

51262

2
Zy



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

**"ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA
CLOROFILINA SOBRE EL DESARROLLO
EMBRIONARIO Y FETAL DEL RATON in vivo"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
(SISTEMAS HUMANOS)**
P R E S E N T A ;
BIOLOGA MARIA DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE INQUISTA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

MEXICO, D. F.

ABRIL 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (UIBR), de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, encabezado por el Dr. Mario A. Altamirano Lozano.

Durante el desarrollo de los estudios de la Maestría y la realización de la tesis se contó con el apoyo de DGAPA, proyecto 500002 y beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de registro 84079.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (UIBR), de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, encabezado por el Dr. Mario A. Altamirano Lozano.

Durante el desarrollo de los estudios de la Maestría y la realización de la tesis se contó con el apoyo de DGAPA, proyecto 500002 y beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de registro 84079.

Expreso mi agradecimiento con especial admiración al Dr. Mario A. Altamirano Lozano, por su excelente asesoría, enseñanza, apoyo y paciencia en la realización de este trabajo.

Agradezco a los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y sugerencias:

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Dr. Pedro R. Morales Ramírez

Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Agradezco la colaboración del P. de Biol. Francisco Chavez Gallegos, por su gran apoyo y ayuda en la realización del trabajo experimental.

Agradezco al Dr. Pedro R. Morales Ramírez por todos sus consejos, enseñanzas y amistad que siempre me ha brindado.

Y a mis profesores, compañeros y amigos que de una manera u otra me ayudaron e impulsaron a lograr este trabajo.

Dedico este trabajo a:

Alejandro

**Por tu amor, apoyo, ayuda, comprensión.....
y por compartir tu vida conmigo.....**

Alex y Deira del Carmen

**Por darle a mi vida todos esos momentos de felicidad.....
Por significar un estímulo constante para mí.....
y por que los amo tanto.....**

A la memoria de mi padre Clemente

**Porque aunque ya no estas a mi lado sigues
siendo una inspiración para mi.....**

A mi madre Concepción

**Por darme la vida, formar mi educación y
enseñarme siempre el mejor camino....**

A mis hermanos: Clemente, Beatriz, Gerardo y J. Luis

**Por su solidaridad y cariño que siempre
me han hecho patente.....**

A Manuel Y Aitagracia

**Por estar a mi lado en los momentos
dificiles.....**

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	
II. INTRODUCCIÓN	1
1. TOXICIDAD	2
1.1 Toxicidad materna, embrionaria y fetal	5
2. EMBRIOLOGÍA Y PRINCIPIOS DE TERATOLOGÍA	6
2.1 Estados del desarrollo embrionario	6
2.2 Principios de teratogénesis	8
2.3 Agentes y factores inductores de teratogénesis	10
3. ESTRATEGIAS Y MÉTODOS PARA EVALUAR DAÑO DURANTE EL PROCESO REPRODUCTIVO	11
3.1 Evaluación de las alteraciones inducidas durante el desarrollo embrionario y fetal <i>in vivo</i>	12
3.2 Evaluación de embriotoxicidad y fetotoxicidad <i>in vivo</i>	14
4. DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS MALFORMACIONES	14
4.1 Malformaciones externas (macroscópicas)	14
4.2 Malformaciones internas (esqueléticas)	17
5. CLOROFILINA	18
5.1 Propiedades físico-químicas	19
5.2 Usos	20
5.3 Antecedentes	20
5.4 Toxicidad	21
5.5 La clorofila y sus sales como agentes antimutágenos, anticancerígenos y radioprotectores	22
5.6 Mecanismos de protección de la clorofila y sus sales	24
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	28
1. OBJETIVO GENERAL	28
2. OBJETIVOS PARTICULARES	28
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	30

1. ANIMALES	30
2. ESTUDIOS PRELIMINARES	30
3. ESTUDIOS DE TERATOGENICIDAD EN EL RATÓN	31
4. ADMINISTRACIÓN DE LA DOSIS	31
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
6. DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE IMPLANTE	33
7. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES ESQUELÉTICAS	33
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
VII. RESULTADOS	40
1. ESTUDIOS PRELIMINARES	40
2. TRATAMIENTOS CON CLOROFILINA	40
3. ESTUDIOS DE EMBRIOTOXICIDAD	45
4. ALTERACIONES EXTERNAS (Macroscópicas)	50
5. ALTERACIONES INTERNAS (Esqueléticas)	53
5.1. Puntos de osificación	53
5.2. Grado de osificación	54
5.3. Malformaciones esqueléticas	55
VIII. DISCUSIÓN	57
IX. CONCLUSIONES	66
X. COMENTARIOS FINALES	68
XI. REFERENCIAS	70

I. RESUMEN

Diversos estudios realizados en diferentes sistemas de prueba con la clorofilina (CLF), sal de sodio y cobre de la clorofila, la han descrito como un potente antimutágeno, anticancerígeno y radioprotector, además de que la administración de ésta por sí sola no ha mostrado efectos genotóxicos, ni se han observado signos de toxicidad aparentes en los organismos. Sin embargo, no existen evidencias sobre su efecto en el desarrollo embrionario y fetal al ser administrada durante la gestación. Por lo anterior en este trabajo se estudió el efecto de la CLF sobre el desarrollo embrionario y fetal de ratones de la cepa CD-1.

Hembras preñadas fueron tratadas con una sola dosis de CLF (100, 50, 40, ó 20 mg/kg de peso corporal), por vía intraperitoneal (i.p.), el día 8 de gestación. Las hembras fueron sacrificadas el día 18 de gestación por dislocación cervical para cuantificar el número de implantes, reabsorciones, fetos vivos y muertos. Los fetos vivos fueron pesados y sexados.

Todas las crías fueron revisadas externamente para determinar las posibles malformaciones macroscópicas, posteriormente se separaron al azar dos terceras partes de los fetos los cuales fueron transparentados y teñidos para analizar morfología esquelética y grado de osificación.

Los resultados obtenidos muestran que la CLF tiene un efecto embriotóxico, ya que indujo el 100% de muerte embrionaria para la dosis de 100 mg/kg, del 76.2% para la dosis de 50 mg/kg, del 35% para la de 40 mg/kg y del 15% para la de 20 mg/kg. La inducción de muerte embrionaria resultó estadísticamente significativo para las dosis de 100, 50 y 40 mg/kg. Por otra parte la CLF mostró cierta asociación hacia los sitios en los cuales existió muerte embrionaria y reabsorción (implantes), ya que los marcó en forma de anillos verdes a lo largo del útero.

Al analizar las anomalías externas en los fetos tratados con CLF (50 y 40 mg/kg), se encontró la presencia de tres casos de dolicocefalea, uno de hipoplásia de una extremidad posterior asociado a uno de los casos de dolicocefalea, uno de exencefalea con párpados abiertos y uno de labio leporino asociado a paladar hendido, las cuales resultaron estadísticamente significativas. En cuanto a las malformaciones internas (esqueléticas), en todas las dosis de CLF administradas se observó algún tipo de alteración ya sea en costillas como fusionadas, bífidas y curvas, en esternones como

asimétricas y fusionadas, en algunas vértebras como fusionadas ó en columna la cual mostraba una desviación, éstas alteraciones únicamente fueron significativas para las dosis de 50 y 40 mg/kg. Todas las alteraciones tanto externas como internas no mostraron una clara relación dosis-dependiente, ni una alta frecuencia y para el caso de las alteraciones esqueléticas la intensidad de daño esquelético variaba intra e inter fetos analizados, por lo que se subdividieron en daño bajo, mediano y alto.

Los resultados obtenidos muestran que la CLF es embriotóxica en forma dosis-dependiente y que presenta afinidad hacia los sitios en los cuales existió la muerte embrionaria y reabsorción, marcándolos en forma de anillos verdes a lo largo del útero. Por otra parte la administración de la CLF a hembras preñadas indujo algunas malformaciones tanto externas como internas, las cuales podrían estar asociadas a ésta misma embriotoxicidad y dado que la frecuencia y tipo de malformaciones en las crías de las hembras tratadas fue muy bajo, podemos decir que para estas dosis la CLF muestra un efecto teratogénico débil.

II. INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico e industrial, el crecimiento demográfico y el uso de nuevos métodos de agricultura tecnificada, son factores que contribuyen a la entrada en el ambiente de cantidades crecientes de sustancias químicas, sintéticas y naturales, cuyas interacciones y efectos adversos sobre el hombre no se conocen o se conocen insuficientemente.

Para dar una idea de la magnitud de los problemas ambientales, conforme a los datos aceptados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1980 la cantidad de sustancias químicas de uso cotidiano en el mundo era de aproximadamente 63,000 (Tabla 1), con un incremento anual de entre 1000 y 2000 agentes nuevos (Houge, 1984; Albert, 1988). Si tomamos en cuenta las consideraciones realizadas por estas organizaciones, esta cantidad de agentes químicos se incrementó entre 78 000 y 93 000 para 1995.

Tabla 1.- Estimaciones de la EPA y OMS de las sustancias de uso común en 1980 (Albert, 1988).

ARTÍCULOS DE HIGIENE	
ADITIVOS DE COSMÉTICOS	10,000
PRODUCTOS DE USO DOMÉSTICO	
TEXTILES	5,000
PLAGUICIDAS	1,000
FÁRMACOS	4,000
OTROS	1,000
TOTAL	63,000

Si además de estos químicos consideramos que en el ambiente hay presentes agentes físicos (calor, ruido, radiaciones X, Gamma, Beta, etc.) y biológicos (virus, bacterias, hongos, etc.), estamos hablando de una exposición compleja y constante que diariamente enfrentamos. Desafortunadamente y en contraste a estos datos, se calcula que las sustancias bien estudiadas en cuanto a sus interacciones y efectos no exceden a

las 2000 y este número aumenta con lentitud (Casarett, 1968; Graedel *et al.*, 1986; Houge, 1984; Albert, 1988).

Las sustancias químicas a las que estamos expuestos se pueden asimilar, transformar y eliminar en el organismo o en el ambiente de manera continua en una situación estable sin causar daños considerables, sin embargo debido al incremento constante de dichas sustancias, en muchos casos se rebasa esta capacidad y por lo tanto se rompe el equilibrio y se incrementa el riesgo de las alteraciones en la salud (Albert, 1988).

Debido al constante aumento de diversas enfermedades en las poblaciones humanas, como son el cáncer, las hereditarias y las reproductivas, dentro de las cuales se encuentran las malformaciones en el recién nacido, organizaciones internacionales como la OMS, la EPA, la Dirección General del Medio Ambiente (MOPU) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), entre otras, han tratado de controlar la entrada de nuevas sustancias al ambiente, por medio de la solicitud de diversas pruebas (toxicidad, citotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad), que deben de realizarse a las sustancias antes de aprobar su uso comercial (Graedel *et al.*, 1986; Houge, 1984; Albert, 1988).

1. TOXICIDAD

De los agentes físicos, químicos y biológicos a los cuales estamos expuestos, los químicos son el grupo que más se ha estudiado, debido a que son con los que tenemos un mayor contacto.

Los efectos causados a los organismos por un agente químico dependen de varios factores, dentro de los cuales se encuentran la dosis, la vía de administración y el tiempo de exposición. Al estudio de la interacción entre los agentes químicos y los procesos biológicos se le llama farmacodinámica (Scialli, 1992).

Diferentes estudios han permitido encontrar los mecanismos generales por los cuales interactúan los agentes químicos dentro del organismo como:

- a) Modificación de las propiedades físicas o químicas de algunos fluidos o sus constituyentes.
- b) Reemplazo de sustancias fisiológicas.
- c) Ocupación de receptores.

- d) Modificación de las funciones de la membrana celular.
- e) Alteración de los productos celulares.
- f) Interferencia con la síntesis de proteínas, con lo cual afectan la replicación y sobrevivencia celular.

Además se ha observado que los agentes químicos presentan cierta asociación con determinados sitios en diferentes organismos, a los cuales se les llama órganos blanco. Las interacciones, las modificaciones y las alteraciones fisiológicas que se llevan a cabo en estos órganos, pueden provocar toxicidad, la cual en poco tiempo se puede generalizar a todo el organismo (Scialli, 1992; Wilson y Clarke, 1977).

Desde el punto de vista toxicológico es importante conocer la naturaleza y cinética de la sustancias en el organismo para entender los diferentes tipos de daño (Figura 1).

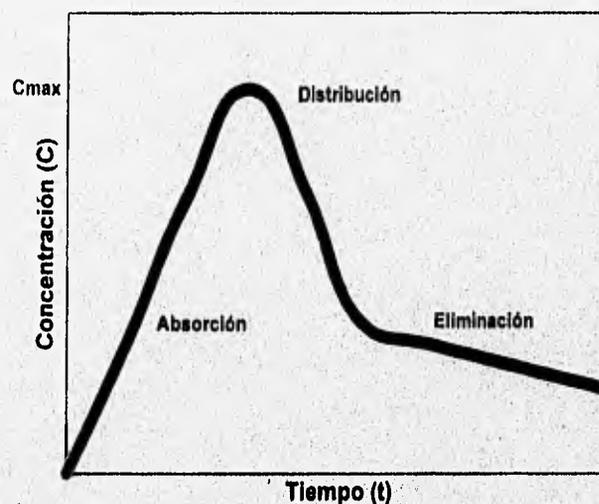


Figura 1.- Cinética del comportamiento de los agentes químicos en el organismo (Scialli, 1992).

Dentro de los factores que se consideran más importantes en los estudios de farmacodinámica se encuentran:

a) La dosis: involucra tanto la concentración de la sustancia química que entra al organismo como el tiempo de tratamiento. La dosis está en función de variables como el peso corporal, la superficie del cuerpo, la edad del individuo, la vía de administración, etc., ya que la dosis puede ser afectada si no son adecuadamente controladas las variables (Wilson y Clarke 1977; Baker *et al.*, 1980; Scialli, 1992).

b) La absorción: cuando una sustancia química ha entrado en el organismo, su efecto depende de la capacidad y la velocidad de absorción, las cuales a su vez dependen de condicionantes como lo es la vía de administración y la fisiología o patofisiología característica del organismo (Ribeiro y Faustman, 1990; Scialli, 1992).

c) La distribución: una vez que se ha llevado a cabo la entrada y absorción de un agente químico, la velocidad y la capacidad de difusión juegan un papel importante en su efecto sobre determinados órganos blancos. El volumen total de todos los compartimentos en los cuales una droga se distribuye es llamado volumen de distribución y éste debe ser igual al volumen de la sangre. El volumen de distribución para un agente difiere marcadamente inter e intra especie o bien por el estado fisiológico particular que presente el organismo, como por ejemplo la gestación, en donde la difusión por placenta de algunas drogas puede depender de su capacidad de enlazarse o no a las proteínas del plasma (Nau, 1987; Scialli, 1992).

d) La biotransformación: uno de los aspectos importantes de la farmacología y la toxicología, es la habilidad del organismo para modificar moléculas con las que nunca había tenido un previo contacto y utilizarlas como si hubiesen sido sintetizadas por él, o bien su capacidad de inactivarlas. El principal problema es cuando el organismo biotransforma moléculas y los metabolitos resultantes tienen algún efecto sobre éste, ya sea en ese momento, o que se almacenen causando efectos posteriores. La mayoría de las enzimas que catabolizan y pueden biotransformar algún agente están principalmente en estómago y en el retículo endoplásmico de los hepatocitos, aunque casi todos los tejidos presentan acción o capacidad metabólica (Alberts *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1986; Scialli, 1992).

e) La eliminación: los agentes químicos pueden ser eliminados por numerosas rutas, considerándose dentro de las más importantes a la excreción por orina y por heces biliares, aunque la excreción por medio de la leche materna también es una ruta importante de eliminación en algunos casos. Entre más rápido sea eliminado el compuesto menor será su efecto (Wilson y Clarke, 1977; Scialli, 1992).

Como se ha mencionado el efecto de los agentes químicos varía inter-especie (debido a las variaciones genéticas principalmente), por lo cual un mismo agente puede ser probado en diferentes sistemas de prueba y presentar efectos diferentes, aunque

también se observan variaciones intra-especie, las cuales están determinadas por el estado patofisiológico o fisiológico del organismo, esto se refiere a las variaciones que en ocasiones se observan al administrar un químico a un mismo grupo de animales los cuales son seleccionados de una misma cepa, edad, sexo y peso. Por otra parte se han descrito variaciones sobre el efecto de un agente en un mismo organismo, las cuales principalmente están dadas por la edad o por una condición fisiológica particular como lo podría ser el periodo de gestación, durante el cual el organismo presenta una serie de cambios fisiológicos específicos, los cuales pueden modificar la absorción, la distribución, la biotransformación y la eliminación de los agentes químicos, por esta razón en farmacotoxicología se recomienda el estudio de las interacciones de los agentes químicos con el organismo, durante este periodo. Otro de los aspectos importantes (además de la toxicidad materna), del estudio de la administración de agentes químicos durante la gestación es la evaluación de los agentes sobre el desarrollo embrionario y fetal, así como de las posibles interacciones entre ambos (Brown *et al.*, 1986; Scialli, 1992).

1.1 Toxicidad materna, embrionaria y fetal

Dentro de los datos experimentales que se tienen, se ha observado que cuando es administrado un agente químico a una hembra preñada ésta puede sufrir alteraciones en su homeóstasis que pueden conducir a claros signos de toxicidad tanto en las madres como en los productos. Los signos de toxicidad que se encuentran con mayor frecuencia en las hembras preñadas a las cuales se les administra algún agente y en sus crías se muestran en la tabla 2 (Khera, 1991).

Tabla 2.- Signos de toxicidad en madres y crías.

EFECTOS EN LAS MADRES	
A) Reducción de peso corporal	A) Incremento significativo de reabsorciones
B) Diarrea, hipoactividad, falta de apetito, malestar general, etc.	B) disminución del peso
C) Actividad farmacológica	C) Inducción de múltiples efectos
D) Muerte	D) Muerte del embrión o del feto

En 1983 Kalter y Warkany, observaron una asociación entre desordenes funcionales en las madres como la diabetes, fenilcetonuria, sangrado vaginal e hipertermia, con la inducción de malformaciones en los productos, ellos estimaron que hasta un 3.5% de todas las malformaciones eran causadas por las enfermedades maternas, las cuales probablemente estaban relacionadas con toxicidad. Posteriormente Khera (1984; 1985), propone que la toxicidad materna juega un papel preponderante en los efectos causados en los productos y que los desordenes metabólicos posiblemente son los inductores de las alteraciones en el recién nacido, lo cual indica un efecto por vía indirecta.

Dado que el desarrollo embrionario consiste en una serie de mecanismos secuenciados, intercomunicados y específicamente programados, cualquier cambio en alguna de sus etapas ya sea directo (toxicidad embrionaria o fetal) o indirecto (toxicidad materna) puede provocar serias consecuencias en el recién nacido (Hogan *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1980; Johnston *et al.*, 1992).

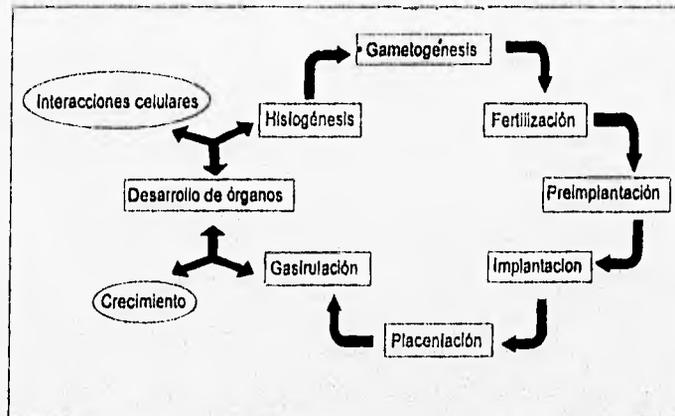
2. EMBRIOLOGÍA Y PRINCIPIOS DE TERATOLOGÍA

2.1 Estados del desarrollo embrionario

Para poder entender las alteraciones del desarrollo, es necesario conocer como se lleva a cabo el desarrollo normal desde la fecundación del ovocito hasta el nacimiento, por lo cual varios autores se han dado a la tarea de estudiar los procesos y mecanismos de diferenciación, que ocurren durante el desarrollo embrionario y fetal de los organismos.

El desarrollo embrionario inicia con la fertilización del ovocito por el espermatozoide en las trompas de falopio, con lo cual se induce la división celular. El ovocito fecundado se implanta en el miometrio y se generan las dos primeras líneas celulares (el trofoectodermo y el endodermo primitivo), las cuales formarán la base de la placenta y las membranas vitelinas extraembrionarias para las interacciones sucesivas con la madre. Las células pluripotenciales dan origen al desarrollo del embrión, mientras que el mesodermo se divide y se duplica en pares repetidos de bloques de somitas que generan el eje antero-posterior del cuerpo. La placa neural aparece y se pliega hacia arriba dentro del tubo neural formándose los primordios nasales, oculares y auditivos. Las células de las crestas neurales inician su migración y se empieza a formar el corazón, ei

sistema circulatorio y las yemas que darán origen a las extremidades (Figura 2) (Hogan *et al.*, 1986; Scialli, 1992).



Formación de órganos				
Ratón	3-4	4-5	6-7	8-9
Humano	5-8	8-13	21-55	267

Figura 2.- Estados del desarrollo embrionario y tiempo de duración de la embriología y fetogénesis en el hombre y ratón.

Se ha mostrado que durante la organogénesis son bastantes los genes que controlan la diferenciación y la morfogénesis, por lo que desde el punto de vista experimental, es una de las etapas en la cual se realizan la mayoría de los estudios del desarrollo normal, del cual aunque ya han descrito ampliamente algunos procesos aún existen varios mecanismos que no se han podido explicar, por otra parte la realización de estudios encaminados a determinar posibles alteraciones inducidas por diferentes agentes también han contribuido a entender el desarrollo embrionario y fetal normal (Hogan *et al.*, 1986; Baker, *et al.*, 1980; Taylor, 1986; Johnston, *et al.*, 1992; McColl, 1966; Shenefelt, 1972; Khera y McKinley, 1972; McClain y Baker, 1972; Jhon *et al.*, 1977; Buttar, 1980; Harris *et al.*, 1980; Kistler, 1981; Khera, 1984).

De los trabajos realizados durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario y fetal se ha concluido que el periodo de la organogénesis es el más sensible a cambios inducidos por los agentes, ya que al ser tratadas las hembras preñadas durante ésta

etapa, los tipos y frecuencia de malformaciones aumenta considerablemente en los productos, debido a que son más fácilmente fijadas las alteraciones (Druga, 1976; Fuyuta *et al.*, 1978; Tanigawa *et al.*, 1979; Baker *et al.*, 1980; Baranski *et al.*, 1982).

2.2 Principios de teratogénesis.

Dado que los agentes químicos están presentes en casi todos los medios en los cuales se desenvuelven las mujeres fértiles y las embarazadas, éstos juegan un papel preponderante en la etiología de las alteraciones reproductivas, ya que pueden modificar los eventos biológicos que se llevan a cabo durante el desarrollo de un nuevo organismo (WHO, 1984; ECETOC, 1983; Palmer, 1980; Khera, 1984; 1985). Las alteraciones pueden ocurrir en cualquiera de los diferentes estados del desarrollo, de donde el tipo e intensidad del daño en los productos depende del estado en el cual se interfiere, siendo desde cambios imperceptibles al nacimiento como lo podrían ser la falta de osificación, los hematomas, el retraso en el crecimiento, la disminución de peso etc., hasta la muerte (Wilson y Clarke, 1977; Beaudoin, 1980; Huffstadt, 1981; Scialli, 1992).

A partir de varios trabajos tanto epidemiológicos como experimentales, en los cuales se reportan diversos efectos teratogénicos causados por distintos agentes y en diferentes estados del desarrollo, en 1959 el Dr. Wilson analizó las interacciones de todos los factores involucrados en la inducción de malformaciones y propuso cinco principios de teratogénesis, posteriormente Wilson y Clarke (1977), a partir de otras observaciones proponen un nuevo principio, quedando así postulados los seis principios de teratogénesis que se conocen en la actualidad:

A. Interacción Genoma-Ambiente. Para todos los organismos, la susceptibilidad a agentes teratogénicos depende del genotipo y la manera en la cual este interactúa con los factores ambientales, por ejemplo existen determinadas malformaciones que se presentan solo en una especie y sólo en determinadas regiones del cuerpo.

B. Estado de dependencia. El estado de desarrollo y tiempo de exposición juegan un papel importante en la susceptibilidad a los agentes teratogénicos, es decir que no se inducen las mismas alteraciones si se administra un agente en diferentes fases del desarrollo (Figura 2).

C. Mecanismos. Los agentes teratógenos interfieren con los mecanismos normales del crecimiento embrionario, ya que actúan de forma específica sobre el desarrollo celular y sobre la iniciación de los tejidos de la embriogénesis (Tabla 3).

Tabla 3.- Tercer principio de Wilson: Mecanismos de inducción de daño de los agentes teratógenos (Wilson y Clarke, 1977).

MECANISMO	ESTADO PATOGENICO	EFECCION
1) Muerte celular.	1) Excesiva - reducción muerte celular.	1) Efecto en algunas células o productos celulares involucrados en la morfogénesis o maduración funcional
2) Genotoxicidad a través de mutaciones y no disyunción de cromosomas	2) Falla en las interacciones celulares	2) Otros desbalances en el crecimiento y diferenciación
3) Interferencia mitótica	3) Reducción de la biosíntesis	
4) Alteración de la integridad o función de los ácidos nucleicos.	4) Impedimento del movimiento morfogénico	
5) Alteración de los precursores necesarios en la biosíntesis provocando una carencia de los mismos	5) Perturbación mecánica de los tejidos	
6) Alteración de las fuentes de energía		
7) Inhibición de enzimas		
8) Desbalances osmóticos		
9) Alteración de las características de las membranas		

D. Manifestaciones del desarrollo anormal. Los efectos causados por el agente teratógeno se pueden manifestar como muerte embrionaria o fetal, malformaciones macro y microscópicas, retardo en el crecimiento y desordenes funcionales entre otros.

E. Acceso del agente. No todos los agentes teratógenos actúan de igual forma, la influencia que puede tener este depende de la naturaleza química del mismo y la vía de administración.

F. Relación Dosis-Respuesta. Las manifestaciones e intensidad de la alteración del desarrollo están en función de la dosis y el tipo de administración aguda o crónica (Wilson y Clarke, 1977).

2.3 Agentes y factores inductores de teratogénesis

Los estudios realizados durante el desarrollo embrionario y fetal han mostrado que algunas de las alteraciones observadas en el recién nacido son inducidas por diferentes agentes o factores, los cuales dependiendo de su naturaleza pueden actuar en algunas de las etapas del desarrollo embrionario o fetal. Dichos teratógenos son:

a) Agentes químicos, aquellas sustancias químicas a las cuales nos exponemos ya sea de manera ambiental, por consumo en la dieta o por prescripción médica.

b) Agentes físicos, como las radiaciones ionizantes, microondas, partículas cósmicas, etc., cuya exposición puede ser ambiental, dentro de estos también se pueden considerar a la temperatura. La exposición a estos agentes puede ser por prescripción médica como lo es la radiación ultrasónica o la radiación X.

c) Enfermedades infecciosas, dentro de los agentes teratógenos más conocidos se encuentran microorganismos como los virus (rubéola, citomegalovirus, herpes, HIV), los protozoarios (*Toxoplasma*), las bacterias (sífilis), etc.

d) Deficiencias o excesos nutricionales, existen diversos trabajos en los cuales se ha reportado la presencia de alteraciones en las crías inducidas por carencias o excesos de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas o minerales en la dieta.

e) Factores hormonales, algunas malformaciones observadas tienen su origen en aquellas alteraciones endocrinas que pudiera tener la madre (inevitables durante la gestación), como lo pueden ser la diabetes, enfermedades de tiroides, alteraciones en ovarios, hipófisis etc. (Wilson y Clarke, 1977; Kalter y Warkany, 1983; Scialli, 1992).

Si bien son miles los agentes químicos, físicos y biológicos a los que estamos expuestos, además de los factores endocrinos y nutricionales, cada uno de ellos tiene su forma particular de interactuar con el organismo y provocar daños o efectos tóxicos, por lo que no podemos generalizar los mecanismos de daño teratogénico lo cual complica su estudio.

3. ESTRATEGIAS Y MÉTODOS PARA EVALUAR DAÑO DURANTE EL PROCESO REPRODUCTIVO

A partir de los episodios ocurridos con la talidomida y con la rubéola, se hizo necesario desarrollar estrategias encaminadas a detectar el efecto que pudieran tener los agentes físicos, químicos o biológicos sobre el ciclo reproductivo y en particular sobre el desarrollo embrionario y fetal.

Cuando se prueba el efecto de un agente químico sobre el proceso reproductivo, en primer lugar se deben buscar indicios de su posible comportamiento, ya sea por los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados con el mismo químico en otros sistemas de prueba, como los ensayos de genotoxicidad (Prueba de Ames, Determinación de Locus Específico, Recesivos Letales Ligados al Sexo, Aberraciones Cromosómicas, Micronúcleos, Intercambios entre Cromátidas Hermanas, Síntesis no Programada de ADN, Dominantes Letales etc.), o bien realizar pruebas de tamizaje, como lo podrían ser la administración de la sustancia química a células de embriones o a organismos adultos de *Drosophila* (para identificar malformaciones en sus descendientes), así como a embriones de anfibios, de pollo o estudios *in vitro*. La elección de estas pruebas depende de la información que se quiera obtener, así como de las ventajas que pudiera aportar el estudio, como lo podrían ser la rapidez y la interpretación de los mecanismos más fácilmente etc. Sin embargo estas pruebas también tienen desventajas que deben ser consideradas como lo puede ser principalmente entre otras la diferencia metabólica que puede existir al comparar estos ensayos con los estudios *in vivo* en mamíferos.

Las pruebas más recomendadas para realizar estudios sobre el desarrollo embrionario son las realizadas *in vivo* con animales de experimentación (principalmente con rata y ratón); con las cuales se puede determinar el efecto de los agentes sobre todo el proceso reproductivo (incluyendo toxicidad y teratogenicidad). Las ventajas de estos estudios es la interacción del agente con el sistema metabólico de todo el organismo, pudiendo en un momento dado establecer comportamientos similares para el humano o tratar de entender algunos mecanismos de acción del agente de prueba (Wilson y Clarke, 1977; Scialli, 1992).

3.1 Evaluación de las alteraciones inducidas durante el desarrollo embrionario y fetal *in vivo*

Es importante realizar estudios en animales de experimentación, que muestren evidencias del efecto de las sustancias químicas a las que estamos o podemos estar expuestos durante el periodo reproductivo, con el fin de obtener indicios del posible comportamiento de dichos agentes durante los procesos del desarrollo embrionario y fetal, así como sus posibles efectos.

Varias organizaciones legisladoras internacionales como la EPA, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA), la OMS y el Ministerio de Agricultura Bosques y Pesca (MAFF), han desarrollado y recomendado diversos protocolos para evaluar los efectos de los agentes químicos sobre el proceso reproductivo usando mamíferos como modelo de prueba (FDA, 1966; ECETOC, 1983).

Para la realización de este tipo de estudios se recomienda el empleo de la rata o del ratón como modelos experimentales, ya que en general éstos son resistentes a las enfermedades, tienen un ciclo reproductivo corto, sus camadas son de buen número y tamaño, presentan pocas malformaciones espontáneas, ocupan poco espacio, su fisiología está bien caracterizada y tienen bastante éxito reproductivo (Baker *et al.*, 1980; ECETOC, 1983; Harkness y Wagner, 1989).

Los primeros estudios de teratología que se realizaron con roedores fueron en 1922 por Bragg, en los cuales se probó el efecto de las radiaciones sobre el desarrollo embrionario. A este trabajo le continuaron muchos más como los realizados por Job *et al.*, (1935) y los de Warkany y Nelson (1940), en donde los roedores mostraron ser un buen modelo experimental para el estudio del desarrollo embrionario y fetal.

Cuando se realizan estudios sobre el proceso reproductivo y en general de cualquier estudio se debe controlar perfectamente el modelo experimental, en este caso se debe observar diariamente el comportamiento de los animales, así como llevar el registro de su peso diario (o de cada tercer día). Los organismos deben tener una dieta regulada, rica en nutrientes y tener libre acceso a ella, además de que los animales deben contar con luz apropiada y ciclos de luz/oscuridad de preferencia de 12 /12 horas, una buena ventilación, temperatura y humedad controladas (Baker *et al.*, 1980; ECETOC, 1983; EPA, 1988).

La administración de los tratamientos puede ser por diferentes vías, aunque una de las más recomendadas es el uso de la aplicación intraperitoneal (i.p.), ya que la absorción es muy rápida en la cavidad peritoneal (ECETOC, 1983; EPA, 1988). Sin embargo, cuando se quieren determinar los efectos directos sobre el embrión se recomienda la administración por vía intravenosa o intracardiaca, o en su defecto la inyección directa a saco vitelino, a la cavidad uterina o en cordón umbilical. La administración subcutánea es muy poco empleada ya que resulta ser la vía más lenta de absorción (Baker *et al.*, 1980).

En los estudios de toxicología reproductiva establecidos para detectar alteraciones en la fertilidad, los organismos se deben de exponer durante todo el ciclo reproductivo al agente, es decir los organismos son tratados desde por lo menos un ciclo espermatogénico y en el último estado de la maduración del ovocito antes de que los animales de la generación progenitora (Fo) sean apareados, aunque en algunos casos la exposición de las hembras se puede continuar después del apareamiento y hasta el final de la lactancia (FDA, 1966; CSM, 1974).

Otros protocolos empleados en toxicología reproductiva (estudios de teratogenicidad, peri y posnatales), consisten en exponer a las hembras preñadas a los agentes sólo durante el periodo de organogénesis, para posteriormente extraer las crías por cesárea un día antes del parto (estudios perinatales), para identificar alteraciones externas e internas, estos estudios por otra parte también nos dan indicios sobre el posible efecto del agente como embrio y fetotóxico. En los estudios postnatales se pueden hacer observaciones a largo plazo con las crías obtenidas de madres tratadas (ECETOC, 1983). Wilson y Clarke, en el *Handbook of Teratology* (1977), sugieren que los tratamientos para identificar la inducción de malformaciones, sean divididas en tres aplicaciones a lo largo del periodo de gestación, siendo la primera entre los días 9 al 11, la segunda entre 12 al 14 y la tercera del 15 al 17 días de gestación ó bien una sola aplicación en cualquiera de esos tres intervalos. Los fetos extraídos también pueden ser empleados para realizar estudios de alteraciones esqueléticas e histológicas (Baker *et al.*, 1980; ECETOC, 1983).

3.2 Evaluación de embriotoxicidad, fetotoxicidad *in vivo*

Para realizar este tipo de evaluaciones se siguen los lineamientos anteriormente descritos, salvo que en estos estudios la administración del agente debe ser por vía intravenosa o intraperitoneal, ya que la sustancia química se absorbe más rápidamente, lo cual permite una mejor interpretación de los resultados, aunque estos no reflejan las rutas a las que normalmente estamos expuestos los humanos (Baker *et al.*, 1980).

La evaluación del efecto embrio y fetotóxico normalmente se realiza a la par de las otras evaluaciones de las alteraciones en el desarrollo y se indica principalmente por disminución del peso corporal y de la talla de las crías que son extraídas por cesárea o durante el nacimiento, así como por la muerte embrionaria temprana (reabsorciones) y la muerte fetal (Taylor, 1986; Baker *et al.*, 1980; Hood, 1989). La toxicidad embrionaria y fetal también puede ser indicada por la inducción de determinadas malformaciones en las crías a las cuales se les ha asociado con embrio y fetotoxicidad, según las observaciones realizadas por varios autores (Khera, 1985).

4. DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS MALFORMACIONES

Se ha estimado que cerca del 70% de las malformaciones en humano son de etiología desconocida, además de que ocurren esporádicamente (Shepard, 1984). Recientemente se ha incrementado la inducción de malformaciones en las poblaciones humanas, esto debido al aumento en el consumo de sustancias químicas durante la gestación (Albert, 1988; ECETOC, 1983; EPA, 1988).

Numerosos trabajos han mostrado que la inducción de las diferentes malformaciones se presenta solamente cuando se exponen a los agentes solo durante determinadas etapas del desarrollo, así por ejemplo en general la exposición temprana del periodo organogénico a agentes químicos afecta principalmente al sistema nervioso, visual y auditivo, mientras que la exposición tardía induce alteraciones preferiblemente a el sistema oral, esquelético y urogenital (Figura 3) (Kreybig, 1969; Beaudoin, 1980; Baker *et al.*, 1980).

4.1 Malformaciones externas (macroscópicas)

La teratología, o el estudio de las malformaciones congénitas, involucra su estudio, manifestaciones, incidencias y los posibles mecanismos.

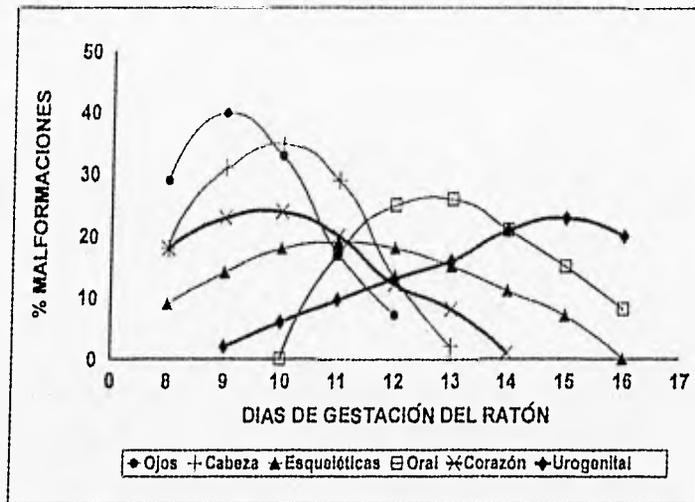


Figura 3.- Representación hipotética de la inducción de malformaciones en la administración de un agente durante los diferentes estados del desarrollo (Baker et al., 1980).

Se ha definido a las malformaciones externas o macroscópicas como un cambio en la morfología o fisionomía de los organismos los cuales pueden ser observables a simple vista. Dentro de las anomalías, aquellas que presentan un efecto adverso sobre la función o adaptabilidad social del individuo son consideradas como mayores, mientras aquellas que pueden ser corregidas o pasan desapercibidas en la población son consideradas como malformaciones menores. Aunque las anomalías congénitas incluyen sólo a las alteraciones macroscópicas, en muchos casos se pueden presentar alteraciones microscópicas o alteraciones como: errores innatos del metabolismo, retraso mental y alteraciones moleculares y celulares (O'Rahilly y Müller, 1992).

Aunque las frecuencias de las alteraciones tanto mayores como menores varía, en la mayoría de los casos las alteraciones espontáneas que más se han descrito a nivel mundial son:

A) Sistema Nervioso Central (SNC), este sistema es muy sensible a la inducción de alteraciones durante el desarrollo, las alteraciones que se inducen sobre el SNC también pueden afectar otros sistemas como por ejemplo el esquelético. A partir de una revisión realizada de trabajos que reportaban alteraciones en el tubo neural en humanos y animales, se propuso como etiología de éstas a la predisposición genética, la inducción

por determinadas enfermedades maternas y la exposición a drogas (Campbell *et al.*, 1986). Algunos ejemplos de estas son:

a) Excencefalia, es una anomalía del desarrollo caracterizada por un cráneo imperfecto, en donde las membranas y sustancia cerebral se encuentra fuera de él. La ausencia de cráneo puede ser parcial o completa.

b) Anencefalia, ausencia congénita de la bóveda craneal y atrofia de los hemisferios cerebrales que se presentan en forma de pequeñas masas nerviosas rudimentarias adheridas a la base.

c) Hidrocefalia, malformación caracterizada por dilatación de los ventrículos, que suele ser secundaria a la obstrucción de la vía del líquido cefalorraquídeo y que se acompaña de la acumulación de este dentro del cráneo. Se caracteriza por un crecimiento de la cabeza y prominencia de la frente.

d) Microcefalia, cráneo reducido que suele acompañarse de retardo mental.

e) Espina bífida, anomalía del desarrollo que se caracteriza por cierre defectuoso de la protección ósea de la médula espinal, de la cual pueden hacer protrusión la médula espinal y las meninges.

f) Dolicocefalia, esta malformación se caracteriza por presentarse la cabeza alargada en forma de balón de fútbol americano, a esta malformación se hace referencia cuando el diámetro del cráneo rebasa las medidas ajustadas al patrón normal, también conocida como braquicefalia (Khera, 1984; Taylor, 1986; Dorland, 1988; Juriloff y Harris, 1988; Macdonald *et al.*, 1989).

B) Sistema oral, dentro de estas malformaciones las más reportadas son:

a) Labio leporino y Paladar hendido, el paladar hendido se caracteriza por tener una fisura congénita en la línea media, el cual puede variar entre un simple surco en la óvula hasta una hendidura que abarca la óvula y el paladar duro, este último surco puede extenderse hacia delante por un lado o por ambos lados (nunca en la línea media) a través del reborde alveolar, en ratón la mayoría de las veces se encuentra asociado con labio leporino (Juriloff *et al.*, 1989; Bannigan *et al.*, 1990; Stricker *et al.*, 1990; Juriloff y Harris, 1988).

C) Sistema locomotor, dentro de este tipo de malformaciones se han reportado:

a) **Polidactilia**, anomalía del desarrollo caracterizada por la presencia de dedos supernumerarios en las extremidades anteriores o posteriores.

b) **Sindactilia**, anomalía congénita más frecuente en las extremidades, caracterizada por persistencia de membranas entre los dos dedos adyacentes (Khera, 1984; Taylor, 1986; Dorland, 1988; Szabo, 1989).

4.2 Malformaciones internas (esqueléticas)

El inicio del desarrollo normal esquelético durante el periodo de organogénesis varía para las diferentes partes del cuerpo, por ejemplo el desarrollo de las vértebras en ratón se da entre los días 15 al 18, las extremidades se desarrollan durante el día 14, las costillas del día 14 al 15 y el esternón entre el día 16 al 18 de gestación por lo cual es importante tener en cuenta el día de administración del agente, así como las malformaciones observadas para poder correlacionarlos (Taylor, 1986).

Diversos trabajos han mostrado el efecto de algunos agentes químicos sobre la osificación prenatal e inducción de malformaciones (Muther, 1988; Beck, 1989; Campbell y Kaplan, 1992). Algunas de las alteraciones esqueléticas inducidas por diferentes agentes en los organismos pueden pasar desapercibidas por tratarse de malformaciones internas que en muchas ocasiones no alteran considerablemente la adaptabilidad fisiológica del organismo a su medio, salvo en el caso de tratarse de malformaciones muy evidentes. Las anomalías del sistema esquelético involucran cambios en el tipo y modo de osificación. Dentro de las principales alteraciones esqueléticas inducidas por agentes químicos se encuentran las descritas en:

A) Costillas, en donde una o varias costillas se pueden presentar bifidas, fusionadas, asimétricas o supernumerarias.

B) Esternón, este tipo de malformaciones consisten el alteraciones de una o más esternobras las cuales se pueden presentar asimétricas, fusionadas o ausentes.

C) Columna, dentro de las malformaciones más comúnmente reportadas son cuando las vértebras se presentan asimétricas, fusionadas o bien la columna se encuentra desviada hacia la derecha o izquierda.

D) Otras, dentro de estas se pueden considerar a la falta de osificación en general, o alteraciones en algún hueso en formación de todo el sistema esquelético.

(Khera, 1984; Taylor, 1986; Dorland, 1988; Nakatsuka, 1988; Stricker *et al.*, 1990; Szabo, 1989).

En la tabla 4 se muestra el tipo y frecuencia de las malformaciones espontáneas más comunes que se presentan en el ratón para la cepa CD-1 (Perraud, 1976; Fritz *et al.*, 1978 y Palmer, 1979), lo cual explica la baja inducción de malformaciones reportadas en algunos trabajos de los cuales hace referencia Khera en sus recopilaciones (Khera, 1984; 1985).

Tabla 4.- Frecuencia de malformaciones espontáneas reportadas por diferentes autores para la cepa CD-1 de ratón.

TIPO DE MALFORMACIÓN	% (Palmer, 1979)	% (Perraud, 1976)	% (Khera, 1984)
a) Exencefalia	0.11	0.4	0.5
b) Anormalidades oculares	0.17	0.7	1.0
c) Anormalidades en vértebras	0.07	0.2	3.9
d) Anormalidades en costillas	-----	0.7	0.4 ^{***}
e) Anormalidades en esternón	14.0	1.0 [*]	8.8 ^{***}
f) Polidactilia	-----	-----	1.2
g) Sindactilia	-----	-----	0.05
h) Malformaciones craneofaciales	0.74	-----	-----
i) Costillas super- numerarias	13.0	1.0 ^{**}	25.8 ^{***}

*: Únicamente esternón fusionado ** :Únicamente cervicales *** : Con vehículo (H₂O).

5. CLOROFILINA.

Diversos estudios han podido establecer una clara correlación entre la exposición a agentes químicos y el incremento en el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer (Gentile y Gentile, 1991), por otra parte se ha descrito que algunos componentes de los alimentos y en particular de los vegetales verdes pueden disminuir este riesgo (Morita *et al.*, 1978).

Los extractos obtenidos a partir de las plantas han mostrado contener varias sustancias que resultaron tener potencial antimutágeno, dentro de las cuales se encuentran los beta carotenos, el alfa-tocoferol, el ácido ascórbico y el selenio entre otros (Sakai *et al.*, 1991). Dentro de los compuestos descritos la clorofila y una de sus sales derivadas (sal de sodio y cobre de la clorofila), conocida como clorofilina (CLF), fueron identificados como compuestos con más actividad antimutagénica que los otros (Gentile y Gentile, 1991).

La clorofila al ser un componente muy abundante en las plantas verdes y poseer una gran similitud con la hemoporfirina, le permitió ser empleada en estudios terapéuticos, sin embargo, dado que era poco estable, que no se le podían eliminar varias impurezas y no era muy soluble en el agua, en la mayoría de los estudios se ha preferido probar a sus derivados más estables como lo son sus sales (Clorofilinas) obteniendo buenos resultados (Kephart, 1955; Kurk, 1962; Newmark, 1987).

5.1 Propiedades físico-químicas

De todas las sales de la clorofila la más empleada terapéuticamente y en la investigación biológica es la CLF (sal de sodio y cobre de la clorofila), cuya estructura química esta conformada por un anillo tetrapirrólico que contiene puentes dobles conjugados con un metal al centro (en este caso cobre). La CLF se obtiene por el método de Schertz y Toepfer, mediante la hidrólisis alcalina de la clorofila en la cual se sustituyen los grupos metil y fitil por sodio (Kurk, 1962; Newmark, 1987), la fórmula química de la CLF es $C_{34}H_{31}Na_4CuO_6$ (Figura 4).

La CLF es una sustancia microcristalina verde-azul oscura que produce el efecto Tyndall en solución acuosa, tiene una característica banda de adsorción entre 630 a 688 nm, es muy soluble en agua y alcohol (Kephart, 1955; Oster *et al.*, 1964). La molécula de CLF posee un alto grado de resonancia y deslocalización de electrones, lo cual sugiere que puede ser un capturador de radicales libres (Simic, 1988).

La CLF posee gran estabilidad, poca o nula toxicidad, es de fácil manejo y una gran efectividad antimutágena, anticancerígena y radioprotectora (Kephart, 1955; Oster *et al.*, 1964; Ong *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1994; Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994; Morales-Ramírez y Mendiola-Cruz, 1995).

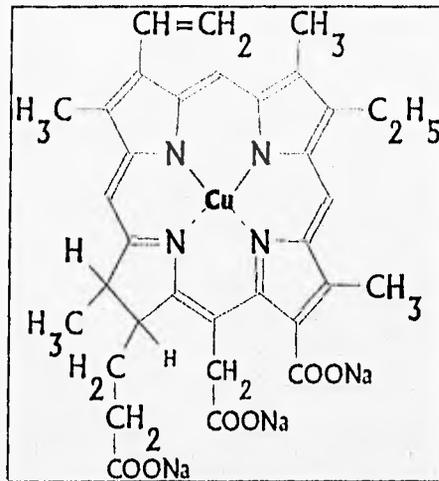


Figura 4.- Estructura química de la molécula de clorofilina (CLF).

5.2 Usos.

Los principales usos humanos que se le han dado a la CLF es en:

- A) los alimentos**, como colorante de dulces, chicles, sopas, gelatinas etc. además de que en tiendas naturistas se vende como complemento alimenticio (vitamínico).
- B) los cosméticos**, como colorante y agente desodorizante en perfumes, lociones, jabones, pastas dentales y desodorantes.
- C) tratamientos terapéuticos**, se le ha empleado en pomadas para ayudar a la cicatrización, en tratamientos contra la anemia, como protector solar y como laxante en pacientes geriátricos (Buttita, 1946; Zubiri, 1946; Kephart, 1955; Kurk, 1962; Oda *et al.*, 1971; Krasnikova, 1974; Nakeeb y Yousef, 1974; Young y Beregi, 1980; Tawashi *et al.*, 1982).

5.3 Antecedentes

Los primeros estudios realizados con CLF fueron encaminados hacia el tratamiento de anemias, partiendo de la semejanza estructural de la CLF con el pigmento de la sangre (hemoporfirina), por lo cual el organismo, tal vez, pudiera utilizar estas sustancias pirrólicas preformadas para la producción de hemoglobina. Durante los primeros estudios se observó que la administración de la CLF a conejos por vía oral

aceleraba la regeneración de células sanguíneas y elevaba los niveles de hemoglobina, posteriormente se emprendieron estudios para determinar si la CLF podía ser administrada en el tratamiento de la hipertensión, encontrando que la regulaba, por lo cual también la relacionaron con el tratamiento de la arteriosclerosis (Kephart, 1955).

Otros estudios mostraron que la CLF aceleraba la coagulación de la sangre, por lo cual se administró en pacientes con el síndrome hemorrágico (Buttita, 1946). Smith y Sano en 1944 observaron que al administrar CLF a un medio de cultivo de fibroblastos embrionarios se eliminaba el periodo de latencia y había un crecimiento inmediato, el cual persistía hasta 48 horas. Krasnikova (1974), encontró también que la CLF inducía la actividad mitótica pero en heridas de la piel de ratones, al observar un incremento en la división celular del epitelio de la herida (por lo cual se aceleraba la cicatrización). También se ha administrado a la CLF como medicamento fotosensibilizador y fotoprotector (Zubiri, 1946).

Nakeeb y Yousef (1974), encontraron que la CLF interfería en el desarrollo de algunos microorganismos como ciertos hongos, con lo cual la CLF mostró tener actividad bacterioestática. En otros estudios realizados se observó que la administración de la clorofila a pacientes con pancreatitis, controlaba y disminuía sus efectos, planteando que tal vez esto se debía a la inhibición de la tripsina (Oda *et al.*, 1971). En un trabajo realizado por Tawashi *et al.* (1982), se encontró que la CLF inducía la cristalización del oxalato de calcio en orina normal. Por otra parte a la CLF se le ha atribuido acción protectora contra la peroxidación lipídica de microsomas y mitocondrias, a las cuales se les ha relacionado con el envejecimiento, la arteriosclerosis y el daño hepático entre otros (Sato *et al.*, 1984).

Dadas sus propiedades como desodorante y laxante, Young y Beregi (1980), la administraron a pacientes geriátricos con éxito.

5.4 Toxicidad.

En la mayoría de los trabajos mencionados anteriormente no se detectaron efectos tóxicos inducidos por la CLF. En estudios realizados para determinar su posible efecto tóxico, se encontró que la administración de CLF por vía oral, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular y subcutánea, durante varios días a conejos (1 a 2 gramos), a perros (100 mg) y a humanos (100 a 800 mg) no producía efectos tóxicos colaterales (Kephart, 1955).

Harrison *et al.* (1954), administraron CLF en la dieta de ratas a lo largo de su vida (equivalente al 3% de su consumo diario) y no encontraron signos de toxicidad, además de que las tasas de crecimiento, supervivencia y fertilidad, no se vieron afectadas. Al realizarles la necropsia a estos animales no se detectaron cambios patológicos, ni se encontraron efectos tóxicos causados por el cobre de la molécula de CLF en el hígado, el riñón y el bazo.

En los tratamientos terapéuticos que se han administrado CLF a humanos, no se han producido efectos tóxicos secundarios, ni se han desencadenado reacciones antigénicas, como ha sido el caso de la administración de CLF a pacientes geriátricos (100 mg 2 o 3 veces al día), a pacientes con pancreatitis (0.35 mg), a pacientes hipertensos (0.8 a 1.5 g), a pacientes anémicos (700 mg) y a pacientes cancerosos (100 mg) (Oda *et al.*, 1971; Young y Beregi, 1980).

Otros estudios han mostrado que al administrar diferentes dosis de CLF en diversos sistemas de prueba no presentan efectos citotóxicos como es el caso de *Salmonella thyphimurium* (Lai, 1979; Kimm *et al.*, 1982; Ong *et al.*, 1986; 1989; Warner *et al.*, 1991), en levaduras (Bronzetti *et al.*, 1990), en *Drosophila* (Negishi *et al.*, 1989), células hepáticas de trucha arco iris (Dashwood *et al.*, 1991), en líneas celulares de ratón (Ong *et al.*, 1994), en rata (Robins y Nelson, 1989), en células V79 (Kato *et al.*, 1983), en células de médula ósea de ratón *in vivo* (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994), y en espermatozonias de ratón (Mendiola-Cruz, 1995).

5.5 La clorofila y sus sales como agentes antimutágenos, anticancerígenos y radioprotectores

A partir de estudios epidemiológicos en los cuales se mostraba, que los vegetarianos tenían un menor riesgo de presentar cáncer (Phillips, 1975), se pensó que los constituyentes de su dieta contenían sustancias anticancerígenas. Por lo cual primero se probaron diferentes compuestos de los vegetales con diversos mutágenos (dentro de los cuales se encontraban el triptofan pirrolisato, el benzo[a]pireno y los epóxidos policíclicos aromáticos), en *Salmonella* y en *Bacillus subtilis*, encontrando en todos los casos que los compuestos de los vegetales presentaban actividad antimutágena (Kada *et al.*, 1978; 1985; Morita *et al.*, 1978; Kada *et al.*, 1984; Terwel y Van der Hoeven, 1985; Wood *et al.*, 1982).

Lai (1979), encontró que la clorofila contenida en los brotes de trigo inhibía la activación metabólica de carcinógenos en *Salmonella*. En otras pruebas utilizando el sistema de Ames, se han probado la actividad antimutágena de diferentes extractos de plantas contra compuestos como el 3-metilclorantreno y el benzo[a]pireno, en donde se ha observado que la presencia de la clorofila en estos extractos de vegetales era la que les confería principalmente sus propiedades antimutágenas, además de que este potencial antimutágeno aumentaba conforme a la concentración de clorofila en la planta de la cual se realizaba el extracto. En estos mismos estudios uno de los derivados de la clorofila (la sal de sodio y cobre CLF) presentó una actividad inhibitoria de mutagenicidad comparable con la de la clorofila e incluso superior (Lai *et al.*, 1980; Matney, 1986).

En los estudios realizados por Cabrera (1991) y Papatwibul (1993), se describe actividad antimutágena de la CLF para una gran gamma de mutágenos (excepto para los pesticidas), además de que al comparar dicha actividad con otras sustancias anteriormente reportadas como antimutágenas (beta-carotenos y vitaminas A, C y D), esta fue mayor para la CLF en *Salmonella* y *Tradescantia*.

La inhibición de la activación mutagénica de agentes como el 3-metilclorantreno y la del benzo [a] pireno, por CLF presenta una relación dosis-dependiente y en general para la mayoría de los mutágenos (Lai *et al.*, 1980; Terwel y Van der Hoeven, 1985; Arimoto *et al.*, 1980a; 1980b; Hayatsu *et al.*, 1988).

Ong *et al.* (1986) y Feng *et al.* (1989), realizaron una serie de experimentos en los cuales observaron que la CLF inhibía hasta el 100% de la mutagenicidad de mutágenos ambientales y mezclas complejas como las presentes en carnes fritas, jugos rojos, vinos rojos, humo de cigarro, partículas de aire y emisiones de partículas de diesel, además de que la CLF no presentó toxicidad en *Salmonella*.

La actividad antimutágena de la CLF se ha seguido probando con éxito en otros sistemas como en: levaduras (Robins, 1986; Bronzetti *et al.*, 1988), *E. coli* (Clarke y Shankel, 1989), *Drosophila* (Negishi *et al.*, 1989; Rodríguez-Arnaiz y Zimmering, 1989) y *Tradescantia* (Cabrera, 1991; Papatwibul, 1993).

Recientemente Dashwood *et al.* (1991), en un estudio que realizaron con ratas observaron actividad quimiopreventiva de la CLF, ellos proponen que esta actividad es dada por la inhibición de enlaces de los carcinógenos con el ADN, en sus resultados muestran una inhibición de daño hasta en un 70%. Otros estudios han probado que la

CLF impide la formación de enlaces covalentes de los agentes mutágenos con el ADN, además de que se ha observado un aumento en la eliminación de los mutágenos por orina y por heces, cuando se administra CLF, así como una disminución en la absorción de los mutágenos en intestino (Dashwood, 1992). Estos hechos sugirieron que la CLF puede actuar como desmutágeno e interceptor de moléculas *in vivo* (Dashwood y Liew, 1992). En otros estudios Arimoto *et al.* (1992), reportan que el cromóforo de la CLF es la parte encargada de atrapar dichos mutágenos.

Por otra parte también se ha descrito que la CLF es capaz de inhibir el efecto mutagénico causado por metales pesados en células somáticas de *D. melanogaster* (Olvera *et al.*, 1993) y en ratón (Sarkar *et al.*, 1993; Palit *et al.*, 1993).

Otra de las propiedades de la CLF es su capacidad de proteger a las células del efecto de la radiación (efecto radioprotector), ya que se ha encontrado que la CLF es capaz de proteger de algunos efectos inducidos por radiación gamma como lo son algunas mutaciones y recombinaciones en *D. melanogaster* (Zimmering *et al.*, 1990), así como de la inducción de Intercambios entre Cromátidas Hermanas y de los efectos sobre el Índice mitótico en células de médula ósea de ratón (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994) y en células de espermatogonias de ratón (Morales-Ramírez y Mendiola-Cruz, 1995). Estos estudios sugieren que el posible mecanismo de protección de la CLF hacia estos daños inducidos por radiación es por medio de la captura de radicales libres. En un trabajo reciente realizado por Morales-Ramírez *et al.* (1995), cuestionan al mecanismo de captura de radicales libres como el encargado de conferirle radioprotección a la CLF y plantean, que dicha protección se debe a otro mecanismo diferente a éste, ya que ellos no observaron respuesta radioprotectora de la CLF, respecto a la inducción de Micronúcleos en eritrocitos policromáticos por radiación gamma.

5.6 Mecanismos de protección de la clorofila y sus sales

Como se han descrito anteriormente existen varios trabajos en los cuales se han estudiado los efectos de la CLF al ser administrada junto o en combinación con agentes mutágenos y cancerígenos, con lo cual de alguna forma se han obtenido evidencias de los mecanismos de protección de la CLF. A partir de las diferentes observaciones se ha planteado que la CLF puede proteger por medio de diferentes mecanismos, los cuales

dependen del agente con el cual se administre, del sistema de prueba que se emplee, de las dosis y la vía de administración tanto del agente como de la CLF y de la condición del estudio *in vivo* o *in vitro*.

Kimm *et al.* (1982) y Terwell y Van der Hoeven (1985), encontraron que la CLF protege más de mutágenos de acción indirecta que de los de acción directa, por lo que sugirieron que su protección es interfiriendo con la función de las enzimas del sistema de activación metabólica, aunque no descartan la posibilidad de que la CLF inactive directamente al compuesto.

Sato *et al.* (1984), observaron que cuando se administraba la CLF a ratas se inhibía el deterioro de las funciones microsómicas hepáticas. Imai *et al.* (1986), también encontraron que la CLF disminuía e inhibía la actividad de las enzimas microsómicas hepáticas que forman parte del sistema de metabolismo de drogas o genotoxinas, por lo que con estos trabajos se apoyan los mecanismos propuestos por Kimm *et al.*, (1982) y por Terwell y Van der Hoeven (1985).

Otro de los mecanismos planteados de protección de la CLF es por medio de la captura de radicales libres responsables del efecto genotóxico (Kimm *et al.*, 1982; Ong *et al.*, 1986; 1989; Robins y Nelson, 1989; Bronzetti *et al.*, 1990; Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994). En los trabajos realizados por Hadnagy y Seemayer (1988), se obtuvieron evidencias directas de que la CLF inactiva radicales libres (entre ellos el oxígeno), de los cuales ya se ha descrito su papel como posibles promotores de cáncer induciendo rupturas del ADN (Troll y Weisner, 1985).

Por otra parte se ha encontrado que la CLF es capaz de interactuar directamente con el mutágeno y formar complejos (Negishi *et al.*, 1989; Dashwood *et al.*, 1991; Dashwood, 1992). En estudios realizados con espectrofotometría se observó que la CLF forma compuestos moleculares no covalentes con aminas heterocíclicas, estos resultados sugieren que la CLF opera como interceptor de moléculas, limitando la biohabilidad de carcinógenos y mutágenos para causar daño (Dashwood y Guo, 1992; Dashwood y Liew, 1992; Dashwood y Guo, 1993).

De los resultados obtenidos por Dashwood y Liew en 1992, se le confiere a la CLF la capacidad de actuar como desmutágeno, ya que ellos observaron que cuando se administraba la CLF por vía oral se aumentaba la excreción del mutágeno en orina y heces, es decir ayudaba la eliminación del mutágeno.

En los estudios realizados por Arimoto *et al.* (1993), en los cuales trabajaron con CLF altamente purificada y tres derivados de la CLF (el clorin-cobre, clorin-hierro y clorin), encontraron que la CLF inhibía la actividad mutágena de estructuras policíclicas planas, por lo que sugieren que el mecanismo es por medio de la formación de complejos en la superficie de las moléculas, ellos también observaron que el metal del centro de la CLF no juega ningún papel en la absorción del mutágeno.

III. JUSTIFICACIÓN

El estudio de diferentes sustancias para poder establecer su posible efecto mutágeno, carcinógeno o teratógeno es muy amplio debido al constante contacto al que estamos expuestos y también al incremento en la incidencia de cáncer, de enfermedades hereditarias y de malformaciones en el recién nacido que se han dado en los últimos años.

Por esta razón recientemente se ha dado un auge hacia la búsqueda de sustancias que contrarresten dichos efectos, así como el tratar de interpretar los mecanismos tanto de inducción de daño como de la protección de daño (hasta el momento principalmente mutagénicos y cancerígenos). Una de las fuentes principales en las que se ha buscado es en los productos naturales de la dieta humana por su baja toxicidad, de donde la clorofila ha resultado ser de las sustancias con mayor potencial antimutágeno y anticancerígeno.

De igual forma la CLF (una sal de sodio y cobre derivada de la clorofila y más estable que ésta), ha mostrado en diferentes estudios un gran actividad antimutágena, anticancerígena y radioprotectora, incluso mayor que la de la clorofila. La CLF no es un compuesto activo en las plantas verdes, sin embargo se le utiliza en la elaboración de productos químicos industrializados (colorantes de alimentos y otros productos como desodorantes, jabones, cosméticos, etc.) y se ha empleado como agente terapéutico en el tratamiento de anemias y cuidado de pacientes geriátricos, incluso se le ha vendido como componente de diferentes pomadas para ayudar a la cicatrización de heridas y en las tiendas naturistas como complemento vitamínico. Por otra parte debido a sus propiedades antimutágenas y anticancerígenas, a la CLF se le coloca como una de las principales sustancias para su posible empleo agente terapéutico en el tratamiento del cáncer (anticancerígeno) en el humano.

A pesar de que a la CLF se le emplea comúnmente en la actualidad, no existen reportes sobre sus efectos al ser administrada durante el embarazo, ni existen trabajos que den indicios de su posible comportamiento en hembras gestantes, tanto en los productos como en las madres. Debido a lo anterior y sabiendo que la CLF es un potente antimutágeno, anticancerígeno y radioprotector, además de poseer una toxicidad

prácticamente nula, en el presente trabajo se decidió estudiar el efecto de la CLF al ser administrada durante la gestación a hembras de ratón *in vivo*, con el objeto de establecer un posible uso de esta sustancia como antimutágeno o antiteratógeno al ser aplicado durante el desarrollo embrionario y fetal.

IV. HIPÓTESIS

Dentro de los inductores de daño sobre el desarrollo embrionario y fetal se han descrito ampliamente diversos agentes mutágenos y cancerígenos incluyendo a la toxicidad materna, a la cual se le ha asociado con algunas de las alteraciones en el recién nacido. Por lo tanto, partiendo de lo anteriormente señalado y dado que en diversos estudios realizados en diferentes sistemas de prueba, la CLF no ha mostrado tener efectos genotóxicos, ni carcinogénicos (sino por el contrario se le ha encontrado actividad antimutágena, anticarcinógena y radioprotectora), además de que no ha mostrado tener efectos tóxicos ni citotóxicos, entonces al ser administrada la CLF por vía i.p. a hembras preñadas no inducirá alteraciones sobre el desarrollo embrionario y fetal.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la CLF sobre el desarrollo embrionario y fetal del ratón, mediante el análisis de la posible inducción de malformaciones y alteraciones externas e internas, así como establecer el efecto embriotóxico y retraso en el desarrollo.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto de diferentes dosis de CLF al ser administrada en el día 8 de gestación por vía i.p. sobre el desarrollo embrionario (embriotoxicidad, retraso en el desarrollo, etc.).

2. Establecer los efectos de la CLF al ser administrada a hembras preñadas en el día 8 de gestación por vía i.p., sobre la posible inducción de malformaciones y alteraciones externas en los fetos obtenidos por cesárea en el día 18 de gestación.

3. Establecer si la CLF al ser administrada a hembras preñadas en el día 8 de gestación por vía i.p., presenta efectos sobre la osificación, por medio de la evaluación de malformaciones y alteraciones esqueléticas en las crías.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se emplearon ratones hembras vírgenes sexualmente maduras de la cepa CD-1, entre 45 y 60 días de edad (28 a 35g de peso), las cuales fueron obtenidas del bioterio de la FES-Zaragoza, UNAM. Los ratones se alimentaron con comprimidos purina y agua *ad libitum* y se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire, así como períodos de luz-oscuridad controlados (12-12 horas). Las hembras se pusieron a cruzar 2:1, durante la noche (20:00 a 8:00 horas), con machos sexualmente maduros de la misma edad y cepa. Se consideró la presencia de tapón espermático como evidencia de cópula y como día cero de preñez.

2. ESTUDIOS PRELIMINARES

Diez hembras preñadas se dividieron en dos grupos (cinco hembras por grupo). Al primer grupo (testigo sin vehículo) se le permitió el desarrollo de sus camadas hasta el día 18 de gestación sin administrarles ninguna sustancia, mientras que al segundo grupo (testigo con vehículo) se le administró 0.25 ml de agua destilada (vehículo de la administración de la CLF en los protocolos del estudio), en el día 8 de gestación. Ambos grupos fueron sacrificados en el día 18 de gestación (Figura 5).

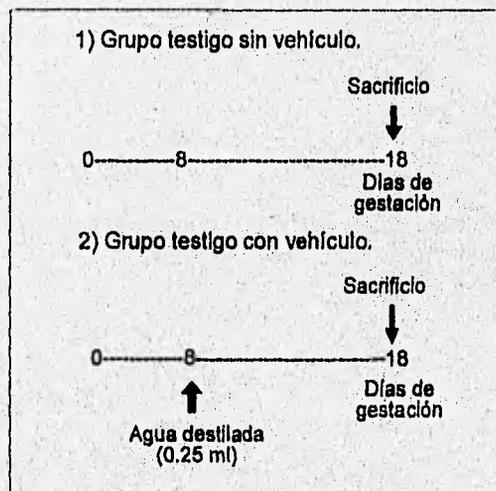


Figura 5.- Protocolo empleado para determinar el efecto del vehículo (agua destilada) sobre el desarrollo embrionario y fetal.

En ambos grupos se realizaron las mismas evaluaciones consideradas para el estudio con CLF, por lo que a partir de estos resultados se seleccionó el testigo a emplear.

3. ESTUDIOS DE TERATOGENICIDAD EN EL RATÓN

Para el desarrollo del estudio se siguieron los lineamientos propuestos por la ECETOC (1983) y por la EPA (1988).

4. ADMINISTRACIÓN DE LA DOSIS

A grupos de 20 hembras preñadas se les inyectó en el día 8 de gestación, por vía i.p. una sola dosis de CLF (Sigma Chemicals Co. St. Louis Mo., USA.) 100, 50, 40 ó 20 mg/kg de peso corporal, diluida en 0.25 ml de agua destilada, iniciándose el estudio con la dosis de 100 mg/kg ya que en reportes previos se había descrito que ésta no presentaba efectos tóxicos, citotóxicos, ni genotóxicos aparentes al ser administrada a ratones (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994; Morales-Ramírez y Mendiola-Cruz, 1995) y a Hámster chino (Renner, 1990). Los grupos testigo se mantuvieron bajo las mismas condiciones pero sin administrar la CLF (Figura 6).

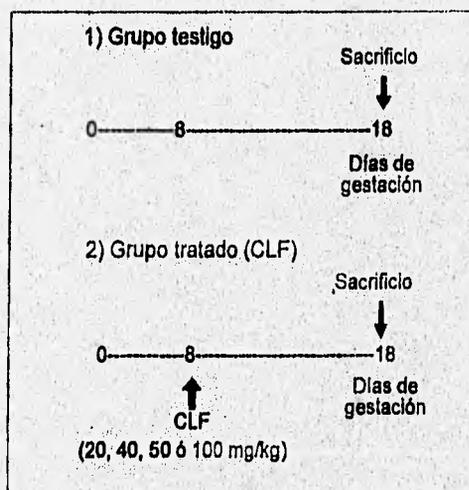


Figura 6.- Protocolo empleado para el estudio sobre el desarrollo embrionario y fetal con el tratamiento de clorofilina.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las hembras preñadas tratadas y no tratadas fueron sacrificadas el día 18 de gestación por dislocación cervical, el útero se abrió y se expuso para contar el número de implantes, reabsorpciones, fetos vivos y muertos. Los fetos fueron removidos del útero y se pesaron, posteriormente se sexaron y bajo un microscopio de disección se examinaron para identificar el tipo y frecuencia de las malformaciones externas. Dos tercios de los fetos de cada camada fueron fijados en etanol al 70%, para identificar malformaciones esqueléticas bajo un microscopio estereoscópico y el otro tercio de los fetos se fijo en solución de Bouin, para realizarles estudios histopatológicos posteriores (Figura 7).

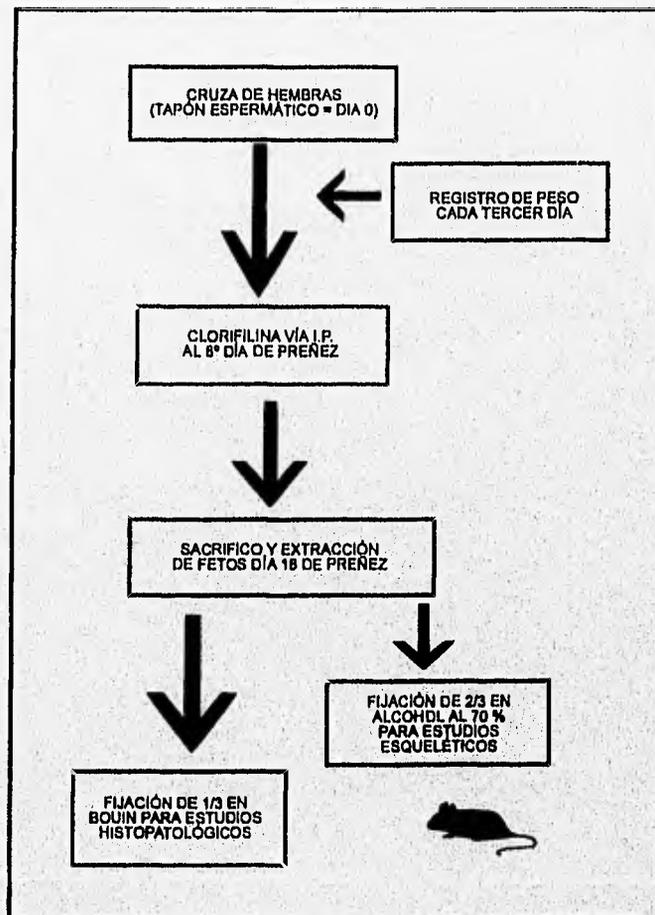


Figura 7.- Metodología de tratamiento, obtención de crías y preparación de las mismas para su análisis.

6. DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE IMPLANTE

Los sitios de implante fueron determinados como la suma de los fetos vivos, de los muertos y las reabsorciones. En todos los casos únicamente se tomaron en cuenta las hembras que presentaron tapón espermático y aumento del peso del día 0 al día 8 de gestación.

Como en las hembras tratadas con CLF se encontró la presencia de anillos verdes en los sitios de posible implantación, para determinar si estos anillos coincidían con dichos sitios de implante se realizaron los protocolos que se muestran en las figuras 8 y 9, empleándose dos grupos experimentales en cada protocolo (hembras preñadas y hembras sin preñar). En la realización del protocolo 1 (Figura 8), se emplearon 4 hembras por grupo y en la realización del protocolo 2 (Figura 9) se emplearon 16 hembras por grupo, las cuales fueron divididas en 4 hembras por subgrupo.

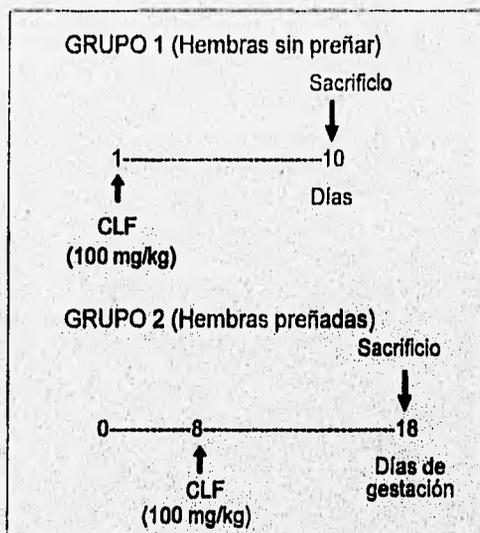


Figura 8.- Protocolo 1 empleado para determinar origen de los anillos verdes y su relación con los sitios de implante

7. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES ESQUELÉTICAS

Las dos terceras partes de los fetos que se fijaron en etanol al 70% (Sigma, México) durante 24 horas, se desvicieron bajo un microscopio estereoscópico, para

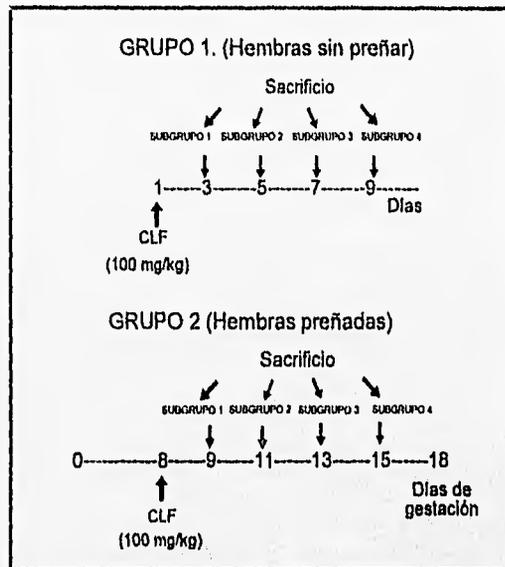


Figura 9.- Protocolo 2 empleado para determinar origen de los anillos verdes y su relación con los sitios de implante.

posteriormente aclararlos en una solución de KOH al 1% (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA) (realizándoles aproximadamente 3 cambios de solución) y se tiñeron durante 48 horas con una solución de rojo de alizarina al 1% disuelta en KOH al 1% (Sigma Chemical Co. St Louis Mo. USA). Una vez transcurrido este tiempo los fetos fueron lavados con glicerina pura (Sigma México) hasta que ésta ya no se tiñera con el exceso de colorante de los fetos (Figura 10) (Dawson, 1926; Wilson, 1965; Aliverti *et al.*, 1979; Taylor, 1986). Los fetos ya transparentados se revisaron bajo el microscopio estereoscópico para registrar la frecuencia y el tipo de malformaciones esqueléticas presentes, además de contar los puntos de osificación.

Dentro de las cuantificaciones realizadas de los puntos de osificación se consideraron extremidades tanto delanteras como traseras, costillas y esternones.

Los tipos de alteraciones esqueléticas observados se clasificaron en:

A) alteraciones en costillas

- 1) falta de osificación (cuando los huesos presentaban una apariencia porosa)
- 2) costillas supernumerarias (más de 26 costillas, parciales o completas)

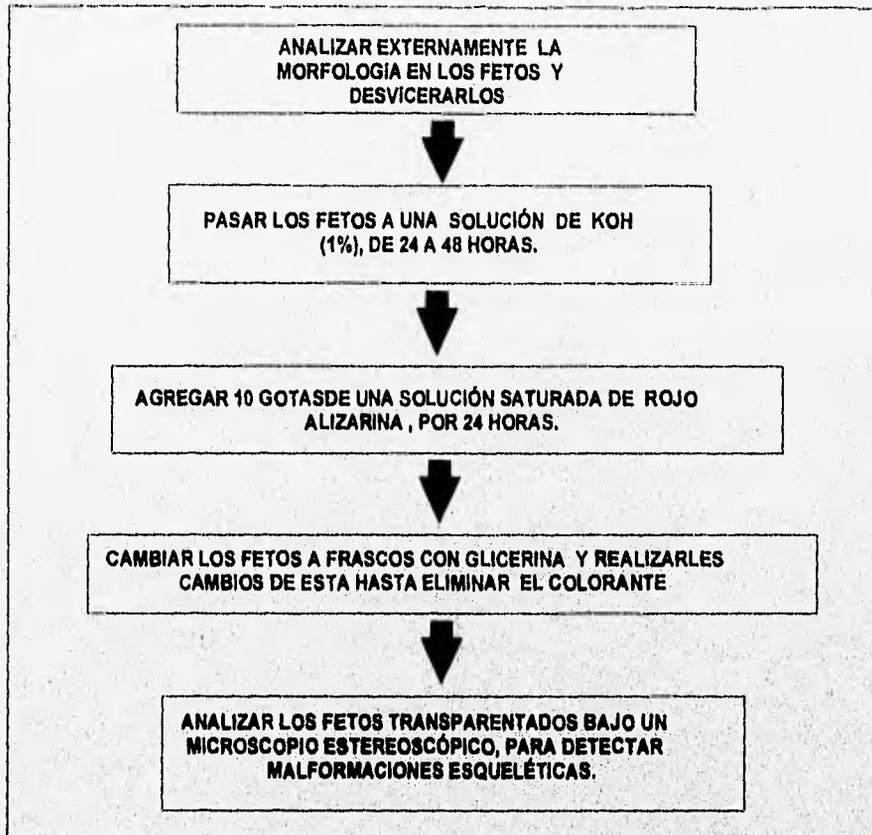


Figura 10.- Técnica de aclaramiento de fetos para el análisis de alteraciones esqueléticas.

3) costillas malformadas, considerándose a las bifurcadas (distal o proximal), fusionadas (proximal, distal, central o total) y onduladas (Figura 11), las cuales dependiendo del número de costillas alteradas se dividieron en:

- a) de una a dos costillas malformadas (daño bajo).
- b) de tres a ocho costillas malformadas (daño mediano).
- c) de nueve a veintiséis costillas malformadas (daño alto).

B) alteraciones en esternones

- 1) falta de osificación (cuando los huesos presentaban una apariencia porosa)

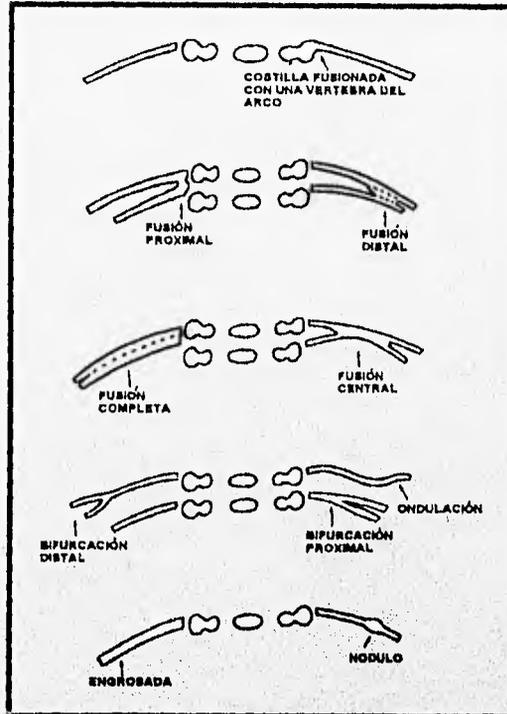


Figura 11.- Esquema de los diferentes tipos de alteraciones presentes en las costillas (Taylor, 1986).

2) esternebbras malformadas, considerándose a las fusionadas, a las hiperplásicas, a las hemiesternebbras, a las bifurcadas y a las asimétricas (Figuras 12 y 13), las cuales dependiendo del número de esternebbras alteradas se dividieron en:

- a) una esternebra malformada (daño bajo).
- b) dos a tres esternebbras malformadas (daño mediano).
- c) cuatro a seis esternebbras malformadas (daño alto).

C) alteraciones en columna

Las alteraciones esqueléticas en columna se consideraron cuando existían 2 vértebras fusionadas, vértebras asimétricas, vértebras divididas, vértebras desplazadas y/o cuando la columna daba la apariencia de estar en forma de "S" (Figuras 14 y 15).

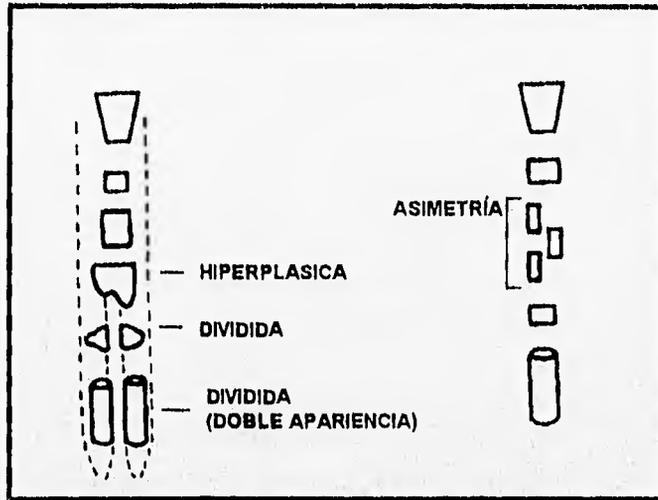


Figura 12.- Esquema de algunas de las alteraciones observadas en esternón (Taylor, 1986)

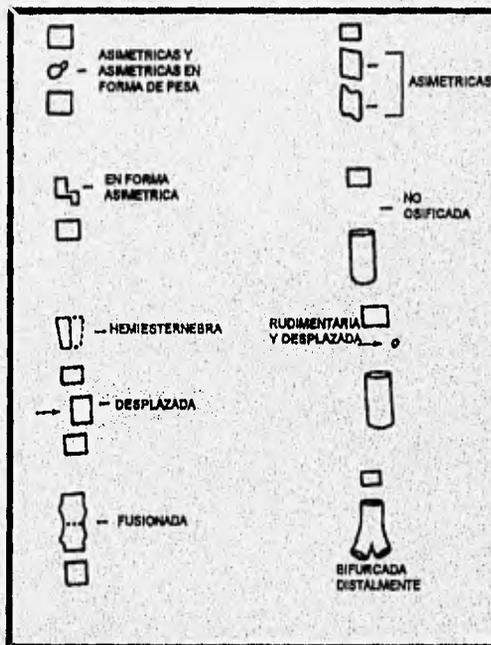


Figura 13.- Esquema de algunas de las alteraciones observadas en las esternobras (Taylor, 1986).

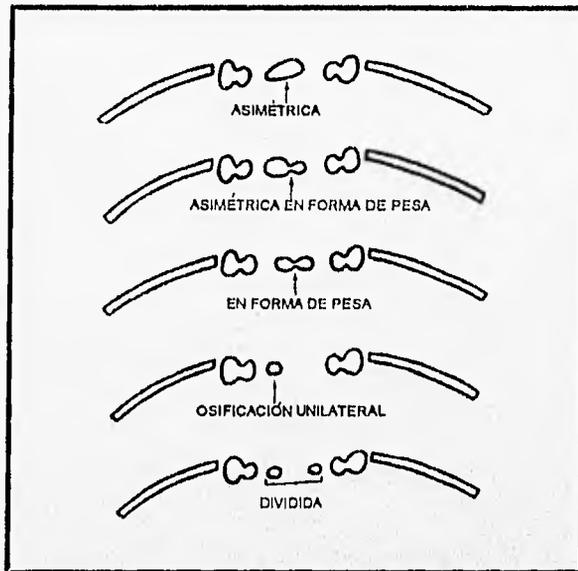


Figura 14.- Esquema de algunas de las alteraciones observadas en las vértebras (Taylor, 1986).

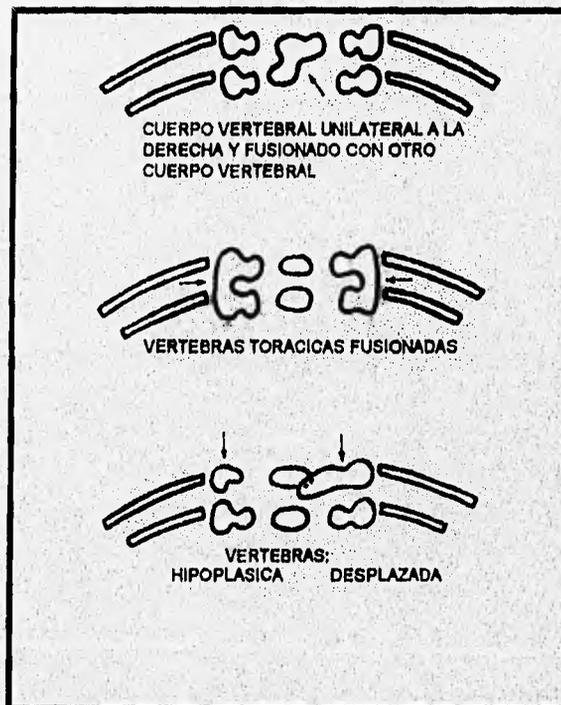


Figura 15.- Esquema de algunas de las alteraciones observadas en las vértebras (Taylor, 1986).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de peso fetal, frecuencia de implantes, fetos vivos, reabsorciones y puntos de osificación se muestran en media \pm error estándar (e.e.) y fueron analizados usando la prueba de "t" de Student, mientras que la proporción de sexos fue analizada con la prueba Chi-cuadrada. El incremento en los pesos de las hembras preñadas, con y sin camada, así como la proporción de camadas con fetos anormales (con malformaciones tanto externas como internas), se muestra en porcentajes y fueron analizadas con la prueba de "Z" para proporciones.

VII. RESULTADOS

1. ESTUDIOS PRELIMINARES

En las tablas 5, 6, 7, 8 y 9, se muestran los resultados obtenidos en los experimentos preliminares (protocolo para la elección del tratamiento de los grupos testigo (Figura 5)), en donde se observa que no existen diferencias significativas al administrar a las hembras preñadas en el día 8 de gestación por vía i.p. el vehículo de la CLF (0.25 ml de agua destilada), sobre el desarrollo de las camadas (Tabla 5), en la frecuencia de malformaciones externas (Tabla 6), en el grado y número de puntos de osificación en los fetos (Tabla 7 y 8), ni en la frecuencia de malformaciones internas (esqueléticas) (Tabla 9), comparadas con las hembras preñadas a las cuales no se les administró el vehículo. A partir de estos resultados se optó por emplear como grupo testigo a hembras preñadas sin la aplicación del vehículo durante el período de gestación.

2. TRATAMIENTOS CON CLF

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos del análisis del incremento de los pesos durante la gestación de las hembras preñadas con y sin camadas obtenidas en el día 18 de gestación, en donde se observa que todas las hembras que presentaron camadas (independientemente de si eran testigo o tratadas), tuvieron un incremento en el peso similar durante toda la gestación (Figura 16), mientras que en las hembras preñadas sin camada se observó un incremento en el peso similar hasta el día 8 de gestación (día en el cual fue administrado el tratamiento de CLF) y a partir de éste, su peso empezó a disminuir hasta regresar a su peso inicial (Figura 17). La disminución en el incremento del peso en las hembras preñadas que no presentaron y que se les administraron las dosis de 20, 40, 50 ó 100 mg/kg de CLF, resultó estadísticamente significativo a partir del día 12 de gestación, al compararlos con el incremento de peso que se dio en las hembras del grupo testigo. Para el caso de las hembras preñadas que se les administró la dosis de 20 mg/kg de CLF, únicamente una hembra no presentó camada por lo que la disminución en el incremento de peso fue significativo solo para el día 18 de gestación (Tabla 10).

Tabla 5.- Desarrollo embrionario y fetal de las hembras preñadas sin administración del vehículo (0.25 ml de agua destilada) Testigo 1 y hembras preñadas tratadas con el vehículo (0.25 ml agua destilada) Testigo 2.

	Hembras preñadas	Hembras con implantos y camadas	Implantes hembra	Reabsorciones hembra	% de muerte embrionaria	Fetos muertos hembra con camada	Fetos vivos hembra con camada	Peso fetal (g)	Proporción de sexos de fetos vivos (♀/♂)
Testigo 1	6/6	5/5	12.8±0.8	0	1.56	0.2±0.2	12.6±0.9	1.4±0.04	1.1/0.9
Testigo 2	5/6	5/5	12.4±0.5	0	0	0	12.4±0.5	1.5±0.1	0.9/1.1

Tabla 6.- Frecuencia de malformaciones externas observadas en los fetos de hembras preñadas sin la administración del vehículo (0.25 ml de agua destilada) Testigo 1 y hembras preñadas tratadas con el vehículo (0.25 ml de agua destilada) Testigo 2.

	Numero de animales examinados	Numero total de fetos	Camadas con fetos normales	Numero total de fetos malformados (%)	Frecuencia de exencefaleas (%)
Testigo 1	5	64	0/5	0 (0)	0/64 (0)
Testigo 2	5	62	1/5	1 (1.61)	1/62 (1.61)

Tabla 7.- Osificación en costillas y esternebros en los fetos de hembras preñadas sin la administración del vehículo (Testigo 1) y hembras preñadas tratadas con agua destilada (Testigo 2).

	Numero de fetos analizados	Numero de fetos con costillas alteradas (%)	Numero de fetos con esternebros alteradas (%)
Testigo 1	45	0 (0)	2 (4.44)
Testigo 2	42	0 (0)	2 (4.76)

Tabla 10.- Promedios por grupo del incremento en el peso durante la gestación de las hembras preñadas tratadas con CLF, con y sin camadas.

	Dosis CLF (mg/kg)	n	Peso día 0 (g)	Incremento del peso al día 7 (g)	Incremento del peso al día 14 (g)	Incremento del peso al día 21 (g)	Incremento del peso al día 28 (g)
TESTIGO	0	19	34.78	2.94 (8.48)	6.22 (17.91)	10.70 (30.81)	28.17 (81.11)
TRATADAS CON CAMADA	20	17	31.57	4.36 (13.81)	6.66 (21.09)	10.92 (34.59)	25.02 (79.25)
	40	13	34.93	3.51 (10.05)	5.63 (16.12)	10.49 (30.03)	25.37 (72.63)
	50	5	32.54	3.98 (12.23)	6.98 (21.45)	10.90 (33.49)	25.76 (79.16)
TRATADAS SIN CAMADA	20	1	25.1	2.10 (6.37)	1.10 (4.38)	1.60 (6.37)	0.30 (1.19) ^a
	40	4	32.2	4.57 (14.19)	1.85 (6.74)	2.12 (6.58) ^a	1.45 (4.50) ^b
	50	14	34.18	2.91 (8.51)	2.07 (6.06)	2.97 (8.69) ^a	2.29 (6.70) ^b
	100	18	34.23	2.90 (8.47)	0.66 (1.93)	0.59 (1.72) ^a	0.55 (1.61) ^b

^ap<0.05 vs el testigo; ^bp<0.005 vs el testigo con prueba de Z para proporciones.

Tabla 8.- Frecuencia de puntos de osificación presentes en los fetos de hembras preñadas sin la administración del vehículo (0.25 ml de agua destilada) Testigo 1 y hembras preñadas tratadas con el vehículo (0.25 ml de agua destilada) Testigo 2.

	Numero de fetos analizados	Extreminades anteriores (x ± e.e.)	Extremidades posteriores (x ± e.e.)	Esternebras (x ± e.e.)
Testigo 1	45	15.9±0.21	17.0±0.25	6.0±0.31
Testigo 2	42	15.9±1.53	17.1±1.75	5.9±0.31

Tabla 9.- Frecuencia de alteraciones esqueléticas en los fetos de hembras preñadas sin la administración del vehículo (0.25 ml de agua destilada) Testigo 1 y hembras preñadas tratadas con el vehículo (0.25 ml de agua destilada) Testigo 2.

	No. de fetos analizados	Costillas con alteraciones	Costillas con alteraciones de forma	Costillas con alteraciones de tamaño	Costillas con alteraciones de posición	Esterne- bras con alteraciones de tamaño	Esterne- bras con alteraciones de posición mediante	Esterne- bras con alteraciones de tamaño alto	Anormali- dades en columna vertebral
Testigo 1	45	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6.67)	2 (4.44)	6 (13.33)	1 (2.22)	0 (0)
Testigo 2	42	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (14.28)	3 (7.14)	2 (4.76)	2 (4.76)	0 (0)

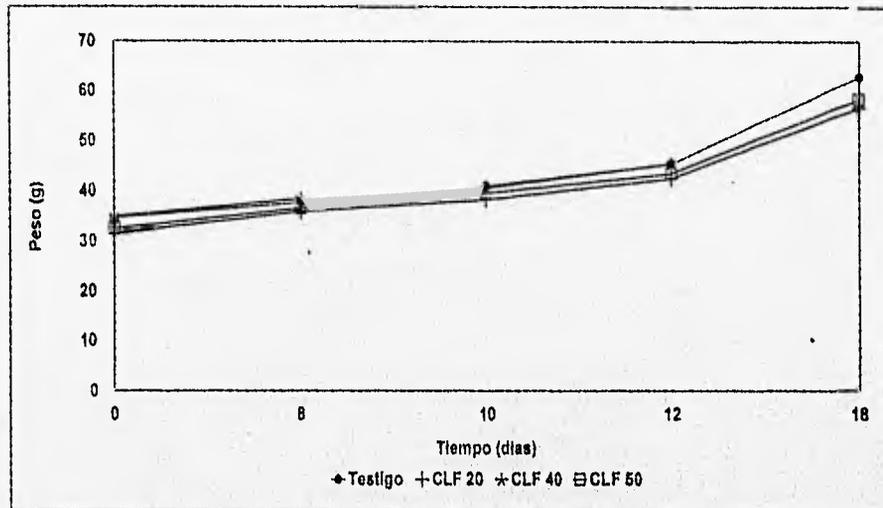


Figura 16.- Promedios de los incrementos en el peso durante la gestación de las hembras preñadas que tuvieron camada.

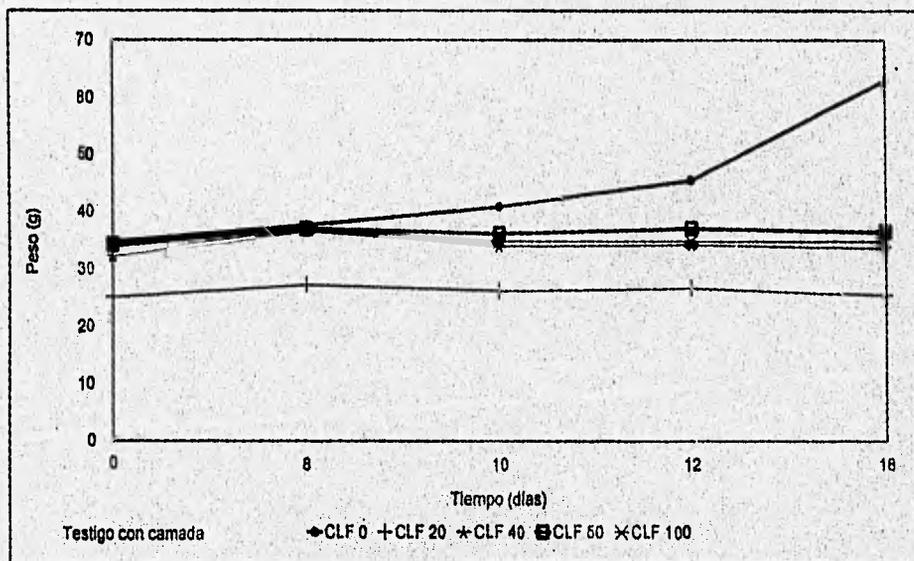


Figura 17.- Promedios de los incrementos en el peso durante la gestación de las hembras preñadas que no tuvieron camada (testigos con camada).

3. ESTUDIO DE EMBRIOTOXICIDAD

En todos los casos la disminución de peso estuvo correlacionada con la ausencia de camadas en las hembras. Para el día 18 de gestación el 100% de las hembras preñadas presentaron camada en el grupo testigo, mientras que en el grupo tratado con la dosis de 100 mg/kg, ninguna de las hembras preñadas tuvieron camada. Para las dosis de 50 mg/kg el porcentaje de hembras preñadas con camada fue de 26.3%, para la de 40 mg/kg aumentó a un 76.5% y para la de 20 mg/kg no hubo efecto, ya que un 94.4% de las hembras preñadas presentaron camada (Tabla 11).

Tabla 11.- Desarrollo embrionario y fetal en hembras preñadas tratadas por vía i.p. el día 8 de gestación con diferentes dosis de CLF.

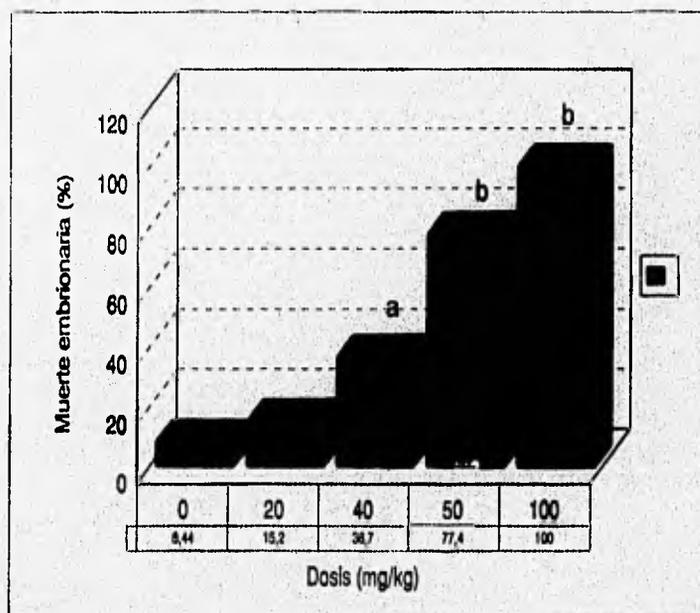
	0	20	40	50	100
Frecuencia de Hembras preñadas	19/21	18/20	17/20	19/21	18/19
No de hembras con implantes o camadas (%)	19/19 (100)	17/18 (94.4)	13/17 (76.5) ^a	5/19 (26.3) ^b	0/18 (0) ^b
Implantes/hembra (x±e.e.)	13.2±0.57	11.6±0.63	12.0±0.60	12.6±0.67	12.8±0.41
Reabsorciones/hembra (x±e.e.)	0.7±0.23	1.6±0.53	4.1±1.49 ^c	9.7±1.45 ^d	12.8±0.41 ^d
Fetos vivos/hembra con camada (x±e.e.)	12.1±0.49	10.5±0.62	10.4±0.83	10.8±0.58	-----
Fetos muertos/hembra con camada (x±e.e.)	0.4±0.14	0.1±0.08	0.4±0.27	0.2±0.20	-----
Peso fetal (g) (x±e.e.)	1.4±0.02	1.4±0.02	1.4±0.02	1.4±0.03	-----
Proporción de sexos en fetos vivos (♀/♂)	0.93/1.07	1.07/0.93	0.95/1.05	0.95/1.05	-----

^ap<0.05 vs. el Testigo; ^bp<0.005 vs. el Testigo, con prueba de Z para proporciones
^cp<0.05 vs. el Testigo; ^dp<0.005 vs. el Testigo, con prueba de "t" de Student

En cuanto al número de implantes y la proporción de fetos vivos y muertos del total de fetos obtenidos por hembra, la administración de la CLF no mostró efecto. De igual forma al evaluar el peso fetal y la proporción de sexos en los fetos extraídos en el día 18 de gestación por cesárea, no se observaron efectos significativos al administrar las diferentes dosis de CLF, comparados con los fetos obtenidos de las hembras testigo (Tabla 11).

Con respecto al número de reabsorciones por hembra, en los grupos de las hembras preñadas tratados con las diferentes dosis de CLF, se observó que conforme se incrementaba la concentración aumentaba el número de reabsorciones, siendo estadísticamente significativos a partir de la dosis de 40 mg/kg (Tabla 11), lo cual está correlacionado con la ausencia de camadas en las hembras preñadas y la disminución del incremento de peso a partir del día 8 de gestación (Tabla 10), estos eventos indican la muerte embrionaria (efecto embriotóxico) inducida por la CLF, la cual como lo muestra la figura 18, presentó en una relación dosis-respuesta muy clara.

Figura 18.- Efecto embriotóxico (muerte embrionaria) inducido por la administración de CLF a hembras preñadas.



Cuando se realizó el análisis de los úteros para cuantificar el número de implantes y el número de fetos presentes, en todos los casos de las hembras tratadas con CLF que no presentaban fetos o que el número de productos por camada disminuyó, se observó la presencia de unos anillos verdes por fuera del útero en la misma posición en la que debían presentarse los fetos.

Para establecer el posible origen de estos anillos verdes y poderlos correlacionar con las muertes embrionarias y las reabsorciones, se realizaron una serie de protocolos en los cuales a hembras sin preñar y hembras preñadas se les trató con la dosis más alta de CLF (100 mg/kg) (Figura 8). Los resultados obtenidos mostraron que cuando se les administró la CLF a las hembras sin preñar y fueron sacrificadas 10 días después no se detectó la presencia de los anillos verdes en los úteros (Figura 19a), mientras que cuando se le administró la CLF a las hembras preñadas, sí se observaron los anillos verdes a lo largo del útero, al ser sacrificadas 10 días después (Figura 19b). La formación de estos anillos verdes en los úteros guardó una disposición similar a la de las reabsorciones y a la de los fetos que se observaron a lo largo de los úteros de las de hembras testigo.

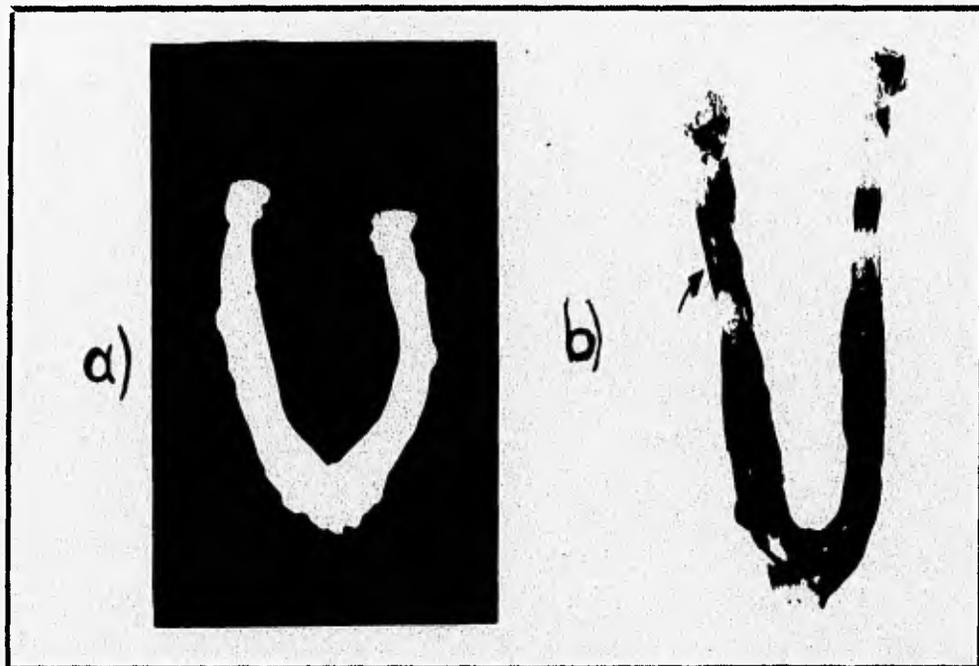


Figura 19.- Úteros de hembras tratadas con 100 mg/kg de CLF, a) hembra sin preñar y b) hembra preñada.

Por otra parte cuando nuevamente se administró la CLF (100 mg/kg) a diferentes subgrupos de hembras preñadas en el día 8 de gestación y se sacrificaron en diferentes días post-tratamiento (Figura 9), se encontró que para el día 9 de gestación (un día después de la administración del tratamiento), los sacos vitelinos estaban hemolíticos y no había respuesta embrionaria aparente, además de presentarse indicios del inicio de reabsorción (Figura 20a). La reabsorción del embrión se observó claramente alrededor del día 13 de gestación (Figura 20c), 5 días después de haber sido administrada la CLF, mientras que para el día 15 de gestación el tejido embrionario ya no podía ser identificado claramente al abrir los úteros, sino únicamente se tenían marcas verdes a lo largo del útero (anillos verdes), similar a lo observado en el día 18 de gestación (Figura 19b). En la figura 21 se muestra el seguimiento del desarrollo embrionario y fetal, para las crías de las hembras testigo al emplear el protocolo de la figura 9.

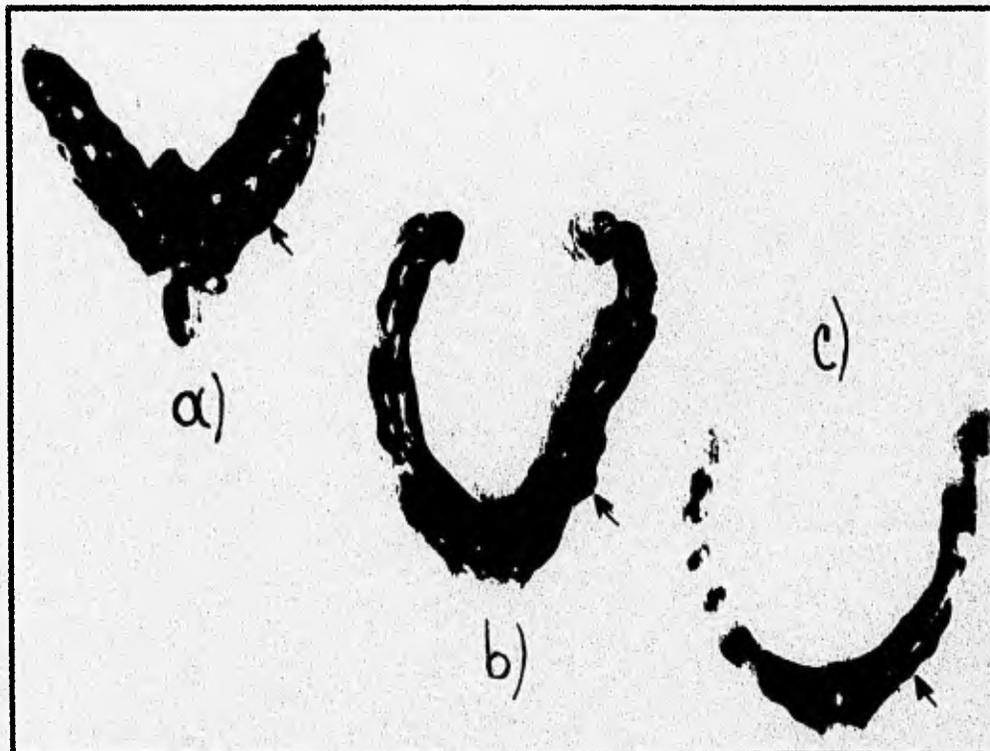


Figura 20.- Seguimiento del desarrollo de las camadas a partir del día 8 de gestación de hembras tratadas con 100 mg/kg de CLF.

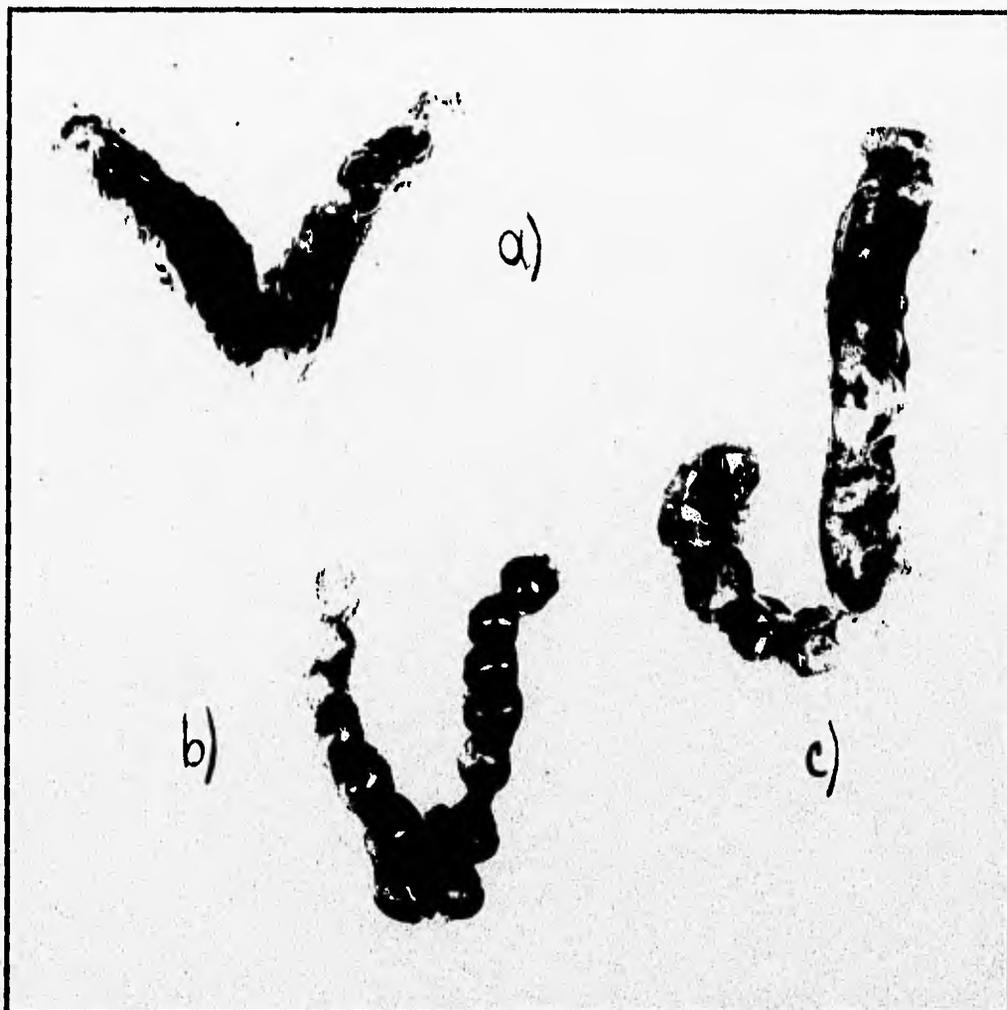


Figura 21.- Seguimiento del desarrollo de las camadas a partir del día 8 de gestación de hembras testigo.

Cuando se realizó el análisis de los anillos verdes se observó que éstos se presentaron por fuera del útero en algunos casos desde el día 11 de gestación (Figura 20b) y en la misma posición de los embriones o fetos presentes (Figura 22). Para el día 18 de gestación, los anillos verdes eran muy evidentes por fuera del útero (Figura 19b) sin encontrar rastros de tejido fetal. En el caso de las reabsorciones tardías, en las cuales aún se detecta parte del tejido fetal, los anillos verdes se encontraron por fuera del útero coincidiendo con la posición de éstas.

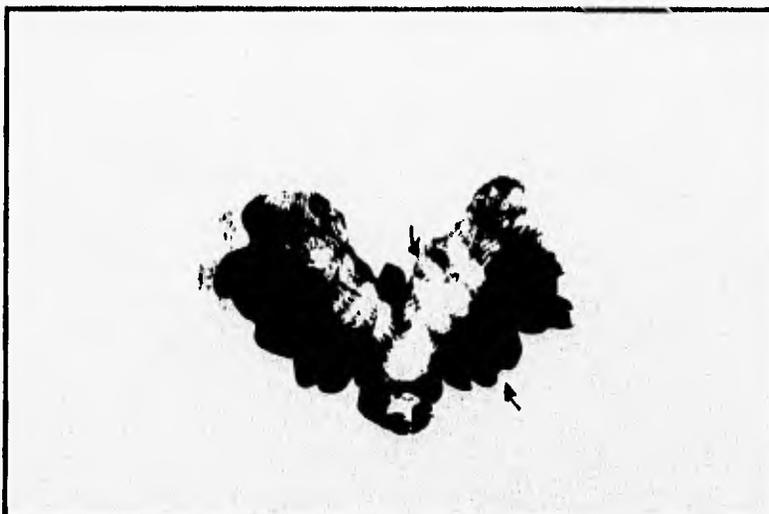


Figura 22.- Útero con reabsorciones y anillos verdes de hembra preñada tratada con 100 mg/kg de Clorofilina (día 13 de gestación).

4. ALTERACIONES EXTERNAS (macroscópicas)

Las alteraciones externas que se observaron en los fetos extraídos el día 18 de gestación se muestran en la tabla 12. En la dosis de 50 mg/kg de CLF se encontraron dos fetos con malformaciones, uno con labio leporino y paladar hendido (Figura 23) y el otro con exencefalea y párpados abiertos (Figura 24) (en ambos casos $p < 0.05$ con prueba de diferencia de proporciones vs el testigo).

En la dosis de 40 mg/kg de CLF, se observaron tres casos con dolicocefalea (Figura 25), la cual correspondió a un 2.54%, esta malformación se presentó en tres fetos de la misma camada y los tres fetos estaban muertos ($p < 0.05$ con prueba de diferencia de proporciones vs el testigo). En este mismo tratamiento se observó también un caso de polidactilia (Figura 26) y una hipoplásia de una de las extremidades posteriores asociada a una de las dolicocefaleas (Figura 25). Otra de las malformaciones observadas fue párpados abiertos en la dosis de 20 mg/kg.

Tabla 12.- Frecuencia de las malformaciones externas en los fetos de hembras preñadas tratadas por vía i.p. el día 8 de gestación con diferentes dosis de clorofilina.

	Dosis (mg/kg)			
	0	20	40	50
No de camadas analizadas	18	17	11	5
Camadas con fetos anormales	2/18	1/17	2/11	1/5
No total de fetos	225	180	118	55
Fetos alterados (%)	2/225 (0.88)	1/180 (0.55)	4/118 (3.39)	2/55 (3.64)
Labio leporino (%)	0/225 (0)	0/180 (0)	0/118 (0)	1/55 (1.81) ^a
Paladar hendido (%)	0/225 (0)	0/180 (0)	0/118 (0)	1/55 (1.81) ^a
Excencefalea (%)	0/225 (0)	0/180 (0)	0/118 (0)	1/55 (1.81) ^a
Dolicocefalea (%)	0/225 (0)	0/180 (0)	3/118 (2.54) ^a	0/55 (0)
Polidactilia (%)	0/225 (0)	0/180 (0)	1/118 (0.84)	0/55 (0)
Hipoplasia en extremidades posteriores (%)	0/225 (0)	0/180 (0)	1/118 (0.84)	0/55 (0)
Párpados abiertos (%)	2/225 (0.89)	1/180 (0.55)	0/118 (0)	1/55 (1.81)

^ap<0.05 vs. el Testigo, con prueba de Z para proporciones

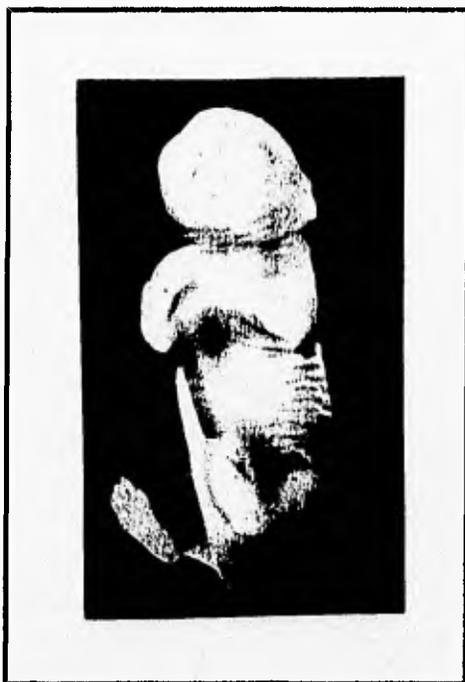


Figura 23.- Labio leporino y paladar hendido.



Figura 24.-Exencefalea y párpados abiertos.



Figura 25.- Dolicocefalea y atresia extremidad posterior.



Figura 26.- Poldactilia.

5. ALTERACIONES INTERNAS (esqueléticas)

5.1. Puntos de osificación

En dos terceras partes de los fetos totales se contaron los puntos de osificación en costillas, esternón, extremidades anteriores y posteriores. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13, en donde se observa que únicamente la dosis de 20 mg/kg de CLF altero el número de puntos de osificación tanto en las extremidades anteriores como en las posteriores ya que los disminuyó (aproximadamente un punto de osificación por extremidad)(Figura 27a y b), mientras que en esternones y costillas, el número de los puntos de osificación en los fetos no fué alterado cuando se administró a las hembras gestantes CLF (20, 40 y 50 mg/kg).

Tabla 13.- Puntos de osificación en los fetos de hembras preñadas tratadas por vía i.p. el día 8 de gestación con diferentes dosis de clorofilina.

	Dosis (mg/kg)			
	0	20	40	50
No de fetos analizados	146	119	79	36
Extremidades delanteras (x±e.e.)	16.3±0.09	15.2±0.19 ^a	16.2±0.11	16.2±0.12
Extremidades traseras (x±e.e.)	17.3±0.14	16.5±0.14 ^a	17.6±0.15	16.7±0.27
Esternebras (x±e.e.)	6.0±0.02	6.0±0.01	6.0±0.02	6.1±0.04

^aP<0.05 vs el Testigo Con prueba de "t" de Student

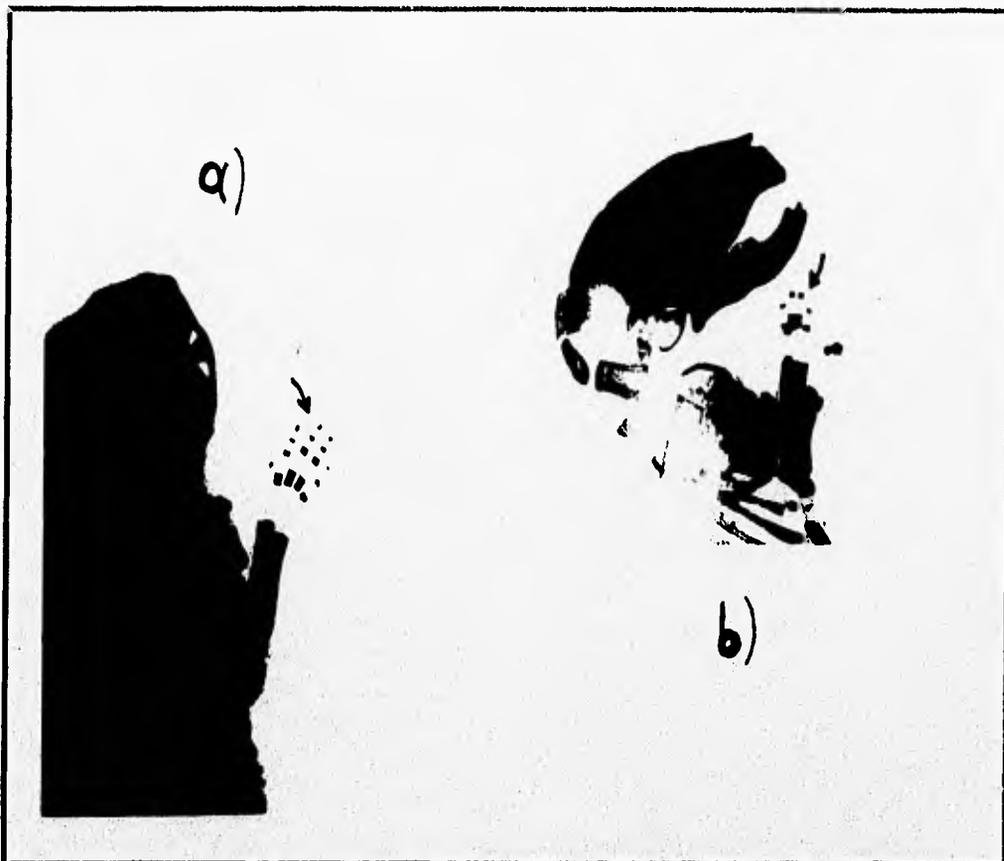


Figura 27.- Puntos de osificación, a) fetos de hembras testigo y b) fetos de hembras tratadas con 20 mg/kg de CLF.

5.2. Grado de osificación

Cuando se realizó el análisis del grado de osificación, se observaron deficiencias en la osificación tanto en costillas como en esternón (se consideró la falta de osificación al esqueleto con apariencia porosa). La tabla 14, muestra que para las dosis de 50 y 40 mg/kg de CLF, el grado de osificación en costillas disminuyó ($p < 0.05$ con prueba de "Z" para diferencia de proporciones). En cuanto a la osificación del esternón, pesar de observar falta de osificación en algunos fetos, para ninguna de las dosis administradas éstas alteraciones resultaron estadísticamente significativas, con respecto al testigo.

Tabla 14.- Efecto de la clorofilina sobre el proceso de osificación en fetos de hembras preñadas tratadas por vía i.p. el día 8 de gestación.

	Dosis (mg/kg)			
	0	20	40	50
No. de fetos analizados	146	120	79	36
Fetos con costillas alteradas (%)	0/146 (0)	1/120 (0.8)	3/79 (3.8) ^a	2/36 (5.5) ^a
Fetos con esternebros alterados (%)	8/146 (5.5)	6/120 (5.0)	7/79 (8.9)	1/36 (2.8)

^ap<0.05 vs. el Testigo con prueba de Z para proporciones.

5.3. Malformaciones esqueléticas

En la tabla 15 se muestran las malformaciones esqueléticas observadas al administrar los diferentes tratamientos de CLF. Cuando se analizaron los fetos obtenidos y se clasificaron las malformaciones en los diferentes grados, se encontró que para la dosis de 50 mg/kg la frecuencia de malformaciones en las costillas era del 5.5% para la de daño mediano, mientras que para el daño alto del 11.1%, las cuales resultaron estadísticamente significativas. En la dosis de 40 mg/kg se observó únicamente malformaciones estadísticamente significativas para la inducción de daño bajo (6.3%). Sin embargo para la dosis de 20 mg/kg la inducción de éste tipo de malformaciones (esqueléticas de daño bajo, mediano y alto) ya no resultaron estadísticamente significativas comparadas con los testigos.

En cuanto a las malformaciones observadas en los fetos obtenidos en esternebros, únicamente se encontró efecto significativo en la inducción de malformaciones de daño alto en la dosis de 50 mg/kg, mientras que en los fetos obtenidos de las madres tratadas con otras dosis de CLF empleadas (40 y 20 mg/kg) a pesar de que también mostraron este tipo de alteraciones, éstas no resultaron estadísticamente significativas al compararlas con los testigos.

De las malformaciones observadas en la columna de los fetos obtenidos (dos vértebras fusionadas, vértebras desplazadas ó columna en forma de "S" etc.), solo se encontró efecto significativo en los obtenidos de las hembras tratadas con la dosis de 50 mg/kg de CLF (24.9% vs 3.42 del testigo; $p < 0.05$ con prueba de diferencia de proporciones). En los fetos obtenidos de las hembras tratadas con las otras dosis administradas, no se observaron éstas alteraciones por lo cual no se presentaron efectos significativos sobre la inducción de éste tipo de malformaciones.

Tabla 15.- Frecuencia de malformaciones esqueléticas en los fetos de hembras preñadas tratadas por vía i.p. el día 8 de gestación con diferentes dosis de clorofilina.

No. de fetos analizados	Dosis (mg/kg)			
	146	120	79	36
COSTILLAS				
Daño bajo (%)	0/146 (0)	2/120 (1.7)	5/79 (6.3) ^b	0/36 (0)
Daño mediano (%)	0/146 (0)	0/120 (0)	1/79 (1.3)	2/36 (5.6) ^b
Daño alto (%)	0/146 (0)	0/120 (0)	2/79 (2.5)	4/36 (11.1) ^b
Supernumerarias (%)	34/146 (23.3)	20/120 (16.7)	16/79 (20.2)	7/36 (19.4)
ESTERNEBRAS				
Daño bajo (%)	10/146 (6.85)	16/120 (13.3)	6/79 (7.6)	1/36 (2.8)
Daño mediano (%)	20/146 (13.7)	21/120 (17.52)	14/79 (17.7)	4/36 (11.1)
Daño alto (%)	1/146 (2.7)	0/120 (0)	2/79 (2.5)	2/36 (5.3) ^a
COLUMNA (%)	5/146 (3.42)	2/120 (1.67)	7/79 (8.9)	9/36 (24.9) ^b

^a $p < 0.05$ vs el Testigo; ^b $p < 0.005$ vs el Testigo con prueba de Z para proporciones

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el efecto de la CLF sobre el desarrollo embrionario y fetal del ratón *in vivo*. Los resultados obtenidos muestran que al administrar la CLF a hembras preñadas en el día 8 de gestación se indujo muerte embrionaria en una relación dosis-respuesta, además de la presencia de algunas alteraciones morfológicas externas e internas (esqueléticas) en los fetos obtenidos en el día 18 de gestación.

En los primeros experimentos realizados en este estudio se probó el efecto del vehículo para administrar la CLF (0.25 ml agua destilada). Al comparar los resultados del grupo de hembras preñadas a las cuales se les administró por vía i.p. el agua destilada en el día 8 de gestación, con el grupo de hembras preñadas que continuó el desarrollo embrionario sin la administración de ninguna sustancia (control negativo), se encontró que el vehículo por sí solo no inducía alteraciones sobre el desarrollo embrionario y fetal. Estos datos concuerdan con lo reportado por otros autores los cuales tampoco han encontrado efectos significativos en el desarrollo de las camadas e inducción de malformaciones al administrar, por diferentes vías, agua destilada a grupos de hembras preñadas (Hackman y Brown, 1972; Seidenberg *et al.*, 1986; Muther, 1988; Bannigan *et al.*, 1990). Con base en estos resultados en los protocolos empleados en este estudio se optó por no administrarles el vehículo de la CLF a las hembras preñadas que correspondían a los grupos testigos.

A nivel experimental en ninguno de los trabajos realizados con diferentes sistemas de prueba, la CLF ha mostrado efectos genotóxicos o citotóxicos (Lai *et al.*, 1980; Arimoto *et al.*, 1980a y b; Ong *et al.*, 1986; Hadnagy y Seemayer, 1988; Bronzetti *et al.*, 1990; Zimmering *et al.*, 1990; Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994; Wu *et al.*, 1994), inclusive en los estudios en los cuales se han administrado altas dosis de la CLF a animales de experimentación, éstos no han mostrado signos de toxicidad aparentes (Renner, 1985; 1990; Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994), sin embargo los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que al administrar la CLF por vía i.p., durante el día 8 de gestación ésta indujo muerte embrionaria (efecto embriotóxico), en forma dosis dependiente, ya que la dosis más alta de CLF produjo el 100% de la muerte de las crías, y disminuyó conforme a la concentración de CLF administrada,

siendo la inducción de muerte en la dosis de 20 mg/kg no significativa en comparación con las hembras testigo.

En la literatura existente no hay datos de los efectos de la CLF sobre el desarrollo embrionario, fetal o sobre el proceso reproductivo en general, por lo que a partir de los resultados aportados por otros autores los cuales emplean diferentes agentes químicos se han planteado dos posibles hipótesis por las cuales la CLF podría inducir la muerte embrionaria:

a) por toxicidad materna (mecanismo indirecto) (Khera, 1984; 1985).

A partir de los trabajos de Khera (1984; 1985), en los cuales realiza una serie de recopilaciones de los datos publicados por otros autores sobre el efecto de diferentes agentes químicos sobre el desarrollo embrionario y fetal en el ratón, la rata, el hámster y el conejo, se planteó la posibilidad de que ciertas alteraciones observadas durante el desarrollo fueran debidas a toxicidad materna más que por un efecto directo del agente sobre el embrión o el feto.

A la toxicidad materna se le ha asociado con las alteraciones en el desarrollo del embrión o del feto, ya que una alteración en la fisiología y metabolismo de las madres a consecuencia de algún agente químico exógeno, ya que al excede la capacidad de detoxificación y eliminación del agente químico por la madre, se pueden alterar algunos procesos fisiológicos que a su vez alteran el desarrollo de las crías normales, incluyendo la muerte.

Khera (1984; 1985; 1991) y algunos otros autores, han planteado al mecanismo de daño por de toxicidad materna en aquellos casos en los cuales la inducción de alteraciones en las crías de madres tratadas (agentes químicos) fuera muy baja, poco frecuente y que no presentara un comportamiento dosis-dependiente.

Los datos encontrados en este trabajo muestran un comportamiento similar a lo propuesto por Khera para el mecanismo de toxicidad materna, dado que para las alteraciones encontradas no se observó un relación dosis-respuesta y se presentaron en una inducción y frecuencia baja. A pesar de estos datos el único signo aparente observado de toxicidad materna fue la disminución del peso corporal a partir de la administración de la CLF. Sin embargo éstas evidencias apoyan la posibilidad de que las

alteraciones observadas y la muerte embrionaria, hayan sido por medio toxicidad materna.

b) por toxicidad en glándulas metriales-saco vitelino (mecanismo directo) (William *et al.*, 1976; Hood, 1989).

A partir del análisis de los sitios de implantación durante la realización del estudio, en donde se encontró que cuando se administró la dosis más alta de CLF, además de inducir el 100% de muerte embrionaria, aparecían por fuera del útero unas marcas verdes, en forma de anillos, las cuales presentaban un número y disposición similar a la que presentaba los fetos en los úteros de hembras testigos y a las reportadas en otros trabajos (Taylor, 1986; Szabo, 1989). Estas observaciones permiten suponer una posible relación entre las marcas y la muerte de los embriones.

Cuando se administraron 100 mg/kg de CLF a grupos de hembras sin preñar y a hembras preñadas al sacrificarlas 10 días después de la administración, se observó que los úteros de las hembras sin preñar no presentaron marcas, mientras que en los úteros de las hembras preñadas sí se encontraron los anillos verdes. Estos resultados indican claramente que los anillos verdes están asociados con los sitios donde había existido implante y la posterior muerte y reabsorción embrionaria.

Además al observar el proceso desde la muerte embrionaria y reabsorción del tejido embrionario hasta la formación de los anillos, cuando a grupos de hembras preñadas se les trató en el día 8 de gestación con la misma dosis de CLF (100 mg/kg). Al sacrificar un grupo de hembras cada tercer día después de la administración de la CLF y se realizó el análisis de los implantes y de los embriones, se observó que a las 24 horas de haber sido administrada la CLF ya había muerte embrionaria, encontrándose los úteros y las cavidades amnióticas hemolíticas. Conforme se fueron sacrificando las hembras en días posteriores se pudo observar el proceso de reabsorción del tejido embrionario hasta la aparición de los anillos verdes por fuera del útero, notando que las reabsorciones coincidían con los sitios en los cuales se localizaban los anillos verdes, aún y cuando no habían desaparecido las reabsorciones. Con estos resultados se corroboró que la CLF era la responsable de la muerte embrionaria y de la formación de los anillos verdes.

Con los datos obtenidos hasta el momento no se puede explicar claramente ¿por que se marcaron los sitios de implante con la CLF?, sin embargo a partir de lo que se a descrito tanto en el ratón y en la rata, que a diferencia de otros mamíferos (incluyendo al humano) el saco vitelino rodea el endométrio en forma de anillo (Figura 28), además de existir intercambio de sustancias entre el saco vitelino y el útero que conecta hacia el exterior (Scialli, 1992), se podría explicar la presencia de dichos anillos verdes. Otra de las observaciones realizadas que podrían estar relacionadas con estos eventos es también el hecho de que se ha descrito que únicamente en los roedores existe la presencia de las glándulas metriales en los sitios en los cuales se lleva acabo el implante (Taylor, 1986; Gude *et al.*, 1982).

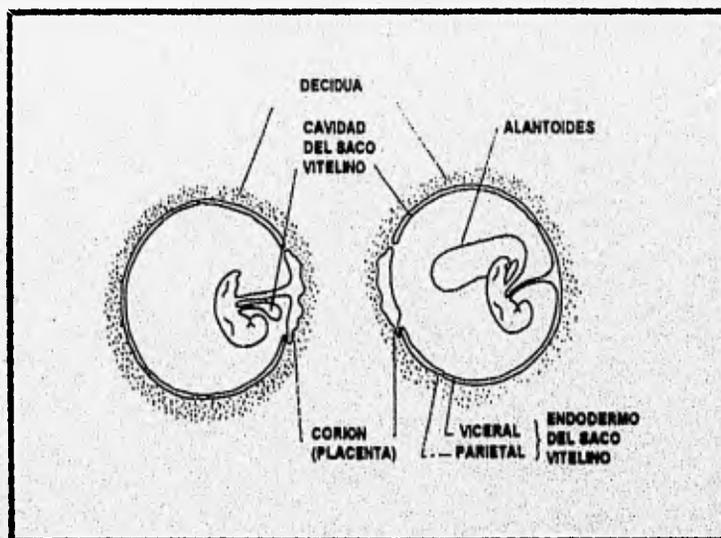


Figura 28. Estructura corionalantoidea vs. placentación tipo saco vitelino. Izquierda: placenta corionalantoidea humana. Derecha: placenta de embrión temprano de rata (Scialli, 1992).

Las glándulas metriales son indicativas de reabsorciones previas y son reconocidas como sitios de implante, ya que se encuentran sobre la superficie externa a lo largo del útero (en el margen metrial) y crecen en los sitios de implante, persistiendo independientemente de que el embrión o feto sobrevivan (Taylor, 1986; Gude *et al.*, 1982), además se han determinado diversos cambios químicos tanto por fuera como por

dentro del útero durante los diferentes estados del desarrollo embrionario y fetal (hormonas y otras sustancias) (Knudsen *et al.*, 1988; Knobil *et al.*, 1994). A partir de esto se puede suponer que las glándulas metriales están asociadas con la forma del saco vitelino ya que ambas sólo se presentan en roedores y debido a los intercambios de sustancias que se llevan a cabo entre el útero, el saco vitelino y el exterior, es necesaria la presencia de estas glándulas para regular dichos procesos fisiológicos.

El hecho que la CLF sea la que forme los anillos verdes en los úteros de las hembras preñadas indica una gran afinidad de la CLF hacia los sitios en los cuales se están desarrollando las crías, así como posiblemente por las glándulas metriales.

A partir de la información encontrada en la literatura, se puede proponer que los posibles mecanismos por los cuales la CLF induce la muerte embrionaria pueden ser varios:

a) Que la CLF se absorba a través del útero y cause toxicidad en saco vitelino. Este tipo de embriotoxicidad ya se ha descrito para otras sustancias como el azul de tripano (Willian *et al.*, 1976), e incluso se ha descrito como una técnica para marcar los sitios de implante, en donde se observa una disposición de los anillos similar a la observada aquí, con la diferencia de que los anillos son azules (Psychoyos, 1973). Taylor (1986), plantea como un técnica de identificación de los sitios de implante la tinción de las glándulas metriales, con compuestos orgánicos como el rojo de glicógeno o con soluciones de sulfato de amonio, ácido clorhídrico y ferrocianuro de potasio, aunque no menciona el mecanismo.

b) Que la CLF forme complejos con algunas de las sustancias que intervienen en estas glándulas. Esta propiedad ya ha sido descrita para la CLF (Newmark, 1987; Daswood *et al.*, 1991; Daswood *et al.*, 1992; Dashwood y Guo, 1992; 1993; Arimoto, 1993), la cual es capaz de limitar la biohabilidad de algunos compuestos para formar complejos moleculares no covalentes con aminas heterocíclicas entre otros compuestos (Dashwood y Guo, 1993), además de formar complejos a través del cromóforo, el cual atrapa a los compuestos (Arimoto *et al.*, 1992; 1993), por lo que no se descarta la posibilidad de que

la CLF esté interactuando de esta forma con algunas de las moléculas de las glándulas metriales y del saco vitelino.

c) Que la molécula de CLF se adsorba a las glándulas metriales y bloquee el intercambio entre éstas y el exterior. El hecho de que la molécula de CLF sea grande (Newmark, 1987) da la posibilidad de que no sea capaz de atravesar fácilmente estos tejidos, por lo que se podría pensar que la CLF se pega a la glándula metrial e impide el funcionamiento de la misma, conduciendo así a la muerte del embrión, aunque existen reportes de que la CLF es capaz de atravesar barreras filtradoras como es el caso de las barreras espermatogénicas (Mendiola-Cruz, 1994).

d) Por medio de la captura de gases como por ejemplo el oxígeno. Dado que tiene la capacidad de capturar el oxígeno entre otros gases, una de las aplicaciones comerciales de la molécula de la CLF consiste en incluiría dentro de las bolsas de los alimentos procesados (Kephart, 1955), además que, las observaciones realizadas muestran que la CLF es capaz de interactuar con los tejidos que forman las estructuras de sostén del embrión, las cuales están muy vascularizadas y existe un alto intercambio gaseoso (Hood, 1989), existe la posibilidad de que la CLF de alguna forma altere el intercambio gaseoso que se lleva a cabo entre la madre y las crías y de esta manera induzca la muerte embrionaria así como las alteraciones que se observaron. Este mecanismo de muerte embrionaria e inducción de alteraciones ya ha sido descrito para otros compuestos (Wilson y Clarke, 1977).

Debido a que en los úteros de las hembras preñadas que no presentaron camada y que fueron tratadas con CLF no fueron apreciables las marcas verdes por dentro, indica que probablemente la CLF no se incorporó al embrión por la vía sangre periférica materna-placenta-embrión, lo cual hace evidente que los mecanismos implicados en la embriotoxicidad de la CLF son más complejos e indirectos.

El hecho de que en el grupo de las hembras tratadas con la dosis de 20 mg/kg, sólo una de ellas no presentó desarrollo de la camada pero sí se logró observar a los anillos verdes y que en las dosis de 40 y 50 mg/kg se incrementó la frecuencia de este tipo de eventos indica que la dosis de la CLF es importante en la inducción de la

embriotoxicidad. Sin embargo el efecto general de la CLF dentro de los grupos tratados siguió la condición todo o nada (Wilson, 1977), esto es que las hembras que lograron desarrollar su camada, lo hicieron de manera normal.

A pesar de que en los fetos extraídos de las hembras tratadas con 50 mg/kg de CLF, solo se observó un solo caso de exencefalea (asociada a párpados abiertos), una polidactilia y un paladar hendido, éstas frecuencias resultaron estadísticamente significativas, debido posiblemente a que la cantidad de fetos analizados para ésta dosis fue muy baja (por la inducción de muerte embrionaria).

A la inducción de malformaciones como la polidactilia, paladar hendido y exencefalea, se les ha asociado principalmente con toxicidad materna (Khera, 1984; 1985), aunque también se ha observado que se incrementa su inducción cuando se administran agentes teratógenos claramente identificados, por lo que a estas malformaciones se les ha propuesto como indicadores de efecto de agentes químicos sobre el desarrollo embrionario y fetal (Wilson, 1977; O'Rahilly, 1992; Hackman y Brown, 1972; Bannigan *et al.*, 1990). Sin embargo cuando existen pocas malformaciones y con una baja frecuencia, se les asocia con toxicidad materna, mientras que, cuando la frecuencia es alta y se observan varias malformaciones diferentes, el efecto se asocia con daño teratogénico directo (Khera, 1984; Wilson y Clarke, 1977; Hood, 1989).

Los trabajos realizados por diferentes autores se muestra que dentro de las malformaciones espontáneas en el ratón (incluso para la misma cepa que aquí se empleó, CD-1), se encuentran las mismas alteraciones que fueron observadas en este estudio con una frecuencia similar a la que ellos describen (Palmer, 1979; Fritz *et al.*, 1978; Perraud, 1976; Szabo, 1989).

Otra de las malformaciones observadas fue la inducción de tres casos de dolicocefalea (braquiocefaleas), los cuales se presentaron en una misma camada de las hembras a las cuales se les administró la dosis de 40 mg/kg. Al igual que en las anteriores alteraciones, al realizar el análisis estadístico resultó ser significativo. A pesar de que a ésta malformación se le ha descrito como un indicador de acción directa por agentes teratogénicos sobre el sistema nervioso central (Stricker *et al.*, 1990), el que se haya presentado solo en una de las camadas analizadas nos hace suponer que no existe

asociación entre esta y el tratamiento con CLF. Por otro lado no existen trabajos en los cuales se relacione la inducción de dolicocefalea con toxicidad materna.

A partir de estos resultados se considera que la CLF presentó efecto sobre la inducción de alteraciones externas en una baja frecuencia.

En cuanto a las alteraciones esqueléticas, se les ha descrito como un indicador de daño sobre el desarrollo embrionario y fetal (Millen y Woollman, 1963), tanto en rata (Aliverti *et al.*, 1979) como en ratón (Russell, 1979), aunque los fetos no presenten malformaciones macroscópicas externas. Se han descrito cerca de 88 alteraciones esqueléticas diferentes (Beck, 1989), los mecanismos de inducción de éste tipo de daño pueden ser por alteración directa de los procesos de desarrollo en las crías o por modificación de la homeóstasis materna (Khera, 1984; 1991).

Dentro de las alteraciones esqueléticas observadas en los fetos obtenidos de hembras tratadas con CLF, se encontró en la dosis de 20 mg/kg la disminución en los puntos de osificación en las extremidades tanto anteriores como posteriores, en donde 7 fetos (tres fetos en la misma camada), eran los que tenían disminuidos los puntos de osificación en las extremidades. Dado que la disminución de los puntos de osificación únicamente se presentó en la dosis de 20 mg/kg, indica la posibilidad de que esta dosis de CLF aún presente efectos tóxicos débiles (disminución de osificación), sin inducir la muerte de los embriones. A la disminución o retardo en la osificación se le ha descrito como una alteración en el desarrollo embrionario, la cual puede ser debida a un efecto embriotóxico (Khera, 1984; Campbell y Kaplan, 1992), aunque en la mayoría de los trabajos esta alteración la describen generalizando a todo el sistema esquelético del feto.

De las malformaciones esqueléticas observadas no se presentó ninguna relación dosis-respuesta con respecto a los tratamientos, ya que la inducción de costillas malformadas (fusionadas o bifurcadas principalmente) se presentaron en la dosis de 40 y 50 mg/kg, mientras que a la inducción de esternos malformadas (asimétricas y fusionadas principalmente) y alteraciones observadas en columna (dos vértebras fusionas, vértebras desviadas o columna en forma de "S"), únicamente se observó efecto en la dosis de 50 mg/kg.

A la inducción de malformaciones en costillas y esternos, como las observadas en este estudio, también se le ha asociado con toxicidad materna (Khera, 1984; 1985),

aunque se ha descrito su presencia al administrar agentes teratogénos claramente identificados (Taylor, 1986). Para el caso de las alteraciones en la columna aún no se les ha relacionado claramente con toxicidad materna o con daño inducido por algún teratogéno en especial.

La frecuencia de malformaciones en costillas y esternón encontradas en este trabajo parece indicar un efecto teratogénico débil de la CLF, aunque el mecanismo pudiera estar relacionado con el proceso de la embriotoxicidad, ya que no se presenta una relación dosis-dependiente como se presenta con la mayoría de los agentes teratogénos bien identificados (Mirkes, 1985 y Taylor, 1986).

Para dar una idea de las de las equivalencias de las concentraciones empleadas en este estudio, la dosis más alta de CLF (100 mg/kg de peso corporal), que se les administró a las hembras de ratón preñadas (día 8 de gestación), equivale aproximadamente a 3 g de harina de hojas de ortiga o alfalfa, ésta misma dosis equivaldría para humanos (persona de alrededor de 50 kg de peso corporal), a la administración de 5 g de CLF administrada por vía i.p. en una sola aplicación (lo cual es aproximadamente 4 kg de harina de hojas de ortiga o alfalfa). Esta concentración corresponde a una dosis terapéutica, ya que las concentraciones que consumimos en la dieta diaria en los alimentos difícilmente la exceden.

En los estudios en los cuales se ha administrado a humanos la CLF como agente terapéutico, las dosis han sido entre 0.5 a 2 g al día (administrada por vía oral) o de 0.1g al día (administrada por vía intra muscular), durante un máximo 10 días (Patek, 1936; Smith y Sano, 1944; Kephart, 1955; Young y Beregi, 1980). Las dosis de CLF administradas terapéuticamente a humanos, exceden al equivalente de la dosis que se administró a las hembras preñadas de ratón (casi el doble de las dosis).

IX. CONCLUSIONES

Dado que la CLF (100 mg/kg), al ser administrada en el día 8 de gestación por vía i.p. a hembras preñadas, indujo la muerte en el 100% de los embriones y que ésta inducción disminuyó directamente proporcional a la dosis administrada, podemos concluir que la CLF resultó tener un efecto embriotóxico con una relación dosis-dependiente.

El hecho que en la rata y el ratón el saco vitelino, a diferencia de otros mamíferos, se encuentre rodeando al útero de manera interna (en forma de anillo), y que además se haya descrito para estos mismos organismos la presencia de las glándulas metriales por fuera del útero, en los sitios en los cuales se lleva a cabo el Implante del embrión, permite concluir que la presencia de los anillos verdes observados en los úteros de las hembras preñadas tratadas con CLF, se debe a la asociación de estas dos estructuras con la CLF.

Debido a que la presencia de los anillos verdes coincidieron con los sitios de implante y reabsorción del tejido embrionario, además de que los análisis de los úteros indicaron que la CLF se encontró por fuera del útero formando los anillos verdes, es posible suponer que el mecanismo de muerte embrionaria fue por la toxicidad provocada en la relación: glándula metrial-saco vitelino-embrión, lo cual concuerda con lo anteriormente señalado.

A pesar de que en los fetos de las hembras preñadas tratadas con 50 mg/kg, se observó en el mismo feto un caso de labio leporino y paladar hendido y en otro feto un caso de exencefalea, además de estar asociadas con la administración de agentes teratógenos y con toxicidad materna, su inducción fue poco frecuente y de igual manera los tres casos de dolicocefaleas observados en el grupo de las hembras preñadas tratadas con 40 mg/kg, al presentarse en una sola camada y no tener una relación dosis-respuesta, por lo tanto se concluye, que ninguna de estas alteraciones están relacionadas con daño teratógeno directo asociado a la administración de la CLF.

Cuando se les administró a las hembras preñadas 50 mg/kg de CLF se observaron, en sus crías, la presencia de malformaciones de daño mediano y alto en costillas, esternón y columna, mientras que con la administración de 40 mg/kg sólo se observaron alteraciones en costillas de daño mediano. Estos resultados indican una relación en la inducción de las malformaciones con la administración de la CLF, ya que la frecuencia en los fetos fue homogénea, siendo el mecanismo de daño probablemente por medio de la misma toxicidad mencionada anteriormente.

Finalmente a partir del análisis de la curva dosis-respuesta del efecto sobre el desarrollo embrionario y fetal de la CLF, se observó que la administración de 20 mg/kg de CLF por vía i.p., a hembras preñadas no fue embriotóxica, ni indujo malformaciones externas e internas, a pesar de que disminuyó el promedio de puntos de osificación en las extremidades tanto posteriores como anteriores en un número bajo de fetos.

X. COMENTARIOS FINALES

Ya que a la CLF se le ha probado con éxito en diferentes sistemas de prueba, como un agente antimutágeno, anticancerígeno y radioprotector, se le sitúa como una de las posibles sustancias a emplear terapéuticamente en las poblaciones humanas para reducir los efectos de la exposición a ciertos agentes genotóxicos. En este trabajo se probó el efecto de la CLF al ser administrada a hembras preñadas, con lo cual se estudió su efecto en otros procesos biológicos, para obtener más información del comportamiento de ésta dentro del organismo.

Los resultados obtenidos muestran que la CLF indujo muerte embrionaria con una relación dosis-respuesta, sin embargo con estos resultados no podemos establecer de manera clara ni totalmente los mecanismos de daño, por lo que a partir de las observaciones en este trabajo y partiendo de lo descrito por otros autores, se podrían realizar otros estudios para tratar de establecer los mecanismos de embriotoxicidad de la CLF:

a) Por toxicidad materna: Para probar esta hipótesis se sugiere la realización de experimentos encaminados hacia determinar toxicidad materna inducida por CLF, por medio de la evaluación en la modificación de la fisiología de algunas de las sustancias maternas que podrían inducir muerte embrionaria. También se podrían realizar estudios en los cuales se determinara si la CLF es capaz de atravesar placenta, además de probar el efecto de la CLF sobre el desarrollo embrionario y fetal en estudios *in vitro*.

b) Por toxicidad directa sobre glándula metrial-saco vitelino-embrión: Para probar esta hipótesis se sugiere la realización de estudios histológicos del útero, así como pruebas bioquímicas entre la CLF y las sustancias involucradas en las glándulas metriales, además del estudio del efecto de la CLF, al ser administradas a hembras preñadas en el día 8 de gestación por otras vías (las mismas dosis de CLF empleadas en este estudio).

Otros estudios que se podrían realizar para tratar de comprender aún más los mecanismos del efecto de la CLF, son los encaminados a probar la sensibilidad embrio y fetotóxica de la CLF durante las diferentes etapas del desarrollo, así como estudios

citogenéticos en las crías de las hembras a las cuales se les administró la dosis de 50 mg/kg de CLF, ya que en estos fetos se observaron alteraciones esqueléticas.

Finalmente dado que la dosis de 20 mg/kg de CLF, no presentó efectos embriotóxicos ni inducción de alteraciones fetales comparadas con los testigos y dadas las características previamente descritas de la CLF, se podrían realizar estudios encaminados hacia la determinación de una posible capacidad de la CLF, como protector de daño inducido por agentes teratógenos.

X. REFERENCIAS

- Albert, L.A. (1988) Curso básico de toxicología ambiental. 2ª ed., Ed. Limusa, México D.F., pp 311.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, D. (1989) Molecular Biology of the cell. 2ª edición, Garland Publishing Inc., USA, pp. 1219.
- Aliverti, V., Bonanomi, L., Giavini, E., Leone, V.G. y Mariani, L. (1979) The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology* 20:237-242.
- Arimoto, S., Neghishi, T. y Hayatsu, H. (1980a) Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.* 11:29-33.
- Arimoto, S., Ohara, Y., Neghishi, T. y Hayatsu, H. (1980b) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:662-668.
- Arimoto, S., Fukuoka, S., Itome, C. y Hayatsu, H. (1992) Adsorption of mutagens to sepharose bearing covalently bound chlorophyllin. *Mutation Res.* 272:251-252.
- Arimoto, S., Fukuoka, S., Itome, C., Nakano, H., Rai, H. y Hayatsu, H. (1993) Bnding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity, *Mutation Res.* 287:293-305.
- Baker, H. J., Lindsey, R.J. y Weisbroth, H.S. (1980) The Laboratory Rat: Research applications. Volumen I y II, Academic Press Inc., USA, pp. 276.
- Bannigan, J.G., Cottell, D.C. y Morris, A. (1990) Study of the mechanisms of BUdR-induced cleft palate in the mouse. *Teratology* 42:79-89.
- Baranski, B., Stetkiewicz, I., Trazcinka-Ochocka, M., Sitarek K. y Szymczak, W. (1982) Teratogenicity fetal toxicity and tissue concentration of cadmium administered to female rats during organogenesis. *J. Appl. Toxicol.* 2:225-259.
- Beaudoin, A.R. (1980) Embriology and teratology. En: *The Laboratory rat: Research applications*. Vol.II, Baker, H.J., Lindsey, J.R. y Weisbroth, S.H. (Eds) Academic Press, New York, pp.276.
- Beck, F. (1979) Trypan blue-induced teratogenesis. En: *Advances in the study of birth defects*. Volumen III, Persaud, T.V.N. (Ed) University Park Press, Maltimore, pag. 37-51.
- Beck, S.L. (1989) Prenatal ossification as an indicator of exposure to toxic agents. *Teratology* 40:365-374.
- Bragg, H. (1922) Disturbances in mammalian development produced by radium

- emanation. Citado en: The Laboratory rat: Research applications. Vol.II, Baker, H.J., Lindsey, J.R. y Weisbroth, S.H. (Eds) Academic Press, New York, pp.276.
- Brown, L.P., Fint, P.O., Orton, T.C. y Gibson, G.G. (1986) Chemical Teratogenesis: testing methods and the role of metabolism, in Drug Metabolism Reviews. 17:221-260.
 - Bronzetti, G., Galli, A. y Della, C. (1988) Studies of the chlorophyllin an cobalt. En:The rolle of short term test in antimutagenic investigation. Kuroda, Y., Shankel, D.M. y Shlrasu, Y. (Eds), pag. 73.
 - Bronzetti, G., Galli, A. y Della, C. (1990) Antimutagenic effects of the chlorophyllin. En: Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism II. Kuroda, Y., Shankel, D. y Water M. (Eds), plenum press, EUA, pag.463-468.
 - Buttar, H.S. (1980) Effects of chlordiazepoxide on the pre and post natal development of rats. Toxicology 17:311-321.
 - Buttita, L. (1946), Azione del clorofilinato di sodio sulla coagulazione del sangue. Citado en: Chlorophyll derivates their chemistry commercial preparation and uses. Kephart, J.C. (1955) Econ. Bot. 9:3-38.
 - Cabrera, G. (1991) Comparative study of 5 antimutagens against 6 mutagens using 3 assays. Envirom. Mol. Mutagen. 17:(Suppl. 19):14.
 - Campbell, L.R., Dayton, D.H. y Sohal, G.S. (1986) Neural tube defects: A review of human and animal studies on the etiology of neural tube defects. Teratology 34:171-187.
 - Campbell, J.T. y Kaplan, F.S. (1992) The role of morphogens In endochondral ossification. Calcif. Tissue Int. 50:283-289.
 - Casarett, P.A. (1968) Radiation Biology, Atomic Energy Commision. Prentice-Hall, Inc. EUA, pp. 368.
 - Clarke, C.H. y Shankel, D.M. (1989) Antimutagenic specificity against spontaneous and nitrofurazone-induced mutations in Escherichia coli K12ND160. Mutagenesis 4:31-34.
 - CSM (1974) Committee on safety of medicines. Guidelines of reproduction studies for guidance of applicants for product licences and clinical trial certificates.
 - Dashwood, R., Brinholt, V. y Bailey, G. (1991) Chemopreventive properties of chlorophyllin: Inhibition of aflatoxin B1(AFB1)-DNA binding in vivo and anti-mutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the salmonella mutagenicity assay. Carcinogenesis 12:939-942.
 - Dashwood, R. (1992) Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-

- 3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis* 3:113-118.
- Dashwood, R. y Guo, D. (1992) Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation. *Carcinogenesis* 13:1121-1126.
 - Dashwood, R. y Liew, Ch. (1992) Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Environ. Mol. Mutagen.* 20:199-205.
 - Dashwood, R. y D. Guo (1993) Antimutagenic potency of chlorophyllin in the Salmonella assay and correlation with binding constant of mutagen-inhibitor complex. *Environ. Mol. Mutagen.* 22:164-171.
 - Dawson, A.B. (1926) A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Citado en: Caffeine and reduction of fetal ossification in the rat: fact or artifact?. Muther, T.F. (1988) *Teratology* 37:239-247.
 - Dorland (1988) *Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina*. 26ª Ed., Editorial Interamericana McGraw-Hill, España, pp.1701.
 - Druga, A. (1976) The effect of perphenazine treatment during the organogenesis in rats. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 27:15-23.
 - ECETOC (1983) *European Chemical Industry Ecology & Toxicology Centre: Identification and assessment of the effects of chemicals on reproduction and development (reproductive toxicology)*. Monograph No. 5., Belgium, pp. 32.
 - EPA (1988) *Environmental Protection Agency: Guidelines for reproduction studies for safety evaluation of drugs for human use*. Washington D.C. 51:34042-34054.
 - FDA, (1966), *Food and Drug Administration: Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use*. USA.
 - Feng, P-C., Chang, Y-Y, Chu, J-X., Chang, X-P. y Fang, L-S. (1989) Antimutagenic activities of chlorophyllin. *Environ. Mol. Mutagen.* 14(suppl.15):60.
 - Freeman, S.J. y Lloyd, J.B. (1983) Inhibition of proteolysis in rat yolk sac as a cause of teratogenesis. Effects of leupeptin in vitro and in vivo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 78:183-193.
 - Freeman, S. J., Brent, R.L. y Lloyd, J.B. (1982) The effects of teratogenic antiserum on yolk-sac function in rat embryos cultured in vitro. *J. Embryol. Exp. Morph.* 71:63-74.
 - Fritz, H., Grauwiler, J., Hummler, H., Lindt, S. y Schön, H. (1978) Collection of control data from teratologic experiments on mice, rats and rabbits. *Arzneim. Forsch.* 28:1410-1413.

- Fuyuta, M., Fujimoto, T. y Hirato, S. (1978) Embryotoxic effects of methyl-mercuric chloride administered to mice and rats during organogenesis. *Teratology* 18:353-366.
- Gentile, J.M. y Gentile, G.J. (1991) The metabolic activation of 4-nitro-o-phenylene diamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutation Res.* 250:79-86.
- Graedel, T.E., Hawkins, D.T. y Claxton, L.D. (1986) Atmospheric Chemical Compounds, Sources, Occurrence and Bioassay. Academic Press, New York, pp. 732.
- Gude, D.W., Cosgrove G.E. y Hirsch, G.P. (1982) Histological Atlas of the laboratory mouse. Plenum Press, New York, pp. 151.
- Hackman, R.M. y Brown, K.S. (1972) Corticosterone-induced isolated cleft palate in A/J mice. *Teratology* 6:313-316.
- Hadnagy, W. y Seemayer, N. (1988) Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. *Mutations Res.* 203:205-206.
- Harkness, J.E. y Wagner, J.E. (1989) The biology and medicine of rabbits and rodents. Edit. Lean y Febiger, London Inglaterra.
- Harris, S.B., Szczech, G.M., Stuckhardt, J.L., Kiley, K., Pormalis, B.P. y Brunden, M. (1980) Evaluation of the Upj: TUC(ICR) strain in mice for use in teratology test. *Toxicol. Environ. Health.* 6:155-165.
- Harrison, J., Levin, S. y Trabin, B. (1954) The safety and fate of potassium sodium copper chlorophyllin and other copper compounds. *J. Amer. Pharmaceut. Assoc.* 43:722-737.
- Hayatsu, H., Arimoto, S. y Negishi, T. (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* 202:429-446.
- Hogan, B., Costantini, F. y Lacy, E. (1986) Manipulating the mouse embryo. Cold spring harbor laboratory, N.Y., pp. 332.
- Hood, R.D. (1989) Developmental Toxicology: risk assessment and the future, Van Nostrand Reinhold, Washington, E.U., pp 277.
- Houge, C.J.R. (1984) The effect of common exposures on reproductive outcomes. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 4:45-57.
- Huffstadt, A.J.C. (1981) Malformaciones Congénitas. Ed. El manual moderno, México, pp. 306.
- Imai, K., Arimoto, T., Sato, M., Waranabe, K., Kimura, R. y Murata, T. (1986) Effects of sodium metallochlorophyllins on the activity and components of the microsomal drug-metabolizing enzyme system in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 34:4287-4293.

- Jhon, J.A., Smith, F.A., Leong, B.K.J. y Schwetz, B.A. (1977) The effects of maternally inhaled vinyl chloride on embrional and fetal development in mice, rat and rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39:497-513.
- Job, T.T., Leibold, G.J. y Fitzmaurice, H.A. (1935) Biological effects of roentgen rays. Citado en: *The Laboratory Rat: Research applications. Volumen II*, Baker, H. J., Lindsey, R.J. y Weisbroth, H.S. (Eds), 1980, Academic Press Inc., USA, pp. 276.
- Johnston, J.D., Jamieson, G.G. y Wright, S. (1992) Reproductive and developmental hazards and employment pollicies. *Br. J. Int. Med.* 49:85-94.
- Juriloff, D.M. y Harris, M.J. (1988) Cleft palate: more genetic lessons from mice. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 8:127-134.
- Juriloff, D.M., Macdonald, K.B. y Harris, M.J. (1989) Genetic Analysis of the cause of exencephaly in the SELH/Bc mouse Stock. *Teratology* 40:395-405.
- Kada, T., Morita, K. y Inoue, T. (1978) Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrrolisate. *Mutation Res.* 53:351-353.
- Kada, T., Kato, M., Aikawa, K. y Kiriyaama, S. (1984) Adsorption of pyrrolisate mutagens by vegetable fibers. *Mutation Res.* 141:149-152.
- Kada, T., Kaneko, K., Matsuzaki, S., Matsuzaki, T. y Hara, Y. (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens a case of the green tea factor. *Mutation Res.* 150:127-132.
- Kalter, H. y Warkany, J. (1983) Congenital malformations. *N. Engl. J. Med.* 308:424-431.
- Katoh, Y., Nemoto N., Takayama, S. (1983) Inhibition of benzo[a]pyrene induced mutagens in chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutation Res.* 121:153-157..
- Kephart, J.C. (1955) Chlorophyll derivates their chemistry commercial preparation and uses. *Econ. Bot.* 9:3-38.
- Khera, K.S. and McKinley, W.P. (1972) Pre and postnatal studies on 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyactic acid and their derivatives in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 22:14-28.
- Khera, K.S., (1984) Maternal toxicity-A possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology* 29:411-416.
- Khera, K.S. (1985) Maternal toxicity: A possible Etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology* 31:129-153.
- Khera, K.S. (1987) Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human

- data. CRC, Critical Reviews in Toxicology 17:4:345-375.
- Khera, K.S. (1991) Chemically induced alterations in maternal homeostasis and histology of conceptus: their etiologic significance in rat fetal anomalies. *Teratology* 44:259-297.
 - Kimm, S., Tchai, B., Park, S. y Jikang, S. (1982) Antimutagenic activity of chlorophyll to direct and indirect-acting mutagens and its contents in vegetables. *Korean J. Biochem.* 14:1-7.
 - Kistler, A. (1981) Teratogenesis of retinoic acid in rats susceptible stages and suppression of acid induced limb malformations by cycloheximide. *Teratology* 23:25-31.
 - Knobil, E., Neill, J.D., Greenwald, G.S., Markert, C.L. y Pfaff, D. (1994) The physiology of reproduction. Vol. I, Second Edition, Raven Press New York pag 396-565.
 - Knudsen, T.B., Gray, M.K., Church, J.K., Blackburn, M.R., Airhart, M.J., Kellems, R.E. y Skalko, R.G. (1989) Early postimplantation embryoletality in mice following in utero inhibition of adenosine deaminase with 2'-deoxycoformycin. *Teratology* 40:615-626.
 - Krasnikova, A.N. (1974) Proliferation of epithelium surrounding a skin wound in hairless mice treated with sodium. *Ekspierimental noi biologii meditsing* 76:99-102.
 - Kreyblg, T. (1969) The critical sensitivity of the developmental phase and the organotropic action of different teratogenic agents, receptors of morphogenesis in the mammalian embryo. En: *Teratology, Proceeding of a Symposium Organized by the Italian Society of Experimental Teratology.* Bertelli, A. y Donati, L. (eds), Italia, pag 152-159.
 - Kurk, O. (1962) Composición química y propiedades de la clorofila. *Enciclopedia de tecnología química, Tomo IV, U.T.E.H.A., México, pag.899-907.*
 - Lai, C.N. (1979) Chlorophyll: The active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogen in vitro. *Nutrition and Cancer* 1:19-21.
 - Lai, C-N., Butler, M.A. y Matney, T.S. (1980) Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Res.* 77:245-250.
 - Macdonald, K.B., Juriloff, D.M. y Harris, M.J. (1989) A developmental study of neural tube closure in a mouse stock with a high incidence of exencephaly. *Teratology* 39:195-213.
 - Matney, T.S. (1986) Introduction. Natural environmental antimutagens. Citado en: *Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules.* Hartman, P.E. y Shankel D.M. (1990) *Environ. Mol. Mutagen.* 15:145-182.

- McClain, R.M. y Baker, B.A. (1972) Effects organo lead compounds on rat embryonic and fetal development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21:265-274.
- McCull, J.D. (1966) Teratogenicity studies. Citado en *Maternal toxicity: A possible Etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species.* Khera, K.S. (1985) *Teratology* 31:129-153.
- Mendiola-Cruz, M.T. (1994) Efecto de la clorofilina sobre la inducción de intercambios en las cromátidas hermanas (ICH), por radiación gamma en espermatogonias de ratón *in vivo*. Tesis Maestría, Division de Estudios de Posgrado Facultad de Ciencias, UNAM, pp 94.
- Millen, J.W. y Wollman, H.M. (1963) Congenital malformations of the skeletal system. En: effects of drugs on the fetus (*Int. Congr. Series No. 64*), Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, pp. 9-24.
- Mirkes, P.E. (1985) Cyclophosphamide teratogenesis: a review. *Teratogen. Carcinogen Mutagen* 5:75-88.
- Morales-Ramírez, P. y García-Rodríguez, M.C. (1994) *In vivo* effect of chlorophyllin on gamma-ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutation Res.* 320:329-334.
- Morales-Ramírez, P. y Mendiola-Cruz, M.T. (1995) *In vivo* radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells. *Mutation Res.* 344:73-78.
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R. (1995) Effect of chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. *Mutation Res* (en prensa).
- Morita, K., Hara, M. y Kada, T. (1978) Studies on natural desmutagens screening for vegetables and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 42:1235-1238.
- Muther, F.T. (1988) Caffeine and reduction of fetal ossification in the rat: fact or artifact? *Teratology* 37:239-247.
- Nakatsuka, T. (1988) Role of myometrial constriction in the induction of wavy ribs in rat fetuses. *Teratology* 37:329-334.
- Nakeeb, M. y Yousef, R. (1974) Antimicrobial activity of sodium copper chlorophyllin. *Pharmazie* 29, 1:48-50.
- Nau, H. (1987) Species differences in pharmacokinetics, drugs metabolism, and teratogenesis, In *Pharmacokinetics in Teratogenesis*. Vol.1, CRC press, Boca

Ratón, Florida.

- Negishi, T., Arimoto, S., Nishizaki, C. y Hayatsu, H. (1989) Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5h-pyrido(4,3-b)indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis* 10:145-149.
- Newmark, H. (1987) Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65:461-466.
- Oda, T., Yokono, O., Yoshida, A., Miyake, K. y Lino, A. (1971) On the successful treatment of pancreatitis with chlorophyll-a and inhibitory effect of its derivatives on trypsin and other protease activities in vitro. *Gastroenterol Japonica* 6:49-54.
- Olivera, O., Zimmering, S., Arceo, C. y Cruces, M. (1993) The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of drosophyla. *Mutation Res.* 301:201-204.
- Ong, T., Whong, W., Stewart, J. y Brockman, H. (1986) Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.* 173:111-115.
- Ong, T., Whong, W., Stewart, J. y Brockman, H. (1989) Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in salmonella typhimurium strain TA98. *Mutation Res.* 222:19-25.
- Ong, T., Brockman, H. E. y Whong, W. Z. (1994) Chlorophyllin: An antigenotoxic agent. *ACS Symposium series* 546:272-281.
- O'Rahilly, R. y Müller, F. (1992) *Human Embryology and Teratology*. Ed. Wiley-Liss, USA, pp. 330.
- Oster, G., Broyde, S. y Bellin, J. (1964) Spectral properties of chlorophyllin. *J. Am. Chem. Soc.* 86:1309-1313.
- Palit, S., Sarkar, D., Ghosh, A.K. y Talukder, G. (1993) Modification of metal-induced clastogenicity by chlorophyllin. *Sixth international conference on environmental mutagens, Melbourne, Australia.* pag. 309.
- Palmer, A. K. (1979) Sporadic malformations in laboratory animals and their influence on drug testing. En: *Drug and fetal development (1972)*. Klingberg, A., Abramovici, A. y Chemke (Eds). Pag. 45-60.
- Palmer, A.K. (1980) *The principles and methods in modern toxicology*. Elsevier/North Holland, N.Y.
- Papatwibul, K. (1993) Inhibition of the mutagenicity of five environmental mutagens by chlorophyllin and five other naturally antimutagens in *Salmonella typhimurium* strain sv 50. *Sixth international conference on environmental conference*

- mutagens, Melbourne, Australia, pag 219.
- Patek, A.J. (1939) Chlorophyllin and regeneration of blood: Effect of administration of chlorophyll derivatives to patients with chronic hypochromic anemia. Citado en: Chlorophyll derivatives their chemistry commercial preparation and uses. Kephart, J.C. (1955) Econ. Bot. 9:3-38.
 - Perraud, J. (1976) Levels of spontaneous malformations in the CD rat and CD1 mouse. Lab. Anim. Sci. 26:293-300.
 - Phillips, R.L. (1975) Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among seventh-day adventists. Cancer Res. 35:3513-3522.
 - Psychoyos, A. (1973) Hormonal control of ovoid implantation. Vitam. Horm. 31:201-256.
 - Renner, H.W. (1985) Anticlastogenic effect of beta-carotene in chinese hamster ovary and dose response studies with different mutagens. Mutation Res. 144:251-256.
 - Renner, H.W. (1990) In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagenic-induced chromosomal aberrations. Mutation Res. 244:185-188.
 - Ribeiro, P.L. y Faustman, E.M. (1990) Pharmacokinetic considerations in developmental toxicology. En: Research Needs in Developmental Toxicology. Hood, R., (Ed), Van Nostrand Reinhold, New York.
 - Robins, E. (1986) Inhibition of aflatoxin mutagenicity by chlorophyllin in *Neurospora crassa*. In Shankel, D.M., Hartman, P.E., Kada, T. y Hollander, A. (Eds) pag. 575-576.
 - Robins, E. y Nelson, R. (1989) Inhibition of 1,2-Dimethylhydrazine-induced nuclear damage in rat colonic epithelium by chlorophyllin. Anticancer. 9:981-986.
 - Rodríguez-Arnaiz, R. y Zimmering, S. (1989) Chlorophyllin is an antimutagen in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mol. Mutagen. 14(Suppl. 15):165.
 - Russell, L.B. (1979) Sensitivity patterns for the induction of homeotic shifts in a favorable strain of mice. Teratology 20:115-125.
 - Sakai, Y., Nagase, H., Ose T., Kito, H., Sato, T., Kawai, M. y Mizuno, M. (1990) Inhibitory action of poeny root extract on the mutagenicity of benzo[a]pyrene. Mutation Res. 244: 129-134.
 - Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G. (1993) Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effect of chromium and chlordon in mouse bone marrow in vivo. Mutation Res. 301:33-38.
 - Sato, M., Imai, K., Kimura, R. y Murata, T. (1984) Effects of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. Chem. Pharm. Bull. 32:716-722.

- Scialli, R.A. (1992) A clinical guide to reproductive and developmental toxicology. CRC, Boca Raton Ann Arbor Florida, EUA, pp. 284.
- Seidenberg, J.M., Anderson, D.G. y Becker, R.A. (1986) Validation of an in vivo developmental toxicity screen in the mouse. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 6:361-374.
- Shenefelt, R.E. (1972) Morphogenesis of malformations in hamster caused by retinoic acid: Relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 5:103-118.
- Shepard, T.H. (1984) Teratogenesis. En: *Mutation, Cancer and Malformation-Environmental Science Research*. Chu, E.H.Y. y Generoso, W.M. (eds). New York Plenum, Vol. 31, pag. 499-527.
- Sivic, M. (1988) Mechanism of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* 202:377-386.
- Smith, L. y Sano, M. (1944) Chlorophyll: an experimental study of its water-soluble derivatives. IV. The effect of water-soluble chlorophyll derivatives and other agents upon the growth of fibroblast in tissue culture. *J. Lab. Clin. Med.* 29:241-246.
- Stricker, M., Meulen, J.V., Raphael, B. y Mazzola, R. (1990) Craniofacial malformations. Longman Grup UK Limited, Churchill Livingstone, New York, pp. 593.
- Szabo, K.T. (1989) Congenital malformations in laboratory and farm animals. Academic Press Inc., USA, pp. 313.
- Tanigawa, H., Obori, R., Taka, H., Yoshida, J. y Kosazuma, T. (1979) Reproduction study of 4-ethoxy-2-methyl-5-morpholino-3(2H)-pyridazinone(M73101) in rabbits: Administration of M73101 during the period of major organogenesis. *J. Toxicol. Sci.*, 4:163-174.
- Tawashi, R., Cousineau, M. y Denis, G. (1982) Crystallisation of calcium oxalate dihydrate in normal urine in presence of sodium copper chlorophyllin. *Urol. Res.* 10:173-176.
- Taylor, P. (1986) *Practical Teratology*. Academic Press Inc, Orlando Florida, pp171.
- Terwel, L. y Van der Hoeven, C.M. (1985) Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the Salmonella/microsome assay. *Mutation Res.* 152:1-4.
- Troll, W. y Weisner, R. (1985) The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25:509-528.
- Warkany, J. y Nelson, R.C. (1940) Appearance of skeletal abnormalities in the offspring of rats reared on a deficient diet. Citado en: *The Laboratory Rat: Research applications*. Volumen II, Baker, H. J., Lindsey, R.J. y Weisbroth, H.S. (1980)

Academic Press Inc., USA, pp. 276.

- Warner, J., Nath, J. y Ong, T. (1991) Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the Salmonella arabinose-resistant assay system. *Mutation Res.* 242:25-30.
- Wattenberg, L.W. (1992) Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res, (Suppl)* 52:2085-2091.
- WHO (1984) Principles for evaluating health risks to progeny associated with exposure to chemicals during pregnancy. Environmental Health Criteria No. 30, Genova.
- Wilson, J.G. (1965) Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. Citado en: Handbook of Teratology, Wilson, J.G. y Clarke, F.F., (1977), Vol. 1, Plenum Press, New York.
- Wilson, J.G. (1973) Principles of teratology, in pathology of development (M. J. Finegold and E.V. Perrin, eds), Williams and Wilkins, Baltimore, pag. 11-30.
- Wilson, J.G. y Clarke, F.F. (1977) Handbook of Teratology. Vol. 1, 2, 3 y 4, Plenum Press, New York.
- William, K.E., Roberts, G., Kidston, M.E., Beck, F. y Lloyd, J.B. (1976) Inhibition of pinocytosis in rat yolk sac by trypan blue. *Teratology* 14:343-354.
- Wood, A.W., Huang, M., Chang, R.L., Newmark, H.L., Lehr, R.E., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M. y Conney, A.H. (1982) Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:5513-5517.
- Wu, Z. L., Chen, J.K., Ong, T., Brockman, H.E. y W-Z, Whong (1994) Antitransforming activity of chlorophyllin against selected carcinogens and complex mixtures. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 14:75-81.
- Young, R. y Beregi, J. (1980) Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. *Journal of the American Geriatrics Society* 28:46-48.
- Zimmering, S., Olvera, O., Hernández, M.E., Cruces, M.P., Arceo, C. y Pimentel, E. (1990) Evidence for radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophyla*. *Mutation Res.* 245:47-49.
- Zubiri, V.A. (1946) Medicamentos fotosensibilizadores y fotoprotectores. Trabajos del INCM, tomo VI, Madrid España, pag. 466-474.



ALAG
Asociación Latinoamericana
de Genética

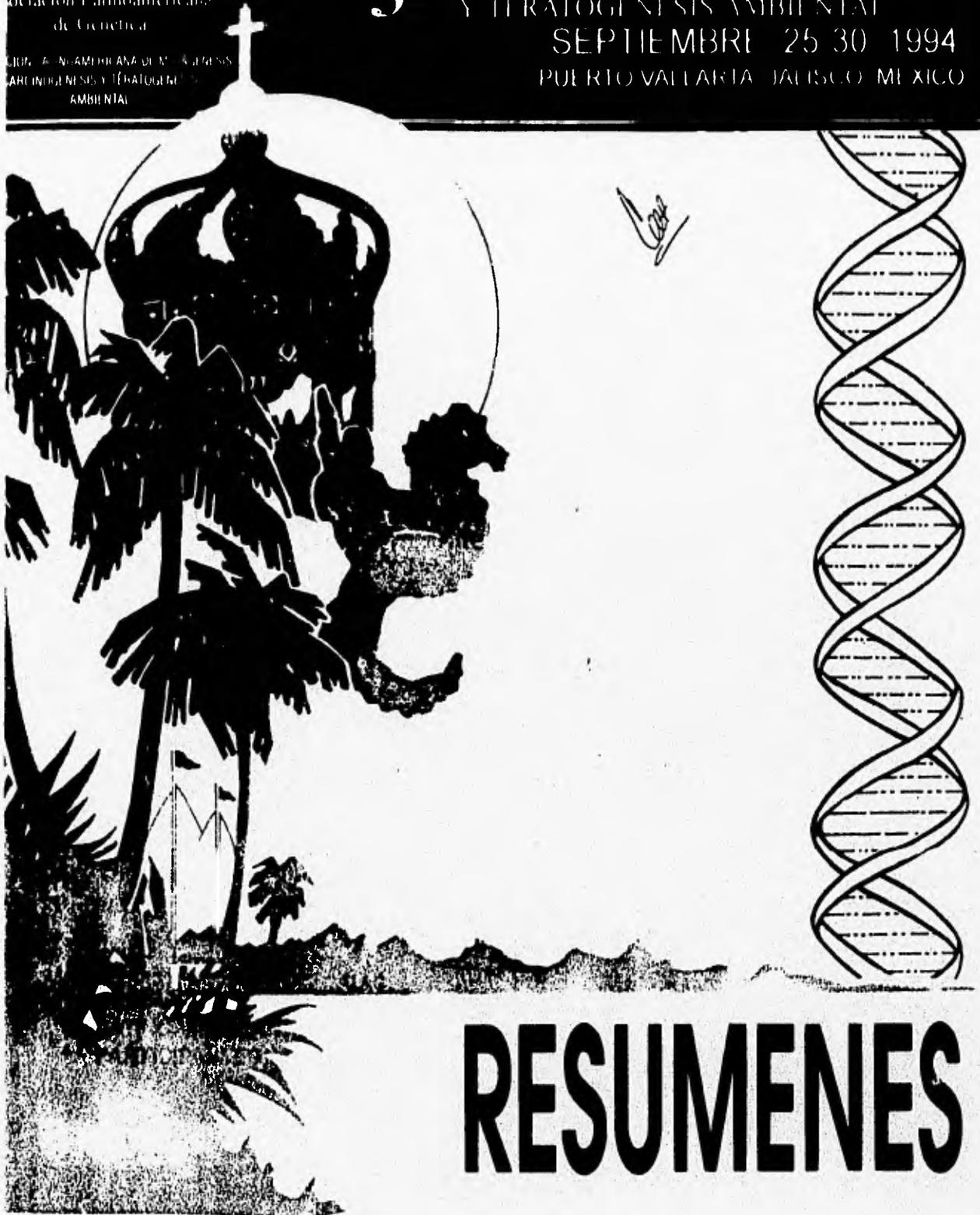
COM. LATINOAMERICANA DE MUTAGENESIS,
CARCINOGENESIS Y TERATOGENESIS AMBIENTALES

CONGRESO LATINOAMERICANO DE GENÉTICA Y

3^o DE MUTAGENESIS, CARCINOGENESIS Y TERATOGENESIS AMBIENTALES

SEPTIEMBRE 25-30 1994

PUEBLO VALLARTA, JALISCO, MÉXICO



RESUMENES

EFFECTO TERATOGENICO DEL CO₂ PRENATAL.
MODELO EXPERIMENTAL

Martha Tena Suck, Gloria Romero, Dolores Saavedra, Manuel Arteaga y Edmundo Mucio Moreno. Hospital "Dr. M. Gea González", México, D.F.

El Dióxido de carbono (CO₂) se utiliza en cirugía laparoscópica abdominal para visualizar el campo operatorio; su aplicación en mujeres embarazadas es controversial. A fin de determinar el efecto teratogénico tóxico del CO₂, se realizó un estudio experimental doble ciego controlado con ratas Wistar. Se formaron 3 grupos: A) Control negativo; B) Control positivo (neumoperitoneo con O₂); y C) Neumoperitoneo con CO₂. Para poder valorar los efectos inmediatos y tardíos, la mitad de los productos se obtuvieron por cesárea al 21º día de la gestación y la otra mitad se sacrificaron a la 7ª semana de vida postnatal. A todas las ratas se les realizó neumoperitoneo con insuflación a presión de 120 cc/mmHg. Se extrajeron los cerebros y se les realizaron coloraciones especiales.

El peso y perímetro abdominal de las madres del grupo de O₂ estuvo aumentado, no así de las del grupo de CO₂. El peso y talla de los fetos del grupo de O₂ estuvo disminuido. El cerebro de los productos de 21 días no mostraron alteraciones en ninguno de los grupos; en los de 7 semanas se encontraron cambios degenerativos de la sustancia blanca a nivel del sistema piramidal, tracto espinotalámico, pedúnculos cerebrales, cerebelo y cuerpo calloso, observándose mayor daño en el grupo de O₂; el grupo de CO₂ mostró cambios similares pero en menor intensidad. Los cambios observados en este modelo experimental son similares a los de la intoxicación por monóxido de carbono, y a los de la intoxicación aguda de CO₂, los cuales son interpretados como cambios hipóxicos crónicos.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL DEL RATON *in vivo*.

Gerardo Rodríguez, M.C. Chávez-Gallegos, F. y Altamirano-Lozano, M. Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Bioteno-Campo II, FES-Zaragoza, UNAM, México D.F.

Se ha descrito que la Clorofina (CLF), es un potente antimutágeno, anticarcinógeno y radioprotector, además de tener una toxicidad muy baja, sin embargo no hay reportes de su posible efecto sobre el desarrollo embrionario o fetal. En este trabajo se estudió el efecto teratogénico de la CLF en ratones hembra preñadas de la cepa CD-1, las cuales fueron tratadas con la CLF por vía intraperitoneal el día 8 de gestación (dosis de 100, 50, 40 y 0 mg/kg de peso del animal). Los organismos fueron sacrificados el día 18 de gestación. Las crías obtenidas por cesárea fueron revisadas internamente (malformaciones esqueléticas) y externamente (malformaciones gruesas). Los resultados muestran que la CLF tiene un efecto embriotóxico (79.81% para la dosis de 100 mg, del 69.24% para la dosis de 50 mg y del 0% para la de 40mg/kg). Se encontró efecto sobre el número de reabsorciones por camada en las tres dosis de CLF y el número de fetos vivos únicamente se vio reducido en las dosis de 100 mg/kg. Por otra parte se encontró una mayor proporción de anomalías externas e internas en forma dosis-dependiente en los fetos tratados con CLF, siendo principalmente: dolicocefalia, polidactilia, hipoplasia, encefalocele occipital, labio leporino y paladar hendido. En cuanto a las malformaciones esqueléticas las principales observadas fueron: costillas fusionadas, bifidas y curvas, esternobras asimétricas y fusionadas, vértebras fusionadas y columnas desviadas.

Los resultados obtenidos muestran que la Clorofina es un agente embriotóxico y tiene efecto teratogénico.

TOXICOLOGIA REPRODUCTIVA DE LA SPIRULINA. I. EVALUACION EN RATA.

M. Salazar¹, S. Salazar¹, N. Pages² y G. Chamorro¹. ¹Departamento de Toxicología, Sección de Graduados, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México y ²Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, Francia.

El efecto sobre el proceso reproductivo es una de las fases que deben estudiarse en la evaluación de seguridad de las proteínas no convencionales para consumo humano.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la Spirulina, alga unicelular que se cultiva principalmente en el lago de Texcoco (México) y en el lago Tehad (Africa Central), sobre la fertilidad y reproducción.

Grupos de 10 ratas macho y 20 hembras, Wistar, recibieron Spirulina durante 9 y 2 semanas antes del apareamiento respectivamente, incorporada al alimento en concentraciones de 0, 10, 20 y 30%. Las hembras continuaron con el tratamiento hasta el destete de sus crías (día 23 postnatal). El día 20 de la gestación se sacrificó la mitad de las hembras de cada lote y a las restantes se les permitió tener sus crías. En las primeras se determinó después del sacrificio, el número de cuerpos lúteos, número y peso de las crías y las reabsorciones, a continuación se analizaron las malformaciones externas y viscerales.

En las crías que nacieron se registró la viabilidad, peso y desarrollo físico y funcional; finalmente se observó la presencia de malformaciones.

La Spirulina no produjo daño en la fertilidad ni en la reproducción de ratas macho y hembras hasta concentraciones del 30%.

EVALUACION DEL EFECTO DE SPIRULINA EN LA FERTILIDAD DE RATAS MACHO.

S. Salazar¹, M. Salazar¹, G. Chamorro¹. Departamento de Toxicología, Sección de Graduados, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México.

Las pruebas de efecto de proteínas no convencionales destinadas a consumo humano sobre la fertilidad, son recomendadas como parte de los estudios de su seguridad.

En el presente trabajo se estudió el posible efecto de alga Spirulina, cianobacteria pluricelular filamentosa, sobre esta variable.

Se emplearon grupos de 10 ratas Wistar macho que se alimentaron con el alga a concentraciones de 0 y 30% durante 8 semanas. Al cabo de este tiempo, después del sacrificio, se expuso el epidídimo caudal derecho, que se perfundió con solución salina para la obtención de los espermatozoides. Después de su homogeneización se determinó la concentración, movilidad y morfología por procedimientos establecidos. Se pesaron testículo, epidídimo, próstata y vesícula seminal izquierdas.

No hubo alteración en los parámetros espermáticos ni en el peso de los órganos, con excepción del correa pendiente a vesícula. El mecanismo detallado de este último efecto no está claro y requiere de estudios posteriores para conocerlo. Sin embargo se concluye que la Spirulina no afecta la fertilidad de ratas macho.



Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A. C.

XXXVIII
Congreso Nacional

que se celebra en la ciudad de Querétaro con el auspicio de la
Universidad Autónoma de Querétaro
del 27 al 31 de agosto de 1995



PROGRAMA GENERAL Y MEMORIA DE LOS RESÚMENES



EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL OZONO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE MONOAMINAS CEREBRALES EN EL PUENTE, MESENCÉFALO Y CUERPO ESTRIADO DE LA RATA ADULTA. González-Piña Rigoberto¹ y Paz Carlos. Departamento de Neurofisiología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez.

Se ha reportado que los animales expuestos a 0.7, 1.5 y 6.0 ppm de ozono (O_3) durante 24 horas o más presentan alteraciones en el contenido cerebral de los neurotransmisores que han sido relacionados con el control del sueño y que el efecto del O_3 sobre la fase del Sueño Paradoxico (SP) se observa desde la primera hora de exposición, mientras que el Sueño de Ondas Lentas (SOL) se afecta posteriormente. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en los niveles cerebrales de Dopamina (DA), Noradrenalina (NA), Serotonina (5-HT) y de sus metabolitos Acido Dihidroxiindolacético (DOPAC), Acido Homovanílico (HVA) y Acido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA), durante las primeras 3 horas de exposición a 1 ppm de ozono. Se utilizaron 50 ratas wistar machos asignadas a cinco grupos: a) control, que consistió de animales expuestos a aire libre de contaminantes; grupos b y c, consistentes de animales expuestos durante 1 y 3 hrs a 1 ppm de O_3 , respectivamente, y grupos d y e, constituidos por animales expuestos durante 3 horas al O_3 , seguidos de 1 y 3 horas de exposición al aire libre de contaminantes respectivamente. Inmediatamente después los animales fueron decapitados y se les extrajo el puente, el mesencéfalo y el cuerpo estriado. Las muestras se analizaron mediante un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución con Detección Electroquímica (Perkin-Elmer, mod. 1020 plus) una columna de 100 x 4.5 mm adsorbosphere catecholamine (ALLTECH) y una fase móvil conteniendo 200 ml de metanol, 800 ml de agua, 4 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $C_2H_5O_2Na$ y 0.15 g de EDTA a un flujo de 1.2 ml/min. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA simple y cuando se encontraron significativos se aplicó la prueba de Tukey. Se encontró que después de la exposición al O_3 , los niveles de las monoaminas y de sus respectivos metabolitos aumentaron en las tres regiones estudiadas y este aumento fue en proporción al tiempo de exposición, pero no hubo efectos sobre el HVA. No se observó la recuperación de los efectos 1 hora después de cesada la inhalación de O_3 , pero sí después de 3 horas. Estos resultados sugieren que el O_3 afecta desde las primeras horas al contenido de monoaminas en las regiones cerebrales relacionadas con la generación del SP, señalando que las alteraciones del sueño provocadas por este gas ocurren de forma selectiva sobre este estado del sueño, mientras que las alteraciones del SOL ocurrirían de manera compensatoria.

LA ENZIMURIA COMO PARAMETRO IMPORTANTE PARA DETECTAR DAÑO RENAL INICIAL EN LA INTOXICACION AGUDA CON PLOMO, EN RATAS. Posadas del Río, F. A., Hernández Galegos, M. E.* y García Osorio, E.* Departamento de Farmacología y Toxicología, CINVESTAV-IPN, 07000 México, D.F.

El daño al organismo producido por xenobióticos se traduce, generalmente, como liberación de enzimas de los órganos afectados a los líquidos extracelulares; las enzimas que se eliminan en la orina se han usado para detectar el daño a los riñones producidos por compuestos nefrotóxicos; la determinación de enzimas en la orina tiene la ventaja de realizar estos ensayos en el mismo sujeto y estudiar el curso temporal de las alteraciones producidas. Los riñones son los principales órganos blanco del Plomo (Pb), debido a que se acumula "preferentemente" en estos órganos. En el trabajo presente se investigó el efecto de una dosis única (10mg/kg) del Cloruro de Plomo, administrado por vía intraperitoneal, sobre varias enzimas y otros componentes de la orina, en ratas macho.

Se usaron ratas Wistar, de 300 a 375 g, que se les administró el Pb, se introdujeron en jaulas metabólicas y se reunió la orina a las 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h posteriores a la administración del Pb; en la orina se determinaron las actividades de la Transpeptidasa de glutamilo (TPG), la dipeptidilaminopeptidasa IV (DAP IV), la Aminopeptidasa de alanina (APA), las Carboxilesterasas/Amidasas (CE/A), las Transferasas de glutatión (TG), la N-Acetilglucosaminidasa (N-AG) y la glucuronidasa beta (GC), en un espectrofotómetro acoplado a un registrador, además se cuantificaron la creatinina (Cr), el pH y la osmolaridad (Os). De los resultados obtenidos solamente se describen los que fueron significativamente ($p < 0.05$) diferentes de los valores de las ratas control. A las 2 h aumentó la actividad de la TPG, la DAP IV y la APA, a las 4 h aumentaron la APA y la TG, y disminuyeron la Cr y la Os, mientras que, a las 6 h, disminuyó la TPG y aumentaron la DAP IV y la APA. Posteriormente, a las 24 h, aumentaron la APA y la TG, y disminuyeron las CE/A; a las 48 y 72 h, aumentaron nuevamente la TPG y la DAP IV, y permanecieron disminuidas las CE/A y la Os. Estos resultados nos permiten: a) concluir que las enzimas de la membrana citoplásmica (TPG, DAP IV y APA) de los túbulos renales se alteran inicialmente en este modelo de intoxicación aguda con Pb, y b) sugerir que podrían utilizarse como uno de los parámetros de daño renal temprano.

ESTUDIO DE LA EMBRIOTOXICIDAD Y DEL EFECTO SOBRE EL DESARROLLO FETAL DEL RATON INDUCIDOS POR LA CLOROFILINA

García-Rodríguez, M.C.* (avalado por Flores R. Angélica), Chávez-Gallegos, F.* y Altamirano-Lozano, M.* Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Bioteno Campo-II. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES-Zaragoza, UNAM, México D.F.

Se ha descrito que la Clorofina (CLF), derivada de las plantas verdes, es un potente antimitógeno, anticancerígeno y radioprotector, además de tener una toxicidad prácticamente nula, sin embargo no hay reportes de su posible efecto al ser administrada durante la gestación. En este trabajo se estudió el efecto de la CLF sobre el desarrollo embrionario y fetal de ratones de la cepa CD-1. Hembras preñadas fueron tratadas con la CLF por vía intraperitoneal el día 8 de gestación (dosis de 100, 50, 40, 20 y 0 mg/kg de peso del animal). Los organismos fueron sacrificados el día 18 de gestación y se cuantificó el número de implantos, reabsorciones, fetos vivos y fetos muertos, peso fetal y proporción de sexos. Las crías obtenidas fueron revisadas internamente (malformaciones esqueléticas) y externamente (malformaciones gruesas). Los resultados obtenidos muestran que la CLF tiene un efecto embriotóxico (100% para la dosis de 100 mg/kg, del 78.2% para la dosis de 50 mg/kg, del 36% para la de 40 mg/kg, del 15% para la de 20 mg/kg), siendo estadísticamente significativos para las dosis de 100 y 50 mg/kg. Al analizar las anomalías externas e internas en los fetos tratados con CLF se encontró la presencia de dolicocefalia, polidactilia, hipoplasia, escafocefalia, labio leporino y paladar hendido. En cuanto a las malformaciones esqueléticas las principales observadas fueron: costillas fusionadas, bifidas y curvas, esternones asimétricos y fusionados, vertebras fusionadas y columnas desviadas.

Los resultados obtenidos muestran que la Clorofina es embriotóxica en forma dosis-dependiente y tiene un débil efecto teratogénico (inducción de malformaciones tanto internas como externas). (Este trabajo fue apoyado por PADEP-UNAM proyecto 500 002)

DETERMINACIÓN DE LAS VARIACIONES EN LA VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN NERVIOSA MOTORA (VCNM) DE LOS NERVIOS MEDIANO Y ULNAR EN SUJETOS SANOS A TEMPERATURA CONTROLADA. Prieto-Martínez, M.J.* (Avalado por Nunez, L.A.), Alatorre-Miguel, E.* Nunez-Licena, A. Aguilar-Ostrosuni, H. U. Depto. de Neurofisiología del Inst. Nal. de Med. de Rehabilitación S.S.; Unidad Universitaria de Invest. Cien. en Neurofisiol del Hospital Juárez de México, S.S. y U.N.A.M.

La técnica de VCNM se utiliza de manera rutinaria en laboratorios de electrodiagnóstico como ayuda para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades de sistema nervioso periférico.

En nuestro país, los valores normativos son los reportados por autores de otros países; debido a que en el nuestro no existen tablas de valores normales.

En un reporte previo (Prieto-Martínez, et al., XXV Cong. Nal. Cien. Fisiol., 1982), se encontró que los valores de VCNM para el segmento Codo/Punto de Erb, eran diferentes a los reportados por diversos autores, y no así en el segmento Muñeca/Codo. La explicación más razonable fue el suponer que la temperatura puede variar por segmentos, y dado que para ese experimento fue tomada solamente a nivel del antebrazo, el objetivo del presente estudio fue el determinar la VCNM de los nervios Mediano y Ulnar en el segmento Codo/Punto de Erb en un grupo de sujetos sanos, tomando la temperatura a nivel del brazo en el momento en que se tenían 30 y 33 °C en el antebrazo.

Se midió la VCNM de los nervios Mediano (n=80) y Ulnar (n=80) de 40 sujetos (21 hombres y 19 mujeres; edades 18 a 35 años, promedio=25.87±6.98 años). Para ello, se registraron los potenciales provocados por estimulación distal y proximal, y se empleó un sistema de registro CADWELL 6200A con un programa para cálculo automatizado de la VCNM, siguiendo la técnica de Johnson (1980). Para alcanzar las temperaturas establecidas, se utilizó un cuadro de temperatura controlada, midiéndose la temperatura a nivel de la piel durante cada registro, haciendo uso de un termistor en ambos sites.

Las temperaturas a nivel del tercio medio del antebrazo fueron de 30 y 33 °C, mientras que simultáneamente a nivel del brazo fueron de 31 y 33.5 °C.

Las velocidades promedio fueron: para el Mediano: 77.64±5.17 (a 31°C); 70.76±5.47 (a 33.5°C); para el Ulnar: 69.20±4.57 (a 31°C); 71.95±5.09 (a 33.5°C). Usando el factor de corrección para la temperatura, obtenido en un trabajo previo, los valores fueron: para el Mediano: 77.19±5.17 (a 30°C); 75.54±5.47 (a 33°C); para el Ulnar: 68.46±4.58 (a 30°C); 71.82±5.09 (a 33°C).

Los resultados demuestran que existe una diferencia de temperatura entre los diferentes segmentos de los miembros que influye en la determinación de la VCNM. Sin embargo, al comparar los valores obtenidos (con factor de corrección) con las tablas internacionales que se emplean en la clínica como referencia, se observa que nuestros resultados continúan siendo mayores, lo cual sugiere la posible presencia de otros factores que afectan la VCNM.