

La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón *in vivo*

Ma. del Carmen García-Rodríguez,* Mario A. Altamirano-Lozano*

RESUMEN

La exposición de las poblaciones humanas a diferentes agentes xenobióticos ha generado un considerable interés en el uso de suplementos dietéticos, particularmente productos derivados de plantas, debido a que se ha demostrado que existe una relación inversamente proporcional entre el consumo de vegetales y la incidencia de cáncer. Esta búsqueda y el estudio de sustancias con propiedades protectoras o moduladoras del daño al ADN, surge como una opción complementaria a los estudios de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se pueden generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores de daño genotóxico. La clorofilina (CFL) es una sal de la clorofila con sodio y cobre, conteniendo un anillo de porfirina con un ion metálico en el centro, teniendo además átomos de sodio o potasio reemplazando los grupos fitil éster. Algunos autores han demostrado los efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos de la CFL en organismos vivos incluyendo el humano. Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que cuando la CFL es administrada intraperitonealmente a ratones normales y a hembras preñadas, ésta es capaz de proteger del daño genotóxico inducido por metales como el cromo, incluso a los mismos fetos, sin que se muestren efectos tóxicos en los animales tratados con la CFL. Estos mismos resultados se observaron cuando se empleó radiación gamma. Por otro lado cuando hembras preñadas fueron tratadas con altas dosis de CFL, ésta indujo una pérdida total de las camadas, sin embargo cuando hembras preñadas fueron tratadas con CrO₃ se observó una alta incidencia de malformaciones externas y esqueléticas y cuando la CFL se administró previa al tratamiento con cromo se observó una disminución de las malformaciones externas. Según estudios realizados, los probables mecanismos antimutagénicos de la CFL son: la captura de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno (EROs), la supresión o in-

ABSTRACT

Exposure of human populations to different environmental xenobiotic agents has generated considerable attention in the use of dietary supplements particularly plant products because exists an inverse correlation between the consumption of vegetables and incidence of cancer. These search and study of substances with protective properties or damage modulators to DNA emerge as a complementary option to genotoxicity studies. The analysis of the protection mechanisms generates alternatives to counteract the effects of agents causing the genotoxicity damage. Chlorophyllin (CHL) is a sodium-copper chlorophyll salt with a flat porphyrin ring and a metal ion atom in the center, with sodium or potassium atoms replacing the phytol ester groups. Several authors have demonstrated the antimutagenic and anticarcinogenic effects of CHL in live organisms including humans. Results obtained in our laboratory show that when CHL was administered i.p. to normal mice, and pregnant female mice, it had a protective effects against genotoxic damage induced by metals such CrO₃ in all animals, including the fetuses, with out toxicity in the treated animal. The same results were observed using gamma radiation. On the other hand when pregnant females were exposed to high doses of CHL, its induce total litter loss, however when CrO₃ was injected to pregnant mice resulted in significant increase in the external and skeletal malformations. CHL treatment before chromium injection resulted in a decreased in the external alterations. According the previous studies, the probable antimutagenic mechanisms of CHL are scavenging of free radicals and active oxygen species, suppression or interference with metabolic activation by specific cytochrome (P-450) and others metabolizing enzymes, and formation of complexes with promutagens or reactive moieties.

* Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D. F.

Correspondencia:

Dra. Ma. del Carmen García-Rodríguez
Bioterio, Campus II, FES-Zaragoza, UNAM. A.P. 9-020, 15000, D.F., México. Fax: +52 5773-6330. E-mail: maricar_67@yahoo.com

Recibido: 21-08-2006

Aceptado: 30-03-2007

terferencia de la activación metabólica por citocromo (P-450) y otras enzimas metabólicas, y la formación de complejos con promutágenos o grupos funcionales reactivos.

Palabras clave: Clorofilina, antimutagénesis, anticarcinogénesis, trióxido de cromo.

INTRODUCCIÓN

La modulación y protección de daño al ADN por sustancias químicas, son temas que siempre han llamado la atención. En las primeras pruebas, las sustancias que se analizaron resultaron ser tóxicas, por lo que fueron dejadas de lado. Tiempo después, Phillips en 1975¹ publica un estudio epidemiológico en el que concluye que el estilo de vida y los hábitos alimenticios juegan un papel importante en el riesgo de desarrollar cáncer. Con base en sus hallazgos, se planteó la posibilidad de que los constituyentes de la dieta, particularmente la vegetariana, contienen sustancias que de alguna manera controlan o protegen a los organismos de los efectos de algunos agentes inductores de cáncer, sin embargo, no es sino hasta la década de los noventa cuando inicia el mayor auge de su estudio.

A partir del análisis de Phillips varios investigadores reiniciaron los estudios sobre la modulación y protección del daño contra diversos mutágenos. En estos trabajos probaron preferentemente extractos de frutas y vegetales, observando que ambos tipos de extractos tienen gran actividad antimutágena.²⁻⁵

Estudios posteriores permitieron discriminar entre los componentes que presentaban una mayor actividad antimutágena y se encontró que pigmentos como los beta-carotenos y la clorofila, así como algunas vi-

Key words: *Chlorophyllin, antimutagenicity, anticarcinogenicity, chromium trioxide.*

taminas (A, C, D y E) eran las principales sustancias que les conferían esta propiedad a las frutas y a los vegetales (*Cuadro I*), siendo esta propiedad más marcada para el caso de la clorofila.⁶⁻¹³

Actualmente, la lista de los componentes de la dieta con propiedades antimutágenas y anticancerígenas, se ha incrementado formidablemente, de tal suerte que ya se han descrito alrededor de 500 agentes con este potencial. Con base a esos resultados se han podido plantear algunos mecanismos de protección como: la bioantimutagénesis, la desmutagénesis, la inactivación de enzimas, la formación de complejos y la captura de radicales libres entre otros.¹³⁻¹⁷

El presente trabajo tiene como objetivo el mostrar algunos de los trabajos que se han realizado a nivel experimental para demostrar que sustancias como la clorofilina tienen propiedades que permiten proteger a los organismos vivos de la acción de agentes mutágenos y carcinógenos químicos y físicos ambientales.

CLOROFILINA

La clorofila es el pigmento natural que le da el color verde a los vegetales. Fue aislada en 1817 por los químicos Pelletier y Caventou de Francia, quienes la separaron por primera vez y la llamaron clorofila,

Cuadro I. Principales fuentes alimenticias de algunos constituyentes de la dieta descritos como antimutágenos y anticancerígenos.

Sustancia protectora de daño mutágeno o cancerígeno	Principales fuentes alimenticias
<ul style="list-style-type: none">• Vitamina A• Beta carotenos• Vitamina C• Vitamina E• Selenio• Clorofila y sus sales• Indol-3-carbinol• Capsaicina• Fibra vegetal• Organosulfuro• Antraquinona• Flavonoides	<ul style="list-style-type: none">• Margarina, hígado• Vegetales rojos y amarillos (zanahoria, jitomate etc.)• Principalmente en cítricos• Aceites vegetales y harinas• Carnes, huevos• Vegetales verdes• Crucíferas• Chile• Vegetales fibrosos (Piña, melón etc.)• Ajo• Sábila• Uvas rojas, vinos maduros

nombre derivado del adjetivo griego *jlorós* y el sustantivo *fýllon*, que significa "verde de hoja".

La molécula de clorofila (*Figura 1a*) posee una gran similitud con la de hemoporfirina de la sangre (*Figura 1b*), por lo que sus primeras aplicaciones fueron encaminadas hacia su uso terapéutico en el tratamiento de la anemia. Tomando en consideración que la clorofila es poco estable y poco soluble en el agua, en los estudios experimentales se ha preferido trabajar con sus sales llamadas clorofilinas (CFL) con mejores resultados.^{13,18,19}

De todas las sales de la clorofila la más empleada terapéuticamente y en la investigación biológica es la CFL-cupri-sódica, cuya estructura química está conformada por un anillo tetrapirrólico que contiene puentes dobles conjugados con un metal al centro, en

este caso cobre (*Figura 1c*), y cuya fórmula química es $C_{34}H_{31}Na_4CuO_6$.

La actividad protectora a la inducción de daño al ADN tanto de la clorofila como de la CFL se ha probado con éxito en diferentes sistemas, desde el ensayo de Ames con *Salmonella typhimurium*, hasta líneas celulares de mamíferos (*Cuadro II*).²⁰⁻³⁹

A partir de los estudios en los que se ha demostrado que la clorofila, cuando es ingerida por los humanos en su dieta (vegetales verdes), es transformada en feofitina, pirofeofitina y feoforbida, las cuales presentan una actividad antitumorigena y antimutágena contra compuestos como el 3-metilclorantreno, se ha sugerido que los derivados de la clorofila pueden jugar un papel importante en la prevención del cáncer.⁴⁰ Otros resultados que apoyan esta idea son los

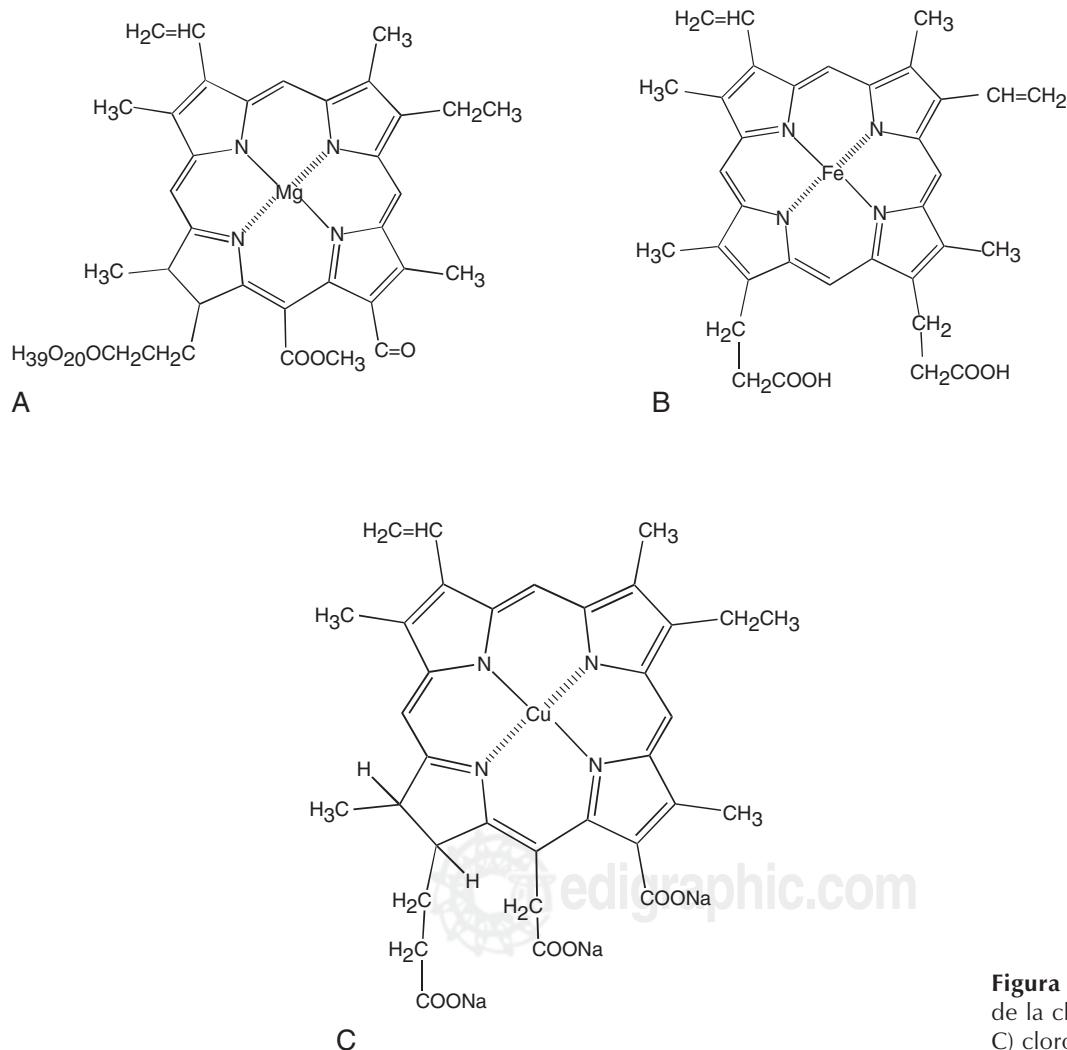


Figura 1. A) Estructura química de la clorofila, B) hemoporfirina, C) clorofilina cupri-sódica.

Cuadro II. Algunos estudios de la actividad protectora de la clorofilina en diferentes sistemas.

Agente	Sistema de prueba	Agente inductor de daño (efecto)	Referencia
Clorofilina	<i>S. typhimurium</i> /sistema microsómico S9 de hígado de rata <i>Salmonella</i> /pruebas de reversión de genes microsómicos Células V59 de hámster chino <i>S. typhimurium</i> <i>S. typhimurium</i> TA98 y <i>Drosophila</i> sp Células CHO <i>in vivo</i> <i>Drosophila</i> Ensayo de <i>Salmonella</i> resistente a arabinosa <i>Salmonella</i> /activación de hígado de trucha Médula ósea de ratón, aberraciones cromosómicas (administración oral)	Productos de pirólisis de aminoácidos(+) Carcinógenos de acción directa e indirecta Benzo[a] pirenos (+) Mezclas complejas de la dieta y ambientales(+) Trp-P-2(+) Tiotepa (+) Radiación gamma MNNG. AFB ₁ B[a, P, 2AA (+) AFB ₁ y 2 aminas heterocíclicas(+)	20 21 22 23 24 25 26 27 28
	Méjula ósea de ratón (ICH) Espermatogonias de ratón (ICH) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D61.M <i>S. typhimurium</i> (TA1535/pSK 1002)	Nicotina (+) Cloruro de cobalto (+) Cloruro de cesio (+) Cloruro de mercurio (+) Óxido de cromo (VI) (+) Radiación gamma Radiación gamma Nocodazol (+) 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol (+) y Mitomicina C (+) 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato 1,2-dimetilhidrazina y 2-amino-3-metilimidazol [4,5-f]quinolina (+)	29 30 31,32 33 19 34 35 36 37 37 38
	Fibroblastos celulares BALB/c3T3 Tumores de colon de rata		
	Sangre periférica de ratón, ensayo MN (administración i.p.)	Óxido de cromo (VI) (+)	39

que describen las propiedades antioxidantes de la CFL, ya que bloquea la peroxidación lipídica en homogenados de hígado de rata, así como la producción de óxido nítrico en cultivos celulares RAW 264.7.⁴¹⁻⁴³

En estudios *in vivo* realizados en salmones, se ha observado que la CFL es capaz de disminuir la hepatocarcinogenicidad inducida por las aflatoxinas B1 y B2.^{44,45} De igual manera cuando la CFL se administró a ratas en las que se indujo desarrollo de cáncer de colon, la CFL inhibió el crecimiento del tumor.³⁸

MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE LA CFL

Se ha propuesto que la CFL protege al ADN de los efectos genotóxicos mediante la inhibición de la función enzimática del sistema de activación metabólica. Esta propuesta se basa en que la CFL inhibe el deterioro de las funciones microsómicas hepáticas, las cuales forman parte del sistema metabólico de drogas o de xenotoxinas.^{46,47}

De igual manera se ha propuesto que la clorofila y la CFL interactúan directamente con el mutágeno y

forman complejos, lo que se traduce en una inactivación de estos agentes inductores de daño.^{8,9,40,44,45,48,49} Estudios realizados con espectrofotometría muestran que la CFL forma compuestos moleculares no covalentes con aminas heterocíclicas, con lo cual la CFL limita la bioabilidad de carcinógenos y mutágenos.^{47,50}

La CFL también impide la formación de enlaces covalentes de los agentes mutágenos con el ADN, además de que disminuye la absorción de los mutágenos en el intestino y aumenta su eliminación por orina y bilis, por lo que se ha propuesto que *in vivo* la CFL puede actuar también como desmutágeno e interceptor de moléculas.^{15,27,51-54}

Debido a que algunas de las características físicocémicas de la CFL, como son su alto grado de resonancia y deslocalización de electrones, se ha propuesto que la CFL captura radicales libres.^{14,15,55,56} Hadnagy y Seemayer en 1988,⁵⁷ obtuvieron las primeras evidencias directas de que la CFL inactiva radicales libres y especies reactivas de oxígeno. Estas observaciones apoyan la idea de que uno de los mecanismos

de radioprotección que posee la CFL es la captura de estos radicales.^{21,34,58,59}

También se ha observado que la CFL protege del daño causado por agentes clastógenos y aneuploidógenos^{25,33,36,39} y que la protección de la CFL es claramente más efectiva hacia los mutágenos de acción indirecta que a los de acción directa^{5,21} aunque, Morales-Ramírez y col. en 1996,⁶⁰ observaron que la CFL no disminuye la frecuencia de micronúcleos (MN) inducidos por radiación gamma.

IMPORTANCIA DE LA LÍNEA DE ESTUDIO

En la actualidad el estudio de sustancias inductoras de daño mutagénico, cancerígeno y/o teratógeno es de gran importancia, debido al incremento en el riesgo de exposición de las poblaciones humanas, a diversos agentes inductores de daño genético. La búsqueda y el estudio de sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN, resurge como una opción complementaria a estos estudios, ya que por una parte al conocer los mecanismos de protección se pueden deducir los de inducción, y por otra, se generan alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores del daño, ya sea preventivos o de tratamiento.

Hasta el momento los resultados obtenidos con las CFL han sido muy satisfactorios y tienen una gran aceptación, tanto que recientemente el *National Institute of Environmental Health Science*, EUA, respaldó una investigación en la República de China, encabezada por los doctores Kensler, Groopman y Bailey, en la cual se está probando la CFL en personas voluntarias expuestas de manera natural en su dieta a concentraciones elevadas de aflatoxina B1. Algunas de las observaciones realizadas en este estudio, indican que en las personas tratadas con CFL se reduce al menos el 20% de la inducción de daño al ADN, aminorado a la reducción del riesgo de desarrollar hepatocarcinomas.⁶¹⁻⁶³ Este mismo grupo de investigadores está realizando pruebas preclínicas con líneas celulares tumorales, para conocer los mecanismos por los que la CFL suprime el cáncer y determinar las posibles condiciones del tratamiento en humanos.^{38,64}

Por otra parte, en un estudio hecho en el hospital de Turín se analizaron a 162 pacientes con cáncer de bazo y 104 individuos testigo, a los cuales se les evaluó la presencia de aductos en el ADN, ya que los pacientes con cáncer presentan una mayor frecuencia de éstos en comparación con los que no lo padecen. Durante el estudio se observó que la ingestión en la dieta con diferentes porciones de vegetales y frutas

por los pacientes con cáncer, disminuía la formación de los aductos, de ahí que se planteara la posibilidad de que este tipo de dieta es capaz de proteger contra la inducción de cáncer en el bazo.⁵⁴ Estos resultados generan grandes expectativas para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con daño al ADN, como algunos tipos de cáncer, mediante la aplicación de sustancias con propiedades antimutágenas y anticarcinógenas.

Sin embargo, pese a que ya se han iniciado estudios sobre los efectos de la CFL en pacientes con cáncer con buenos resultados^{42,54,64-66} ya que se han reconocido un gran número de agentes antimutágenos y anticarcinógenos, las perspectivas para la aplicación de los agentes protectores de daño al ADN aún son limitadas. Si bien se están estudiando los mecanismos de protección que ejercen estos agentes, es necesario conocer los mecanismos de inducción del daño, para identificar el proceso de iniciación, promoción y progresión del cáncer, y saber en qué momento y bajo qué condiciones debe ser aplicado el tratamiento, para de esta manera obtener una mayor eficacia.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE LA CLOROFILINA

A) Estudios sobre el daño genotóxico en organismos adultos

Al inicio de la década de los noventa, el estudio de sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN estaba recién en sus comienzos. En ese entonces, estudios realizados principalmente en *Salmonella typhimurium* y *Drosophila melanogaster* mostraban que la CFL era una de las sustancias que presentaba mayor actividad de protección de daño al ADN. Por ello, en una investigación encabezada por el Dr. Morales-Ramírez, que se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, se evaluó el efecto de la CFL administrada a ratones, que después fueron sometidos a radiación.

La radiación gamma provoca el aumento en el número de células de la médula ósea que presentan intercambios entre cromátidas hermanas (ICH), lo cual indica daño genotóxico, además de que la radiación disminuye el índice mitótico (IM), lo que se expresa como citotoxicidad. El objetivo del estudio fue el de evaluar la posible capacidad radioprotectora de la CFL, frente a los efectos de la radiación. Los resultados obtenidos mostraron que la CFL no tiene efectos genotóxicos. Cuando se administró CFL a una dosis de 100 µg/g de peso corporal, la CFL protegió a los

animales del daño genotóxico producido por la radiación gamma, en la dosis de 50 $\mu\text{g/g}$ la protección fue significativamente menor y no se observó cuando los animales fueron tratados con la dosis de 10 $\mu\text{g/g}$. La CFL también inhibió el efecto citotóxico causado por la radiación. Así mismo, se observó que el tratamiento con la CFL retrasa el ciclo de la división celular, ya que disminuye el tiempo generacional promedio (TGP) en aproximadamente 2 horas.³⁴

Con base en los resultados descritos se planteó que la CFL protege del daño al ADN en mamíferos inducido por radiación gamma. Además, que la CFL se incorpora a las células en donde actúa directamente sobre los agentes que inducen el daño. El hecho de que la CFL haya sido capaz de proteger de la inducción de ICH, hace suponer que el mecanismo de radioprotección es mediado por la captura de radicales libres provocados por la radiación.³⁴

Como parte de un programa de investigación para evaluar sustancias quimiopreventivas y quimioprotectoras en el ratón, se estudió si la CFL tiene efectos protectores sobre el daño clastógeno provocado por sales metálicas. Para tal efecto, se seleccionó al trióxido de cromo (CrO_3). El estudio consistió en evaluar el efecto de la CFL sobre frecuencia de MN (*Figura 2*) inducidos por el CrO_3 , en eritrocitos policromáticos de sangre de ratón. En los resultados obtenidos se pudo observar que el CrO_3 induce MN a las 12 y 48 horas después del tratamiento. Que la administración de CFL (20 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal) no incrementa el número de MN. En cambio, cuando la CFL fue administrada antes del tratamiento con CrO_3 , la inducción de MN que se presenta a las 12 ho-

ras disminuyó significativamente, lo cual no sucedió en los animales estudiados 48 horas después del tratamiento. El hecho de que la CFL sólo haya protegido en uno de los tiempos de inducción (12 h), nos hace suponer que los MN que se forman en respuesta al tratamiento con CrO_3 , tienen diferentes mecanismos de inducción y que la CFL tiene efecto sólo sobre uno de los mecanismos de daño al ADN del CrO_3 .³⁹

Para ampliar la información acerca de la protección del daño genotóxico de la CFL frente al CrO_3 , se diseñó un protocolo en el cual se administraron vía oral las mismas dosis de CFL probadas anteriormente. Los resultados se muestran que al igual que en los estudios anteriores la CFL no modifica el número de MN. A diferencia del estudio anterior, cuando se administró el tratamiento de CFL por vía oral, esta molécula protegió a los ratones del aumento en el número de MN inducidos por el CrO_3 , tanto a las 12 como a las 48 horas. Estos resultados indican que la administración de la CFL por vía oral protege del daño genotóxico, de manera más efectiva que cuando se administró por vía intraperitoneal (i.p.). A partir de estos resultados se puede decir que la vía de administración de la CFL juega un papel importante en sus mecanismos de protección.⁶⁷

B) Estudios de los efectos sobre el daño genotóxico y teratógeno durante la gestación

Como se describió anteriormente, en la actualidad hay una intensa búsqueda y desarrollo de estudios de sustancias que pudieran contrarrestar los efectos causados por agentes mutágenos y cancerígenos, así como determinar los mecanismos de protección.^{16,68} Aunado a esto, se han iniciado otras líneas de investigación tendientes a evaluar si la protección que ejercen los agentes antigenotóxicos también se observan durante la gestación tanto en las madres como en las crías, además de estudiar la posible protección de la inducción del daño teratógeno. Para ello han utilizado agentes que tienen propiedades genotóxicas y teratógenas, y con mecanismos de inducción de daño similares.⁶⁹⁻⁷¹

En los primeros estudios *in vitro* se observó que era posible disminuir las alteraciones del desarrollo en el tejido embrionario mediante el empleo de sustancias que protegen a las células de la inducción de radicales libres.^{69,71,72} Estos resultados dieron las primeras evidencias para poder estudiar a la CFL en esta área. Para ello, ratonas en el día 15 de gestación fueron inyectadas con CFL por vía intraperitoneal (i.p.), con la misma dosis que protege del daño geno-

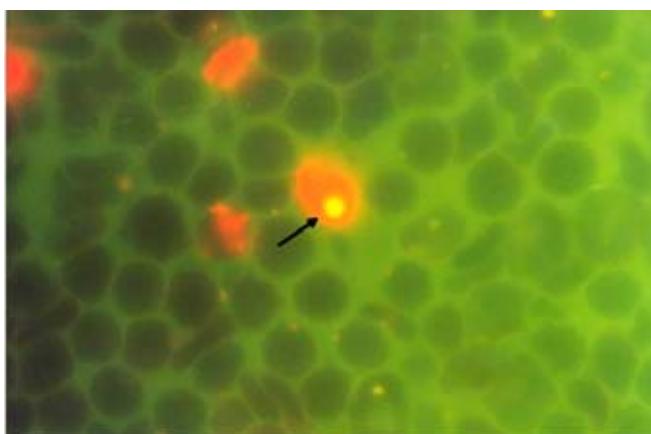


Figura 2. Frotis de sangre de ratón teñida con naranja de acridina y mostrando a un eritrocito policromático con un micronúcleo (MN).

tóxico inducido por CrO_3 . La administración de CFL no altera el número de MN en las hembras gestantes ni en sus crías, mientras que el daño genotóxico inducido por el CrO_3 , se presenta en las hembras preñadas y en sus crías. El tratamiento con CFL previo a la inyección de CrO_3 , protegió parcialmente a los fetos del daño genotóxico, lo que no ocurrió con las madres. Estos resultados indican que la CFL ejerce una protección marginal en las crías. En las hembras gestantes no se observó disminución en la inducción de MN cuando se combinaron los tratamientos CFL- CrO_3 . Una de las posibles explicaciones para estos resultados del daño causado por el CrO_3 en hembras preñadas sería que el CrO_3 se distribuyó entre la madre y los fetos, por lo que la concentración del agente genotóxico fue menor y por lo tanto la inducción de daño disminuyó en comparación con los estudios anteriores, donde no se emplearon hembras gestantes. Posiblemente lo mismo ocurre con la CFL, lo cual explicaría su menor protección del daño genotóxico en las hembras preñadas.⁶⁷

En otro estudio se probó las mismas dosis de CFL que son protectoras de daño genotóxico, sobre el desarrollo embrionario y fetal. Para ello hembras en el día 8 de gestación fueron inyectadas con una sola dosis de CFL por vía i.p. (20, 40, 50 ó 100 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal). En el día 18 de gestación, las hembras fueron sacrificadas y los fetos fueron examinados empleando las técnicas convencionales de teratología. En este estudio se observó que el tratamiento con CFL induce pérdida total de las camadas en forma dosis-dependiente, además de que los sitios de implante en el útero eran marcados como "anillos verdes", esto se dedujo ya que el número de estas marcas en el útero presentaba una relación inversa con el número de implantes (*Figura 3*). A partir de estos resultados planteamos que la CFL es capaz de llegar al sitio en donde se está llevando a cabo el desarrollo embrionario y fetal, y modificarlo. La inyección de CFL indujo malformaciones externas y esqueléticas de manera marginal en comparación con los efectos de otras sustancias claramente identificadas como agentes teratógenos. Con base a estos resultados, se plantea que la embriofetalidad y las alteraciones del desarrollo observadas con los tratamientos de CFL, son debidas a un efecto tóxico más que teratógeno.⁷³

PERSPECTIVAS

El impacto que el estudio de la antimutagénesis y la anticarcinogénesis tienen en la prevención y el tratamiento de las enfermedades humanas, ha generado

que se desarrollen diferentes eventos internacionales, para discutir los principales resultados y avances en el área, como lo es la *International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis*, que se celebra cada tres años. Algunas de las conclusiones a las que se ha llegado hasta el momento con respecto al uso de sustancias moduladoras o protectoras del daño al ADN son:

- 1) El uso de antimutágenos y anticarcinógenos en los humanos, puede ser uno de los procedimientos más efectivos para prevenir el cáncer y las enfermedades genéticas.
- 2) No se debe descartar la posibilidad de que el daño puede ser incrementado por el agente protector o modulador.
- 3) El principal efecto de estos antimutágenos es sobre mutágenos comunes de exposición cotidiana y diaria, lo cual resulta aún de mayor importancia.

Como se puede observar, la posibilidad de emplear sustancias que pudieran contrarrestar los efectos causados al ADN, abre un campo de investigación muy importante, y dados los resultados y datos que se tienen hasta el momento, la aplicación en humanos es ya casi una realidad, sin embargo es necesario continuar este tipo de estudios para plantear los mecanismos por los cuales se puede proteger o modular el daño al ADN.

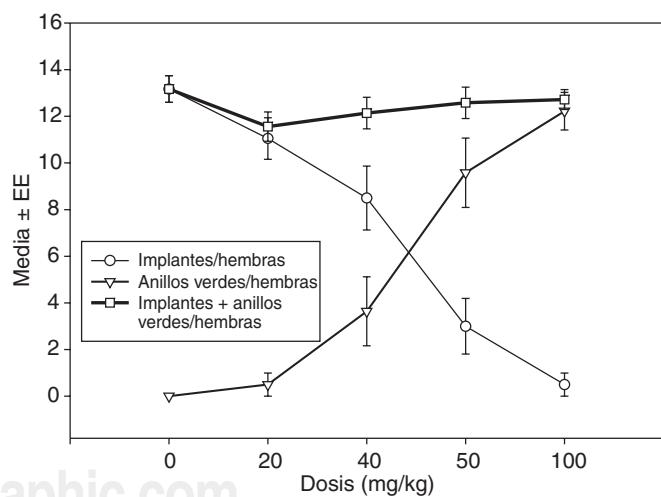


Figura 3. Correlación entre el número de implantes y la presencia de anillos verdes en las hembras preñadas tratadas con clorofilina. Datos expresados como media \pm error estándar. ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Dunnett; $p < 0.05$ vs grupo testigo.⁷⁴

REFERENCIAS

1. Phillips RL. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among seventh-day Adventists. *Cancer Res.* 1975; 35: 3513-3522.
2. Kada T, Morita K, Inoue T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutat Res.* 1978; 53: 351-353.
3. Morita K, Hara M, Kada T. Studies on natural desmutagens screening for vegetables and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric Biol Chem.* 1978; 42: 1235-1238.
4. Kada T, Kato M, Aikawa K, Kiriya S. Adsorption of pyrrolisate mutagens by vegetable fibers. *Mutat Res.* 1984; 141: 149-152.
5. Terwel L, Van der Hoeven CM. Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat Res.* 1985; 152: 1-4.
6. Mendes-Pinto MM, Silva-Ferreira AC, Caris-Veyrat C, Guedes de Pinho P. Carotenoid, chlorophyll, and chlorophyll-derived compounds in grapes and port wines. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 10034-10041.
7. Ferguson LR, Philpott M, Karunasinghe N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology.* 2004; 198: 147-159.
8. Lai CN. Chlorophyll: the active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. *Nutr Cancer.* 1979; 1: 19-21.
9. Lai CN, Butler MA, Matney TS. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat Res.* 1980; 77: 245-250.
10. Whong W, Stewart J, Brockman HE, Ong T. Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B₁-induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Teratogen Carcinogen Mutagen.* 1988; 8: 215-224.
11. Ong TM, Whong WZ, Stewart J, Brockman HE. Comparative antimutagenicity of five compounds against five mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutat Res.* 1989; 222: 19-25.
12. Gentile JM, Gentile GJ. The metabolic activation of 4-nitro-O-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and anti-mutagenicity. *Mutat Res.* 1991; 250: 79-86.
13. García-Rodríguez MC, Altamirano-Lozano M. Sales de sodio y cobre de la clorofila: usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígeno. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 2001; 4: 77-86.
14. Kapiotis S, Hermann M, Exner M, Laggner H, Gmeiner BM. Cooper- and magnesium protoporphyrin complex inhibit oxidative modification of LDL induced by hemin, transition metal ions and tyrosyl radicals. *Free Radic Res.* 2005; 39: 1193-1202.
15. Pietrzak M, Wieczorek Z, Wieczorek J, Darzynkiewicz Z. The "interceptor" properties of chlorophyllin measured within the three-components system: intercalator-DNA-chlorophyllin. *Biophys Chem.* 2006; 123: 11-19.
16. Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res.* 1994; 307: 395-410.
17. Lee BM, Park KK. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2003; 523-524: 265-278.
18. Kephart JC. Chlorophyll derivates their chemistry commercial preparation and uses. *Econ Bot* 1955; 9: 3-38.
19. Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium (VI) oxide in mice. *Phytother Res.* 1994; 9: 99-202.
20. Arimoto S, Negishi T, Hayatsu H. Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.* 1980; 11: 29-33.
21. Kimm S, Tchai B, Park S, Kang S. Antimutagenic activity of chlorophyll to direct-acting and indirect-acting mutagens and its contents in vegetables. *Korean J Biochem.* 1982; 14: 1-8.
22. Katoh Y, Nemoto N, Tanaka M, Takayama S. Inhibition of benzo [a] pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutat Res.* 1983; 121: 153-157.
23. Ong TM, Whong WZ, Stewart J, Brockman HE. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutat Res.* 1986; 173: 111-115.
24. Negishi T, Arimoto S, Nishizake C, Hayatsu H. Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3 - amino - 1 - methyl - 5H - pyrido [4,3 - β-indole (Trp - P2). *Carcinogenesis* 1989; 10: 145-149.
25. Renner HW. *In vivo* effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutat Res.* 1990; 244: 185-188.
26. Zimmering S, Olvera O, Hernandez ME, Cruces MP, Arceo C, Pimental E. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutat Res.* 1990; 245: 47-49.
27. Warner JR, Joginder N, Ong T. Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella arabinose* resistant assay system. *Mutat Res.* 1991; 262: 25-30.
28. Dashwood RH, Breinholt V, Bailey GS. Chemo-preventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* 1991; 12: 939-942.
29. Sen S, Sharma A, Talukder G. Inhibition of clastogenic effects of nicotine by chlorophyllin in mice bone marrow cells *in vivo*. *Phytother Res.* 1991; 5: 130-133.
30. Palit S, Sen S, Sharma A, Talukder G. Protection by chlorophyllin against induction of chromosomal aberrations by cobalt in bone marrow cells of mice *in vivo*. *Fitoterapia* 1991; 42: 425-428.
31. Ghosh A, Sen A, Sharma A, Talukder G. Inhibition of clastogenic effects of cesium chloride in mice *in vivo* by chlorophyllin. *Toxicol Lett.* 1991; 57: 11-18.
32. Ghosh A, Sen S, Sharma A, Talukder G. Modification of clastogenic effects of mercuric chloride by chlorophyllin in bone marrow cells *in vivo*. *Food Chem Toxicol.* 1991; 29: 777-779.
33. Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*. *Mutat Res.* 1993; 301: 33-38.
34. Morales-Ramírez P, García-Rodríguez MC. *In vivo* effect of chlorophyllin on γ-ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutat Res.* 1994; 320: 329-334.
35. Morales-Ramírez P, Mendiola-Cruz MT. *In vivo* radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cell. *Mutat Res.* 1995; 344: 73-78.
36. Verma A, Brockman HE, Mayer VW. Utility of a test for chromosomal malsegregation in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M for the detection of antianeugens: test of the

- model combination of chlorophyllin and nocodazole. *Mutat Res.* 1996; 358: 73-80.
37. Okai Y, Higashi-Okai K, Yano Y, Otani S. Suppressive effects of chlorophyllin on mutagen-induced umu C gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002) and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c 3T3 fibroblast cells. *Mutat Res.* 1996; 370: 11-17.
 38. Blum AC, Xu M, Orner AG, Fong TA, Bailey, SG, Stoner DG, et al. β -catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 2001; 22: 315-320.
 39. García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res.* 2001; 496: 145-151.
 40. Chernomorsky S, Segelman A, Poretz RD. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogen Carcinogen Mutagen.* 1999; 19: 313-322.
 41. Sato M, Iguchi N, Murata T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation: I. Effect on lipid peroxidation in rat liver homogenates in the presence of both Fe^{2+} and L-ascorbic acid. *Yakugaku Zasshi* 1977; 97: 268-273.
 42. Sato M, Fujimoto I, Sakai T, Aimoto T, Kimura R, Murata T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation: IX On the antioxidative components in commercial preparations on sodium coopeer chlorophyllin. *Chem Pharm Bull.* (Tokyo) 1986; 34: 2428-2434.
 43. Cho KJ, Han SH, Kim BY, Hwang SG, Park KK, Yang KH, et al. Chlorophyllin suppression of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000; 166: 120-127.
 44. Hayashi, Schimerlik M, Bailey G. Mechanism of chlorophyllin anticarcinogenesis: dose-responsive inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 158: 132-140.
 45. Breinholt V, Arbogast D, Loveland P, Pereira C, Dashwood R, Heendricks J, et al. Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B1 bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability vs. target organ protective mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 158: 141-151.
 46. Sato M, Imai K, Kimura R, Murata T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem Pharm Bull.* 1984; 32: 3513-3522.
 47. Dashwood R, Guo D. Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation. *Carcinogenesis* 1992; 13: 1121-1126.
 48. Tajmir-Riahi HA, Neault JF, Diamantoglou S. DNA adducts with chlorophyllin as antimutagenic agents: synthesis, stability, and structural features. *Methods Mol Biol.* 2004; 274:159-171.
 49. Marty R, Ouameur AA, Neault JF, Tajmir-Riahi HA. RNA adducts with chlorophyllin: stability and structural features. *J Biomol Struc Dyn.* 2004; 22: 45-50.
 50. Dashwood R, Guo D. Antimutagenic potency of chlorophyllin in the *Salmonella* assay and its correlation with binding constants of mutagen-inhibitor complexes. *Environ Mol Mutagen.* 1993; 22: 164-171.
 51. Dashwood R, Liew C. Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-me-thylimidazol [4,5-f] quinoline. *Environ Mol Mutagen.* 1992; 20: 199-205.
 52. Imai K, Aimoto T, Sato M, Watanabe K, Kimura R, Murata T. Effects of sodium metalochlorophyllin on the activity and components of the microsomal drug-metabolizing enzyme system in rat liver. *Chem Pharm Bull.* 1986; 34: 4287-4293.
 53. Ait Amara-Mokrane, Lehucher-Michel MP, Balansard G, Duménil G, Botta A. Protective effects of alfa-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1996; 11: 161-167.
 54. Peluso M, Airolidi L, Magagnotti C, Fiorini L, Munna A, Hautefeuille A, et al. White blood cell DNA adducts and fruit and vegetable consumption in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 183-187.
 55. Simic MG. Mechanism of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 1988; 202: 377-386.
 56. Arimoto S, Fukuoka S, Itome C, Nakano H, Rai H, Hayatsu H. Banding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutat Res.* 1993; 287: 293-305.
 57. Hadnagy W, Seemayer NH. Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. *Mutat Res.* 1988; 203: 205-206.
 58. Robins EW, Nelson RL. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced nuclear damage in rat colonic epithelium by chlorophyllin. *Anticancer Res.* 1989; 9: 981-986.
 59. Bronzetti G, Galli A, Della Croce DM. Antimutagenic effects of chlorophyllin. In: Kuroda Y, Sankel DM, Waters MD. [Eds] *Antimutagenesis and anticarcinogenesis: mechanisms II*. Ed. New York: Plenum Press. 1990. p. 463-468.
 60. Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. Effect of chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. *Mutat Res.* 1996; 367: 51-56.
 61. Bailey GS. Chlorophylls: can these green food pigments prevent some cancers? Available from: URL <http://www.orst.edu/dept/lpi/f-w97/chrphyl.html>. 30 abril 1998, (fecha de acceso 07 de septiembre del 2001).
 62. Egner PA, Wang JB, Zhu YR, Zhang BC, Wu Y, Zhang QN, et al. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Med Sci.* 2001; 98: 14601-14606.
 63. Egner PA, Muñoz O, Kensler TW. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutat Res.* 2003; 523-524: 209-211.
 64. Díaz GD, Qingjie L, Daswood RH. Caspase-8 apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res.* 2003; 63: 1254-1261.
 65. Gao F, Hu XF. Analysis of the therapeutic effect of sodium copper chlorophyllin tablet in treating 60 cases of leucopenia. *Chin J Integr Med.* 2005; 11: 279-282.
 66. Kensler TW, Egner PA, Wang JB, Zhu YR, Zhang BC, Lu PX, et al. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. *Gastroenterology* 2004; 127: S210-S218.
 67. García-Rodríguez MC, Pérez-Flores G, Nevares JC, Sánchez-Ruiz JF, Altamirano-Lozano M. Comparison of effects of chlorophyllin administered by different routes on genotoxicity of hexavalent chromium in cd-1 mice. In: Bronzetti G, Ferguson LR, De Flora S. [Eds] *Proceedings of ICMAA-VIII Eighth International Conference on me-*

- chanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis.* Pisa, Italia, STAR 2003. p. 50-51.
- 68. Surh Y-J, Ferguson RF. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential highlights of a symposium. *Mutat Res.* 2003; 523-524: 1-8.
 - 69. Eriksson UJ, Borg LAH. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. *Diabetologia* 1991; 34: 325-331.
 - 70. Nosal GP, Klein NW. Methionine decreases the embryotoxicity of sodium valproate in the rat: *in vivo* and *in vitro* observations. *Teratology* 1992; 46: 499-507.
 - 71. Desesso J M, Scialli RA, Goeringer GC. D-mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits. *Teratology* 1994; 49: 248-259.
 - 72. Pillans PI, Ponzi SF, Parker MI. Effects of ascorbic acid on the mouse embryo and on cyclophosphamide-induced cephalic DNA strand breaks *in vivo*. *Arch Toxicol.* 1990; 64: 423-425.
 - 73. García-Rodríguez MC, Morales-Ramírez P, Altamirano-Lozano M. Effects of chlorophyllin on mouse embryonic and fetal development *in vivo*. *Teratogen Carcinogen Mutagen.* 2002; 22: 461-471.

