, S. (1986). Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *Biol. Chem*. 261: 5952-5958.

Kerger, B. D., Finley, B. L., Corbett, G. E., Dodge, D. G., Paustenbach, D. J. (1997). Ingestion of chromium (VI) in drinking water by human volunteers: absorption, distribution, and excretion of single and repeated doses. *J. Toxicol. Environ. Health*. 50: 67-95.

Kennedy, J. C., Pottier, R. H., Pross, D. C. (1990). Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: Basic principles and present clinical experience. *Photochem. Photobiol*. 6: 143-148.

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

Lauwerys, R. R. (2007). *Toxicology Industrially et intoxications professional's*. 5th ed. Paris: Masson. pp 240-254.

Lehmann, H., Carrell, R. W. (1969). Variations in the structure of human hemoglobin. With particular reference to the unstable haemoglobins. *Br Med Bull*. 25: 14-23.

Leal, G. M., García, O. L., Ruiz, A. L., Gracia, M. I., Luna, D. J., Sumano, H. (2007). Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeínas in anaesthetized dogs. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 101: 151-158.

Lindeque, J. Z., Levanets, O., Louw, R., van der Westhuizen, F. H. (2010). The involvement of metallothioninas in mitochondrial function and disease. *Curr. Protein Peptide. Sci*. 11: 292-309.

López, R. A., Carabez, T. A, Rosas, S. F., Mejia, C., Ruiz, A. L., Miledi, R., Martinez, T. A. (2011). The metal-coordinated Casiopeina III Ea induces the petite phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals*. 24:1189-1196.

Marrett, L. D., Hartge, P., Meigs, J. W. (1986). Bladder Cancer and Occupational Exposure to Leather. *Ind Med*. 43:96-100.

Martínez, G. (2005). Base de dato interactiva para la investigación redox.

Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., Santini, C. (2009). Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem*. 9: 185-211.

Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., Marquez, J. (2008). Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch. Toxicol*. 82: 273-299.

- Mejía, C., Ruiz, A. (2008). Casiopeinas IIgly y IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Patol. Oncol. Res.* 14: 467-472.
- Morehouse, K. M., Moreno, S. N. J., Mason, R. P. (1987). The one-electron reduction of uroporphyrin I by rat hepatic microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 257: 276-284.
- Muller, H. J. (1927). Artificial Transmutation of the Gene. *Science* 66:84-87.
- Natale, G., Basso, N., Ronco, A. (2000). Effect of Cr (VI) on early life stages of three species of hylid frogs (Amphibia, Anura) from South America. *Environmental Toxicolo.* 15: 509-512.
- Niki, E., Noguchi, N. (2000). Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *IUBMB Life.* 50: 323-329.
- Nicco, C., Laurent, A., Chereau, C., Weill, B., Batteux, F. (2005). Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed. Pharmacother.* 59: 169-174.
- Pimentel, E., Cruces, M. P., Zimmering, S. (1999). On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cell of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 446: 189-192.
- Pimentel, E., Cruces, M. P., Zimmering, S. (2000). Evidence that chlorophyllin (CHLN) may behave as an inhibitor or a promoter of radiation-induced genetic damage in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 472: 71-74.
- Pimentel, E., Tavera, L., Cruces, M. P., Balcazar, M., de la Rosa M. E. (2003). Low radon-dose effect on fecundity and egg-to-adult viability of *Drosophila*. *Radiat. Measur.* 36: 511-516.
- Pimentel, E., Cruces, M. P., Salceda, S. V. (2007). A long term study of the desiccation resistance of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* from the Mexican nuclear power plant "Laguna Verde". *Environ. Monit. Assess.* 128: 251-257.
- Pimentel, E., Cruces, M. P., Zimmering, S. (2011). A study of the inhibition/promotion effects of sodium-copper chlorophyllin (SCC)-mediated mutagenesis in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat Res.* 722: 52-55.
- Pimentel, E., Vidal, L. M., Cruces, M. P., Krzysztof, J. M. (2013). Action of protoporphyrin-IX in the lifespan of *Drosophila melanogaster* deficient in endogenous antioxidants, Sod and Cat. *Open Journal of Animal Sciences.* 3(4): 1-7.
- Potter, J. D., Steinmetz, K. (1996). Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. *IARC Sci. Publ.* 139: 61-90.
- Pottier, R. H., Chow, Y. F. A., La Plante, J. P., Truscott, T. G., Kennedy, J. C., Beiner, L. A. (1986). Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra in vivo. *Photochem. Photobiol.* 44: 679-687.
- Quiévryn, G., Peterson, E., Messer, J., Zhitkovich, A., (2003). Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry* 42: 1062-1070.
- Rahman, K., (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging.* 2: 219-236.
- Rengaraj, S., Yeon, K. H., Moon, S. H. (2001). Removal of chromium from water and wastewater by ion exchange resin. *Journal of Hazardous Materials B.* 87: 273-287.

- Rigonato, J., Mantovani, M. S., Jordão, B. Q. (2004). Mechanism of Action of Chlorophyllin against Mitomycin-C Mutagenicity in *Allium cepa*. *Cytologia*. 69: 459-465.
- Rick, K., Sroka, R., Stepp, H., Kriegmair, M., Huber, R. M., Jacob, K., Baumgartner, R. (1997). Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *Photochem. Photobiol.* 40: 313-319.
- Ríos, de M. M. C. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Química viva*. 2: 17-28.
- Rivero, M. A., De Vizcaya, R. A., Planc, N., Ruiz, L., Dobrota, M. (2007). Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 165: 189-199.
- Rodríguez, E. S., Vital, G. P. A., Flores, R. F. L., Marín, H. A., Ruiz, A. L., Moreno S. R. (2006). Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 215: 208-217
- Ruiz, A. L. (1994). Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención. SECOFI, Dic. 9 No. 172248.
- Ruiz, A. L., Bravo, G. M. E. (2010). Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr Med Chem.* 17: 3606-3615.
- Schumacker, P.T. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell* 10: 175-176.
- Serment, G. J., Cano, S. P., Reyes, P. E., Velazquez, G. F., Bravo, G. M. E., Ruiz, A. L. (2011). Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas. *Toxicology in vitro.* 25: 1376-1384.
- Shi, X., Dalal, N. S., Kasprzak, K. S. (1993b). Generation of free radicals from hydrogen-peroxide and lipid hydroperoxides in the presence of Cr(III). *Arch. Biochem. Biophys.* 302: 294-299.
- Singh, J., Carlisle, D. L., Pritchard, D. E., Patierno, S. R. (1998). Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncol. Rep.* 5: 1307-1318.
- Sissi, F., Mancin, C., Gatos, M., Palumbo, M., Tecilla, P., Tonellato, U. (2005). Efficient Plasmid DNA Cleavage by a Mononuclear Copper (II) Complex. *Inorg. Chem.* 44: 2310-2317.
- Smith, K. M. (1978). *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Academic Press, New York. pp 439.
- Standeven, A., Wetterhahn, K. J. (1989). Chromium(VI) toxicity: uptake, reduction and DNA damage. *Am. Chem. Coll. Toxicol.* 8: 1275.
- Sunderman, J. W. (2001). Nasal Toxicity, Carcinogenicity and Olfactory Uptake of Metals. *Annals of Clinical/Laboratory Science.* 31 (1): 3-24.
- Téllez, J., Carvajal, R. M., Gaitán, A. M. (2004). Aspectos Toxicológicos Relacionados con la Utilización del Cromo en el proceso Productivo de Curtiembres. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia.* 52: 50-61.
- Trejo, S. C., Palencia, G., Zuñiga, S., Rodríguez, R. A., Osorio, R. L., Luvia, S. T., Gracia, M. I., Marquez, R. L., Sánchez, A., Moreno, G. M. E., Cruz, A., Bravo, G. M. E., Ruiz, R. L., Rodríguez, E. S., Sotelo, J. (2005).

Cas Iigly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*. 7:563–574.

Tribble, D. L., Tak, Y. A., Jones, D. P. (1987). The pathophysiological significance of lipid peroxidative cell injury. *Hepatology*. 7: 377-387.

Tschudy, D. P. (1983). The porphyrias. En: Williams W. J., Beutler E., Erslev A. J. y Lichtman M. A. (eds.) *Hematology*, McGraw-Hill, New York. pp. 691-703.

Vogel, E. W. (1987). Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis*. 2: 161-171.

Vogel, E. W., Zijlstra, J. A. (1987a). Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutat Res*. 180: 189-200.

Vogel, E. W., Graf, U., Frei, H. J., Nivard, M. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens IARC. *Sci. Publ*. 146: 427-470.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem*. 12: 1161-1208.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*. 160: 1-40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 39: 44–84.

Van Steveninck, J., Boegheim, J. P. J., Dubbelman, T. M. A. R. (1988). The influence of porphyrins on iron-catalysed generation of hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*. 250: 197-201.

Vincent, J. B. (2010). Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Trans*. 39: 3787–3794.

Wang, Q., Ponomareva, O. N., Lasarev, M., Turker, M. S. (2006). High frequency induction of mitotic recombination by ionizing radiation in *Mih1* null mouse cell. *Mutat Res*. 594: 189-198.

Waters, M. D., Stack, H. F., Jackson, M. A., Brockman, H. E., de Dora, S. (1996). Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. *Mutat. Res*. 350: 109-129.

Wei, T. H., Hagan, D. J., Sence, M. J., Stryland, E. W., Perry, J. W., Coulter, D. R. (1992). Direct measurements of nonlinear absorption and refraction in solutions of phthalocyanines. *Appl. Phys. B*. 54: 46-51.

Wijnhoven, S. W., Sonneveld, E., Kool, H. J., van Teijlingen, C. M., Vrieling, H. (2003). Chemical carcinogens induce varying patterns of LOH in mouse T-lymphocytes. *Carcinogenesis*. 24: 139-144.

Wootton, B. C. P., Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*. 44: 3135–3148.

Würgler, F. E., Sobels, H., Vogel, E. W. (1984). *Drosophila* as an assay system for detecting changes. *Handbook of mutagenicity test procedure*. Eds. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. y Rmel, C. Elsevier Science Publishers B. V. pp. 555-601.

Xu, M, Orner, G. A., Bailey, G. S., Stoner, G. D., Horio, D. T., Dashwood, R. H. (2001). Post-initiation effects of chlorophyllin and indole-3-carbinol in rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methylimidazo. *Carcinogen*. 22: 309-14.

Zhang, Y., Guan, L., Wang, X., Wen, T., Xing, J., Zhao, L. (2008). Protection of chlorophyllin against oxidative damage by inducing HO-1 and NQO1 expression mediated by PI3K/Akt and Nrf2. *Free Radic. Res*. 42: 362-371.

Zhitkovich, A. (2005). Importance of chromium-AND adducts in mutagenicity and toxicity if chromium (VI) . *Chem. Res. Toxicol*. 18: 3-11.

Zhou, J. F., Chen, W. W., Tong, G. Z. (2003). Ozone emitted during copying process. A potential cause of pathological oxidative stress and potential oxidative damage in the bodies of operators. *Biomed Environ Sci*. 16(2): 95-04.

Zijilstra, A. J. (1987). Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Doctoral Thesis. University of Leiden. Capítulo 1, pp. 7-19.

Zimmering, S., Olvera, O., Hernández, M. E., Cruces, M. P., Arce, C., Pimentel, E. (1990). Evidence for a radioprotective effects of clorofyllin in *Drosophila*. *Mutat. Res*. 245: 47-49.

## 12. CARTA DE ENVIÓ DE ARTÍCULO

**Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza**

---

**De:** ees.toxlet.0.2b255c.20a0b425@eesmail.elsevier.com en nombre de Toxicology Letters  
[toxlet@mgreditorial.com]  
**Enviado el:** domingo, 10 de agosto de 2014 05:37 a.m.  
**Para:** Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza; epimen63@gmail.com  
**Asunto:** Submission Confirmation for

Dear Dr. Emilio Pimentel,

Your submission entitled "Genetic damage induced by CrO<sub>3</sub> can reduce by low doses of Protoporphyrin-IX in somatic cells of *Drosophila melanogaster*" has been received by Toxicology Letters

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/toxlet/>.

Your username is: emilio.pimentel@inin.gob.mx. If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/toxlet/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/toxlet/automail_query.asp).

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Toxicology Letters

### 13. Artículo

#### **Genetic damage induced by CrO<sub>3</sub> can reduce by low doses of Protoporphyrin-IX in somatic cells of *Drosophila melanogaster***

Luz M. Vidal E.<sup>1</sup> Emilio Pimentel P.<sup>1\*</sup>, M. Patricia Cruces M.<sup>1</sup> and Juan C. Sánchez<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), Ocoyoacac, México

<sup>2</sup> Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

\*Corresponding author: [emilio.pimentel@inin.gob.mx](mailto:emilio.pimentel@inin.gob.mx)

## Abstract

Several epidemiological studies have reported the relation between chromium exposure (used in different industrial processes) and cancer risk. Evidence indicates that the hexavalent form is mutagenic and carcinogenic. Chemoprevention has emerged as a good strategy for reducing the risk for exposure to xenobiotics including heavy metals. There is evidence that some tetra-pyrroles such as protoporphyrin IX (PP-IX), a porphyrin without a metal center and which is a precursor of hemoglobin and cytochrome, acts as an antioxidant modulating the induction of antioxidant enzymes. The present study was performed to evaluate their antimutagenic potential against genetic damage induced by chromium trioxide ( $\text{CrO}_3$ ). The wing spot test (SMART) was used. Groups of 48h-old larvae were pretreated for 24 h with 0, 0.69, 6.9 or 69 mM of PP-IX, after which groups of larvae were fed 0.025 to 2.5 mM  $\text{CrO}_3$  solution in *Drosophila* instant medium. The results indicated that the lower PP-IX concentration (0.69 mM) significantly reduced the genetic damage induced by all  $\text{CrO}_3$  concentrations tested. In contrast, 6.9 and 69 mM only inhibited the damage induced by  $\text{CrO}_3$  2.5 mM. Absence of an inhibitor effect of PP-IX against 20 Gy gamma rays suggested that this porphyrin acted preferably forming complexes with chromium at low doses, inactivating its genotoxic action rather than capturing or inactivating the reactive oxygen species generated by the chromium.

**Key words:** Protoporphyrin-IX; hexavalent chromium; reactive oxygen species; SMART; *Drosophila melanogaster*

## 1. Introduction

Exposure to environmental pollutants of anthropogenic origin is associated with an important increase of chronic degenerative diseases including cancer [De Flora and Ferguson, 2005]. Heavy metals are considered to be the most dangerous of xenobiotics, due to their chemical stability and high bioaccumulation in organisms [Llugany et al., 2007, Thomann, 1982]. They have also been associated with diseases such as pneumonia, renal dysfunction, emphysema, and bone cancer [Bernard and Lauwerys, 1984], as well as with an impaired nerve function system [Lebel et al., 1996].

Given this situation, the need arises to implement strategies to reduce the occurrence of degenerative diseases. The first, and the most obvious, is to avoid exposure of human beings to those agents that have the ability to modify the genetic material and therefore increase the risk of diseases such as cancer. However, in practice this is almost impossible since many of such agents are found naturally in the atmosphere (as ultraviolet or ionizing radiation), and others are the products of the metabolism of innocuous compounds such as nitrates [Jakszyn and González, 2006]. The second alternative is to increase the consumption of substances capable of preventing or reducing the adverse effects of mutagenic and carcinogenic agents. This strategy refers to chemoprevention and it is defined as the use of chemical compounds, especially those of natural origin that cause inhibition or reversal of mutagenesis or carcinogenesis in the pre- malignant state [De Flora and Ferguson, 2005].

Among heavy metals, chromium is considered one of the most dangerous. More than one hundred years ago, the International Agency of Research on Cancer (IARC, 1990) recognized the carcinogenicity of chromium [De Flora, 2000]. One of the biggest sources of Cr VI exposure is through the release of particles during stainless steel solder [Frausto de Silva and Williams, 1991; Gauglhofer and Bianchi, 1991]. Exposure pathways include the following: oral, respiratory and dermal [de Flora et al., 1995]. Chromium has been reported to be distributed into the body through the bone marrow, lungs, lymph nodes, spleen, kidney and liver [ATSDR, 2006; Lauwerys, 2007]. The danger of this element is known to occur during the reduction process of Cr (VI) to Cr (III), generating reactive oxygen species (ROS) that interact with the genetic material and are able to induce various alterations, for example: sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations and cross links in double-stranded DNA [Telles, 2004]. Not only workers in manufacturing industries are exposed to chromium compounds; the general public is

also exposed to chromium through cigarette smoke, automobile emissions, landfills and hazardous waste disposal sites (Wu *et al.*, 2012).

Among the natural compounds with chemo-prevention properties, porphyrins are aromatic heterocyclic macrocycles derived from the porphine base structure. They are considered promising mainly because of their low toxicity. These molecules have the ability of forming complexes directly with planar polycyclic structures preventing their interaction with DNA; however, tetrapyrroles can also be interspersed in the molecule [Lauwerys, 2007]. In the case of porphyrins containing some metal ion, their antimutagenic activity is due to its antioxidant effect [Young *et al.*, 2000; Hayatsu *et al.*, 1993; Odin, 1987]. Protoporphyrin-IX, is a molecule with no metal core coming from the biosynthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA) and it is the immediate precursor of heme [Tschudy, 1983]. The toxic effect of PP-IX could probably be due to the imbalance of the redox systems for the over production of ROS [Morehouse *et al.*, 1987; Van Steveninck *et al.*, 1988], leading to an increase in lipid peroxidation, which in turn is the main cause of damage to the liver [Comeorti, 1985; Tribble *et al.*, 1987]. In rats of the CF1 strain, PP-IX induced lipid peroxidation and increased the activity of CAT 30% after 2 hours of administration while the SOD enzyme increases 24 h after administration, yet peroxidation decreases after several doses of PP- IX [Afonso *et al.*, 1999]. Chronic treatment with PP- IX was recently found to prolong the lifespan of a wild *Drosophila* strain. In contrast, half life was reduced in the *Sod* deficient strain; these data provide information that the PP- IX can act as an antioxidant and as a pro-oxidant [Pimentel *et al.*, 2013]. Based on these previous works, the aim of the present study was to evaluate the antimutagenic capacity of PP-IX against the genetic damage induced by CrO<sub>3</sub> (VI), an agent that induced genetic damage especially through ROS.

## 2. Materials and Methods

*Somatic Mutation and Recombination Test.* In order to test DNA damage, the wing spot test [Graf *et al.*, 1984] was performed as follows: three-day-old *mwh +/mwh +* females and *flr<sup>3</sup> / in* (3LR), TM3, *Bds* males, were mated for 2 h and then transferred to an egg-laying surface. Oviposition was restricted to a 2 h period in order to obtain more homogeneous samples in the age of individuals under test. Then 48h-old larvae were collected by density gradient using a 20% sucrose solution. They were subsequently washed with 24 ± 1 °C tap water and pretreated for 24 h in the dark, in flasks (1/4 L) with a paper filter (Whatman # 2), saturated with PP-IX 0,

0.69, 6.9 or 69 mM dissolved in a 5% sucrose solution. Distilled water was used for all solutions. PP-IX and CrO<sub>3</sub> were purchased from Sigma Chemicals Company (St. Louis, MO).

On completion of the pretreatment period, the larvae were washed with tap water at 24 ± 1°C. At this time, aliquots of larvae from each pretreatment concentrations of PP-IX were treated with 0.025, 0.25, 1.25, 2.0 or 2.5 mM CrO<sub>3</sub> in plastic vials (9.5 cm height and 2.5 cm diameter) with 1.5g of *Drosophila* instant medium (formula 4-24 Carolina Biol. Supply Co.). Experiments were carried out in triplicate for each pretreated PP-IX solution and for each treatment CrO<sub>3</sub> solutions. All treatments were conducted in the dark.

Upon eclosion, organisms were fixed in 70% alcohol and the wings of the *mwh* *+/+* *flr*<sup>3</sup> flies (i.e., non-Ser) were mounted on slides for 40X microscopic analysis. The wings were examined to identify small single spots (one or two cells), large single spots (more than two cells) of either *mwh* or *flr*, and *mwh-flr* twin spots. Single *mwh* spots are expected to be produced following mutation at the *mwh* + locus or by an interchange between the *mwh* and *flr*<sup>3</sup> loci succeeded by homozygosis for *mwh*. Single *flr*<sup>3</sup> spots may arise by mutation at the *flr*<sup>3+</sup> locus or by double exchange. Twin spots are the result of an interchange between the *flr*<sup>3</sup> and the centromere [Graf et al., 1984]. For a description of the mutants see Lindsley and Zimm (1992).

All data for each group represent at least two experiments performed in triplicate. Results from the groups treated with PP-IX and CrO<sub>3</sub> were compared with the group corresponding to each CrO<sub>3</sub> concentration. The SMART statistical program proposed by Frei and Würigler (1988) was used to determine differences between treatments. The criterion for significance was set at  $p < 0.05$ .

*Toxicity test:* In order to quantify the toxicity provoked by the PP-IX and CrO<sub>3</sub> by themselves, groups of 50 48h-old larvae *mwh* *+/+* *flr*<sup>3</sup> were collected and treated following the above described method using the same concentrations of PP-IX and CrO<sub>3</sub>. To evaluate the toxicity of the combined treatment of the different PP-IX concentrations, we selected the higher CrO<sub>3</sub> concentration (2.5mM). Chi square test was used for statistical analysis at  $p < 0.05$  level.

*Treatment with gamma rays:* To explore the activity of the PP-IX as a radical scavenger, we collected 48h-old *mwh* *+/+* *flr*<sup>3</sup> larvae and pretreated them for 24 h with PP-IX following the method described above. On completion of the pretreatment, larvae from each concentration were divided into two groups, one of each was irradiated with 20 Gy gamma rays in a Transelektro LGI-01, Co-60 irradiator, with a dose rate of up to 1259.44 Gy/h. and the other

served as control. After irradiation, larvae were put into a plastic vial with hydrated medium formula 4-24. All the vials were introduced into a culture room until the development concluded. The analysis of the wings was done as described before.

### 3. Results

The frequencies of all kinds of spots induced by the different concentrations of  $\text{CrO}_3$  are presented in Table 1. Statistical significant differences were found for all kinds of spots from 0.25 mM concentration. Noticeably, the higher concentration provoked a frequency of mutation that represents 23 times the frequency found for the control group.

Table 2 includes the results obtained with the pre-treatment of 0.69, 6.9 or 69 mM of PP-IX and with the combined treatment of PP-IX +  $\text{CrO}_3$ : sections 1, 2 and 3 respectively. Comparison of the action of PP-IX alone indicated that only 69 mM doubled the basal mutation frequency.

The statistical analysis of comparing the combined treatments with their respective positive control in Table 1 indicated that pretreatment with 0.69 mM of PP-IX caused a reduction in the frequency of all kinds of spots from PP-IX + 0.025 mM  $\text{CrO}_3$ , unless this reduction were not statistically significant for all kinds of spots. A statistically significant reduction was found from PP-IX 0.69 +  $\text{CrO}_3$  0.25 mM, which decreased the twin spots induced by all concentrations of  $\text{CrO}_3$  with the exception of PP-IX + 1.25 mM group. Pre-treatment with PP-IX 6.9 mM caused only a slight reduction in the frequency of the different kinds of spots from the PP-IX + 0.25 mM group, and only a weak decrease with respect to damage caused by 2.0 mM  $\text{CrO}_3$ ; however, this concentration of PP-IX plus 2.5 mM  $\text{CrO}_3$  fell six times the frequency of total spots induced by the mutagen alone (2.5 mM). Comparison of the effect of pre-treatment with the 69 mM concentration and the previous two indicated that the combined treatment PP-IX +  $\text{CrO}_3$  2.5 mM group decreased four times the frequency of total spots induced by  $\text{CrO}_3$  alone.

Results of toxicity for different concentrations of PP-IX,  $\text{CrO}_3$  (0.25, 2 and 2.5 mM) combined treatments are shown in Table 3. The analysis showed that PP-IX was non-toxic at the three concentrations tested compared to the control.  $\text{CrO}_3$  was toxic at 2 and 2.5 mM; the latter reduced viability 53% over the control. In contrast the combined treatments reduced toxicity, but 69 PP-IX+ 2.5  $\text{CrO}_3$  increased viability 7% compared with the 2.5 mM  $\text{CrO}_3$  control group. Table 4 presents the results obtained for somatic mutation when larvae were pretreated with

different concentrations of PP-IX and then treated with 20 Gy of gamma rays. The results indicated that PP-IX in all tested concentrations had no effect on damage induced by gamma rays.

#### **4. Discussion**

Cr [VI] is well known to produce breaking in one or both strands of DNA; DNA-DNA bonds; DNA cross-links with proteins, besides modifying the nucleotides as is the case of guanine, 8-hydroxiguanina links. Although the mechanisms involved are not yet very clear, all DNA alterations can cause chronic degenerative diseases, including cancer (De Flora, 2000).

Genetic damage induced by chromium is mainly produced as a result of its ability to induce free radicals, especially during the reduction from Cr VI to Cr III. Such radicals are the superoxide anion ( $O^{2-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $OH\bullet$ ) [Jomovaa and Valko, 2011]. To counteract the action of ROS, cells have a system of endogenous enzymes such as Sod, Cat and glutathione. Furthermore, the cell face radicals attack using exogenous antioxidants such as vitamins. The main subject of the present study was to evaluate the antioxidant capacity of PP-IX avoiding the genetic damage induced by  $CrO_3$ . There is evidence that the antioxidant action of this tetrapyrrol depends on its concentration [20-Afonso *et al.*, 1999; Gibson and Hilf, 1985; Kennedy, 1990]. The results obtained in our study provided evidence of this effect: although the PP-IX was not toxic by itself (Table 3) and concentrations of 0.69 and 6.9 mM did not induce genetic damage, the fact that the second concentration decreased toxicity and the basal mutation frequency by itself (Table 3) suggested that protoporphyrin can act as a true antimutagen. Moreover, the highest concentration (69 mM) proved to be mutagenic and induced damage comparable with 0.25 mM of  $CrO_3$ . In agreement with this, PPIX has been proven to induce oxidative stress [Afonso *et al.*, 1999] via production of superoxide ions and more efficiently of singlet oxygen in organic solutions [Cox *et al.*, 1979]. Our results are in accord with this finding. Pimentel *et al.* (2011) found that this pigment at 69 mM can be mutagenic 24 h after its administration in combination with 0.5 mM N-nitroso-N-ethylurea (ENU) and that such activity may persist for 72 h. However, the evidence found in this study indicated that in organisms pretreated with PP-IX and subsequently treated with  $CrO_3$ , the frequency of genetic damage was reduced in most of the treated groups.

Worth noting is the effect of the lowest concentration of PP-IX, (0.69 mM) which caused a significant decrease of damage in four of the five concentrations of CrO<sub>3</sub> tested. In comparison, 6.9 mM significantly decreased the frequency of damage induced by 2 and 2.5 mM of the mutagen, and the highest concentration (69 mM) only reduced the damage induced by 2.5 mM. Even so, 2.5 mM of CrO<sub>3</sub> provoked high mortality (61%) which could result in loss of information; in combination with PP-IX, 69 mM increased viability 7% and provoked a net effect of reducing 3 times inhibition of the genetic damage induced by CrO<sub>3</sub> 2.5 mM ( $p < 0.05$ ).

Explaining the increase in mutation frequency obtained in the groups 69 + 1.25 and 2 mM CrO<sub>3</sub> is not simple. However, this increase could suggest a synergistic effect of CrO<sub>3</sub> plus the pro-oxidant action of PP-IX for its accumulation generating superoxide, as suggested by Afonso *et al.* [1999]. PP-IX reacts with molecular oxygen producing peroxide radicals that cause lipid peroxidation and lead to different cell damage such as structural changes in the cell membrane, damage to proteins, inactivation of receptors, enzymes and ion channels, all of which can lead to cell death [Girotti, 1985]. Other studies have demonstrated that porphyrins can bind to DNA via a specific insertion within only one strand of DNA, i.e., by hemi-intercalation [Lipscomb *et al.*, 1996] with a binding constant of around  $10^6 \text{ M}^{-1}$  [Fiel *et al.*, 1976; Sari *et al.*, 1990] In this way, these extra-helical structural elements could be a factor in certain pathways of mutagenesis [Afonso *et al.*, 1999].

The fact that the lowest concentration of PP-IX provoked a significant decrease in damage could be due to the fact that the porphyrin ring could make complexes or act as a chelator, introducing the chromium into the ring. PP-IX has been reported to be able to bind other metals such as zinc and nickel [Peixsoton *et al.*, 2005]. The different studies on the role of ferrochelatase have revealed that this enzyme catalyzes zinc as well as the iron chelating activity of protoporphyrin [Lauwerys, 2007; Hayatsu *et al.*, 1993]. Ferrochelatase is known to catalyze insertion of divalent transition metal ions other than iron in vitro, most notably zinc, but cobalt, nickel, and copper have also each been reported to act as substrates, although species-specific differences have been noted [Gora et al 1996, Hanson et al 1984, Taketani, S., and Tokunaga 1982]. Ferrochelatase could participate in the chelating chromium, provoking a reduction in its mutagenic effect. The work performed by Pimentel *et al.* [1996] and Gaivão *et al.* [1999], have demonstrated that the somatic mutation and recombination test in *Drosophila* is a useful tool that detects the very low doses of alpha particles and the ROS induced by oxidants agents,

respectively; a possibility to explain our results is the ability of PP-IX to release electrons [Fijan *et al.*, 1995], which may have inactivated the free radicals generated by chromium thereby avoiding DNA damage. The studies performed by Afonso *et al.* (1999) provide evidence of the action of PP-IX for generating superoxide and hydrogen peroxide, causing activation of superoxide dismutase and catalase enzymes that help to inactivate the ROS produced by the chromium oxide-reduction reactions. In contrast, Cruces *et al.*, (2009) found that a pretreatment with very low doses of sodium copper chlorophyllin increased the somatic mutation frequency induced by 10 Gy gamma rays.

Results from the present work showed evidence that the lower concentration of PP-IX reduced the genetic damage of the radiomimetic agent CrO<sub>3</sub>. To evaluate the ability of PP-IX as a radical scavenger, we tested its action against the effect of 20 Gy of gamma rays (Table 4). The comparison of the effect of PP-IX against the two agents revealed that the action of PP-IX could be preferable through the formation of chemical complexes with chromium rather than decreasing reactive oxygen species. These findings placed PP-IX as an effective mutagen at low doses.

### **Acknowledgements**

The work was supported in part by a grant (No. 167461) to Cruces M.P. from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, and it involved in part research carried out by L.M. Vidal to obtain the Master's Degree in Environmental Sciences at the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). The authors wish to acknowledge the splendid technical assistance provided by Hugo Suarez Contreras and Alicia Hernández Arenas.

### **5. References**

1. Afonso, S., Vanore, G., Batlle, E., 1999. Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Rad. Res.* 31, 161-170.
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Profile for chromium. Department of Health and Human Services Toxicological, Department of Commerce. 1993. Springfield, VA, USA.
3. Agency for Toxic Substances and disease Registry (ATSDR). (2006). Chromium Toxicity. Case Studies in Environmental Medicine. Course: SS3048 U.S.
4. Bernard, A., Lauwerys, R., 1984. Cadmium in Human Population. *Experien.* 40, 143-152.

5. Comporti, M., 1985. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory investigation* 53, 599-623.
6. Cox, G.S., Whitten, D.G., Giannotti, C., 1979. Interaction of porphyrin and metalloporphyrin excited states with molecular oxygen. Energy-transfer versus electron-transfer quenching mechanisms in photooxidations. *Chem. Phys. Lett.* 67, 511–515.
7. Cruces, M.P., Pimentel, E., Zimmering, S., 2009. Evidence that low concentrations of chlorophyllin (CHLN) increase the genetic damage induced by gamma rays in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 679, 84-86.
8. De Flora, S., Camoirano, A., Bagnasco, M., Zancacchi, P., 1995. Chromium and carcinogenesis. In: Berthon, G. (Ed.), *Handbook on Metal Ligand Interactions in Biological Fluids. Bioinorganic Medicine*, vol. 2. Marcel Dekker, New York, pp. 1020–1036.
9. De Flora, S., 2000. Threshold mechanisms and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 533–541.
10. De Flora, S., Ferguson, L.R., 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 591, 8-15.
11. Fiel, R.J., Howard, J.C., Mark, E.H., Datta, G.N., Gupta, N., 1979. Interaction of DNA with a porphyrin ligand: evidence for intercalation. *Nucleic Acids Res.* 6, 3093–3118.
12. Fijan, S., Hönigsmann, H., Ortel, B., 1995. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and desferrioxamine. *Dermatol.* 133, 282-288.
13. Frausto da Silva, J.J.R., Williams, R.P.J., 1991. The biological chemistry of the elements. *The Inorganic Chemistry of Life*, Clarendon Press, Oxford, p. 532-551.
14. Frei, F., Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297–308.
15. Gaivão, I.; Sierra, L.M.; Comendador, M.A. 1999. The w/w+ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of oxygen species inducing compounds", *Mutat. Res.* 440:139 - 145.
16. Gauglhofer, J.W., Bianchi, V., 1991. *Metals and their compounds in the environment*, VCH, Weinheim Germany.
17. Gibson, S.L., Hilf, R., 1985. Interdependence of fluence, drug dose and oxygen of hematoporphyrin derivative induced photosensitisation of tumor mitochondria. *Photochem. Photobiol.* 42, 367-373.
18. Girotti, A.W., 1985. Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 1, 87-95.
19. Gora M, Grzybowska E, Rytka J, Labbe-Bois R. 1996. Probing the active-site residues in *Saccharomyces cerevisiae* ferrochelatase by directed mutagenesis. *In vivo and in vitro* analyses. *J Biol Chem.* 271:11810-11816.
20. Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153–188.
21. Hanson, J. W., and H. A. Dailey. 1984. Purification and characterization of chicken erythrocyte ferrochelatase. *Biochem. J.* 222:695-700.
22. Hayatsu, H., Negishi, T., Arimoto, S., Hayatsu, T., 1993b. Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.* 290, 79-85.

23. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Chromium, Nickel and Welding. Vol. 49. 1990. Lyon, France.
24. Jakszyn, P., González, C.A., 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World J. Gastroenterol.* 12, 4296-4303.
25. Jomovaa, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65-87.
26. Kennedy, J.C., Pottier, R.H., Pross, D.C., 1990. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: Basic principles and present clinical experience. *Photochem. Photobiol.* 6, 143-148.
27. Lauwerys, R.R., 2007. *Toxicología Industrial e intoxicaciones profesionales*. 5th ed. Paris: Masson. pp 240-254.
28. Lebel, J., Mergler, D., Lucotte, M., 1996. Evidence of Early Nervous Systems Dysfunction in Amazonian Populations Exposed to Low-Levels of Methylmercury. *Neurotoxicol.* 17, 157-168.
29. \*Lindsley, D., Zimm, G., 1992. *The genome of Drosophila melanogaster*. San Diego, CA: Academic Press.
30. Lipscomb, L.A., Zhou, F.X., Presnell, S.R., Woo, R.J., Peek, M.E., Plaskon, R.R., Williams, L.D., 1996. Structure of a DNA-porphyrin complex. *Biochemistry* 35, 2818–2823.
31. Llugany, M., Tolra, R., Poschnrieder, C., Carceló, J., 2007. Hiperacumulación de metales ¿Una ventaja para la planta y para el hombre?. *Ecosistem.* 16, 1-8.
32. Morehouse, K.M., Moreno, S.N.J., Mason, R.P., 1987. The one-electron reduction of uroporphyrin I by rat hepatic microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 257, 276-284.
33. Odin, A.P., 1997. Antimutagenicity of the porphyrins and non-enzyme porphyrin-containing proteins. *Mutat. Res.* 387, 55-68.
34. Peixoto, A.F., Pereira, M.M., Sousa, A.F., Pais, A.A.C., Neves, M.C.P.M.S., Silva, A. M.S., Cavaleiro J.A.S., 2005. Improving regioselectivity in the rhodium catalyzed hydroformylation of protoporphyrin-IX and chlorophyll a derivatives. *J. Molecular Catalysis* 235, 185-193.
35. Pimentel, E., Zimmering, S, de la Rosa, M.E., Tavera, L., Cruces, M.P. 1996. Evidence for an effect of exposure to low levels of alpha particle irradiation in larval cells of *Drosophila* as measured in the wing-spot test. *Mutat. Res.*, 354:139–142.
36. Pimentel, E., Cruces, M.P., Zimmering, S., 2011. A study of the inhibition/promotion effects of sodium-copper chlorophyllin (SCC)-mediated mutagenesis in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat Res.* 722, 52-55.
37. Pimentel, E., Vidal, L.M., Cruces, M.P., 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, 1-7.
38. Sari, M.A., Battioni, J.P., Dupre, D., Mansuy, D., Le Pecq, J.B., 1990. Interaction of cationic porphyrins with DNA: importance of the number and position of the charges and minimum structural requirements for intercalation. *Biochemistry* 29, 4205–4215.
39. Taketani, S., and Tokunaga, R. 1982. Purification and substrate specificity of bovine liver-ferrochelatase. *Eur. J. Biochem.*, 127, 443-447

40. Téllez, J., Carvajal, R.M., Gaitán, A.M., 2004. Aspectos Toxicológicos Relacionados con la Utilización del Cromo en el proceso Productivo de Curtiembres. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia* 52, 50-61.
41. Tribble, D.L., Tak, Y.A., Jones, D.P., 1987. The pathophysiological significance of lipid peroxidative cell injury. *Hepatology* 7, 377-387.
42. Thomann, R.V., 1982. Physico-Chemical and Ecological Modeling of the Fate of Toxic Substances in Natural Water Systems. Prepared for the Conference on Modelling the Fate and Effect of Toxic Substances in the Environment. Copenhagen (Denmark).
43. Tschudy, D.P., 1983. The porphyrias. En: Williams W. J., Beutler E., Erslev A. J. y Lichtman M. A. (eds.) *Hematology*, McGraw-Hill, New York. pp. 691-703.
44. Van Steveninck, J., Boegheim, J.P.J., Dubbelman, T.M.A.R., 1988. The influence of porphyrins on iron-catalysed generation of hydroxyl radicals. *Biochemical Journal* 250, 197-201.
45. Wu, C.H., *et al.*, 2012. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 488, 499–503.
46. Young, S.C., Sun, T.H., Kyung, H.C., Young, H.C., An, S.C., 2000. Chemopreventive activity of porphyrin derivatives against 6- Sulfooxymethylbenzo(a)pyrene mutagenicity. *J. Cancer Prev.* 1, 311-317.

**Table 1. Spots frequency induced in 48 h larvae *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* by different concentrations of chromium trioxide (VI)**

Treatment (mM)	No. of wings	Spots per wing (number of spots)							
		Small single spots		Large single spots		Twin spots		Total spots	
CrO <sub>3</sub>		(1-2 cells), m=2		(>cells), m=5		m=5		m=2	
0	160	0.24	(39)	0.09	(14)	0.01	(1)	0.34	(54)
0.025	120	0.26	(31) -	0.04	(5) -	0.03	(4) i	0.33	(40) -
0.25	150	0.43	(64) +	0.11	(16) -	0.05	(8) +	0.59	(88) +
1.25	118	0.63	(74) +	0.36	(42) +	0.14	(16)+	1.12	(132)+
2.0	80	0.81	(65) +	0.52	(42) +	0.45	(36)+	1.79	(143)+
2.5	120	2.87	(344) +	1.97	(236) +	2.11	(254)+	6.95	(834)+

Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988): + = positive; - = negative; w = weak positive; i = inconclusive; m = multiplication factor. Probability levels: alpha = beta = 0.05. One side statistical test.

**Table 2. Spots frequency induced by chromium trioxide (VI) treatment in 48 h larvae *mwh* +/- *flr*<sup>3</sup> pre-treated 24 h with 0.69, 6.9 or 69 mM of PP-IX**

Treatment (mM)	No. of wings	Spots per wing (number of spots)						Total spots	
		Small single spots (1-2 cells), m=2		Large single spots (> cells), m=5		Twin spots m=5		m=2	
Pre-treatment with PP-IX 0.69 mM (Section 1)									
0.69	120	0.33	(40) i	0.05	(6) -	0.03	(3) i	0.41	(49) -
+0.025	80	0.16	(13)i	0.02i	(2) i	0.02	(2) i	0.21	(17) i
+0.25	80	0.30	(24)i	0.06	(5) -	0.01	(1) i	0.37	(30)+
+1.25	80	0.41	(80)+	0.10	(8) +	0.14	(11)-	0.65	(52)+
+ 2.0	80	0.70	(56)-	0.32	(26) -	0.26	(21)+	1.30	(103)+
+ 2.5	120	0.57	(69)+	0.32	(38) +	0.28	(33)+	1.17	(140)+
Pre-treatment with PP-IX 6.9 mM (Section 2)									
6.9	120	0.23	(28) -	0.05	(6) -	0	(0)	0.28	(34) -
+ 0.025	40	0.26	(8) i	0.08-	(3) -	0	(0)	0.28	(11) i
+ 0.25	80	0.31	(25) i	0.14	(11) -	0.04	(3) i	0.59	(88) -
+ 1.25	80	0.51	(41) -	0.37	(30) -	0.12	(9) -	1.00	(80) -
+ 2.0	80	0.59	(47) +	0.31	(25) -	0.30	(24) -	1.20	(96) w
+ 2.5	120	0.64	(77) +	0.32	(38) +	0.23	(28) +	1.19	(143) +
Pre-treatment with PP-IX 69 mM (Section 3)									
69	160	0.51	(81) +	0.14	(23) -	0.01	(2) i	0.66	(106) +
+ 0.025	120	0.37	(45) -	0.08	(10) -	0	(0)	0.46	(55) -
+ 0.25	120	0.32	(39) -	0.08	(9) -	0.02	(2) i	0.42	(50) i
+ 1.25	80	1.51	(121) -	0.56	(45) -	0.40	(32) -	2.47	(198) -
+ 2.0	80	1.10	(87) -	0.60	(48) -	0.54	(43) -	2.22	(178) -
+ 2.5	140	0.92	(129) +	0.46	(64) +	0.40	(56) +	1.78	(249) +

Statistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988): + = positive; - = negative; w = weak positive; i = inconclusive; m = multiplication factor. Probability levels: alpha = beta = 0.05. One side statistical test. The comparisons were between each group PP-IX+CrO<sub>3</sub> concentration with the respective positive control concentration included in Table 1. The signs indicated in the PP-IX concentration alone are the results from the comparisons with the negative control.

**Table 3. Toxicity of 48 h age larvae *mwh*+/*flr*<sup>3</sup> after the treatment for 24 h with PP-IX, CrO<sub>3</sub> or combined treatment**

Treatment (mM)	No. of larvae	No. Viable larvae ± EE	% of toxicity
0	500	420 ± 0.9	16
PP-IX			
0.69	500	394 ± 1.7	21
6.9	500	447 ± 0.6	11
69	500	368 ± 0.5	26
CrO <sub>3</sub>			
0.25	500	448 ± 0.3	10
2.0	300	194 ± 2.8	35*
2.5	500	194 ± 0.8	61*
PP-IX + CrO <sub>3</sub>			
0.69 + 2.5	400	164 ± 1.2	59
6.9 + 2.5	500	216 ± 2.0	57
69 + 2.5	500	230 ± 1.8	54**

\*: Significant to  $p < 0.05$ . Compared with control.

\*\* : Significant to  $p < 0.05$ . Compared with CrO<sub>3</sub> 2.5 mM.

**Table 4. Spots frequency induced in 48 h old *mwh* +/*flr*<sup>3</sup> larvae pretreated 24 h with different concentrations of PP-IX and subsequently treated with 20 Gy of gamma rays**

Treatment	No. of wings	Spots per wing (number of spots)							
		Small single spots (1-2 cells), m=2		Large single spots (> cells), m=5		Twin spots m=5		Total spots m=2	
0	40	0.27	(11)	0.05	(2)	0.02	(1)	0.35	(14)
20 Gy	80	0.70	(56)	1.57	(126)	0.06	(5)	2.33	(187)
0.69 +	80	0.82	(66) -	1.16	(93) w	0.08	(7) -	2.07	(166)-
6.9 +	80	0.69	(55) -	1.84	(147) -	0.15	(12) -	2.67	(214)-
69 +	80	1.16	(93) -	1.52	(122) -	0.07	(6) -	2.76	(221)-

Statistical diagnoses according to Frei and Wüergler (1988): + = positive; - = negative; w = weak positive; i = inconclusive; m = multiplication factor. Probability levels: alpha = beta = 0.05. One side statistical test.