



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

RELACIÓN ENTRE EL DAÑO GENÉTICO Y LONGEVIDAD
PROVOCADA POR DOS RAZONES DE DOSIS DE RAYOS GAMA Y
SU MODULACIÓN CON ANTIOXIDANTES EXÓGENOS EN
Drosophila melanogaster

MODALIDAD

TESIS POR ARTICULOS ESPECIALIZADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. María Elena González Herrera



DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza

Dra. Petra Sánchez Nava

Dra. Martha Patricia Cruces Martínez

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO A 25 DE FEBRERO 2022

RESUMEN

Dado el incremento significativo de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento y ante la imposibilidad de evitar la exposición de los seres humanos a los agentes que provocan cambios en el material genético que pueden provocar enfermedades degenerativas, una alternativa para reducir el riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas es utilizar sustancias de origen natural con muy pocos o nulos efectos tóxicos para reducir el riesgo genético. Entre estas sustancias se encuentran los antioxidantes, como el ácido ascórbico (AA), algunas vitaminas y la clorofilina (CCS).

Esta investigación tuvo como objetivo principal establecer la relación entre la frecuencia de mutaciones somáticas y la longevidad de *Drosophila melanogaster* tratadas con los antioxidantes solos y en combinación con radiación ionizante. Se evaluó la viabilidad, el tiempo de desarrollo y el potencial anti-mutagénico del AA y la CCS.

Se encontró que el AA *per se* no modificó ninguno de los índices evaluados, ni en combinación con 20 Gy de radiación a las diferentes razones de dosis (RD) a ninguna de las concentraciones probadas, aunque con la RD más alta la viabilidad disminuyó. Los resultados en conjunto revelaron que el efecto radio-protector del AA depende de la RD con la que se administra la radiación gamma.

Se confirmó que la CCS reduce la frecuencia de mutación y prolonga el periodo de vida de las hembras pero no en los machos y en combinación con 20 Gy lo hace en ambos sexos. Se encontró que los individuos con una frecuencia de mutación alta son los que mueren a una tasa mayor. Los resultados indican que muy probablemente el mecanismo de acción para reducir el daño genético tanto del AA como el de la CCS es a través de una acción antioxidante que provoca selección de los individuos más aptos lo que sugiere que pueden ser excelentes radio-protectores.

1. INTRODUCCIÓN

La esperanza y la calidad de vida de los seres humanos ha ido en aumento gracias a los descubrimientos de nuevos medicamentos, el cambio en los hábitos alimenticios y el estilo de vida, desafortunadamente, con vidas mucho más largas, los seres humanos también se enfrentan a un aumento significativo en las tasas de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Bahadorani *et al.*, 2007). Este proceso es producto de la interacción de factores genéticos, bioquímicos, ambientales y físicos como la radiación ionizante (RI). Aunque no existe un acuerdo general sobre los mecanismos que provocan el envejecimiento, la hipótesis de los radicales libres ha sido la más aceptada (Halliwell, 1996). El desequilibrio entre las defensas antioxidantes del organismo y la producción de radicales libres provoca un estado denominado estrés oxidante. Las células pueden hacer frente al estrés oxidante mediante la acción de antioxidantes. La alta capacidad antioxidante de la vitamina E, el AA, y algunos tetrapirroles como la clorofilina los hace candidatos para ser utilizados como agentes quimio preventores evitando el daño provocado por los radicales libres y prolongando así el periodo de vida de los organismos (Alkadi, 2020).

Una estrategia eficaz para examinar directamente si estos compuestos tienen algún efecto en la longevidad y en las patologías asociadas con el envejecimiento es determinar si su administración puede modificar el periodo de vida de algunas especies de invertebrados de vida corta, que representan modelos adecuados para explicar el proceso del envejecimiento en los seres humanos (Kenyon, 2001). En este sentido *Drosophila melanogaster* es un organismo muy útil para los estudios de longevidad, debido a su periodo de vida corto y a que no ocurren mitosis en el adulto.

2. ANTECEDENTES

Los procesos biológicos y la exposición a agentes físicos o químicos de origen antropogénico, generan especies reactivas de oxígeno (ERO) muy electrofílicas. Un exceso de ERO en las células, provoca estrés oxidante que puede causar daño al ADN, ARN, proteínas y lípidos e inducir enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas, cáncer, artritis y aterosclerosis, entre otras patologías, así como acelerar el proceso normal de envejecimiento (Halliwell, 2006; 2009).

2.1 Especies Reactivas de Oxígeno y Radicales libres

Los radicales libres (RL) se definen como moléculas que tienen un electrón desapareado, en su orbital más externo, lo que los hace muy inestables y reactivos (Gilbert, 2000; Halliwell, 2006). Se derivan de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, que forman las especies reactivas de oxígeno (ERO) nitrógeno (ERN) y de azufre (SRS) respectivamente (Carocho y Ferreira, 2013). La reducción parcial del oxígeno molecular produce ERO como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). El primero es un radical producido por los complejos uno y tres de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, por 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 peroxidroxilo (HO_2^\cdot) (Carocho y Ferreira, 2013). El H_2O_2 aunque no es un RL, en presencia de metales de transición como el Fe^{2+} , induce la formación del radical OH^\cdot , que puede atravesar las membranas biológicas. El radical hidroperoxilo se disocia a un pH de 7 y forma O_2 . Este anión es altamente reactivo y puede interactuar con otras moléculas generando otras ERO. El O_2 puede ser dismutado a través de la acción de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) vía la reacción de Haber-Weiss y formar agua, por

medio de la catalasa (CAT). En la Figura 1 se presentan las reacciones que dan lugar a las ERO (Carocho y Ferreira, 2013).

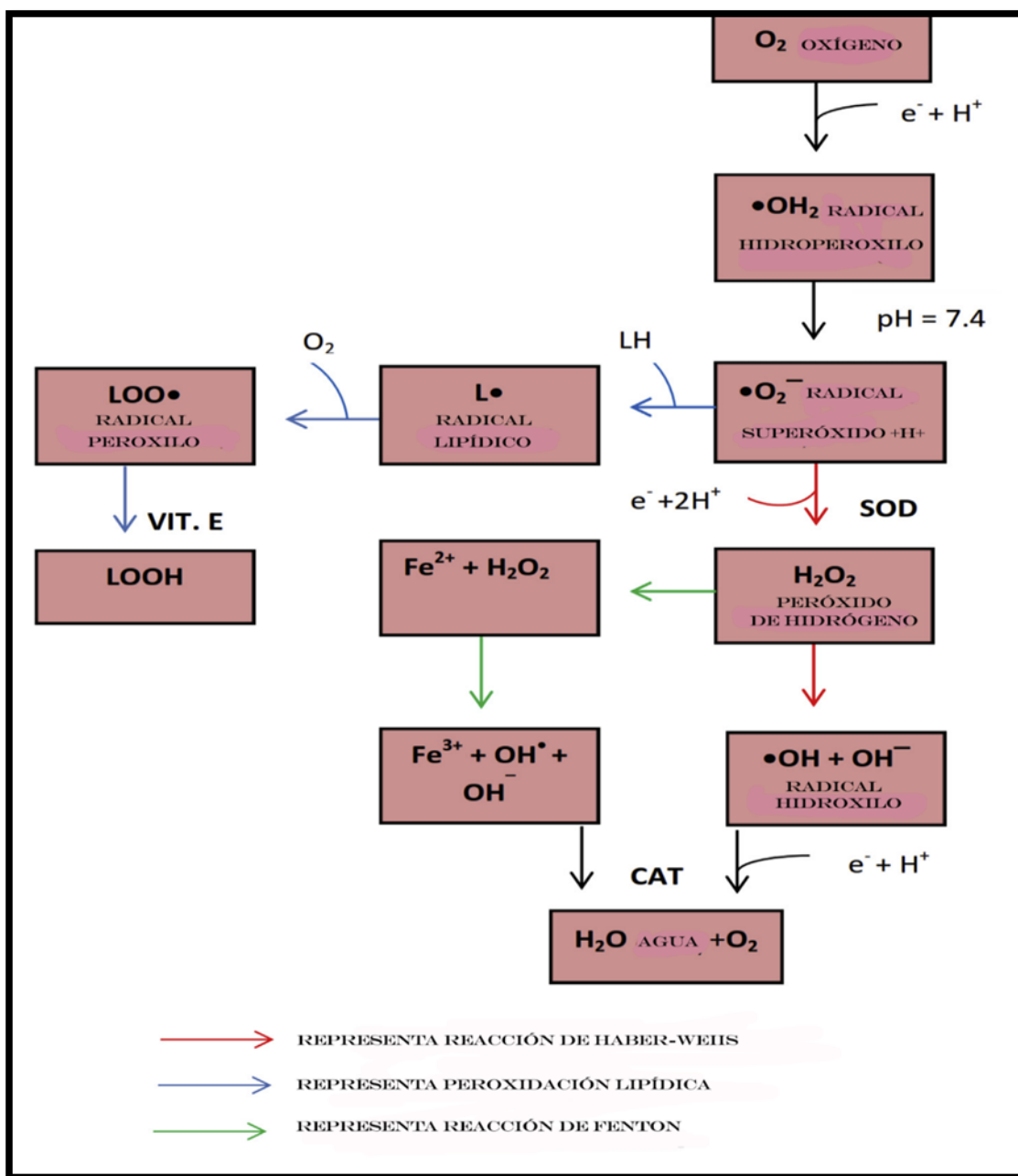


Figura 1 Diagrama que representa la formación de las ERO a través de diferentes reacciones. Tomado y editado de Neha *et al.*, 2019.

Los RL se producen de manera normal en el metabolismo celular y son indispensables para llevar a cabo diferentes funciones tales como la señalización celular, la traducción, la transcripción, la regulación de las proteínas encargadas de controlar el ciclo celular (Zheng, 2000; Lander, 1997) y la activación de los fagocitos y macrófagos del sistema inmune (McCord, 2000). Se estima que algunos tipos celulares diariamente son atacados por un número grande de radicales hidroxilo y otras ERO (en promedio 105 veces) (Valko *et al.*, 2006). El nivel normal de los RL se puede incrementar por factores externos como el consumo del tabaco, la contaminación ambiental, la RI, algunos medicamentos, los plaguicidas, los solventes industriales y el ozono.

Los RL y las ERO pueden dañar a todos los componentes de los seres vivos a las proteínas, ADN, ARN, azúcares y lípidos (Lü *et al.*, 2010). Este deterioro se traduce en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, padecimientos cardiovasculares, desórdenes neurológicos (Alzheimer, Parkinson y Huntington), renales (glomérulo nefritis), artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus, cataratas, algunos tipos del espectro autista, vasculitis, lupus eritematoso, úlceras gástricas y preeclampsia, entre otras (Rahman, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Lü *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010).

2.2. La radiación ionizante como inductora de estrés oxidante.

La radiación se define como la energía emitida y transferida en el espacio (Riley, 1994) Se clasifica con base a dos criterios: 1) por su naturaleza y 2) por la energía asociada a ella. Por la energía asociada se clasifica en ionizante o de alta energía (partículas alfa, beta, rayos cósmicos, rayos gamma y X) y no ionizante (ondas de radio, televisión, radiaciones ópticas y campos electromagnéticos) (Leroi *et al.*, 2016). Y por su naturaleza, la radiación puede ser electromagnética y corpuscular. La radiación electromagnética se refiere a la propagación ondulatoria de energía eléctrica y magnética, dentro de este tipo se encuentran los rayos gamma y los rayos X y las radiaciones ópticas como las radiaciones ultravioletas, infrarrojas y radiofrecuencias. La radiación corpuscular se debe a la propagación de partículas subatómicas. Las radiaciones alfa, beta, neutrónicas y cósmicas son radiaciones de naturaleza corpuscular (Bushong, 1993). La RI es capaz de retirar un electrón del átomo con el que interactúa, a esta interacción de la radiación con la materia se le llama ionización (Leroi *et al.*, 2016). La RI proviene de fuentes naturales como algunos elementos radioactivos presentes en la corteza terrestre (como el potasio 40 k-40, el rubidio 87 rb-87, y el uranio 238) o de fuentes artificiales como la medicina nuclear y la radioterapia, las plantas nucleoelectricas, los accidentes nucleares etc. (Kamran *et al.*, 2016).

2.3. Efectos Biológicos de la Radiación Ionizante

La RI puede afectar a las moléculas de importancia biológica de manera azarosa, ya que puede incidir sobre cualquier electrón en cualquier molécula y sus efectos son inespecíficos. Los efectos biológicos de la RI son la consecuencia de un número de fenómenos desencadenados por el paso de radiación a través de un medio. Cada uno de los eventos interactivos entre la radiación y la materia involucran la transferencia de una cantidad de

energía al medio; los eventos iniciales son ionizaciones y excitaciones de átomos y moléculas del medio a lo largo de las trayectorias de las partículas u ondas. El efecto biológico depende del tipo de radiación, de la energía asociada, de la transferencia lineal de energía (LET), la dosis y la razón de dosis (RD). Los cambios producidos por la radiación pueden originarse por el efecto directo o indirecto (Del Cura *et al.*, 2009). En el efecto directo la radiación puede transferir su energía directamente a las moléculas de importancia biológica como el ADN y modificar su estructura. El efecto indirecto, es debido a la radiólisis del agua, que genera productos altamente reactivos como los RL (Puerta y Morales, 2020) (Fig.2).

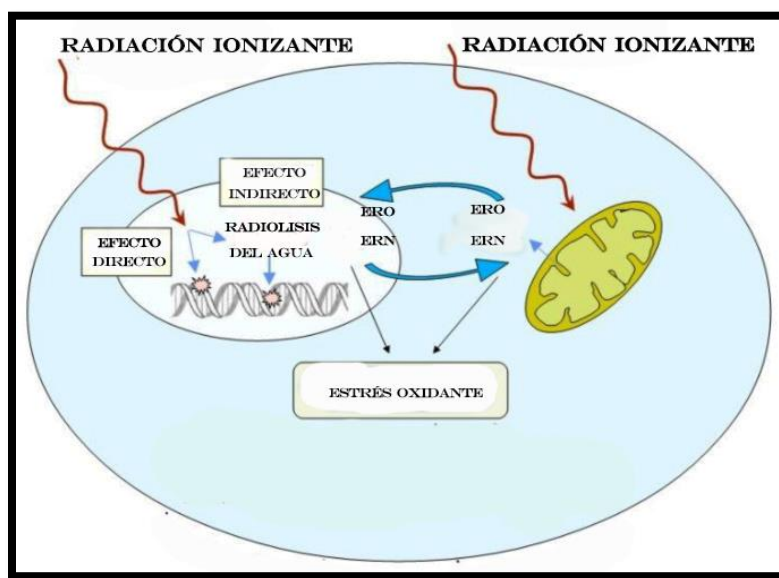


Figura 2 Representación del efecto directo e indirecto de la RI. En el efecto directo la energía se deposita inmediatamente en cualquier molécula provocando diferentes daños. El efecto indirecto se debe a la acción de los RL originados por la radiólisis del agua. En condiciones aerobias los RL pueden convertirse en ERO. Tomado y editado de Belli y Tabocchini, 2020.

2.4. La razón de dosis y su importancia en el efecto biológico de la RI

Uno de los factores que modifican el efecto biológico de la RI es la razón de dosis (RD), ésta se define como el tiempo en que se administra una dosis de radiación determinada (Tanarro y Tanarro, 2008). En general se piensa que si la RD es alta (RDA), el efecto biológico será

mayor, a esto se le conoce como el Efecto Directo de la Razón de Dosis (Brooks *et al.*, 2016) y se le atribuye al incremento en la eficacia de los mecanismos de reparación del ADN (Mitchel *et al.*, 2002) y a la potenciación de las señalizaciones de apoptosis de las células dañadas (McMahon *et al.*, 2013).

Si el efecto biológico de la RD incrementa cuando el organismo se expone a una Razón de Dosis Baja (RDB) que se considera de 10 a 100 Gy/h (Mitchel *et al.*, 2002), entonces se presenta el fenómeno del Efecto Inverso de la Razón de Dosis (Przybyszewski *et al.*, 2008). Este efecto se ha observado en cultivos *in vitro* de células de mamíferos. Stevens (*et al.*, 2014) reveló que la exposición a RDB incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas y el índice de apoptosis de la línea celular V79-4 de hámster chino tratadas con 0.36 y 0.69 Gy a una RD de $8.0 \times 10^3 \text{ Gy/h}^{-1}$ y $1.54 \times 10^2 \text{ Gy h}^{-1}$ respectivamente. También se ha evidenciado que las RDB incrementan la mutagénesis de las células somáticas (Fukushi *et al.*, 2008) y las germinales (Vilenchik y Knudson, 2000). Este fenómeno se ha relacionado con el desarrollo de “ventanas” de extrema radiosensibilidad celular que se producen ante la exposición a una RDB de tal manera, que los efectos biológicos de la radiación son más eficientes a medida que se prolonga el tiempo de irradiación (Rossi y Kellerer, 1993). Cada tipo celular presenta un grado diferente de sensibilidad al daño inducido por la RI esto se le conoce como radiosensibilidad (Baños y Alegría, 2001).

2.5. Envejecimiento

El envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de diversas enfermedades humanas tales como, trastornos neurodegenerativos, y cardiovasculares, cáncer, artritis, demencia, cataratas y diabetes. Este proceso está regulado

por factores genéticos y ambientales (Nacmias *et al.*, 2018) y es dependiente del estilo de vida que se lleve a cabo (Pereira *et al.*, 2004). Aunque entre todos los organismos, el envejecimiento es un proceso relativamente conservado, los mecanismos moleculares no se han explorado completamente (Cui *et al.*, 2012). Aunque no existe un acuerdo general sobre los mecanismos que provocan el envejecimiento, la hipótesis de los radicales libres ha sido la más aceptada (Halliwell, 1996).

2.6. Mecanismos y Teorías del envejecimiento

La comunidad científica ha propuesto más de 300 teorías que intentan explicar el proceso del envejecimiento, sin embargo, ninguna ha logrado explicarlo de manera precisa (Pomatto y Davies, 2018). Entre las diferentes propuestas se encuentran la Teoría de la pleiotropía antagonista que sugiere que algunos genes benéficos durante el desarrollo se vuelven perjudiciales en la vejez (Ungewitter y Scrable, 2009) 2). La Teoría del soma desechable: propone que el gasto energético del organismo se deposita en la reproducción o el mantenimiento de las células somáticas (Kirkwood, 1977). Recientemente surgió la teoría de la hiperfunción, argumenta que las funciones útiles durante el desarrollo continúan su curso cuando su función ya no es necesaria, lo cual favorece al envejecimiento y las enfermedades asociadas, causando crecimiento o hiperplasia y/o cáncer y acumulación de biomasa u obesidad, dislipidemia y aterosclerosis o de proteínas mal conformadas causando neurodegeneración por proteinopatía (Gems y De la Guardia, 2013). De manera general esta teoría explica por qué la disminución de las vías de señalización responsables del crecimiento tiene efectos favorables para un envejecimiento saludable (Gems y De la Guardia, 2013). La teoría de las mutaciones somáticas menciona que el origen del envejecimiento es el daño a

los ácidos nucleicos. La teoría de los telómeros sugiere que conforme avanza la edad del organismo, estos sufren un acortamiento, mientras que la teoría de las proteínas alteradas, postula que el daño progresivo de estas moléculas está fuertemente relacionado con trastornos degenerativos (Theurey y Pizzo, 2018). Recientemente, una nueva teoría llamada “Teoría de los radicales libres de la fragilidad” define que el daño ocurrido durante la oxidación de moléculas se asocia con el envejecimiento y al origen de las enfermedades crónico-degenerativas (Viña, 2019).

Sin embargo, la teoría más aceptada del envejecimiento es la propuesta por Denham Harman en 1956 (Harman, 1956) llamada teoría del envejecimiento mitocondrial por radicales libres (TERLM); si bien es la más aceptada ha sido muy discutida debido a sus controversiales postulados.

2.6.1. La teoría del envejecimiento mitocondrial por radicales libres

En 1956, Denham Harman propuso una teoría innovadora, que revolucionó la comprensión de la biología del envejecimiento y fue clave para que otras investigaciones se enfocaran en comprender los mecanismos de este proceso (Carocho *et al.*, 2019). Harman tomando algunas investigaciones posteriores (Harman (1956; 1981) sugirió que el envejecimiento es debido al desequilibrio entre la formación de radicales y las defensas antioxidantes del estrés oxidante que genera el incremento anormal de ERO y RL (Shigenaga *et al.*, 1994) y establece que el envejecimiento es debido al desequilibrio del estrés oxidante que genera el incremento anormal de ERO y RL (Shigenaga *et al.*, 1994).

Blagosklonny (2008) menciona algunas contradicciones de la TERLM, como el hecho de postular a los RL como principales causantes del envejecimiento cuando existen numerosos agentes físicos y químicos y reacciones químicas (incluyendo replicación, transcripción y

traducción) que también pueden causar daño molecular de manera azarosa. Diversos estudios correlacionan mayor producción de ERO con el incremento del periodo de vida (PV) (que se define como el total de días de vida de un organismo) (Blagosklonny, 2008), lo cual contradice a la TERLM, posteriormente se sugirió que el aumento de ERO incrementa la resistencia al estrés oxidante, esta condición propicia al incremento del PV del organismo (Kharade *et al.*, 2005, Radak *et al.*, 2005).

2.6.2. El envejecimiento y los estilos de vida como factores para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas

Factores como el llevar cabo estilos de vida poco saludables como el tabaquismo, el alcoholismo, las dietas altas en grasas y carbohidratos y realizar poca actividad física, pueden acelerar el proceso normal del envejecimiento y promover la incidencia de enfermedades degenerativas incluso a edades tempranas (Shlisky *et al.*, 2017). Algunas investigaciones refuerzan que el hecho de que mejorar las prácticas de salud podría reducir el riesgo de sufrir accidentes cerebro-vasculares y diabetes en un 80% (WHO, 2005).

Acciones como mantener un peso corporal adecuado y una dieta baja en grasas saturadas y rica en antioxidantes como la vitamina E, AA o el selenio, podrían disminuir la mortalidad y la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, de tal manera que el PV se incremente por lo menos 5 años de manera saludable y productiva (Harman, 1981).

2.7. Antioxidantes

Para hacer frente al daño producido por los RL, las células cuentan con defensas antioxidantes, estas son de carácter enzimático: Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutación Peroxidasa (GPx) y no enzimático o exógenos. Los antioxidantes no enzimáticos o exógenos se definen como cualquier sustancia cuya presencia en el organismo

en concentraciones menores a las de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe su oxidación (Halliwell, 1995; 2006). Muchos antioxidantes se encuentran en los alimentos que ingerimos, por lo que sus niveles en el organismo se pueden incrementar. Los antioxidantes que han sido más ampliamente estudiados son el AA, el α tocoferol o vitamina E y el β caroteno. Estos compuestos tienen una estructura similar que en la mayoría de los casos es responsable de su actividad e incluye al menos un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilo que pueden actuar como donadores de electrones (Simic y Jovanovic, 1988).

Diferentes estudios muestran que existe una relación inversa entre el consumo de frutas y verduras ricas en antioxidantes y el riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Meydani, 1999). De acuerdo con lo anterior, evitar la deficiencia de antioxidantes en la dieta es esencial para proteger del efecto aterogénico producido por la peroxidación lipídica. Tanto el AA como la vitamina E previenen la peroxidación lipídica y otros eventos oxidantes y por eso son considerados como los mejores antioxidantes en fase acuosa y lipídica respectivamente (Esterbauer *et al.*, 1991). Ambos neutralizan al O_2 , estabilizan radicales hidroxilo y aniones superóxidos. Adicionalmente el AA regenera la forma oxidada de la vitamina E restituyendo su actividad antioxidante (Packer, 1994).

2.8. Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de los antioxidantes pueden clasificarse de manera general en dos categorías: a) Prevención de la formación de RL y b) Inactivación de los RL. La inactivación de los RL es el principal mecanismo de acción (Rose y Bode, 1993).

Los mejores antioxidantes desde el punto de vista biológico deben combinar dos funciones: tienen que reaccionar con los RL pero como al donar uno de sus hidrógenos los compuestos

se transforman en RL, deben ser capaces también de interactuar con compuestos solubles en agua para poder regenerarse y recuperar sus funciones (Rose y Bode, 1993).

2.9. Los antioxidantes y el envejecimiento

Diversas investigaciones se han centrado en cómo retardar el envejecimiento a través del consumo de antioxidantes. Peng *et al.*, (2014) sometió a comprobación las diferentes teorías que explican el origen del envejecimiento mediante el consumo de antioxidantes exógenos como el AA, la vitamina A, y el alfa-tocoferol probando diferentes modelos biológicos como células humanas, la mosca de la fruta, la levadura de cerveza, la rata y el ratón. En sus experimentos, la antocianina incrementó significativamente el PV de la mosca de la fruta, en comparación con otros antioxidantes, sus resultados respaldan una de las primicias de la TERLM.

Dado que se ha sugerido que los RL son los responsables de la aceleración del proceso normal de envejecimiento, la administración de los antioxidantes como el AA y la clorofilina cuprosódica (CCS) podrían ser una herramienta para dilucidar si su consumo puede prolongar el PV de modelos biológicos unicelulares y multicelulares tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Se han realizado investigaciones con el AA para analizar si su administración afecta el periodo de vida de modelos biológicos multicelulares (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*). Los resultados no son consistentes debido a las variables como el protocolo utilizado y la edad de los organismos anteriormente descritos (Phillips *et al.*, 2000). Hasta el momento no se ha demostrado con certeza si un antioxidante por si solo puede incrementar el PV de los sistemas biológicos mantenidos en condiciones controladas (Bayne y Sohal, 2002).

2.10. Radioprotectores

Debido a que no se puede evitar la exposición de los individuos a la RI, desde hace mucho tiempo se han realizado estudios con el fin de identificar sustancias que disminuyan o eliminen el daño de la radiación. Los radioprotectores son agentes que protegen a los organismos antes o durante la exposición a la RI, su introducción en el campo de la radioterapia tiene el fin de optimizar la eficacia de la terapia y disminuir los efectos adversos producidos por el efecto directo e indirecto de la RI (Citrin *et al.*, 2010).

Estos agentes pueden ser naturales o sintéticos, funcionan como antioxidantes e inmunomoduladores (Kamran *et al.*, 2016) de manera general protegen a los sistemas biológicos de la radiación inactivando los RL, induciendo hipoxia, activando enzimas antioxidantes como SOD y estimulando los mecanismos de reparación.

Los radioprotectores se clasifican en:

- a) Radioprotectores de origen natural: vitamina A, C, E, selenio, melanotina, flavonoides y metilxantinas.
- b) Sintéticos que contienen el grupo tiol: amofostina, prC-210.
- c) Sintéticos que no contienen el grupo tiol: incluyen los nitroxidos, los bis-benzimidazoles, los fulerenos.

El principal mecanismo de acción de los antioxidantes como radioprotectores se basa en su capacidad para estabilizar los radicales OH° y O_2^- . También mediante la supresión de la formación de especies reactivas, desintoxicación de las especies inducidas por la radiación (incremento de enzimas antioxidantes como: SOD, CAT y GPx). En general las vitaminas A, C, E y el selenio ofrecen protección frente a la radiación gamma minimizando al estrés oxidante generado por las ERO (Konopacka *et al.*, 1998).

2.11. El ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) o vitamina C es un micronutriente soluble en agua, esencial para llevar a cabo múltiples funciones biológicas: participa como co-factor de diversas enzimas, en la hidroxilación del colágeno, en la biosíntesis de la carnitina y en la conversión de neurotransmisores como por ejemplo la dopamina a partir de la norepinefrina. La mayoría de los animales como peces primitivos, anfibios y reptiles, son capaces de producir AA a partir de la glucosa, pero en los humanos, los primates y los cobayos entre otros, el gen que codifica la enzima gulonolactona oxidasa que sintetiza el AA no es funcional, por lo tanto, dichos organismos obtienen el AA de su dieta. Su deficiencia provoca el escorbuto (Halliwell, 2001, Arrigoni y De Tullio, 2002).

La forma oxidada puede convertirse a ascorbato a través de una reducción. Esto permite que el AA done uno o dos electrones en las reacciones de hidroxilación. Esta capacidad de interacción electrónica por parte del ascorbato permite la transferencia de electrones a través de la membrana plasmática (May, 1999).

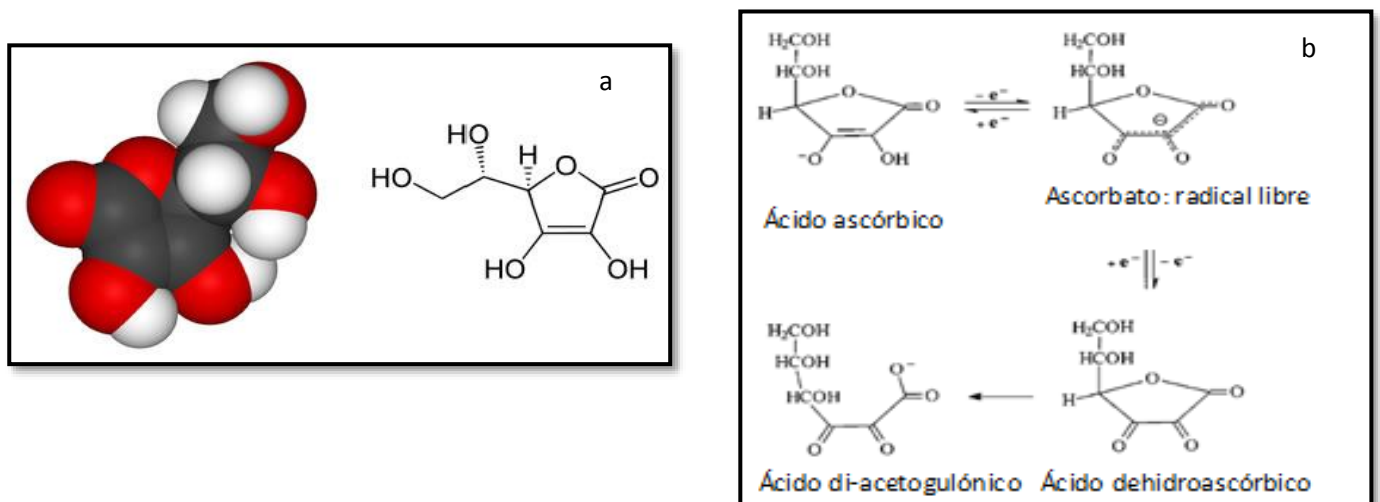


Figura 3. a) Modelo y estructura química del AA: el color negro representa el grupo carbono, el rojo el oxígeno y el blanco el hidrogeno, b) Metabolismo Redox del ácido ascórbico. Tomado de May, 1999.

A pesar de la gran cantidad de investigaciones que indican que el AA puede reducir el daño genético provocado por diferentes agentes, existen estudios *in vitro* e *in vivo* que aportan evidencia de su efecto pro-oxidante. La combinación de AA y metales de transición como el hierro y el cobre han sido utilizados por décadas para la inducción de daño oxidante en lípidos, proteínas y ADN mediante la producción de radicales hidroxilo facilitada por la reducción de dichos metales (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Cabe resaltar que el efecto pro-oxidante del AA no siempre depende de la presencia de metales de transición (Suh *et al.*, 2003), en presencia de CoCl_2 el AA aumentó los eventos de recombinación mitótica en células somáticas de *Drosophila* (Kaya *et al.*, 2002).

Usando *Drosophila melanogaster* se demostró que el AA combinado con vitamina E, puede disminuir la genotoxicidad provocada por doxorrubicina (Costa y Nepomuceno, 2006).

Jagetia, (2004) observó que el AA inhibe la peroxidación lipídica inducida por radiación.

Olvera *et al.*, 1995 encontraron que las concentraciones de 25, 50 y 100 mM de AA en combinación con 20 Gy de rayos gamma disminuyen la frecuencia de mutaciones y los eventos de recombinación somática. En contraste, Konopacka *et al.*, 1998 reportaron que el AA a concentraciones relativamente altas incrementó el daño radioinducido. Existen investigaciones, que han demostrado el efecto radioprotector del AA en diferentes órganos de mamíferos (Jagetia *et al.*, 2002; Artikhov, 1992) Mahdavi y Mozdarani (2011), evaluaron el efecto protector de la famotidina y el AA en el daño celular provocado por radiación.

2.12. La clorofilina cuprosódica (CCS)

La CCS es un derivado soluble de la clorofila, estructuralmente a diferencia de la clorofila que posee 4 anillos pirrólicos y estos en su centro poseen un átomo de magnesio y un quinto anillo de carbonos con una larga cola de fitol (Fig. 4a) que le confiere la característica de ser hidrofóbica además de limitar la capacidad de unirse a agentes mûgatenos y carcinogénicos, en la CCS se reemplaza el átomo de magnesio por uno de cobre, un grupo de etil y metil éster que su hidrolisis es sustituida por grupos de sodio y potasio (Fig. 4b). Se ha propuesto que esta estructura química le confiere su capacidad antioxidante y anticancerígena que es mediada por su anillo porfirinico que inactiva los RL (Fahey *et al.*, 2005). Se ha reportado que la CCS no es tóxica para los seres humanos de tal manera que puede consumirse en altas concentraciones (Osowski *et al.*, 2010).

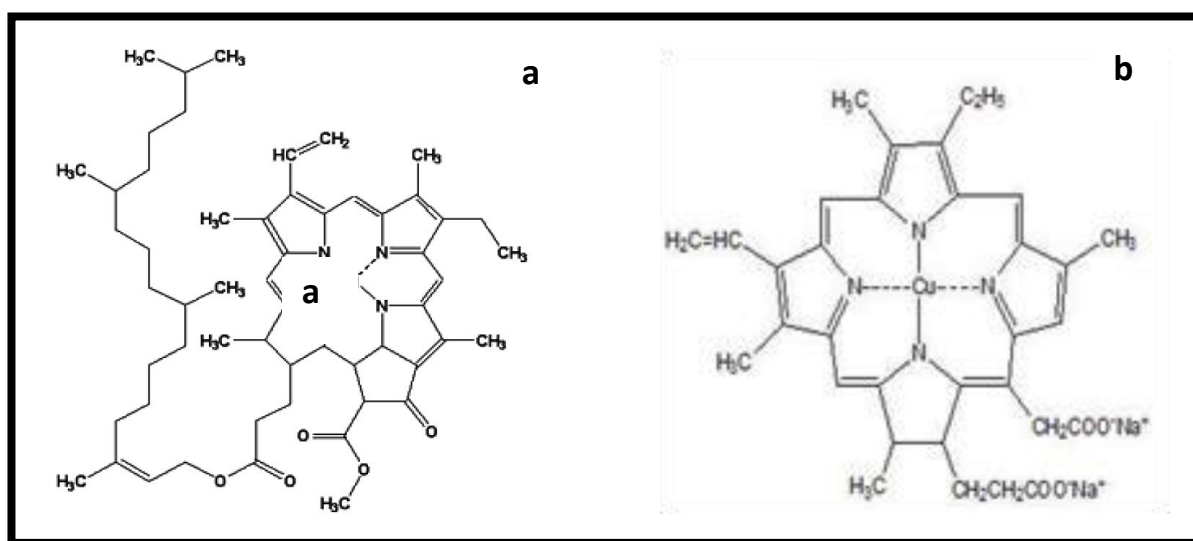


Figura 4^a. Estructura química de la clorofila y 5^b estructura química de la CCS Tomado de Dashwood, 1997.

Las investigaciones más actuales de la CCS han evidenciado su efecto protector con diferentes agentes genotóxicos como la nitrosourea (Ozcan *et al.*, 2018) y las aflatoxinas

(Abdel-Latif *et al.*, 2017), micotoxinas (Domijan *et al.*, 2015) y con RI en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Yin *et al.*, 2013; D'Epiro, *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2020). Así como efecto anticarcinogénico en líneas celulares de diversas neoplasias como colon-rectales, mamaria y hepática. Este efecto se le atribuye principalmente a su capacidad de quelación (Yang *et al.*, 2013; Pinelli *et al.*, 2019) ya que en esos experimentos hubo presencia de metales pesados como mercurio y cadmio.

Se ha estudiado su acción contra el daño provocado por los RL; Yu *et al.*, 2011, investigó la capacidad antioxidante de la CCS y la clorofilina con centro de Fe en células de Jurkat tratadas con ERO como agentes oxidantes. En sus resultados encontraron que ambos derivados de la clorofila mostraron capacidad antioxidante para los radicales: oxígeno singulete, peroxinitrito y el radical peroxilo. En particular, la clorofilina con centro Fe mostró mayor efecto en la citotoxicidad y la apoptosis de las células tratadas con peróxido de hidrógeno.

Vesenick *et al.*, (2012) evaluaron la acción de la CCS en la inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación celular y la expresión de los genes CASP8, CASP9 y CTNNB1 en un modelo *in vitro* de la línea celular HT29 de adenocarcinoma colon-rectal. En este estudio encontraron que la concentración más alta de CCS disminuyó significativamente la viabilidad de las células tratadas.

Adicionalmente, existe evidencia que respalda el efecto antimicrobiano y antiparasitario de la CCS (Singh y Singh, 2016; Caires *et al.*, 2017; Krüger *et al.*, 2019).

Tumulo y Márquez 2012, realizaron una revisión que aborda la ingesta de la CCS y su relación con posibles beneficios para la salud humana. Los resultados llamaron la atención,

sobre todo porque el antioxidante puede ser una alternativa de suplemento alimenticio y un producto bio-activo con actividades antimutagénicas y anticancerígenas.

2.13. *Drosophila melanogaster* como modelo biológico para investigar el envejecimiento

Dentro los modelos biológicos más utilizados para estudios de envejecimiento se encuentran: *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus*.

Desde hace más de 100 años *Drosophila melanogaster*, ha sido un modelo muy útil para estudiar la genética y la biología molecular. En 1908 Thomas Hunt Morgan fue el primer científico en utilizar este modelo biológico y con este demostró que los genes están dentro de los cromosomas. La mosca de la fruta tiene un ciclo de vida de 10 a 14 días (Fig. 5) un índice de fecundidad alto y su progenie es numerosa, además su mantenimiento es barato y fácil. Su genoma consta de 4 pares de cromosomas, 13,000 genes y 170 MB. El 77% de estos genes que provocan enfermedades en los seres humanos tienen homólogos en la mosca de la fruta (Adams *et al.*, 2000). Su PV es de 4 a 6 semanas y se pueden realizar múltiples experimentos como la administración de drogas, antioxidantes, manipulación genética. Este sistema facilita el monitoreo de eventos como mutagénesis, expresión génica, microarreglos etc. ya que posee variedad de genes que modulan la expresión de dichos eventos (Piper y Partridge, 2018).

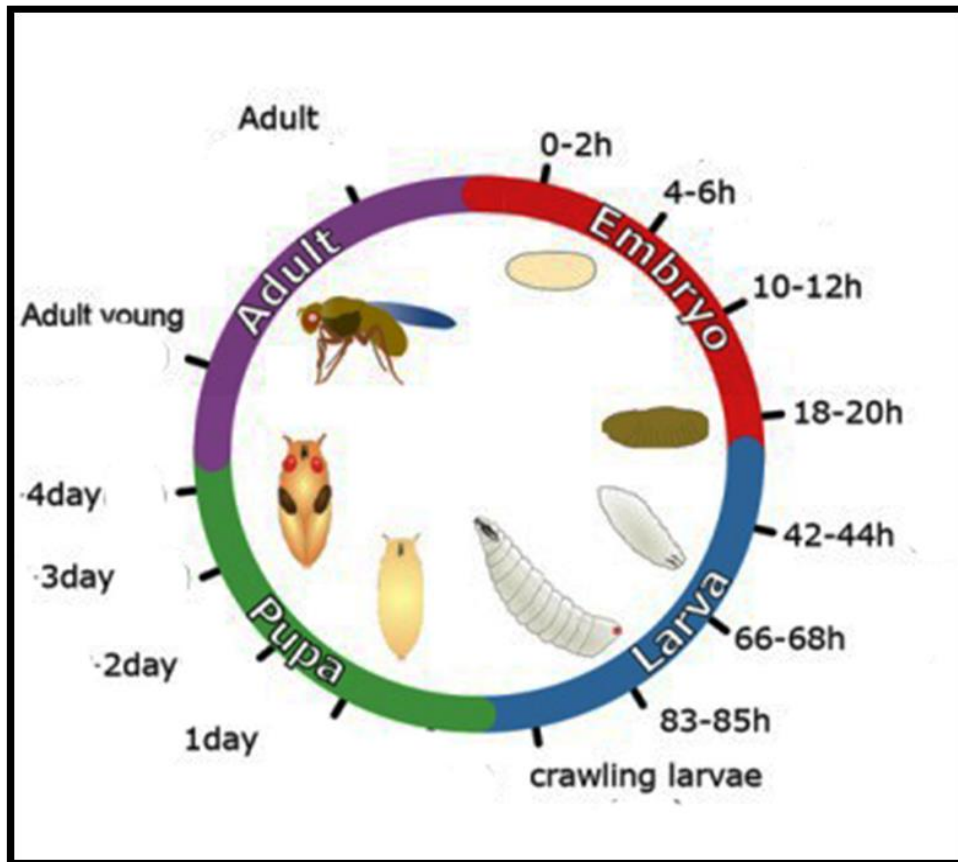


Figura 5. Representa el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* con sus diferentes estadios y tiempos que corresponden a: huevo, larva, pupa y adulto. Tomado y editado de Casas *et al.*, 2017.

El uso de *Drosophila* para realizar estudios de envejecimiento presenta diversas ventajas: 1) vive aproximadamente dos meses a una temperatura controlada de 25°C 2) la mayoría de sus células son post-mitóticas, a excepción de algunas células del intestino y las gónadas. Otra ventaja muy importante en estudios de genética y biología molecular es la manipulación de la expresión de genes relacionados con el envejecimiento durante la fase adulta.

Los mamíferos y *Drosophila* muestran similitud en eventos que ocurren durante el envejecimiento, lo que indica que este es un proceso conservado evolutivamente. Ejemplos de estas similitudes son: la disminución en capacidades de locomoción, habilidades de aprendizaje, funciones sensoriales y las conductas relacionadas al sueño y el apareamiento,

(Rhodenizer *et al.*, 2008). Incluso comparte con el ser humano cambios relacionados al sistema circulatorio (Nishimura *et al.*, 2011).

Existe también similitud de los mecanismos de expresión de proteínas que provocan el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (McGurk *et al.*, 2015), como el Parkinson, la proteína sinucleína (Feany y Bender, 2000) y la enfermedad de Huntington con la expansión de poliglutaminas (Jackson *et al.*, 1998).

Existen algunas limitaciones para estudiar el envejecimiento en *D. melanogaster*. Por ejemplo, no se pueden estudiar los telómeros y su relación con el envejecimiento debido a que la mosca de la fruta no tiene como tales telómeros, sino, versiones modificadas de estos que ayudan a mantener los extremos de los cromosomas (Casacuberta, 2017). Además, no participan en el envejecimiento, su función principal está relacionada con la esterilidad en las hembras (Walter *et al.*, 2007). Otra limitación es que la gametogénesis en los machos y hembras es continua mientras que en los seres humanos sólo los hombres producen espermatozoides continuamente (Panagopoulos, 2012). En la naturaleza, *D. melanogaster* vive en promedio 6 días (Rosewellte *et al.*, 1987) en condiciones de laboratorio su PV es mucho más prolongado (Tatar y Yin, 2001; Schmidt *et al.*, 2005).

3. DEFINICIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO

Con base a las evidencias que indican que la sobreproducción de radicales libres aceleran el envejecimiento al provocar daño celular y que el uso de antioxidantes se ha relacionado con el incremento de la longevidad, la ingesta de antioxidantes exógenos como el ácido ascórbico (AA) y la clorofilina cuprosódica (CCS) podría ser una alternativa para evitar o disminuir el daño provocado por los radicales libres durante la vida útil de *Drosophila melanogaster*.

4. HIPÓTESIS

El envejecimiento en *Drosophila melanogaster* es el resultado de la acumulación de mutaciones somáticas, entonces los antioxidantes exógenos como la CCS y el AA podrán disminuir la frecuencia de mutaciones somáticas e incrementar su periodo de vida de *Drosophila melanogaster*.

5. OBJETIVO GENERAL

Relacionar la frecuencia de mutaciones somáticas y la longevidad de los organismos de *Drosophila melanogaster* tratados con ácido ascórbico o clorofilina, solos o en combinación con radiación gamma administrada a dos razones de dosis.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la toxicidad de diferentes concentraciones de ácido ascórbico y CCS, solos y en combinación con 20 Gy de radiación gamma administrada a diferentes razones de dosis.
- 2.- Establecer la relación entre la frecuencia de mutaciones somáticas y la longevidad de los organismos tratados con clorofilina en combinación con radiación gamma.

7. METODOLOGÍA

Material biológico: Se utilizaron dos cepas de *Drosophila melanogaster*: mwh^+ / mwh^+ (multiple wing hair) y $flr^3/TM3; Ser$ que modifican el fenotipo del tricoma del ala de *Drosophila*.

Reactivos: La CCS se adquirió de Merck (Hillipor, Darmstadt Germany). El medio de cultivo sintético Fórmula 4-24 Carolina Biological Supply Burlington, North Carolina, USA, y el AA L(+)(-) de Merck (Hillipor, Darmstadt Germany).

Cruza y colecta de larvas: Se cruzaron durante dos horas hembras vírgenes de la cepa mwh^+ / mwh^+ con machos de la cepa $flr^3/TM3; Ser$, ambos de 3 a 4 días de edad. Posteriormente, se cambiaron a otros frascos con alimento nuevo para que ovipositaran durante 2 horas. Después, los adultos se retiraron y los frascos con los huevos se mantuvieron en un cuarto de cultivo con 25 °C y 60 % de humedad relativa para obtener larvas de segundo estadio. Cuando los organismos tuvieron 72 h de edad (larvas de 48h), se colectaron por diferencia de densidad con una solución de sacarosa al 20 %, con un embudo de separación.

Pretartamientos y tratamiento con radiación: Las larvas colectadas se dividieron en cinco grupos, cada grupo contenía aproximadamente 1000 larvas y se pusieron en pre-tratamiento en frascos de 250 ml que contenían un papel filtro (Whatmann No. 2) impregnado con las soluciones a probar: el control contenía 3 ml de solución de sacarosa al 5 % y el tratado 3 ml de 69 mM de CCS o 25, 50 o 100 mM de AA disueltos en solución de sacarosa al 5%. Después de 24 h de tratamiento en obscuridad, los grupos de las larvas se dividieron en dos, con el fin de irradiar a un grupo de cada pretratamiento. Para ello, cada grupo se irradió con

20 Gy de rayos gamma a dos diferentes razones de dosis (una RD en el irradiador Trans Elecktro LGI-01 Hungría con una razón de dosis de 960 Gy/h y la otra en el irradiador Gammacell 220 Co60 Nordion, Canada con una razón de dosis de 27.17 Gy/h) después, las larvas de cada grupo, se sembraron en grupos de 100 larvas por tubo homeopático (12 cm altura x 2.5 cm de diámetro) con 0.8 g de medio de cultivo sintético hidratado con 2.5 ml de agua destilada. Todos los grupos de larvas tratadas concluyeron su desarrollo en un cuarto de cultivo en condiciones de laboratorio y en completa oscuridad.

Viabilidad larva-adulto: Cuando inició la emergencia de los adultos, se contaron diariamente hembras y machos por separado para medir el tiempo de desarrollo y la viabilidad larva-adulto, los datos se graficaron entre los distintos grupos. Todos los tubos homeopáticos se etiquetaron por sexo, tratamiento y edad para evaluar su periodo de vida o longevidad.

Prueba de periodo de vida o longevidad: Para esta prueba se seleccionaron los individuos del día de máxima emergencia de los tratamientos. Los adultos emergidos se colocaron en grupos de 100 individuos en botes de poblaciones que contenían una caja Petri de 5 cm de diámetro con medio de cultivo regular que se cambió dos veces por semana. Cada lote de población se etiquetó con el tratamiento correspondiente, sexo y fecha de inicio del experimento. Todo el tiempo de duración del experimento las moscas se mantuvieron en un cuarto de cultivo a 25° C y 60% de HR. Los individuos que morían se contaron dos veces por semana hasta que murió el total de moscas probadas. Las moscas que morían cada quince días se agruparon y se fijaron en alcohol al 70 % para medir su frecuencia de mutación. Con los datos obtenidos se construyeron curvas de sobrevivencia.

Relación entre la frecuencia de mutaciones somáticas y la longevidad: Se disectaron las alas de los individuos que murieron cada quince días, se fijaron en alcohol al 70% y se montaron por separado en preparaciones fijas. Brevemente, los eventos genéticos inducidos en las células del disco imagal de la larva que da origen al ala en su fase adulta, producen grupos de células mutantes denominadas clones o manchas en la cutícula del ala. Los tricomas originados por la expresión de los genes *mwh* y *flr³* fueron identificados y examinados para determinar su tamaño como manchas pequeñas (1 o 2 células) o manchas grandes (más de 2 células) y su fenotipo *mwh* o *flr³* y ambos fenotipos adyacentes que indican una mancha gemela. Los clones celulares o manchas son producidos por eventos genéticos como mutaciones puntuales o deleciones del alelo silvestre o de recombinación mitótica entre *mwh* y *flr³*. Las manchas gemelas son resultado de la recombinación entre el alelo *flr³* y el centrómero (Lindsey y Zimm 1985).

De cada prueba se hicieron al menos tres experimentos independientes y cada uno de ellos con tres replicas.

Análisis estadísticos: Para establecer las diferencias entre los tratamientos, los resultados de la viabilidad larva-adulto se analizaron con la prueba estadística *t* de Student, a un nivel de confianza del 5%. La toxicidad se obtuvo dividiendo el total de los adultos viables y el número de larvas tratadas.

La frecuencia de mutación y recombinación somáticas se analizó mediante el programa informático SMART que se basa en el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würigler (1988); este permite obtener cuatro diferentes diagnósticos: negativo (-), débilmente positivo (w), positivo (+) y no concluyente (i). El procedimiento se basó en dos hipótesis: (1) no hay diferencia en la frecuencia de mutación entre las series de control y de tratamiento; (2) los

resultados del tratamiento con radiación tienen un incremento en la frecuencia de mutación inducida “n” veces comparada con los controles negativos.

La longevidad se analizó mediante los datos que arrojaron las curvas de sobrevivencia, el primer dato es el periodo medio de vida, este es el punto de intersección del eje X u horizontal (días) y el porcentaje de sobrevivencia que corresponde al eje Y, es decir, el día en que comenzó a morir el 50% de la población. El segundo es el periodo de vida total o máximo que representa el día en que la población ya había muerto completamente o quedaba un 10% del tamaño de la muestra original. Los datos que proporciona la curva se organizaron en una tabla de sobrevivencia que indica el tamaño de muestra y las diferencias entre tratamientos y los sexos, indicando el valor de p . Para ello, se utilizó el paquete estadístico de XL-STAT (Addison. 2010), que contiene las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier.

8. RESULTADOS

8.1. Artículo I

González E, Cruces MP, Pimentel E, Sánchez P. Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018 Sep;62:210-214. doi: 10.1016/j.etap.2018.07.015.

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Toxicology and Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/etap

Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate

Elena González^a, Martha P. Cruces^{a,*}, Emilio Pimentel^b, Petra Sánchez^b

^a Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca 5/9, La Marquena, Ocoyucan, 52750, Mexico
^b Universidad Autónoma del Estado de México Campus del Cerro de Piedras Blancas, Carretera Toluca-Jerálbaaca Km 15.5, Toluca de Lerdo, 50200, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Somatic mutation
D. melanogaster
Radiation dose rate
Ascorbic acid
Radioprotection
Wing test

ABSTRACT

Many studies have revealed that ascorbic acid (Aa) acts as a powerful inhibitor of genetic damage. The objective of the present study was to evaluate the radioprotector effect of Aa at two different radiation dose rates. The somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* was used. 48 h larvae were treated for 24 h with 25, 50 and 100 mM of Aa. After pretreatment, larvae were irradiated with 20 Gy of gamma rays administered at 36 or 960 Gy/h. Toxicity, development rate and frequency of mutant spots were recorded. Results provide evidence of a radioprotective effect for all tested concentrations of Aa only when 20 Gy were delivered at 36 Gy/h and only with 25 mM using the 960 Gy/h. To consider the use of Aa as radioprotector or therapeutic agent, it is necessary to know its potential under different situations to avoid unwanted injuries.

1. Introduction

The harmful effects of ionizing radiation in biological systems are produced essentially through direct deposition of energy into crucial molecules (direct effect), or through the intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) including superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, peroxide radicals, and other free radicals (Azzaam et al., 2012). The most common reactive ROS include superoxide anion (O^{2•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radicals (OH•). At low levels, ROS show beneficial effects: they participate in cellular response and immunity (Selim et al., 2016), but its excess provokes different effects including lipid peroxidation, removal of thiol groups from cellular and membrane proteins, strand breaks and base alterations leading to DNA damage (Shukla et al., 2010). Free radicals produce single and double DNA strand breaks, which lead to mutations. Nowadays, it is well known that DNA damage plays a significant role in the development of atherosclerosis and other degenerative diseases including some kind of autism, Alzheimer, Parkinson and cancer (Jones, 2010; Mirończuk-Chodakowska et al., 2018; Sanz, 2016). The risk of injury from radiation is a function of the doses received; the type of radiation (low or high linear energy transfer), the type of cell and dose rate, among others (Kelsey et al., 2014). Dose rate is defined as the radiation dose absorbed per unit of time (Ślósarek et al., 2014).

Nowadays, the extensive use of radiation for medical treatment, diagnosis; its use in the energy sector, industry, nuclear accidents,

nuclear terrorism and in some other activities such as outer space or air traveling, has increased the necessity to identify, develop, and validate potential strategies to protect normal tissues from the harmful effects of ionizing radiation (Singh and Krishnan, 2015). Pharmacological intervention could be the most prudent strategy, given that compounds, especially those of natural origin that can act as free radical scavengers and antioxidants, are able to reduce or mitigate the deleterious effects of ionizing radiation (Maurya et al., 2006).

Radioprotective agents are chemical compounds that reduce the effects of radiation in healthy tissues and have been used to reduce morbidity or mortality produced by ionizing radiation (Greenberger, 2009), they also have a practical use in clinical radiotherapy because normal tissues should be protected against radiation injury while cancerous tissues are exposed to higher doses of radiation to obtain better results. A large number of compounds showed good radioprotection in *in vitro* studies, but most of them failed in *in vivo* application due to acute toxicity and side effects (Weiss and Landauer, 2003). There have been many attempts to find an ideal radioprotector that can preferentially protect normal tissues from radiation damage without affecting the sensitivity of tumor cells (Bump and Malaker, 1997). The chemicals that can scavenge free radicals reduce the occurrence of DNA strand breaks. Thus they can prevent the formation of free radicals or destroy free radicals by reacting with them, thereby inhibiting their reaction with biomolecules. Since free radicals are short-lived, it is necessary for such radioprotective molecules to be present in the cellular media at the

* Corresponding author.
E-mail address: marthapatriciacruces@inin.gob.mx (M.P. Cruces).

8.2. Artículo II

Los resultados correspondientes a la evaluación de la longevidad y su relación con la frecuencia de mutación de *Drosophila melanogaster* provocadas por radiación ionizante y CCS, están incluidos en el siguiente artículo.

Acuse de recibo de la editorial *Environmental Toxicology and Pharmacology*.

De: ETAP <em@editorialmanager.com>
Fecha: 21 de enero de 2022, 4:27:42 GMT-6
Para: Pimentel Emilio <epimen63@gmail.com>
Asunto: A manuscript number has been assigned: ETAP-D-22-00056
Responder-Para: ETAP <support@elsevier.com>

Ms. Ref. No.: ETAP-D-22-00056
Title: Relationship between lifespan and somatic mutation in *D. melanogaster* after treatment with chlorophyllin
Environmental Toxicology and Pharmacology

Dear Dr. Pimentel Emilio,

Your submission entitled "Relationship between lifespan and somatic mutation in *D. melanogaster* after treatment with chlorophyllin" has been assigned the following manuscript number: ETAP-D-22-00056.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/etap/>.

Your username is: emilio.pimentel@inin.gob.mx

If you need to retrieve password details, please go to: <https://www.editorialmanager.com/etap/l.asp?i=344002&l=F2YZID4J>

For guidelines on how to track your manuscript in EM please go the following address: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/89

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Environmental Toxicology and Pharmacology

Relationship between lifespan and somatic mutation in *D. melanogaster* after treatment with chlorophyllin

González Elena¹, Pimentel Emilio¹, Cruces Martha Patricia¹, Jiménez Elizabeth¹, Sánchez Petra².

¹Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), Carretera México-Toluca, S/N, la Marquesa, Ocoyoacac, CP. 52750, México.

²Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Edo Mex., México.

Corresponding author: Dr Emilio Pimentel Peñaloza

e-mail: emilio.pimentel@inin.gob.mx

Relationship between lifespan and somatic mutation in *D. melanogaster* after treatment with chlorophyllin

González Elena¹, Pimentel Emilio¹, Cruces Martha Patricia¹, Jiménez Elizabeth¹, Sánchez Petra².

¹Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), Carretera México-Toluca, S/N, la Marquesa, Ocoyoacac, CP. 52750, México.

²Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Edo Mex., México.

Abstract: Sodium copper chlorophyllin (SCC) has a genetic damage inhibitory capacity through its antioxidant action, for this reason we considered to investigate its role in the life span of *Drosophila melanogaster* and its relationship with the frequency of somatic mutation induced by gamma rays. Results indicated that SCC alone prolonged the lifespan only to females, but in combination with 20 Gy of gamma rays, the aging delay in both sexes was overwhelming. In addition to confirming that the pigment reduces the frequency of mutation, the individuals with the highest mutation load are the individuals who die more quickly and that once eliminated, the individuals treated with 20 Gy or with SCC + 20 Gy survivors, die at the same rate. The results together indicate that SCC not only inhibits induced genetic damage, but it also has beneficial effects that probably cause an aging delay of the treated population that need to be investigated.

Keywords: Lifespan, Chlorophyllin, Gamma rays, *Drosophila*, Somatic mutation

1. Introduction

Currently there is experimental evidence suggesting that aging is the result DNA damage accumulation caused by the imbalance between the production of ROS and the antioxidant defense system producing a correct cellular function breakdown (Shigenaga et al., 1994). ROS at balanced concentrations are essential in cell signaling, for mitogenic response induction, defense against infectious agents, in the immune response (Son and Lee, 2019), while ROS excess, can alter the normal cellular functions and promote irreversible damage to nucleic acids, lipids and cellular proteins inducing oxidative stress. A ROS increase may be is the etiological factor for acute and chronic-degenerative diseases such as atherosclerosis (Yang *et al.*, 2017); insulin resistance (Yaribeygi et al., 2019); cardiometabolic and neurodegenerative and kidney disorders (Verdile et al., 2015; Garaschuk et al., 2018); macular degeneration and biliary diseases and cancer (Chandrasekaran et al., 2017; Di Meo and Venditti, 2020).

Lifestyle involving smoking or sedentary can increase cellular oxidative stress accelerating the aging process and stimulate the incidence of diseases (Shlisky et al., 2017). It is known that a healthy lifestyle reduces the risk of stroke and diabetes by 80% (WHO, 2005) because it promotes the reduction of harmful ROS reactions, without modifying their vital functions in cells and tissues and keep them in homeostasis. Unfortunately, daily life stress currently does not allow a totally healthy lifestyle, which makes it relevant to evaluate alternatives such as the consumption of natural antioxidants.

Antioxidants such as tocopherols, ascorbic acid, carotenoids, flavonoids, some amino acids, phospholipids, and sterols are found in food and play an important role in ROS homeostasis (Ali et al., 2020), and in this way they prevent the generation of ROS (Oter et al., 2012). But nevertheless, there are other molecules widely distributed in nature that exhibit antioxidant proprieties such as porphyrins (Tsolekile and Nelana, 2019). Porphyrins include protoporphyrin IX, chlorophyll or sodium copper chlorophyllin (SCC), a soluble semisynthetic derivative of chlorophyll (Hayatsu et al., 1993) Nagini et al., 2015) and

bilirubin (Jiménez et al, 2020). SCC has been approved by Food and Drug Administration (FDA) of USA as a food colorant, in addition to its high antioxidant capacity (Yu et al., 2010; Ozcan et al., 2018), its antimutagenic and anticancer activity has been demonstrated in different experimental models (Zimmering et al., 1990; Pimentel et al., 1999; 2000; Kumar et al., 2004; El-Ghor et al., 2014; Domijan et al., 2015). Its bactericidal effects (Liu Z et al., 2020), antimicrobial (Krüger et al., 2019), antiparasitic (Häder et al., 2016; Singh and Singh, 2016) gastroprotector (Lv H et al., 2019), radioprotective (Citrin et al, 2010); antimutagenic (Zimmering et al., 1990; Pimentel et al., 1999; Jiménez et al., 2020) have been demonstrated. There is also evidence of its role in the activation of signaling pathways for the expression of genes related to apoptosis and cell proliferation (D'Epiro, et al, 2016), these data suggest its immunomodulatory activity (Yin et al, 2013). As nanoparticles and liposomes form (Gomma et al., 2017; Chang et al., 2018).

The radioprotective effect of SCC has been compared with the action of Amifostina® (Jiménez et al., 2020) the only radioprotectant approved by the EPA using the somatic mutation and recombination assay in *Drosophila*. The results indicated that there exists a direct relationship between exposure time and genetic damage reduction. While exposure time increases, genetic damage reduces. SCC caused a greater reduction in gamma-ray-induced genetic damage than Amifostine®.

Various studies have focused on the role of some antioxidants such as vitamins E and C (Sadowska and Bartosz, 2014) in delaying aging in different biological models. Since SCC, has shown to possess antioxidant and radioprotective properties, we consider relevant to evaluate its action in modulating the lifespan of *D. melanogaster* and to correlate it to the frequency of somatic mutation induced by gamma rays.

Drosophila melanogaster offers many advantages for lifespan studies (Piper and Partridge, 2018); it has a short life cycle, is inexpensive to maintain, and large sample sizes can be obtained in a short time and the absence of regulatory oversight for their use in experiments. In addition, it has orthologous genes to those of man involved in aging processes and degenerative diseases (Regan and Partridge, 2013; Carazo et al. 2016; Ugur et al. 2016).

2.- Material and Methodology

Biological material: Two strains of *D. melanogaster* were used: *mwh + / mwh +* (3-0.3) which in homozygous condition this allele produces three or more trichomes per cell instead of one, and *flr³ / In (3 LR)TM3*; *Ser (flr³, 3–38.8)* also modifies the appearance of the trichome, from a needle to a flame shape. In homozygous condition *flr³* is lethal, therefore it includes the balancer gene TM3, which prevents the homozygous condition (Lindsley and Zim, 1992).

Crosses and larval collection: Virgin females of the *mwh + / mwh +* strain were crossed with *flr³ / TM3*; *Ser* males for two hours, both 3 to 4 days old, in flasks with standard culture medium. Subsequently, they were transferred to bottles with new medium to oviposit for 2 hours. Afterwards, the adults were removed and the bottles with the eggs were kept in a culture room at 25 ± 1 °C and 60% relative humidity continue development. When the organisms reached 72 h old (48 h larvae), were separate from culture medium by density difference by means of a 20% sucrose solution, using a separating funnel.

Treatments: Collected larvae were divided into two groups and placed in in 250 ml flasks containing a filter paper (Whatmann No. 2) impregnated with the solutions to be treated: the control contained 3 ml of a 5% sucrose solution or the same amount of SCC dissolved in 5% sucrose. After 24 h of pre-treatment in the dark, half larvae pretreated with sucrose and half pretreated with SCC were irradiated with 20 Gy of gamma rays in a cobalt-60 source of a Gamma-Cell 2000 irradiator (Dose rate at the moment of irradiation was 27.17 Gy/h). Larvae of each group were put in groups of 100 in homeopathic tubes (12 cm height x 2.5 cm diameter) with 0.8 g of synthetic culture medium Formula 4-24 Carolina Biological Supply hydrated with 2.5 ml of distilled water. All groups of larvae concluded their development in a culture room under laboratory conditions and in complete darkness.

Reagents: SCC was purchased from Merck (Hillipor, Darmstadt Germany). Synthetic culture medium Formula 4-24 Carolina Biological Supply Burlington, North Carolina, USA.

Larva-adult viability: From day 10 since the oviposition, the number of emerged females and males were daily separately counted to measure larva-adult viability. The data was plotted to determine development time.

Lifespan test: The individuals were selected from the maximum emergence day of each treatment and were placed in groups of 100 in population pots (see Figure 2) with a 5 cm diameter Petri dish with regular culture medium that was changed twice a week and the individuals that died from each treatment were counted. The dead flies were grouped collected every fifteen days, fixed in 70% alcohol to later measure their mutation frequency. Each population pot was identified with the treatment, sex and experiment star date. The flies were kept in a culture room at 25 ° C and 60% RH and darkness for the entire duration of the experiment. Survival curves were made with the data obtained.

Genotoxicity test: The wings of the individuals who died every fifteen days, were fixed in permanent preparations and then were scored under optical microscope. Genetic changes induced in the larval wing disc cells produce groups of mutant cells (spots) easily identifiable in the adult wing blade. Wings were examined to identify small single spots (one or two cells), large single spots (larger than 2 cells) of either *mwh* or *flr*, and *mwh-flr* twin spots. Single spots (either *mwh* or *flr*) arise from point mutations or deletions at the wild type allele of each locus or for *mwh*, mitotic recombination in the chromosomal region comprised between *mwh* and *flr*. Twin spots arise following a recombination event between *flr* and the centromere region (Lindsley and Zimm, 1992).

Statistical analysis: Kaplan-Meier curves were plotted using XLSTAT-2015 life software [Addinsoft. XLSTAT. Addinsoft, USA; 2011]. Survival functions were estimated to obtain the cumulative survival curves for each experimental group and for each sex. Curves were statistically compared by the mean lifespan of the experimental and the control variants, with the Tarone-Ware, Wilcoxon and Logrank tests. This Kaplan-Meier method is a sensitive method that provides survival rates such as mean survival time (MST) and total survival time (TST), as well as the differences between the survival rates of different treated populations (Liang, and Wang, 2018).

To establish differences between treatments in the somatic test, the larval-adult viability results were analyzed with a Student's t-test at 0.05 probability level. Toxicity was obtained dividing the total of viable adults by the number of larvae tested. Data of mutations and recombination were analyzed using the SMART computer program based upon the multiple-decision procedure of Frei and Würgler (1988), which enables to obtain four different diagnoses: negative (-), weakly positive (w), positive (+) and inconclusive (i). The procedure was based upon two hypotheses: (1) there is no difference in the mutation frequency between control and treatment series; (2) radiation treatment results have an increasing mutation frequency n times the induced in negative controls. Because small single spots and total spots have a comparatively high spontaneous frequency, m is fixed at a value of 2 (testing for a doubling of the spontaneous frequency to define a negative results). For the large single spots and the twin spots, which have a lower spontaneous frequency, $m = 5$ is used. Both hypotheses are tested at 5% significance level. To test against the hypotheses, the conditional binomial test according to Kastenbaum and Bowman or Chi-Square test for proportions may be applied (Frei and Würgler 1988).

3.- Results

3.1 Larva-adult viability: Table 1 represents the percentages of viability of from a total of 1500 larvae tested in three independent experiments. The percentage of viability in the control group was of 90.0 ± 0.36 , for the pretreatment with SCC the percentage was 88.5 ± 0.32 significant differences were found. The percentage of viability for 20 Gy alone and combined with SCC (SCC + 20Gy) were 87.0 ± 0.32 and 85.5 ± 0.35 respectively, viability comparison with the control group indicated a statistical significant reduction ($P < 0.05$) for both treatments, not difference was found between these treatments.

3.2. Development time: The daily emergence of individuals is represented in Figure 2. It can be appreciated that non irradiated organisms (Control and SCC) concluded their development on the 11th day. Those treated with 20 Gy or SCC + 20 Gy, concluded it on the 12th day. This data are relevant to make the corresponding comparisons on the induction of genetic damage.

3.3. *Lifespan*: Figure 3 shows the survival curves calculated with the Kaplan-Mayer program for the lifespan of the four groups treated in second larval stage with: SCC, 20Gy, SCC + 20Gy and the control. It can be appreciated that SCC treatment increase the survival in 4.5 days ($P < 0.001$) but only in the females (Figure 3a) and significant reduction ($P < 0.0001$) in males, compared to the control. It can also be observed that although 20Gy gamma rays caused a significant reduction in the estimated mean survival time (MST) for each sex, the pretreatment with SCC and after that with 20 Gy, caused a recovery of the estimated survival value of 7 days ($P < 0.0001$) in the females and 8 days in the males ($P < 0.0001$) respect to 20 Gy group.

3.4. *Relationship of somatic mutation in the life span of D. melanogaster treated with SCC*: Table 3, include the somatic mutation frequency induced in larvae *mwh +/+ flr³*, it can be seen that pretreatment with SCC caused a significant reduction in all kind of spots induced by 20 Gy of gamma rays. The comparison between them was statistical different (+). Figure 4 correlates the lifespan with the frequency of somatic mutation and recombination analyzed in wing cells. In the first three fortnights, in addition to the higher number of dead organisms in the 20 Gy group, the mutation frequency of these organisms was also significantly higher 45, 55 and 41% in fortnights 1, 2 and 3 respectively. The remaining individuals had an estimated lifespan of 79.7 days for those treated with 20 Gy, and 86.3 days for those treated with SCC+20 Gy. The comparison between them was statistically different ($P < 0.0001$).

5.- Discussion:

Aging is a natural process, in which the structural integrity of an organism decreases over time, this causes the loss of the organism's functionality, as well as an increased risk of death (López-Otín et al., 2013). Given the discovery that ageing is under genetic control and that different organisms have evolved vastly different lifespans, it is evident that ageing would be modifiable by genetic manipulations (Piper and Patridge 2018).

A typical, healthy and well-maintained outbred *Drosophila* population will have a median lifespan of approximately 70 days and maximum of approximately 90 days at 25 °C (Ziehm and Torton 2013). Free radicals produced during normal metabolism, cause damage to

macromolecules. The free radical theory of aging proposes that the organism is unable to repair all of them and that, with time, unrepaired damages accumulate and put the organism at risk, in other words, free radicals provoke aging and death. (Anarunjani, 2014). There is experimental evidence that some tetrapyrroles, such as sodium copper chlorophyllin (SCC) are very efficient inhibiting genetic damage caused by exposure to ionizing radiation (IR). The copper center of the SCC, plays a fundamental role in its function as an antioxidant (Pimentel *et al.*, 2013, 2016) causing the stabilization of free radicals and forming complexes with mutagens causing their inactivation (Blumer *et al.*, 2008; Egner *et al.*, 2003). Given that IR induces damage mainly through the generation of free radicals (FR) (Hiscock, 1999) that supports the theory proposed by Harman (1956), it highlights the importance of evaluating the action of SCC in the life span or longevity of *D. melanogaster*.

Results obtained in the present investigation revealed that the pretreatment with SCC has beneficial effects all parameters under study, the viability of the organisms treated only with SCC indicated that it is non-toxic and had a visible advantage in the females, in addition to confirming that the SCC administered as pretreatment inhibits the genetic damage induced by IR, it probably also causes other organic benefits as yet unknown that makes longer the lifespan of females.

The action of the SCC in the lifespan, hasn't been practically explored, however, it is widely demonstrated that it is an excellent antimutagen (Zimmering *et al.*, 1990; Pimentel *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2004; Abdel-Latif *et al.*, 2017; Jiménez *et al.*, 2020); bactericidal, (Krüger *et al.*, 2019); antiparasitic (Häder *et al.*, 2016); anticancer (Ozca *et al.*, 2018) In all these studies it has been proposed that the antioxidant activity of SCC is responsible for the reported effects. In the present study, it was confirmed that SCC administered as pretreatment was responsible for the decrease in genetic damage induced by IR although there is a still unknown beneficial effect or effects that causes SCC to prolong the lifespan females when SCC was administered in larval stage.

The results obtained in the organisms treated with SCC in combination with 20 Gy of gamma rays could also support the benefits induced by SCC. The lifespan was significantly prolonged for both males and females. The results obtained from the relationship of mutation frequency with lifespan could support the induction of adaptive advantages caused by SCC

since individuals with a higher frequency of induced mutation (group treated with 20Gy) die early, while flies in the group treated with SCC + 20 Gy died at a lower rate and prolonged their lifespan. The mechanism that causes SCC to extend the lifespan is unknown. However there are studies that reported that protoporphyrin-IX (PP-IX) a metal free porphyrin prolonged the lifespan of a wild strain of *D. melanogaster* (Canton-S) (Pimentel et al., 2013) and this observation could be attributed to a Sod- mimetic effect (Afonso, 1999). Unless there is no key evidence that establishes a direct causal link between oxidative stress and the rate of aging it has been shown that SOD overexpression strongly increased lifespan in two studies (Parkes et al 1998, Sun and Touner 1999).

Pimentel *et al.*, 2013, found that radio protective effect of SCC is in proportion with the amount of copper present in the molecule that includes a copper center, it was shown that its proportion is related to the magnitude of the decrease in induced genetic damage, the copper center of the SCC through oxide reduction reactions is capable of donating electrons (Blumer et al., 2008) and inactivating reactive oxygen species (ROS) (Tumolo and Lanfer-Marquez, 2012). The stabilization of FR ie hydroxyl (the most reactive of the FR) generated by the accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) (Zhang et al., 2012) and inhibit the induction of point mutations, mitotic recombination events or deletions could be responsible (Morley and Trainor, 2001) for the increased longevity in adults to of *D. melanogaster* treated with SCC+20Gy. There is evidence supporting that SCC can also decreased lipid peroxidation in mitochondria which could also explain the increase in the longevity observed in the present study (Sato et al., 1984).

It has already been reported that the administration of antioxidant agents to *D. melanogaster* such as cocoa (Bahadorani and Hilliker, 2008), resveratrol (Wang et al., 2013), trolox and carnitine (Stvolinsky et al., 2016), increases the life span. Lifespan increased in 3 days in males treated with ginger extract (2mg / ml) (Zhou et al., 2018), with anthocyanins, the increases was of 5 days (Wang et al., 2015). In females, the addition of resveratrol in the culture medium combined with a diet deficient in sugar and protein, increased their life span by 15% (Wang et al., 2013). In general, the authors attributed this effect to the antioxidant capacity of the agents, their modulation in the face of oxidative stress and / or the metabolic conditions of the organisms. An increase in the longevity of *D. melanogaster* treated with

Curcumin (Shen et al., 2013), a natural product with antioxidant properties, was also reported.

The individuals lifespan increase treated in the larval stage with SCC + 20 Gy of gamma rays highlights that SCC not only inhibits IR-induced genetic damage, it probably also causes other beneficial effects. It is possible that SCC may have a protective function of organelles involved in the aging process such as mitochondria, since the biological mechanisms that support the aging theory and the biological action of gamma rays are through similar processes and both are mediated by the generation of ROS (Kuzmic et al., 2019). It has been shown by electron-spin resonance that SCC is capable of directly inactivating FR (Kamat et al., 2000). The stimulating the immune system through the activation of transcription factors that overexpress proteins such as cyclines, and that favors apoptosis via caspases (Patar et al., 2018), could contribute to the increase of the lifespan of the group of flies from the SCC+20Gy treatment.

The mitochondria is strongly involved in the development of aging and chronic degenerative diseases (Schapira, 2012; Jang et al., 2018), it is an important target of the biological effect of IR (Kamat et al., 2000), and its functions can be enhanced with the administration of antioxidants and prolong the lifespan of organisms (Schriner et al., 2005; Munro et al., 2019; Shabalina et al., 2017). Additionally, it has been documented that when organisms are exposed to a mutagenic agent combined with SCC, the levels of endogenous enzymes increase their levels (Fulda and Kroemer, 2011). An in vivo and in vitro study demonstrated that SCC protects the mitochondrial membrane from damage caused by different doses of IR (Kamat et al., 2000). Sharma and Kumar, (2007) demonstrated that SCC decreases the amount of intracellular ROS in irradiated mouse spleen cells attributed to the inactivation of the oxygen singlet and hydroxyl. Kumar et al, (2001) proposed that SCC inhibits the chelation of Fe (II) responsible for the generation of the hydroxyl radical.

6.- Conclusion:

Based on the relationship between the frequency of somatic mutation and lifespan, the free radical theory of aging is supported, since the organisms that die in the first fortnight are

those with a higher frequency of mutations. It is important to mention that 60% of the genetic damage produced by low energy transfer ionizing radiation (such as gamma rays) is the result of the production of free radicals. SCC pretreatment caused a significant increase in the lifespan of *D. melanogaster*, most likely due to its inhibition of oxidative damage.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work involved in part research carried out by María Elena González Herrera to obtain the Ph. Degree in Sciences at the Universidad Autónoma, Estado de México (UAEM) with a fellowship (CVU-586704) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACyT), México. The authors wish to acknowledge the splendid technical assistance provided by Hugo Suarez Contreras.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Abdel-Latif, M.S., Elmeleigy, K.M., Aly, T.A., Khattab, M.S., & Mohamed, S.M., 2017. Pathological and biochemical evaluation of coumarin and chlorophyllin against aflatoxicosis in rat. *Exp Toxicol Pathol* 69 (5), 285-291.
- Addinsoft. 2011. XLSTAT. Addinsoft, USA.
- Afonso, S., Vanore, G., Batlle, A., 1999. Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Radic Res* 31 (3), 161-170.
- Ali, S.S., Ahsan, H., Zia, M.K., Siddiqui, T., & Khan, F.H., 2020. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem* 44 (3), e13145.

Anuranjani, B.M., 2014. Concerted action of Nrf2-ARE pathway, MRN complex, HMGB1 and inflammatory cytokines - implication in modification of radiation damage. *Redox Biol* 2, 832–846.

Bahadorani, S., & Hilliker, A.J., 2008. Cocoa confers life span extension in *Drosophila melanogaster*. *Nutr Res* 28 (6), 377-382.

Blumer, A.C., Ried, K., Blanchfield, J.T., Wegner, K., 2008. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res* 658, 28–41.

Buchovec, V., Lukseviciūtė, R., Kokštaite, D., Labeikyte, L., Kaziukonyte, Z., Luksiene., 2017. Inactivation of Gram (–) bacteria *Salmonella enterica* by chlorophyllin-based photosensitization: mechanism of action and new strategies to enhance the inactivation efficiency. *J Photochem Photobiol B Biol* 172:1-10.

Caires, C.S., Leal, C.R., Ramos, C.A., Bogo, D., Lima, A.R., Arruda, E.J., & Nascimento, V.A., 2017. Photoinactivation effect of eosin methylene blue and chlorophyllin sodium-copper against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Lasers Med Sci* 32 (5), 1081-1088.

Carazo, P., Green, J., Sepil, I., Pizzari, T., & Wigby, S., 2016. Inbreeding removes sex differences in lifespan in a population of *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett* 12 (6), 20160337.

Chandrasekaran, A., Idelchik, M.D.P.S., & Melendez, J.A., 2017. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol* 11, 91-102.

Chang, R., Hsu, C.F., & Tsai, W.B., 2018. Fabrication of chlorophyll-incorporated nanogels for potential applications in photothermal cancer therapy. *ACS omega* 3 (11), 16057-16062.

Citrin, D., Cotrim, A.P., Hyodo, F., Baum, B.J., Krishna, M.C., & Mitchell, J.B., 2010. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *The oncologist* 15 (4), 360.

D' Epiro, G.F.R., Semprebon, S.C., Niwa, A.M., Marcarini, J.C., & Mantovani, M.S., 2016. Roles of chlorophyllin in cell proliferation and the expression of apoptotic and cell cycle genes in HB4a non-tumor breast cells. *Toxicol Mech Methods* 26 (5), 348-354.

Di Meo, S., Venditti, P., Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other oxidants. *Oxid Med Cell Longev* 23, 9829176.

Domijan, A.M., Gajski, G., Jovanović, I.N., Gerić, M., & Garaj-Vrhovac, V., 2015. In vitro genotoxicity of mycotoxins ochratoxin A and fumonisin B1 could be prevented by sodium copper chlorophyllin—Implication to their genotoxic mechanism. *Food Chem* 170, 455-462.

Egner, P.A., Muñoz, A., & Kensler, T.W., 2003. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutat Res* 523, 209-216.

El-Ghor, A., Noshay, M.M., Galal, A., Mohamed, H.R.H., 2014. Normalization of nano-sized TiO₂-induced clastogenicity, genotoxicity and mutagenicity by chlorophyllin administration in mice brain, liver, and bone marrow cells. *Toxicol Sci* 142 (1), 21-32.

Frei, H., & Wurgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutat Res* 203, 297–308.

Fulda, S., & Kroemer, G., 2011. Mitochondria as therapeutic targets for the treatment of malignant disease. *Antioxid Redox Signal* 15, 2937–2949.

Garaschuk, O., Semchyshyn, H.M., & Lushchak, V.I., 2018. Healthy brain aging: Interplay between reactive species, inflammation and energy supply. *Ageing Res Rev* 43, 26-45.

Gerić, M., Gajski, G., Mihaljević, B., Miljanić, S., Domijan, A.M., & Garaj-Vrhovac, V., 2019. Radioprotective properties of food colorant sodium copper chlorophyllin on human peripheral blood cells in vitro. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 845, 403027.

Gomaa, I., Sebak, A., Afifi, N., & Abdel-Kader, M., 2017. Liposomal delivery of ferrous chlorophyllin: A novel third generation photosensitizer for in vitro PDT of melanoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 18, 162-170.

Häder, D.P., Schmidl, J., Hilbig, R., Oberle, M., Wedekind, H., & Richter, P.R., 2016. Treatment of ichthyophthiriasis with photodynamically active chlorophyllin. *Parasitol Res* 115 (4), 1509-1517.

- Harman, D., 1956. Aging: A theory base on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3), 298-300.
- Hayatsu, H., Negishi, T., Arimoto, S., & Hayatsu, T., 1993. Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutat Res* 290 (1), 79-85.
- Hiscock, R.R., 1999. Radiation protection in medical radiography. *Radiol Technol* 70 (6), 592.
- Jang, J.Y., Blum, A., Liu, J., & Finkel, T., 2018. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 128 (9), 3662-3670.
- Jiménez, E., Pimentel, E., Cruces, M.P., & Amaya-Chávez, A., 2020. Radioprotective effect of chlorophyllin, protoporphyrin-IX and bilirubin compared with amifostine® in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Pharmacol* 80, 103464.
- Kamat P., Bolor K.K., Devasagayam TBA., Jayashree B., Kesavan PC., 2000. Differential modification by caffeine of oxygen-dependent and independent effects of γ -irradiation on rat liver mitochondria. *Int J Radiat Biol* 76 (9), 1281-1288.
- Kang, M.S., Kim, J.H., Shin, B.A., Lee, H.C., Kim, Y.S., Lim, H.S., & Oh, J.S., 2013. Inhibitory effect of chlorophyllin on the *Propionibacterium acnes*-induced chemokine expression. *J Microbiol* 51 (6), 844-849.
- Krüger, M., Richter, P., Strauch, S. M., Nasir, A., Burkovski, A., Antunes, C.A., & Lebert, M., 2019. What an *Escherichia coli* Mutant Can Teach Us About the Antibacterial Effect of Chlorophyllin. *Microorganisms* 7(2), 59.
- Kumar, S.S., Devasagayam, T.P.A., Bhushan, B., & Verma, N.C., 2001. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. *Free Radic Res* 35 (5), 563-574.
- Kumar, S.S., Shankar, B., & Sainis, F.B., 2004. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1672, 100–111.

Kuzmic, M., Galas, S., Lecomte-Pradines, C., Dubois, C., Dubourg, N., & Frelon, S., 2019. Interplay between ionizing radiation effects and aging in *C. elegans*. *Free Radic Biol Med* 134, 657-665.

Liang, Y., & Wang, Z., 2018. Which is the most reasonable anti-aging strategy: meta-analysis. *Adv Exp Med Biol* 1086, 267-282.

Lindsley, D., Zimm, G., 1985. *The Genome of Drosophila melanogaster*. University of California, San Diego, La Jolla CA pp. 92093.

Liu, Z., Xia, S., Wang, X., Lan, Q., Li, P., Xu, W., & Jiang, S., 2020. Sodium Copper Chlorophyllin Is Highly Effective against Enterovirus (EV) A71 Infection by Blocking Its Entry into the Host Cell. *ACS Infect Dis* 6 (5), 882-890.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., y Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153 (6), 1194-1217.

Lv H., Lin Y., Liu P., 2019. Protective effects and potential underlying mechanisms of sodium copper chlorophyllin against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 51(9), 925-933.

Morley, A.A., & Trainor, K.J., 2001. Lack of an effect of vitamin E on lifespan of mice. *Biogerontology* 2 (2), 109-112.

Munro, D., Baldy, C., Pamerter, M.E., y Treberg, J.R., 2019. The exceptional longevity of the naked mole-rat may be explained by mitochondrial antioxidant defenses. *Aging Cell* 18 (3), e12916.

Nagini, S., Palitti, F., & Natarajan, A.T., 2015. Chemopreventive potential of chlorophyllin: a review of the mechanisms of action and molecular targets. *Nutr Cancer* 67 (2), 203-211.

Oter, S., Jin, S., Cucullo, L., & Dorman, H.D., 2012. Oxidants and antioxidants: friends or foes?. *Oxid Antioxid Med Sci* 1(1), 1-4

Ozcan, M., Esendagli, G., Musdal, Y., Canpinar, H., Bacanlı, M., Anlar, H.G., Aksoy, Y., 2019. Dual actions of the antioxidant chlorophyllin, a glutathione transferase P1-1 inhibitor, in tumorigenesis and tumor progression. *J Cell Biochem* 120 (5), 7045-7055.

Parkes TL, Elia A.J, Dickinson, D., Hilliker, A.J, Phillips, J.P., Boulianne, G.L., 1998. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nature Genet* 19, 171–174.

Patar, A.K., Sharma, A., Syiem, D., & Bhan, S., 2018. Chlorophyllin supplementation modulates hyperglycemia-induced oxidative stress and apoptosis in liver of streptozotocin-administered mice. *BioFactors* 44 (5), 418-430.

Pimentel, E., Cruces, M.P., & Zimmering, S., 1999. On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat Res* 446 (2), 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 (1-2), 71-74.

Pimentel, E., Cruces, M.P., Zimmering, S., 2013. A Further Study of the Role of Copper in Regard to the Antimutagenic Action of Sodium Copper Chlorophyllin (SCC) in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Biomark Insights* 8, 29-33.

Pimentel, E., Vidal, L.M., Cruces, M.P., y Janczur, M.K., 2013. Action of protoporphyrin-IX (PP-IX) in the lifespan of *Drosophila melanogaster* deficient in endogenous antioxidants, Sod and Cat. *J. Anim. Sci* 3(04), 1.

Piper, M.D., & Partridge, L., 2018. *Drosophila* as a model for ageing. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(9 Pt A), 2707-2717.

Regan, J.C., & Partridge, L., 2013. Gender and longevity: why do men die earlier than women? Comparative and experimental evidence. *Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27 (4), 467-479.

Sadowska-Bartosz, I., y Bartosz, G., 2014. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed Res Int* 2014, 404680.

Sato, M., Imai, K., Kimura, R., & Murata, T., 1984. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 32 (2), 716-22.

- Schapira, A.H.V., 2012. Targeting mitochondria for neuroprotection in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 16 (9), 965-73.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Rabinovitch, P.S., 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308 (5730), 1909-1911.
- Shabalina, I.G., Vyssokikh, M.Y., Gibanova, N., Csikasz, R.I., Edgar, D., Hallden-Waldemarson, A., Nedergaard, J., 2017. Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1. *Aging (Albany NY)* 9 (2), 315.
- Sharma, D., Kumar, S.S., & Sainis, K.B., 2007. Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. *Mol Immunol* 44 (4), 347-59.
- Shen, L.R., Xiao, F., Yuan, P., Chen, Y., Gao, Q.K., Parnell, L.D., Lai, C.Q., 2013. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*. *Age* 35 (4), 1133-1142.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., & Ames, B.N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23), 10771-10778.
- Shlisky, J., Bloom, D., Beaudreault, A., Tucker, K., Keller, H., Freund-Levi, Y., Meydani, S., 2017. Nutritional considerations for healthy aging and reduction in age-related chronic disease. *Adv Nutr* 8(1),17-26.
- Singh, D.J., & Singh, D.K., 2016. Anthelmintic activity of chlorophyllin against different larval stages of *Fasciola gigantica*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 58:39.
- Son, J.M., & Lee, C., 2019. Mitochondria: multifaceted regulators of aging. *BMB reports* 52(1), 13. *BMB Rep* 52(1), 13-23.
- Stvolinsky, S., Antipin, M., Meguro, K., Sato, T., Abe, H., y Boldyrev, A., 2016. Effect of carnosine and its Trolox-modified derivatives on life span of *Drosophila melanogaster*. *Rejuvenation Res* 13(4), 453-457.

- Sun, J., & Tower, J. 1999. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol. Cell Biol.* 19(1), 216-228.
- Thiyagarajan, P., Kavitha, K., Thautam, A., Dixit, M., & Nagini, S., 2014. Dietary chlorophyllin abrogates TGF β signaling to modulate the hallmark capabilities of cancer in an animal model of forestomach carcinogenesis. *Tumour Biol* 35 (7), 6725-37.
- Tsolekile, N., Nelana, S., & Oluwafemi, O.S., 2019. Porphyrin as diagnostic and therapeutic agent. *Molecules* 24(14), 2669.
- Tumolo, T., & Lanfer-Marquez, U.M., 2012. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties. *Food Res Int* 46 (2), 451-459.
- Ugur, B., Chen, K., & Bellen, H.J., 2016. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis Model Mech* (3), 235-244.
- Verdile, G., Keane, K.N., Cruzat, V.F., Medic, S., Sabale, M., Rowles, J., & Newsholme, P., 2015. Inflammation and oxidative stress: the molecular connectivity between insulin resistance, obesity, and Alzheimer's disease. *Mediators Inflamm* 2015, 105828.
- Wang, C., Wheeler, C.T., Alberico, T., Sun, X., Seeberger, J., Laslo, M., & Zou, S., 2013. The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age* 35 (1), 69-81.
- Wang, L., Li, Y.M., Lei, L., Liu, Y., Wang, X., Ma, K.Y., & Chen, Z.Y., 2015. Cranberry anthocyanin extract prolongs lifespan of fruit flies. *Exp Gerontol* 69, 189-95.
- World Health Organization, Public Health Agency of Canada, y Canada. Public Health Agency of Canada. 2005. Preventing chronic diseases: a vital investment.
- Yang, X., Li, Y., Li, Y., Ren, X., Zhang, X., Hu, D., & Shang, H., 2017. Oxidative stress-mediated atherosclerosis: mechanisms and therapies. *Front Physio* 8:600.
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F.R., Butler, A.E., & Sahebkar, A., 2019. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol* 234 (6), 8152-8161.

- Yin, L.M., Jiang, H.F., Wang, X., Gao, R. L., Lin, X.J., Chen, X.H., y & Wang, L.C., 2013. Effects of sodium copper chlorophyllin on mesenchymal stem cell function in aplastic anemia mice. *Chin J Integr Med* 19 (5), 360-6.
- Yu, J.W., Yang, R., & Kim, Y.S., 2010. Differential cytoprotective effect of copper-and iron-containing chlorophyllins against oxidative stress-mediated cell death. *Free Radic Res* 44 (6), 655-67.
- Zhang, Y.L., Guan, L., Zhou, P.H., Mao, L.J., Zhao, Z.M, Li, S.Q., Xu, X.X., Cong, C.C., Zhu, M.X., Zhao, J.Y., The protective effect of chlorophyllin against oxidative damage and its mechanism. *Chin J Int M* 51 (6), 466-70.
- Zhou, Y.Z., Xue, L.Y., Gao, L., Qin, X. M., & Du, G. H., 2018. Ginger extract extends the lifespan of *Drosophila melanogaster* through antioxidation and ameliorating metabolic dysfunction. *J Funct Foods* 49, 295-305.
- Zhuo, Z., Song, Z., Ma, Z., Zhang, Y., Xu, G., & Chen, G., 2019. Chlorophyllin e6-mediated photodynamic therapy inhibits proliferation and induces apoptosis in human bladder cancer cells. *Oncol Rep* 41(4), 2181-2193.
- Ziehm, M. y Thornton J., 2013. Unlocking the potential of survival data for model organisms through a new database and online analysis platform. *Surv Curv Aging Cell*, 12(5), 910-916
- Zimmering, S., Olvera, O., Hernández, M.E., Cruces, M.P., Arceo, C., & Pimentel, E., 1990. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutat Res* 245(1), 47-9.

Tables and figures

Table 1. Larvae-adult viability of *D. melanogaster* (*mwh + / + flr³*) pretreated with 69 mM SCC alone or in combination with 20 Gy of gamma rays.

Treatment	No. of larvae tested	No. of viable adults	% of viability \pm SEM
Control	1500	1350	90.0 \pm 0.36
SCC (69 mM)	1500	1328	88.5 \pm 0.32
20 Gy	1500	1306	87.0 \pm 0.32*
SCC+20 Gy	1500	1282	85.5 \pm 0.35*

Significant at a value of $P \leq 0.05$, with respect to the control.

Table 2. Lifespan of adult *D. melanogaster* (*mwh + / + flr³*) treated with SCC alone or in combination with 20 Gy of gamma rays.

Treatment	No. of adults tested	MST (Days) \pm SDM	Comparisons	<i>P</i> -value ^a
FEMALE				
Control	270	102 \pm 0.22		
SCC	270	103 \pm 0.22	Control vs SCC	<0.001 \uparrow
20Gy	375	80 \pm 0.21	SCC vs 20Gy	<0.0001 \downarrow
SCC+20Gy	375	86 \pm 0.20	20 Gy vs SCC+20 Gy	<0.0001 \uparrow
MALE				
Control	270	104 \pm 0.31		
SCC	270	100 \pm 0.29	Control vs SCC	<0.0001 \downarrow
20Gy	375	78 \pm 0.28	SCC vs 20Gy	<0.0001 \downarrow
SCC+20Gy	375	86 \pm 0.30	20 Gy vs SCC+20 Gy	<0.0001 \uparrow

Curves were statistically compared between the mean lifespan of the experimental and the control variants, using the Tarone-Ware, Wilcoxon and Logrank tests. MST: mean survival time; \downarrow : significant reduction; \uparrow significant increase.

^a Test of equality of the survival distribution functions (DF= 3):

Statistic	Observed value	Critical value	P-value	alpha
Log-rank	10382.668	7.815	<0.0001	0.05
Wilcoxon	6763.653	7.815	<0.0001	0.05
Tarone-Ware	8452.777	7.815	<0.0001	0.05

Table 3. Somatic mutation frequency induced in larvae *mwh +/+ flr³* 72h age of *D. melanogaster* after treated with 69 mM SCC alone or in combination with 20 Gy of gamma rays

Treatment	No. of wings	Spots							
		small		large		twin		Total	
		n	s/w	n	s/w	n	s/w	n	s/w
		(1-2 cells), m=2		(>2 cells), m=5		m=5		m=2	
Control	170	32	0.19	10	0.06	4	0.02	46	0.27
SCC	170	30	0.18	7	0.03	4	0.02	41	0.24
20 Gy	293	145	0.49	903	3.08	90	0.31	1138	3.88
SCC+20Gy	293	97	0.30 +	578	0.10 +	60	0.03 +	735	↓2.51 +

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

Figure 1.



Figure 2.

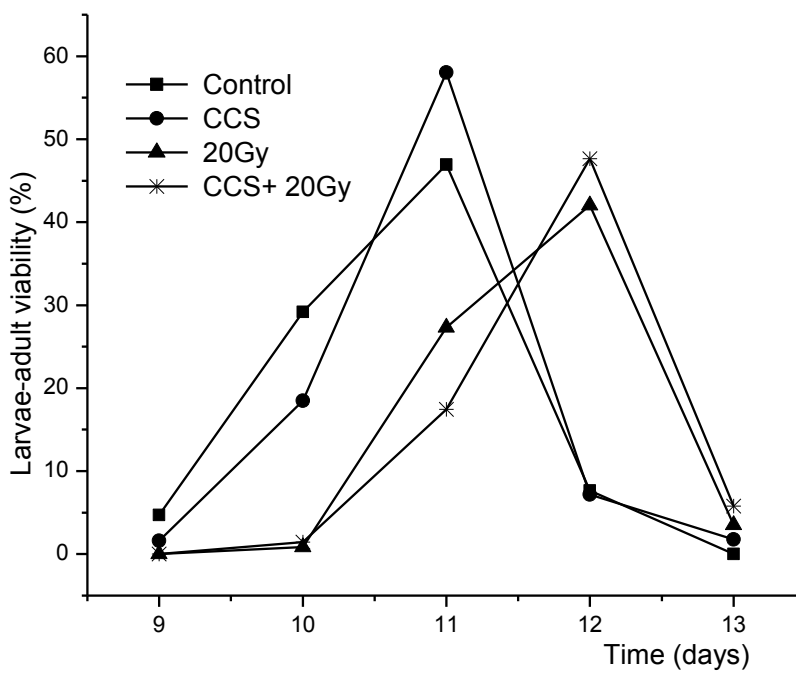


Figure 3. a and b

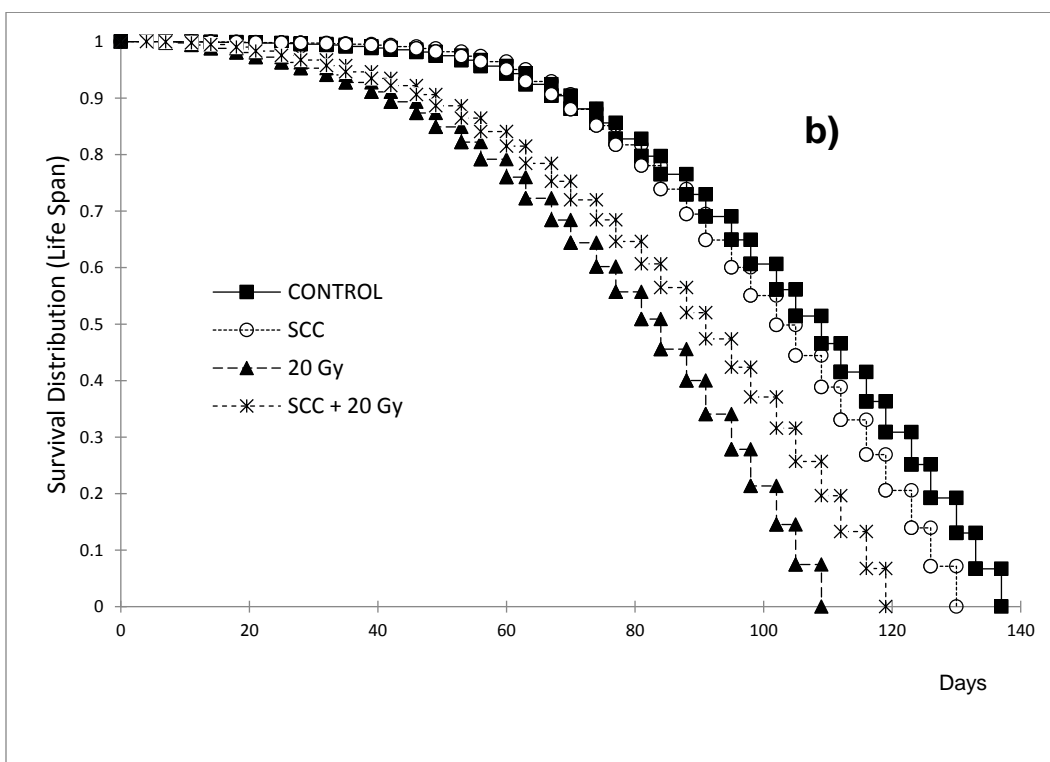
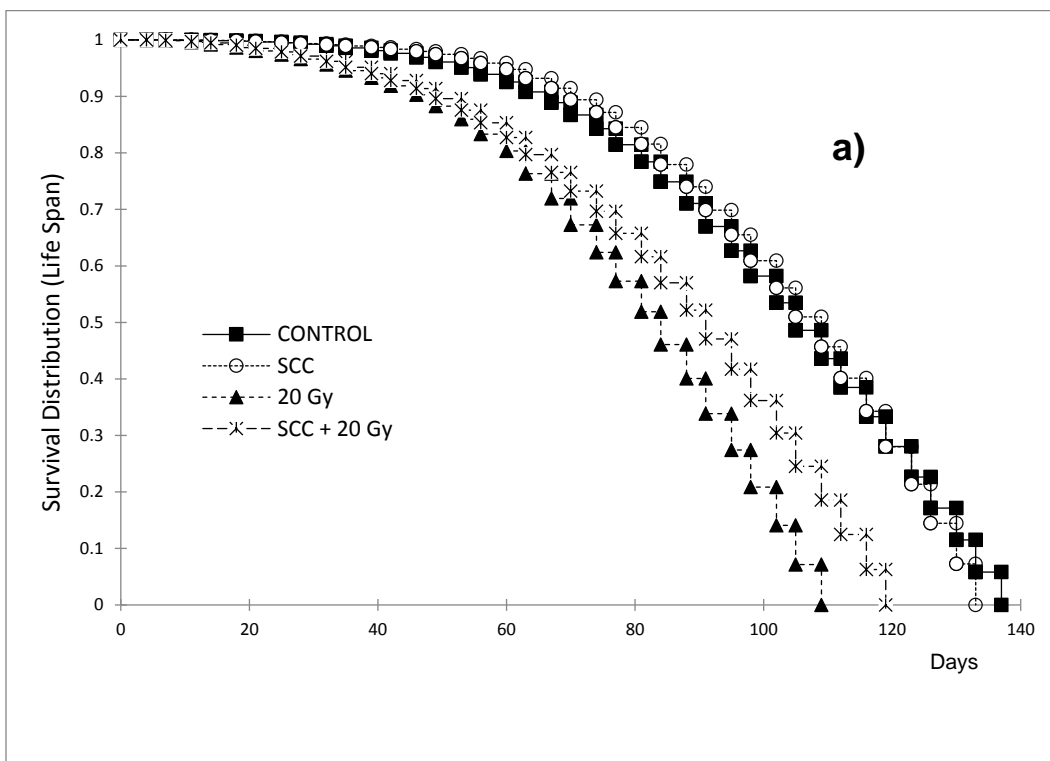


Figure 4.

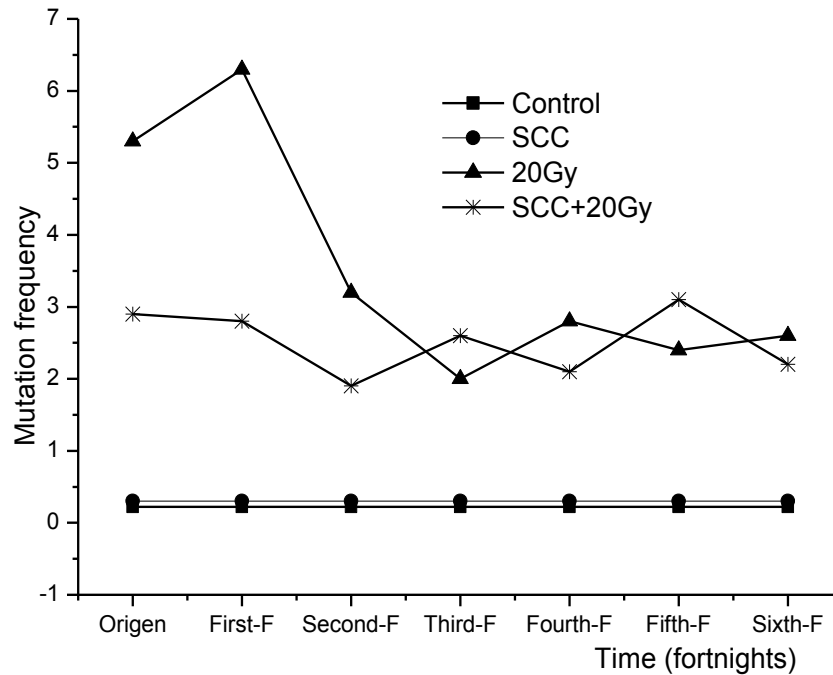


Figure captions:

Figure 1. Population pots used for lifespan tests. The population pots include: 1) a hole covered with gauze for air exchange; 2) a sponge screw cap that holds a 3) Petri dish with regular culture medium placed and removed every other day.

Figure 2. Larva-adult development time of *D. melanogaster* (*mwh + / + flr³*), after being pretreated for 24 h with SCC alone or in combination with 20 Gy of gamma rays

Figure 3. Survival curves (lifespan) of adults of *D. melanogaster* (*mwh + / + flr³*) pretreated 24h with 69 mM SCC and irradiated or not with 20 Gy of gamma rays in the second instar larvae stage. a) Females; b) Males. Survival functions were estimated to obtain the cumulative survival curves for each experimental group and for each sex.

Figure 4. Relationship between lifespan and the frequency of somatic mutation, induced in adults of *D. melanogaster* *mwh + / + flr³* adults that dead every fortnight (-F), after being treated for 24 hours with 69 mM SCC alone and in combination with 20 Gy of gamma rays

9. DISCUSIÓN GENERAL

Los antioxidantes son moléculas que pueden proteger a los organelos celulares del daño provocado por los RL (Warraich *et al.*, 2020) mediante diferentes mecanismos de acción como inactivarlos, disminuir la producción de ERO y proteger la membrana plasmática (Simioni *et al.*, 2018) y como consecuencia, retrasar el proceso de envejecimiento entre otros efectos positivos.

El AA reduce el estrés oxidante y los RL que pueden dañar al ADN y a las membranas de diversos órganos (Halliwell, 2006), también se ha demostrado que reduce significativamente la genotoxicidad de algunos agentes mutagénicos (Odín, 1997).

Por esta razón, en esta investigación se evaluaron varios índices tales como la viabilidad, la tasa de desarrollo y el potencial anti-mutagénico del AA y la CCS. En el caso del AA encontramos que no provocó modificación de ninguno de los índices evaluados, solo o en combinación con 20 Gy de radiación a diferentes RD a ninguna de las concentraciones probadas, solamente disminuyó la viabilidad cuando la radiación se administró a la RD más alta (960 Gy/h). La RD es un factor físico que puede modificar la respuesta biológica de la RI (Brooks *et al.*, 2016), nuestros resultados confirmaron esta teoría, el AA en combinación con 20 Gy a la RD más alta (960 Gy/h), no causó reducción en la frecuencia de daño genético con las concentraciones más altas, posiblemente se debe a que la radiación administrada a una razón de dosis alta, provoca daño severo. Fujii *et al.* (2010) reportó que el tratamiento de AA provocó un incremento del porcentaje de sobrevivencia de fibroblastos humanos irradiados con rayos X, este efecto no se observó cuando las células se irradiaron con iones

pesados, y sugirieron que la RD alta produce en mayor proporción un daño similar al efecto directo de la RI, como rompimientos de doble banda. Los resultados de nuestro estudio aportan evidencia de la capacidad protectora del AA en contra del daño inducido por RI a diferentes RD. El efecto protector observado a una RDA con la concentración más baja de AA pudo deberse a una sinergia con enzimas endógenas. Yang *et al.*, 2017 en *Piccia caribbiga* encontró que la administración de vitamina C incrementó la actividad de SOD y CAT y éstas disminuyeron los niveles de ERO en sus células. En mutantes de DJ-1 β de *Drosophila* tratadas con alfa tocoferol y vitamina C se observó que aumentaron la actividad de catalasa y disminuyeron la cantidad de ERO en comparación de los organismos que no tuvieron el tratamiento de los antioxidantes (Casani *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, la RI induce daño principalmente a través de la generación de los RL (Hiscock, 1999). Los RL pueden dañar a moléculas de importancia biológica y organelos celulares, este daño se considera como el agente etiológico del proceso de envejecimiento y es el principal sustento de la teoría propuesta por Harman (1956).

El envejecimiento es un proceso natural, en el que la integridad estructural de un organismo disminuye a través del tiempo, esto provoca la pérdida de la funcionalidad del organismo, así como el incremento del riesgo de muerte (López-Otín *et al.*, 2013). Aproximadamente el 70% del daño celular provocado por RI ocurre cuando excede los niveles de ERO lo que favorece a un estado constante de estrés oxidante (Anuranjani, 2014).

Se ha demostrado que los tetrapirroles tales como la CCS son muy eficientes disminuyendo el daño genético provocado por el incremento del estrés oxidante debido a la exposición a RI (Zimmering *et al.*, 1990). El efecto radioprotector de la CCS se demostró en células somáticas de *Drosophila melanogaster* (Pimentel *et al.*, 1999 Cruces *et al.*, 2003; 2009; Pimentel *et al.*,

2011) por esta razón en esta investigación se consideró evaluar su acción en el proceso de envejecimiento o periodo de vida.

Los resultados obtenidos revelaron que la CCS pudo haber tenido algunos efectos benéficos en los organismos. Los datos de viabilidad indican que la CCS por si sola, no fue tóxica, probablemente el pigmento provocó algún mecanismo ventajoso para las hembras. No hay evidencia experimental de que esto ocurriera, pero el hecho de que la CCS haya prolongado el PV de las hembras, podría indicar que esto pudo haber ocurrido. En contraste, la CCS por si sola no tuvo efecto en los machos. Prácticamente no se ha explorado. El efecto de la CCS en el periodo de vida, sin embargo, se ha reportado que es antimutagénica (Abdel-Latif *et al.*, 2017); bactericida, (Krüger *et al.*, 2019); antiparasitaria (Häder *et al.*, 2016); anticancerígena (Ozcan *et al.*, 2018) y agente fotosensibilizador (Buchove *et al.*, 2017). En todos estos estudios se ha propuesto que la actividad antioxidante de la CCS es la responsable de los efectos reportados. En el presente estudio, se confirmó que la CCS administrada como pretratamiento provoca la disminución de daño genético inducido por la RI y, por un mecanismo aún desconocido, la CCS *per se* provocó una prolongación del periodo de vida de las hembras pre-tratadas en estado larvario en contraste con la falta de efecto en este índice en los machos.

Otro resultado relevante es que la CCS en combinación con 20 Gy de rayos gamma provocó que el periodo de vida se prolongara significativamente tanto de las hembras como de los machos. Este resultado con la disminución de mutaciones indica que muy probablemente la CCS actúa como un inhibidor de daño genético que además provoca ventajas adaptativas en los organismos tratados. Lo anterior se basa en los resultados obtenidos de la relación de la

frecuencia de mutación con la longevidad. Los resultados evidencian que los organismos con mayor frecuencia de mutación, mueren más rápidamente (Artículo II).

En estudios previos se encontró que la administración de antioxidantes en *D. melanogaster* como la cocoa (Bahadorani y Hilliker, 2008), el resveratrol (Wang *et al.*, 2013), el trolox y la carnitina (Stvolinsky *et al.*, 2016) incrementó su PV. En otro estudio se reveló que los machos tratados con extracto de jengibre (2mg/ml) incrementaron 3 días su PV (Zhou *et al.*, 2018), con antocianinas, aumentaron 5 días (Wang *et al.*, 2015). En las hembras, la adición de resveratrol en el medio de cultivo y una dieta deficiente en azúcares y proteínas incrementó su PV un 15% (Wang *et al.*, 2013). Los autores atribuyeron estos resultados a la capacidad antioxidante de los agentes y las condiciones metabólicas de los organismos.

Por otro lado, se reportó que la protoporfirina (una porfirina sin centro metálico) prolonga el PV de una cepa silvestre de *D. melanogaster* (Canton-S) (Pimentel *et al.*, 2013) debido a que la PP-IX se comportó como una Sod-mimética (Afonso, 1999). La estructura química de la CCS incluye un centro de cobre el cual se ha demostrado que la proporción de cobre influye en la proporción de disminución de daño genético, lo que resalta la importancia del metal (Pimentel *et al.*, 2013). El centro de cobre de la CCS mediante reacciones de óxido reducción, es capaz de donar electrones (Blumer *et al.*, 2008) e inactivar ERO (Tumolo y Lanfer-Marquez, 2012). Una posible explicación del incremento de la longevidad en los adultos de *D. melanogaster* tratados con CCS+20 Gy, fue su capacidad para inactivar al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Zhang *et al.*, 2012), el H₂O₂ es responsable de producir mutaciones puntuales y eventos de recombinación mitótica y en menor proporción deleciones (Morley y Trainor, 2001). También se reportó incremento en la longevidad de *D. melanogaster* tratadas con Curcumina (Shen *et al.*, 2013) un tubérculo con propiedades

antioxidantes. La disminución de la peroxidación lipídica en sistemas de organelos membranosos como la mitocondria podría ser otro mecanismo de la CCS que causa un incremento en la longevidad de *D. melanogaster* tratada con el pigmento (Sato *et al.*, 1984).

El incremento del PV de los organismo tratados con CCS + 20 Gy de rayos gamma, destaca el efecto protector de la CCS hacia la RI u otros inductores de daño oxidante, así como su función protectora de organelos implicados en el proceso de envejecimiento como la mitocondria, posiblemente los mecanismos biológicos que sustentan la MFRTA y la acción biológica de los rayos gamma son mediante procesos similares, debido a que ambos son mediadas por la generación de ERO (Kuzmic *et al.*, 2019).

Se ha demostrado por la resonancia de espín electrónico, que la CCS es capaz de inactivar directamente a los RL (Kamat *et al.*, 2000). La inactivación del radical hidroxilo, mediante la estimulación del sistema inmune a través de la activación de factores de transcripción que sobre expresan proteínas como las ciclinas, y que favorece la apoptosis vía caspasas. (Patar *et al.*, 2018) podría contribuir al incremento del PV del grupo de moscas del tratamiento CCS+20 Gy de rayos gamma.

La mitocondria está fuertemente implicada en el desarrollo del envejecimiento y de enfermedades crónico-degenerativas (Schapira, 2012; Jang *et al.*, 2018), es un blanco importante del efecto biológico de la RI (Kamat *et al.*, 2000), y sus funciones pueden potenciarse con la administración de antioxidantes y prolongar el PV de los organismos (Schriner *et al.*, 2005; Munro *et al.*, 2019; Shabalina *et al.*, 2017).

Se ha documentado que cuando los organismos son expuestos a algún agente mutagénico combinado con CCS, los niveles de enzimas endógenas incrementan sus niveles (Fulda y

Kroemer *et al.*, 2011). Un estudio *in vivo* e *in vitro* demostró que la CCS protege a la membrana de la mitocondria por el daño ocasionado por diferentes dosis de RI (Kamat *et al.*, 2000). Sharma y Kumar, (2007) demostraron que la CCS disminuye la cantidad de ERO intracelular de células de bazo de ratón irradiadas por la inactivación del radical singulete de oxígeno y el hidroxilo. Los estudios de Kumar *et al.*, (2001) propusieron que la CCS inhibe la quelación del Fe(II) responsable de la generación del radical hidroxilo.

10.CONCLUSIONES

El AA provoca una reducción de daño genético que depende de la razón de dosis con la que se administra la radiación gamma. Se confirmó que la CCS reduce la frecuencia de mutación y que prolonga el periodo de vida de las hembras *per se* pero no en los machos y en combinación con 20 Gy lo hace en ambos sexos. Se encontró que los individuos con una frecuencia de mutación alta son los que mueren más rápidamente y que una vez eliminados los individuos con más carga genética, los sobrevivientes mueren a la misma tasa. Los resultados en su conjunto indican que muy probablemente el mecanismo de acción para reducir el daño genético tanto del AA como el de la CCS es a través de una acción antioxidante provocando selección de los individuos más aptos lo que sugiere que pueden ser excelentes radio-protectores.

11. REFERENCIAS

1. Abdel-Latif, M. S., Elmeleigy, K. M., Aly, T. A., Khattab, M. S., y Mohamed, S. M. 2017. Pathological and biochemical evaluation of coumarin and chlorophyllin against aflatoxicosis in rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69(5), 285-291.
2. Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., y George, R. A. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
3. Addinsoft. 2011. XLSTAT. Addinsoft, USA.
4. Afonso, S., Vanore, G., Batlle, A. 1999. Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(3), 161-170.
5. Antunes LG. y Takahashi C. 1998. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicine induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res*. 417: 137-143.
6. Anuranjani, y Bala, M. 2014. Concerted action of Nrf2-ARE pathway, MRN complex, HMGB1 and inflammatory cytokines - implication in modification of radiation damage. *Redox biology*, 2, 832-846.
7. Arrigoni O., De Tullio M.C. 2002. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant *Biochim Biophys Acta*. 1519: 1-9.
8. Artikhov VG. 1992. The spectral and paramagnetic properties of oxyhemoglobinsolution UV- irradiated in the presence of ascorbic acid. *Radiobiological*, 32: 48- 55.
9. Bahadorani S, Hilliker AJ. 2008. Cocoa confers life span extension in *Drosophila melanogaster*. *Nutr Res*. Jun;28(6):377-82. doi: 10.1016/j.nutres.2008.03.018. PMID: 19083435
10. Bahadorani, E., Bahadorani, P., Phillips, J. y Hilliker A. 2007. The Effects of Vitamin Supplementation on *Drosophila* Life Span Under Normoxia and Under Oxidative Stress.

11. Bayne, A.C. y Sohal, R.S. 2002. Effects of superoxide dismutase/catalase mimetics on life span and oxidative stress resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Free Radical Biology and Medicine*. 32:1229-1234.
12. Beck, M. A. 2000. Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease. *Am J Clin Nutr* 71(6 Suppl): 1676S-1681S.
13. Belli M, Tabocchini MA. 2020. Ionizing Radiation-Induced Epigenetic Modifications and Their Relevance to Radiation Protection. *Int J Mol Sci*. Aug 20;21(17):5993. doi: 10.3390/ijms21175993. PMID: 32825382; PMCID: PMC75032
14. Blagosklonny, M. V. 2008. Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle*, 7(21), 3344–3354. doi:10.4161/cc.7.21.6965.
15. Blumer, A.C., Ried, K., Blanchfield, J.T., Wegner, K. 2008. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat. Res.* 658, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.05.001>.
16. Brooks, A.L., Hoel, D.G., Preston, R.J., 2016. The role of dose rate in radiation cancer risk: evaluating the effect of dose rate at the molecular, cellular and tissue levels using key events in critical pathways following exposure to low LET radiation. *Int. J. Rad. Biol.* 92 (8), 405–426.
17. Buchovec, V. Luksevičiūtė, R. Kokštaite, D. Labeikyte, L. Kaziukonyte, Z. Luksiene. 2017. Inactivation of Gram (–) bacteria *Salmonella enterica* by chlorophyllin-based photosensitization: mechanism of action and new strategies to enhance the inactivation efficiency, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 172.
18. Buettner., G. y Jurkiewicz B. 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Radiat Res.* 145: 532-541.
19. Caires, C. S., Leal, C. R., Ramos, C. A., Bogo, D., Lima, A. R., Arruda, E. J., y Nascimento, V. A. 2017. Photoinactivation effect of eosin methylene blue and chlorophyllin sodium-copper against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Lasers in medical science*, 32(5), 1081-1088.

20. Caratero A, Courtade M, Bonnet L, Planel H, Caratero C. 1998. Effect of a continuous gamma irradiation at a very low dose on the life span of mice. *Gerontology*. 44(5):272-6. doi: 10.1159/000022024. PMID: 9693258.
21. Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., Morales, P., Soković, M., 2019. Antioxidants and Prooxidants: Effects on Health and Aging 2018. *Oxid Med Cell Longev*, p. 7971613.
22. Carocho, M., y Ferreira, I. C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*.51: 15-25.
23. Casacuberta E. 2017. *Drosophila*: retrotransposons making up telomeres. *Viruses*: 9(7):e192.
24. Casani, S., Gómez-Pastor, R., Matallana, E., Paricio, N., 2013. Antioxidant compound supplementation prevents oxidative damage in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 61, 151–160.
25. Casas-Vila N, Bluhm A, Sayols S, Dinges N, Dejung M, Altenhein T, Kappei D, Altenhein B, Roignant JY, Butter F. 2017. The developmental proteome of *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* Jul;27(7):1273-1285. doi: 10.1101/gr.213694.116.
26. Citrin, D., Cotrim, A. P., Hyodo, F., Baum, B. J., Krishna, M. C., y Mitchell, J. B. 2010. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *The oncologist*, 15(4), 360.
27. Costa, W. F., y Nepomuceno, J. C. 2006. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and molecular mutagenesis*. 47: 18-24.
28. Cruces, M.P., Pimentel, E., Zimmering, S. 2003. Evidence suggesting that chlorophyllin (CHLN) may act as an inhibitor or a promoter of genetic damage induced by chromium (VI) oxide (CrO₃) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.-Gen. Toxicol. Environ.* 536, 139–144. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00043-3).

29. 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. Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 679 (1-2), 84–86.
30. Cui, H., Kong, Y., y Zhang, H. 2012. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of signal transduction.* 2012.
31. D' Epiro, G. F. R., Semprebón, S. C., Niwa, A. M., Marcarini, J. C., y Mantovani, M. S. 2016. Roles of chlorophyllin in cell proliferation and the expression of apoptotic and cell cycle genes in HB4a non-tumor breast cells. *Toxicology mechanisms and methods*, 26(5), 348-354.
32. Dashwood, R. 1997. Chlorophylls as anticarcinogens. *International journal of oncology*, 10(4), 721-727.
33. Del Cura, J., Pedraza, S., Gayate, A. 2009. *Radiología esencial*. Ed. Médica Panamericana. Madrid.
34. Domijan, A. M., Gajski, G., Jovanović, I. N., Gerić, M., & Garaj-Vrhovac, V. 2015. In vitro genotoxicity of mycotoxins ochratoxin A and fumonisin B1 could be prevented by sodium copper chlorophyllin—Implication to their genotoxic mechanism. *Food chemistry*, 170, 455-462.
35. Esterbauer H., Dieber., RM., Striegel G y Waeg G. 1991. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low density lipoprotein. *Am J. Clin. Nutr.* 53: 314- 321.
36. Fahey, J. W., Stephenson, K. K., Dinkova-Kostova, A. T., Egner, P. A., Kensler, T. W., Talalay, P. 2005. Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. *Carcinogenesis*, 26(7), 1247-1255.
37. Feany MB, Bender WW. 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature.* 2000;404:394-398.

38. Ferrucci, L., Gonzalez-Freire, M., Fabbri, E., Simonsick, E., Tanaka, T., Moore, Z., Salimi, S., Sierra, F., y de Cabo, R. 2020. Measuring biological aging in humans: A quest. *Aging cell*, 19(2), e13080. <https://doi.org/10.1111/ace1.13080>.
39. Frei, B. 1999. On the Role of Vitamin C and Other Antioxidants in Atherogenesis and Vascular Dysfunction (44444). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222(3), 196–204
40. Frei, H., & Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4), 297-308.
41. Frei, H., Wurgler, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutat. Res.* 203, 297–308.
42. Frei, H., y Würgler F. 1995. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203:297-308.
43. Fujii, Y., Kato, T.A., Ueno, A., Kubota, N., Fujimori, A., Okayasu, R., 2010. Ascorbic acid gives different protective effects in human cells exposed to X-rays and heavy ions. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 699 (1), 58–61.
44. Fulda, S., Kroemer, G., 2011. Mitochondria as therapeutic targets for the treatment of malignant disease. *Antioxid. Redox. Signal.* 15, 2937–2949.
45. Furuno-Fukushi, I., Ueno, A. M., y Matsudaira, H. Mutation induction by very low dose rate γ rays in cultured mouse leukemia cells L5178Y. *Radiat. Res.*, 115: 273–280, 1988.
46. Gems D. y De la Guardia Y. 2013. Alternative Perspectives on Aging in *Caenorhabditis elegans*: Reactive Oxygen Species or Hyperfunction? *Antioxid Redox Signal.* 19: 321-
47. Gilbert DL. 2000. Fifty years of radical ideas. *ANN NY Acad. Scie.* 899: (1) 1-14.

48. Graf, U., Würigler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., & Kale, P. G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, 6(2), 153-188.
49. Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 6: 153-188.
50. Häder, D. P., Schmidl, J., Hilbig, R., Oberle, M., Wedekind, H., y Richter, P. R. 2016. Treatment of ichthyophthiriasis with photodynamically active chlorophyllin. *Parasitology research*, 115(4), 1509-1517.
51. Halliwell B. 1995. Antioxidant, characterization and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 49:1341-1348.
52. Halliwell B. 1999. Vitamin C poison, prophylactic or panacea?. *Trends Biochem. Sci.* 24:
53. Halliwell, B. 1996. Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free radical research*, 25(1), 57-74.
54. Halliwell, B. 2001. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res.*475: 29-33
55. Halliwell, B. 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(5), 531-542.
56. Halliwell, B. Gutterindge JM. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford. Oxford University Press.
57. Halliwell. B. 2006. Oxidative stress and neugeneration: Where are we now? *Journal of neurochemistry*. 97: 1634-1658.
58. Harman, D. 1956. Aging: A theory base on free radical and radiation chemistry. *The journal of gerontology*. 11: 298-300.
59. Harman, D. 1981. The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 7124-7128.

60. Hiscock, R.R., 1999. Radiation protection in medical radiography. *Radiol. Technol.* 70 (6), 592.
61. Jackson, G., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P., Zipursky, S. 1998. Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron*, 21(3), 633-642.
62. Jagetia GC, Rajanikant GK, Rao SK. 2002. Evaluation of the effect of ascorbic acid treatment on wound healing in mice exposed to different dose of fractionated gamma radiation. *Radiat Res.* 150: 371-380.
63. Jagetia GC. 2004. Ascorbic acid treatment reduces the radiation induced delay in the skin excision wound of Swiss albino mice. *Indian J Radiat Res.* 1-7.
64. Jang JY, Blum A, Liu J, Finkel T. 2018. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest.* Aug 31;128(9):3662-3670. doi: 10.1172/JCI120842.
65. Jiménez, E., Pimentel, E., Cruces, M. P., & Amaya-Chávez, A. 2020. Radioprotective effect of chlorophyllin, protoporphyrin-IX and bilirubin compared with amifostine® in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103464.
66. Johnson, H. 1964. Age and sensitivity to radiation life shortening. *Radiation research*, 23(1), 19-25.
67. Kamat P., Bolor KK., Devasagayam TBA., Jayashree B., Kesavan PC. 2000. Differential modification by caffeine of oxygen-dependent and independent effects of γ -irradiation on rat liver mitochondria. *International Journal of Radiation Biology*, 76(9), 1281-1288.
68. Kamran, MZ., Ranjan, A., Kaur, N., Sur, S., Tandon, V. 2016. Radioprotective agents: Strategies and translational advances. *Medicinal research reviews.* 36:461-493.
69. Kaya, B., Creus, A., Velázquez, A., Yanikoğlu, A., Marcos, R. 2002. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid: studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 520: 93-101.

70. Keaney, M., y Gems, D. 2003. No increase in lifespan in *Caenorhabditis elegans* upon treatment with the superoxide dismutase mimetic EUK-8. *Free Radical Biology and Medicine*. 34:277-282
71. Kenyon CJ. 2010. The genetics of ageing. *Nature*. 464: 504-512
72. Kharade SV, Mittal N, Das SP, Sinha P, Roy N. 2005. Mrg19 depletion increases *S. cerevisiae* lifespan by augmenting ROS defence. *FEBS Lett*; 579:6809-13.
73. Kirkwood TB. 1977. Evolution of ageing. *Nature* 170: 201-204
74. Konopacka, M., Widel, M., Rzeszowska-Wolny, J. 1998. Modifying effect of vitamin C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutat. Res*. 417: 85-94.
75. Krüger, M., Richter, P., Strauch, S. M., Nasir, A., Burkovski, A., Antunes, C. A., y Lebert, M. 2019. What an *Escherichia coli* Mutant Can Teach Us About the Antibacterial Effect of Chlorophyllin. *Microorganisms*, 7(2), 59.
76. Kumar SS, Devasagayam TP, Bhushan B, Verma NC. 2001. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. *Free Radic Res*. Nov;35(5):563-74. doi: 10.1080/10715760100301571. PMID: 11767414.
77. Kuzmic, M., Galas, S., Lecomte-Pradines, C., Dubois, C., Dubourg, N., & Frelon, S. 2019. Interplay between ionizing radiation effects and aging in *C. elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.
78. Lander, HM. 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *The FASEB journal*. 11: 118-124.
79. Leroi, N., Lallemand, F., Coucke, P., Noel, A., Martinive, P. 2016. Impacts of Ionizing Radiation on the Different Compartments of the Tumor Microenvironment. *Frontiers in pharmacology*, 7:78.
80. Lindsley, D.L. y Zimm, G.G. 1992. *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press. 133pp.

81. Lobo, V., Phatak, A., Chandra, N. 2010. Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4:118–126.
82. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., y Kroemer, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.
83. Lü, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell Mod. Med.*14, 840– 860.
84. Mahdavi. M. y Mozdarani H. 2011. Protective effects of famotidine and vitamin C against radiation induced cellular damage in mouse spermatogenesis process. *Iran. J. Radiat. Res.*8: 223-230.
85. Matsuya, Y., Tsutsumi, K., Sasaki, K., y Date, H. 2015. Evaluation of the cell survival curve under radiation exposure based on the kinetics of lesions in relation to dose-delivery time. *Journal of radiation research*, 56(1), 90-99.
86. May, J. 1999. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB J.* 13: 995-1006.
87. McCord, JM. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 108: 652-659.
88. McGurk L, Berson A, Bonini N. 2015. Drosophila as an in vivo model for human neurodegenerative disease. *Genetics.* 2015;201(2):377-402.
89. McMahon SJ, Butterworth KT, Trainor C, McGarry CK, O'Sullivan JM, Schettino G, Hounsell AR, Prise KM. 2013. A kinetic-based model of radiation-induced intercellular signalling. *PLoS One.*8(1):e54526. 10.1177/0146645316629336.
90. Meydani D. 1999. Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mech Ageing Dev.* 11: 123-132.
91. Morley, A. A., & Trainor, K. J. (2001). Lack of an effect of vitamin E on lifespan of mice. *Biogerontology*, 2(2), 109-112.

92. Moskalev A, Shaposhnikov M, Turysheva E. 2009. Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutation of Hsf and Hsps. *Biogerontology* 10:3–11.
93. Munro, D., Baldy, C., Pamerter, M. E., y Treberg, J. R. 2019. The exceptional longevity of the naked mole-rat may be explained by mitochondrial antioxidant defenses. *Aging Cell*, 18(3), e12916.
94. Nacmias, B., Bagnoli, S., Piaceri, I., y Sorbi, S. 2018. Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: Embracing research partnerships. *Journal of Alzheimer's Disease*.62 (3), 903-911.
95. Narra, V.R., Howell, R.W., Sastry, K.S., Rao, D.V., 1993. Vitamin C as a radioprotector against iodine-131 in vivo. *J. Nucl. Med.* 34, 637–640.
96. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. 2019. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem*. Sep 15;178:687-704. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.010.
97. Nishimura M, Ocorr K, Bodmer R, Cartry J. 2011. *Drosophila* as a model to study cardiac aging. *Exp Gerontol*. 2011;46(5):326-330.
98. Odin, P., 1997. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat. Res.* 386, 39–67.
99. Olvera, O., Zimmering, S., Arceo, C., Guzman, J., De la Rosa M.E. 1995 Evidence for the protective effect of ascorbic acid (Vitamin C) in treatment with γ -rays and chromium (VI) oxide (CrO₃) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 346: 19–21.
100. Osowski, A., Pietrzak, M., Wieczorek, Z., y Wieczorek, J. 2010. Natural compounds in the human diet and their ability to bind mutagens prevents DNA–mutagen intercalation. *Journal of Toxicology and environmental health, Part a*, 73(17-18), 1141-1149.
101. Ozcan, M., Esendagli, G., Musdal, Y., Canpinar, H., Bacanlı, M., Anlar, H. G., Aksoy, Y. 2019. Dual actions of the antioxidant chlorophyllin, a glutathione transferase P1-1 inhibitor, in tumorigenesis and tumor progression. *Journal of cellular biochemistry*, 120(5), 7045-7055.

102. Packer L. 1994. Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci. Am. Med.* 1: 54-63.
103. Panagopoulos DJ. 2012. Gametogenesis, embryonic and post-embryonic development of *Drosophila melanogaster*, as a model system for the assessment of radiation and environmental genotoxicity. In: Spindler-Barth M, ed. *Drosophila melanogaster: Life Cycle, Genetics and Development*. New York, NY: Nova Science Publishers:1-38.
104. Patar, A. K., Sharma, A., Syiem, D., y Bhan, S. 2018. Chlorophyllin supplementation modulates hyperglycemia-induced oxidative stress and apoptosis in liver of streptozotocin-administered mice. *BioFactors*, 44(5), 418-430.
105. Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Chen, Z. Y. 2014. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed Research International*.
106. Pereira A., Freitas C., Mendonça C., Marçal F., Souza J., Noronha J. P. 2004. Envelhecimento, estresse e sociedade: uma visão psiconeuroendocrinológica. *Ciências y Cognição*. 01:34-53.
107. Phillips, J.P., Parkes, T.L., y Hilliker, A. J. 2000. Targeted neuronal gene expression and longevity in *Drosophila*. *Experimental gerontology*. 35:1157-1164.
108. 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.-Gen. Tox.* 722, 52-55. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.03.001>.
109. 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(04), 1.
110. Pinelli, A., Ferrario, P., y Trivulzio, S. 2019. Preliminary Observation on the Cytotoxic Activity of New Chlorophyllin Derivative RCD on Human Tumour Cell Lines In Vitro. *Anticancer Research*, 39(4), 1807-1812.

111. Piper, M. D., y Partridge, L. 2018. *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864(9), 2707-2717.
112. Pomatto, L.C., Davies, K.J., 2018. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic. Biol. Med.* 124, 420–430.
113. Przybyszewski, WM, Wideł, M, Szurko, A, Maniakowski Z. Dose rate-dependent cellular and molecular effects of ionizing radiation. 2008. *Postepy Hig Med Dosw.*
114. Puerta-Ortiz, J. A., y Morales-Aramburo, J. 2020. Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes. *Revista Colombiana de Cardiología*, 27, 61-71.
115. Radak Z, Chung HY, Goto S. 2005. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*; 6:71-5.
116. Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv. Aging.* 2: 219–236.
117. Rhodenizer D, Martin I, Bhandari P, Pletcher SD, Grotewiel M. 2008. Genetic and environmental factors impact age-related impairment of negative geotaxis in *Drosophila* by altering age-dependent climbing speed. *Exp Gerontol.*43(8):739-748.
118. Riley, P. 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 27-33.
119. Rose, R. y Bode, A. 1993. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* 7:1135-1142.
120. Rosewell J, Shorrocks B. 1987. The implication of survival rates in natural populations of *Drosophila*: capture-recapture experiments on domestic species. *Biol J Linn Soc.*32:373-384. 42.
121. Rossi, H. H. y Kellerer, A. M. 1986. The dose rate dependence of oncogenic transformation by neutrons may be due to variation of response during the cell cycle. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 50: 353–361.

122. Rugh, R., & Wolff, J. 1956. X-irradiation sterilization of the female mouse. *Fertility and sterility*.7(6), 546-560.
123. Sato, M., Imai, K., Kimura, R., y Murata, T. 1984. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 32(2), 716-722.
124. Schapira, A. H. V. (2012). Targeting mitochondria for neuroprotection in Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling*, 16(9), 965-973.
125. Schmidt PS, Paaby AB, Heschel MS. 2005. Genetic variance for diapause expression and associated life histories in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*.59(12):2616-2625.
126. Schriener, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., Rabinovitch, P. S. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *science*, 308(5730), 1909-1911.
127. Senturk M, Bellen HJ. 2018. Genetic strategies to tackle neurological diseases in fruit flies. *Curr Opin Neurobiol*. 2018;50:24-32.
128. Shabalina, I. G., Vyssokikh, M. Y., Gibanova, N., Csikasz, R. I., Edgar, D., Hallden-Waldemarson, A., Nedergaard, J. 2017. Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1. *Aging (Albany NY)*, 9(2), 315.
129. Sharma, D., Kumar, S. S., & Sainis, K. B. 2007. Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. *Molecular Immunology*, 44(4), 347–359. doi:10.1016/j.molimm.2006.02.031
130. Shen, L. R., Xiao, F., Yuan, P., Chen, Y., Gao, Q. K., Parnell, L. D., Lai, C. Q. 2013. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*. *Age*, 35(4), 1133-1142.

131. Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., y Ames, B. N. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 10771-10778.
132. Shlisky, J., Bloom, D., Beaudreault, A., Tucker, K., Keller, H., Freund-Levi, Y., Meydani, S. 2017. Nutritional considerations for healthy aging and reduction in age-related chronic disease. *Advances in nutrition*, 8(1), 17.
133. Simic, M. G. y Jovanovic, S. V.. 1988. Redox properties of oxy and antioxidant radicals. In *Oxygen Radicals in Biology and medicine* (pp. 115-122). Springer, Boston, MA.
134. Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A. M., Vitale, M., Sacchetti, G., Gonelli, A., y Neri, L. M. 2018. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, 9(24), 17181.
135. Singh, D. J., y Singh, D. K. 2016. Anthelmintic activity of chlorophyllin against different larval stages of *Fasciola gigantica*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58.
136. Singh, S., Vrishni, S., Singh, B. K., Rahman, I., y Kakkar, P. 2010. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free radical research*, 44(11), 1267-1288.
137. Stevens DL, Bradley S, Goodhead DT, Hill MA. 2014. The influence of dose rate on the induction of chromosome aberrations and gene mutation after exposure of plateau phase V79-4 cells with high-LET alpha particles. *Radiat Res.Sep*; 182(3):331-7.
138. Stvolinsky S, Antipin M, Meguro K, Sato T, Abe H, Boldyrev A. 2010. Effect of carnosine and its Trolox-modified derivatives on life span of *Drosophila melanogaster*. *Rejuvenation Res.* Aug;13(4):453-7. doi: 10.1089/rej.2009.1010. PMID: 20681748.

139. Suh J., Zhu Bb. y Frei B. 2003. Ascorbate does not act as a prooxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free. Radic. Biol. Med.* 34: 1306-1314.
140. Tanarro., Tanarro A. 2008. Diccionario Inglés-español sobre tecnología nuclear. 2ed. Madrid Foro Nuclear
141. Tatar M, Yin CM. 2001. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp Gerontol.*36(4–6):723-738.
142. Theurey, P., Pizzo, P. 2018. The aging mitochondria. *Genes* 9 (1), 22.
143. Tumolo, T., y Lanfer-Marquez, U. M. 2012. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties?. *Food Research International*, 46(2), 451-459.
144. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. 2006. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266: 37–56.
145. Vaupel, J.W y Oeppen, J. 2002. Demography. Broken limits to life expectancy. *Science.* 296:1029–1031.
146. Vesenick DC, De Paula NA, Niwa AM, Mantovani MS. 2012. Evaluation of the effects of chlorophyllin on apoptosis induction, inhibition of cellular proliferation and mRNA expression of CASP8, CASP9, APC and bcatenin. *Curr Res J Biologic Sci* 4:315–22.
147. Viña, J., 2019. The free radical theory of frailty: mechanisms and opportunities for interventions to promote successful aging. *Free Radic. Biol. Med.* 134, 690–694.
148. Walter MF, Biessmann MR, Benitez C, Torok T, Mason JM, Biessmann H. Effects of telomere length in *Drosophila melanogaster* on life span, fecundity, and fertility. *Chromosoma.* 2007;116(1):41-51.
149. Wang C, Wheeler CT, Alberico T, Sun X, Seeberger J, Laslo M, Spangler E, Kern B, de Cabo R, Zou S. 2013. The effect of resveratrol on lifespan depends on both

- gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordr)*. Feb;35(1):69-81. doi: 10.1007/s11357-011-9332-3.
150. Wang, J., Guo, Y., Gao, J., Jin, X., Wang, Z., Wang, B., y Li, Y. 2011. Detection and comparison of reactive oxygen species (ROS) generated by chlorophyllin metal (Fe, Mg and Cu) complexes under ultrasonic and visible-light irradiation. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(5), 1028-1034.
151. Warraich, U. E., Hussain, F., y Kayani, H. 2020. Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon*, 6(5), e04107.
152. Williams, G.C. 1957. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution on Senescence. *Evolution*. 11, 398–411.
153. World Health Organization, Public Health Agency of Canada, y Canada. Public Health Agency of Canada. 2005. *Preventing chronic diseases: a vital investment*. World Health Organization.
154. Xu, J. Q., Murphy, S. L., Kochanek, K. D., y Arias, E. 2020. Mortality in the United States. 2018. NCHS data brief, no 355. National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD.
155. Yang, Q., Li, Y., Li, C., Zhang, H., Jiang, Z., Zhang, X., Zhu, S., 2017. Antioxidative enzymes and substances involve in the activity of improving the oxidative tolerance of *Pichia caribbica* by ascorbic acid. *Biol. Control* 108, 83–88.
156. Yang, U. J., Park, T. S., y Shim, S. M. 2013. Protective effect of chlorophyllin and lycopene from water spinach extract on cytotoxicity and oxidative stress induced by heavy metals in human hepatoma cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76(23), 1307-1315.
157. Yin, L. M., Jiang, H. F., Wang, X., Gao, R. L., Lin, X. J., Chen, X. H., y Wang, L. C. 2013. Effects of sodium copper chlorophyllin on mesenchymal stem cell function in aplastic anemia mice. *Chinese journal of integrative medicine*, 19(5), 360-366.

158. Yu, J. W., Yang, R., y Kim, Y. S. 2010. Differential cytoprotective effect of copper-and iron-containing chlorophyllins against oxidative stress-mediated cell death. *Free radical research*, 44(6), 655-667.
159. Zhang, J., Wang, W., Yang, F., Zhou, X., Jin, H., y Yang, P. Y. 2012. Comparative proteomic analysis of drug sodium iron chlorophyllin addition to Hep 3B cell line. *Analyst*, 137(18), 4287-4294.
160. Zhang, Y. L., Guan, L., Zhou, P. H., Mao, L. J., Zhao, Z. M., Li, S. Q., y Zhao, J. Y. 2012. The protective effect of chlorophyllin against oxidative damage and its mechanism. *Zhonghua nei ke za zhi*, 51(6), 466-470.
161. Zheng, M. y Sotorz G. 2000. Redox sensing by prokariotic transcription factors. *Biochem plarmacol.* 59:1.
162. Zhou, Y. Z., Xue, L. Y., Gao, L., Qin, X. M., & Du, G. H. 2018. Ginger extract extends the lifespan of *Drosophila melanogaster* through antioxidation and ameliorating metabolic dysfunction. *Journal of Functional Foods*, 49, 295-305.
163. Zimmering, S., Olvera, O., Hernandez, M. E., Cruces, M. P., Arceo, C., y Pimental, E. 1990. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Research Letters*, 245(1), 47-49.