



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”

**“ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA
CLOROFILINA SOBRE LA ACCIÓN
GENOTÓXICA Y TERATÓGENA
DEL CROMO (VI)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)
P R E S E N T A :

M. en C. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM.

El desarrollo de esta investigación estuvo financiado por los proyectos PAEP-UNAM 500306, 500406 y 014302. Así mismo se contó con beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

El presente trabajo fue presentado de manera parcial o total en los siguientes eventos académicos:

A) NACIONALES

EVENTO: VII CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA, CELEBRADO DEL 28 DE SEPTIEMBRE AL 2 DE OCTUBRE DE 1997 EN ENSENADA, BAJA CALIFORNIA.

TÍTULO DE LA PONENCIA: "EFECTO DEL TRIÓXIDO DE CROMO SOBRE LA INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS POLICROMÁTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN".

AUTORES: GARCÍA-RODRÍGUEZ M.C., LÓPEZ-SANTIAGO, V., PINEDA-HERRERA, E. Y ALTAMIRANO-LOZANO, M.

EVENTO: V CONGRESO CONJUNTO DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA Y LA SOCIEDAD MEXICANA DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA, CELEBRADO DEL 27 DE SEPTIEMBRE AL 2 DE OCTUBRE DE 1998 EN EL PUERTO DE ACAPULCO, GRO. MEX.

TÍTULO DE LAS PONENCIAS:

- "CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE MN-PCE EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN TRATADOS CON CROMO, USANDO LAMINILLAS CUBIERTAS CON NARANJA DE ACRIDINA".

AUTORES: GARCÍA-RODRÍGUEZ M.C., LÓPEZ-SANTIAGO, V., Y ALTAMIRANO-LOZANO, M.

- "ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO Y TERATÓGENO DEL CrO₃, AL SER ADMINISTRADO DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS EN EL RATÓN".

AUTORES: GARCÍA-RODRÍGUEZ M.C., LÓPEZ-SANTIAGO, V., Y ALTAMIRANO-LOZANO, M.

EVENTO: IV CONGRESO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, CELEBRADO LOS DÍAS 23 Y 24 DE MARZO DEL 2001, EN CULIACÁN, SINALOA.

TÍTULO DE LA PONENCIA: "REDUCCIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DE METALES PESADOS POR COMPONENTES DE LA DIETA".

AUTORES: M. C. GARCÍA-RODRÍGUEZ Y M. ALTAMIRANO-LOZANO.

EVENTO: CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2002, CELEBRADO DEL 24 AL 28 DE SEPTIEMBRE DEL 2002 EN LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, MORELIA, MICH.

TÍTULO DE LAS PONENCIAS:

- "MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS DEL TRIÓXIDO DE CROMO, UTILIZANDO HIBRIDACIÓN *in situ* CON FLUORESCENCIA EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN *in vivo*".

- "ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA ACCIÓN GENOTÓXICA DEL TRIÓXIDO DE CROMO DURANTE EL DESARROLLO FETAL DEL RATÓN *in vivo*".

-"ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO Y TERATÓGENO DEL TRIÓXIDO DE CROMO DURANTE EL DESARROLLO FETAL DEL RATÓN *IN VIVO*".

-ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CLOROFILINA SOBRE LA ACCIÓN GENOTÓXICA DEL CrO₃ EN ERITROCITOS POLICROMÁTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN *IN VIVO*"

EVENTO: III CONGRESO NACIONAL SOBRE DEFECTOS AL NACIMIENTO, CELEBRADO DEL 12 AL 14 DE JUNIO DEL 2003, EN UNIDAD DE CONGRESOS DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, MÉXICO, D. F.

TÍTULO DE LA PONENCIA: "EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CLOROFILINA EN COMBINACIÓN CON TRIÓXIDO DE CROMO, SOBRE EL DESARROLLO FETAL DEL RATÓN".

AUTORES: CARMEN GARCÍA-RODRÍGUEZ, GERARDO PÉREZ-FLORES Y MARIO ALTAMIRANO-LOZANO.

B) INTERNACIONALES

EVENTO: 5º CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MUTAGÉNESE, CARCINOGENESE E TERATOGÉNESE AMBIENTAL, CELEBRADO DEL 15 AL 20 DE NOVIEMBRE DE 1998, EN CURITIBA, PARANÁ-BRASIL.

TÍTULO DE LA PONENCIA: "ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE MN-PCE INDUCIDA POR CrO₃, EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN, USANDO LA TÉCNICA DE NARANJA DE ACRIDINA.

AUTORES: GARCÍA-RODRÍGUEZ M.C., LÓPEZ-SANTIAGO, V. Y ALTAMIRANO LOZANO, M.

EVENTO: 2000 ENVIRONMENTAL MUTAGEN SOCIETY ANNUAL MEETING, CELEBRADO DEL 8 AL 13 DE ABRIL DEL 2000, EN NEW ORLEANS, LA, USA.

TÍTULO DE LA PONENCIA: "EFFECT OF CHLOROPHYLLIN ON THE MN-PCE INDUCTION IN PERIPHERAL BLOOD OF MICE EXPOSED TO CHROMIUM TRIOXIDE *IN VIVO*."

AUTORES: GARCÍA-RODRÍGUEZ M. C., LÓPEZ-SANTIAGO, V. Y ALTAMIRANO LOZANO, M.

ORGANIZADOR: ENVIRONMENTAL MUTAGEN SOCIETY.

EVENTO: 7TH ICMIA INTERNATIONAL CONFERENCE ON MECHANISMS OF ANTIMUTAGENESIS AND ANTICARCINOGENESIS, CELEBRADO DEL 23 AL 27 DE SEPTIEMBRE DEL 2000, EN GRAND RAPIDS, MICHIGAN, USA.

TÍTULO DE LA PONENCIA: "STUDY OF PROTECTIVE EFFECT OF CHL IN THE MN-PCE INDUCTION BY Cr(VI) *IN VIVO*".

AUTORES: GARCÍA-RODRÍGUEZ M. C., LÓPEZ-SANTIAGO, V. Y ALTAMIRANO LOZANO, M.

ORGANIZADOR: ELSEVIER SCIENCE.

EVENTO: EIGHTH INTERNACIONAL CONFERENCE ON MECHANISMS OF ANTIMUTAGÉNESE AND ANTICARCINOGENESIS, CELEBRADO DEL EL 6 DE OCTUBRE DE 2003 EN PISA, ITALIA.

TÍTULO DE LA PONENCIA: "COMPARISON OF EFFECTS OF CHLOROPHYLLIN ADMINISTERED BY DIFFERENTS ROUTS ON GENOTOXICITY OF HEXAVALENT CHROMIUM IN CD-1 MICE".

AUTORES: M. CARMEN GARCÍA-RODRÍGUEZ, GERARDO PÉREZ-FLORES, J. CARLOS NEVARES, J. F. SÁNCHEZ Y MARIO ALTAMIRANO-LOZANO.

ORGANIZADOR: CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE Y LA INTERNACIONAL ASSOCIATION OF ENVIRONMENTAL MUTAGÉNESE SOCIETIES.

Expreso mi sincero agradecimiento:

Al Dr. Mario A. Altamirano Lozano por su asesoría y dirección en el presente trabajo.

A los integrantes del Comité Tutoral por su tiempo e importantes aportaciones en el desarrollo y conclusión del presente trabajo de investigación.

Dr. Mario A. Altamirano Lozano
Dr. Pedro R. Morales Ramírez
Dr. Emilio Rojas del Castillo
Dra. Patricia Rosas Saucedo

A los distinguidos Miembros del Jurado por sus comentarios y atinadas observaciones para mejorar y enriquecer el presente escrito.

Dr. J. Miguel Betancourt Rule
Dr. Mario A. Altamirano Lozano
Dr. Pedro R. Morales Ramírez
Dr. Víctor M. Mendoza Núñez
Dra. A. Roció Ortiz Muñiz
Dr. Emilio Rojas del Castillo
Dra. Judith Guzmán Rincón

A los Alumnos que ayudaron y participaron en la realización del trabajo experimental, porque con su valiosa colaboración contribuyeron a la realización del presente trabajo de investigación.

Biol. Victoria López Santiago
Biol. Elizandro Pineda Herrera
Biol. Yolanda Santiago Moreno
P. de Biol. Gerardo Pérez Flores
P. de Biol. Juan Carlos Nevarez López

Y a todos mis compañeros y amigos que de una manera u otra me ayudaron e impulsaron a lograr esta meta...

Particularmente quisiera agradecer a mis Maestros:

Porque he aprendido que lograr el Doctorado implica mucho más que un apelativo en mi nombre y un cuadro colgado en la pared... esto lo aprendí de mis maestros.

Quisiera empezar por el primero que me enseñó, que cuando uno discute un tema hay que tener fundamentos... mi padre, **Clemente García Loyola**, gracias por esas largas confrontaciones, porque desde niña me enseñaste a cuestionar todo, inclusive lo que tu decías...

En mi primer intento de hacer investigación, afortunadamente el destino me puso como maestro al **Dr. Pedro Morales Ramírez**, quien fue la persona que me enseñó a plantear preguntas antes de dar respuestas, a caminar antes de empezar a volar y no ha sido fácil... aún sigue siendo mi maestro y espero lo sea por siempre...

Hay personas que aunque no estén cerca de uno son nuestros maestros, porque representan un ejemplo a seguir, y aquí quisiera mencionar con todo mi respeto al **Dr. Miguel Betancourt Rule**, quien me ha brindado su apoyo en todo momento, gracias por esos detalles que simplemente me han hecho ver su enorme calidad humana, pero sobre todo gracias por la amistad.

En mi vida he tenido grandes tropiezos, pero estos me han permitido conocer gente valiosa como el **Dr. Víctor Mendoza Núñez**, quien me ha enseñado que un doctor también se forma fuera de un laboratorio... no se si en todos los países sea igual, pero en éste no se puede hacer investigación solo sacando "dieses"... gracias por compartir conmigo esa experiencia y gracias por seguir confiando en mí...

Así como he tenido grandes desilusiones en mi vida, también me he encontrado con grandes sorpresas. He aprendido que ser crítico es bueno, pero es mejor ser crítico y propositivo, en este andar fue como encontré a un maestro de vida al **Mtro. Juan F. Sánchez Ruiz**, a quien le agradezco todas sus enseñanzas y su confianza... hoy en día no cualquiera cree en la gente que viene detrás.

Y finalmente, quisiera hacer mención al **Dr. Roberto Domínguez Casala**, por ser un maestro en toda la extensión de la palabra y ser su alumna es todo un honor para mí... gracias por todo el apoyo, por adoptarme en estos últimos meses y por ayudarme a "cerrar esta puerta" llamada tesis.

A todos mis maestros... ¡Gracias por participar en mi formación!

Dedico este trabajo a:

Alejandro

Por ser el amor de mi vida... por todo y cuanto me has dado, por tu apoyo incondicional, porque este trabajo sin tu ayuda jamás se hubiera logrado... ¡simplemente porque te amo!

Alex y Deira

Por ser mí inspiración día a día... por estar a mi lado, por su apoyo, por su comprensión, por todos esos momentos que le dan el verdadero sentido a mi vida, por ser como son... ¡los amo!.

*A la memoria de mi padre Clemente García Loyola
Por todo cuanto me diste, porque se que aún me
sigues cuidando... ¡te extraño tanto!*

*A mi madre Concepción Rodríguez Salguero
Porque me enseñaste a luchar en la adversidad,
porque me enseñaste que el mejor camino,
no siempre es el más corto...*

*A mis hermanos: Clemente, Beatriz, Gerardo y Luis
Por todos los momentos que hemos pasado
juntos, por su amor fraternal...*

*A Manuel y Altagracia
Por su apoyo incondicional en todo momento...*

*A la memoria de Vicky
Porque más que mi alumna fuiste mi amiga...
Jamás te olvidaré!*

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE DE ABREVIACIONES.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Modulación y protección de daño genotóxico.....	4
1.2. Clorofilina.....	8
1.2.1. Principales usos.....	10
1.2.2. Aplicaciones terapéuticas.....	10
1.2.3. Efectos antigenotóxicos y anticancerígenos.....	13
1.2.4. Mecanismos de protección de daño genotóxico.....	15
1.2.5. Toxicidad.....	17
1.3. Protección de agentes teratógenos.....	20
1.4. Agentes genotóxicos y teratógenos.....	21
1.4.1. Metales pesados (cromo).....	22
1.4.1.1. Generalidades y principales usos del cromo.....	22
1.4.1.2. Mecanismos de inducción de daño.....	27
1.5. Evaluación de la genotoxicidad.....	29
1.5.1. Micronúcleos.....	31
1.6. Evaluación de alteraciones durante el proceso reproductivo.....	34
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
3. HIPÓTESIS.....	39
4. OBJETIVOS.....	39
4.1. General.....	39
4.2. Particulares.....	40
5. MATERIAL Y MÉTODO.....	41
5.1. Animales.....	41
5.2. Reactivos.....	42
5.3. Tratamientos.....	41
5.4. Establecimiento de las dosis del Cr (VI) y de la CFL.....	42
5.5. Tiempos de evaluación.....	42
5.5.1. Genotoxicidad y citotoxicidad.....	42
5.5.2. Fetotoxicidad y teratogenicidad.....	45
5.6. Evaluaciones.....	45
5.6.1. Genotoxicidad y citotoxicidad.....	45
5.6.2. Alteraciones en el desarrollo.....	48
5.7. Efecto de la CFL sobre la inducción de daño genotóxico y citotóxico del Cr(VI).....	51

5.8. Relación entre la protección de la CFL y la cinética de inducción de MN por el Cr (VI).....	53
5.8.1. Método de hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia.....	54
5.9. Efecto de la CFL sobre alteraciones del desarrollo.....	56
5.10. Análisis estadístico.....	56
6. RESULTADOS.....	57
6.1. Cinética de inducción de MN y de la frecuencia de EPC por Cr (VI) (hembras sin preñar).....	57
6.2. Origen de MN inducidos por CrO ₃	62
6.3. Efecto de CFL sobre el daño genotóxico.....	66
6.4. Cinética de inducción de MN y de la frecuencia de EPC por CrO ₃ (hembras preñadas).....	74
6.5. Efecto genotóxico y citotóxico del CrO ₃ en los fetos.....	77
6.6. Efecto de la CFL sobre el daño genotóxico del CrO ₃ en hembras preñadas.....	80
6.7. Efecto de la CFL sobre el daño genotóxico en fetos obtenidos de hembras tratadas con CrO ₃	83
6.8. Efecto de la CFL sobre el daño causado por el CrO ₃ en el desarrollo fetal.....	86
7. DISCUSIÓN.....	93
7.1. Cinética y origen MN inducidos por Cr (VI).....	93
7.2. Efecto de la CFL sobre el daño genotóxico del Cr (VI).....	96
7.3. Efecto de la CFL y Cr (VI) sobre la citotoxicidad.....	100
7.4. Efecto de la CFL sobre las alteraciones del desarrollo inducidas por CrO ₃	100
8. CONCLUSIONES.....	104
9. REFERENCIAS.....	106
10. PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTE TRABAJO.....	130

RESUMEN

La búsqueda y el estudio de sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN, surge como una opción complementaria a los estudios de genotoxicidad, ya que al conocer los mecanismos de protección se pueden generar alternativas para contrarrestar los efectos de los agentes inductores del daño genotóxico. El objetivo de este estudio consistió en evaluar los efectos de la clorofilina (sal de la clorofila) sobre el daño genotóxico y teratógeno inducido por las sales metálicas del cromo (VI) [CrO_3 ó $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$]. Se emplearon hembras de ratón de la cepa CD-1 sin preñar y preñadas, a las que se les trató con clorofilina (CFL) (20 mg/kg), Cr (VI) (20 mg/kg) ó CFL(20 mg/kg) y Cr (VI) (20 mg/kg). La ruta de administración de la CFL fue vía oral ó intraperitoneal (i.p.), mientras que la del Cr (VI) por vía i.p. El efecto genotóxico fue evaluado con el análisis de las frecuencias de micronúcleos (MN) en sangre y el daño teratógeno con las malformaciones externas y esqueléticas en los fetos. Las muestras de sangre de los organismos adultos fueron obtenidas de la vena caudal y de los fetos por decapitación.

En los resultados de este trabajo se observó que, en las hembras sin preñar la CFL administrada de forma i.p reduce sólo la frecuencia de MN inducidos por el CrO_3 en la hora 12, a partir de esto se plantea que los MN que se forman en respuesta al tratamiento con CrO_3 tienen diferentes vías de inducción, y que la CFL administrada por vía i.p. tiene efecto sólo sobre los MN originados de manera temprana. Cuando se administró la misma dosis de CFL por vía oral, la disminución en el número de MN se presentó tanto en la hora 12 como en la 48, por lo que se puede decir que la vía de administración de la CFL juega un papel importante en sus mecanismos de protección, los cuales pueden estar relacionados con la velocidad de absorción de la CFL. Al probar el efecto del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, se observó que este a diferencia del CrO_3 tiene un menor efecto genotóxico. Al administrar la CFL previamente al tratamiento con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, se disminuyen significativamente los MN observados en la hora 48, esto quiere decir que la protección de la CFL está relacionada con el compuesto y con la toxicidad del mismo.

En las hembras preñadas la administración de CrO_3 en el día 15 de gestación induce daño genotóxico al igual que en sus crías. Estos incrementos en el número de MN son menores en comparación con el efecto en las hembras sin preñar. Cuando se administró la CFL por vía i.p previa a la aplicación del CrO_3 , se observó que si bien la CFL reduce el número de MN, esta reducción no es significativa, por lo que se puede decir que la CFL no protege del daño genotóxico a las hembras gestantes tratadas con CrO_3 en el día 15 de gestación. Sin embargo, en los fetos sí se disminuyó el número de MN inducidos por CrO_3 con el tratamiento previo de las madres. Estas observaciones hacen suponer que al redistribuirse la CFL entre la madre y sus crías, posiblemente la concentración de la CFL fue más alta en los fetos.

En cuanto a las evaluaciones de las frecuencias de eritrocitos policromáticos (EPC) en hembras sin preñar no se observaron efectos, por lo que se puede decir que no hubo un efecto citotóxico claro inducido por los tratamientos de CFL, CrO_3 y CFL- CrO_3 . En las hembras preñadas hubo una disminución de la frecuencia de EPC sólo en el grupo tratado con CrO_3 , esto nos hace suponer que los efectos citotóxicos podrían depender de la condición endocrina de los animales. En los fetos se observó una disminución de la frecuencia de EPC tanto en el grupo tratado como en el testigo, por lo que se sugiere que la disminución se debe al desarrollo fetal y no a los tratamientos.

Finalmente, la administración del CrO_3 a hembras preñadas incrementó el número de malformaciones externas y esqueléticas en los fetos. La administración de CFL antes del tratamiento con CrO_3 en hembras preñadas reduce significativamente las alteraciones externas. A partir de estos resultados se puede sugerir que existe una relación entre los mecanismos genotóxicos y el daño teratógeno.

ABSTRACT

The search and study of substances with protective properties or damage modulators to the DNA emerge as a complementary option to genotoxicity studies. The analyses of the protection mechanisms generate alternatives to counteract the effects of agents causing the genotoxic damage. The aims of the present project were to study the effects of chlorophyllin (Na and Cu salt of chlorophyll) on the genotoxic and teratogen damage induced by the metallic salts of chromium (VI) [CrO_3 ó $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ [Cr (VI)]]. Female mice from CD-1 strain, pregnant and non-pregnant, were treated with chlorophyllin (CHL) (20 mg/kg), Cr (VI) (20 mg/kg) or with CHL and Cr (VI) at 20 mg/kg body weight. The CHL was administered by gavage or intraperitoneal (i.p.), and Cr (VI) via i.p. The genotoxic effect was evaluated with the analysis of the micronucleus (MN) in the peripheral blood and teratogen effect with external and skeletal macroscopic malformations in fetuses. Blood samples of adult organisms were obtained from the tail vein and in the fetuses from the trunk after decapitation.

In non-pregnant females, CHL administrated i.p. reduces the frequency of MN induced by CrO_3 12 h after treatment, such effect not was observed 48 h after it. These results suggest that MN are formed in response to treatment CrO_3 by different ways. When the same dose of CFL was administrated via oral, a decrease in the number of MN was presented 12 and 48 h after treatment. It can be said that the administration via of CFL plays an important role in its mechanisms of protection; such differences could be explained by the speed of absorption of the CFL. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ showed lower genotoxic effects than CrO_3 . CFL administrated previously to the treatment with $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, diminishes significantly the MN observed 48 h after treatment, suggesting that CFL protection could be related to the compound and its toxicity.

The administration of CrO_3 to 15-day pregnant mice induced genotoxic damage in the mothers and pups. The increment in the frequency of MN are smaller compared to the effect in non-pregnant females. CFL administrated via i.p. previously to the injection of CrO_3 reduced the number of MN present in the pregnant mice in a non-significant way. Nevertheless, a significative reduction in the number of MN was observed in the fetuses of pregnant mice treated with CFL before CrO_3 administration. These observations suggest that CFL is redistributed between the mother and her breeding, suggesting that the CFL level high in the fetuses is higher in the mother.

The frequency of polychromatic erythrocytes (PCE), in non pregnant females mice was not modify by CFL, CrO_3 and CFL- CrO_3 treatments, suggesting that a cytotoxic effect was not induced. The frequency of PCE was lower in CrO_3 pregnant treated mice than control ones, suggesting that the cytotoxic effects could depend on the endocrine condition of the animals. No significant effects of CrO_3 PCE in the fetuses were observed. In the fetuses, the diminution of PCE was observed both in treated and control groups, suggests that such diminution obeys to the fetal development and not to the treatments.

Finally, CrO_3 injected to pregnant mice resulted in significant increase in the number of external and skeletal malformations. CFL treatment before CrO_3 injection resulted in a decrease in the frequency of external alterations. Taken together present results suggest the existence of an interrelationship between the genotoxic mechanisms and teratogenic damage induced by CrO_3 .

1. INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que la dieta humana esta asociada con la inducción del cáncer. En 1981, Doll y Peto publicaron los resultados de un estudio de correlación entre los factores de exposición y la muerte inducida por cáncer, ellos observaron que alrededor de una tercera parte de los canceres humanos están relacionados con la dieta (figura 1). A partir de estos datos, diversos investigadores empezaron a estudiar las propiedades de los componentes de la dieta humana, y encontraron que nuestra dieta está constituida tanto por sustancias con actividad mutágena y cancerígena, como por sustancias capaces de contrarrestar o inhibir estos efectos (Ames, 1983; Renner, 1990; Block *et al.*, 1992; Surh y Ferguson, 2003).

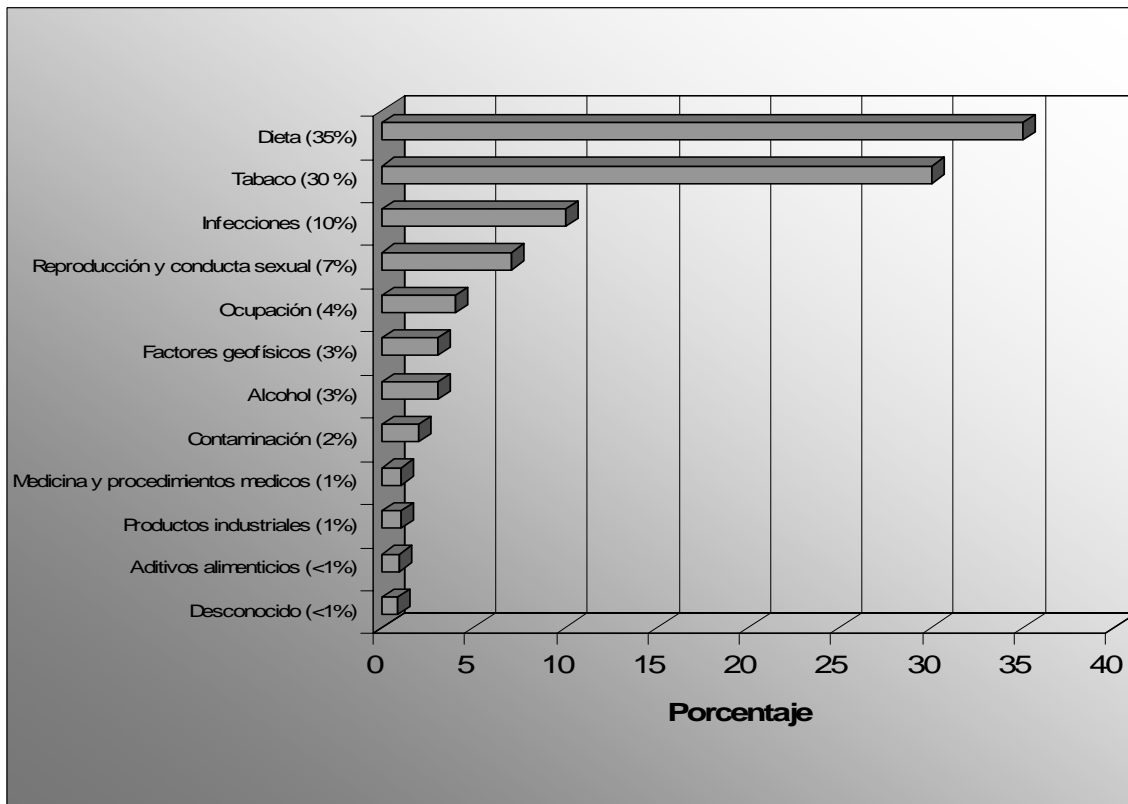


Figura 1. Proporciones estimadas de factores de riesgo asociados con muerte por cáncer (adaptada por Lee y Park, 2003 de Doll y Peto, 1981).

Las frutas y los vegetales, fueron de los primeros componentes de la dieta que llamaron la atención para su estudio como posibles agentes protectores del daño al ADN, esto debido a que están constituidos por sustancias que tienen propiedades antioxidantes. En el cuadro 1 se muestran algunas de los componentes de las frutas y vegetales que en la actualidad han sido descritas con potencial antimutágeno y anticancerígeno (Graham *et al.*, 1978; Shu *et al.*, 1989; Barone *et al.*, 1992; Block *et al.*, 1992; Harris y Ferguson 1993; Ferguson, 1994).

Cuadro 1. Principales fuentes alimenticias de algunos constituyentes de la dieta descritos como antimutágenos y anticancerígenos.

Principales fuentes alimenticias	Sustancia protectora de daño mutágeno o cancerígeno
Margarina, hígado- Vegetales rojos y amarillos (zanahoria, jitomate etc.)-	Vitamina A Beta carotenos
Principalmente en cítricos-	Vitamina C
Aceites vegetales y harinas-	Vitamina E
Carnes, huevos-	Selenio
Vegetales verdes-	Clorofila
Crucíferaceas-	Indole-3-carbinol
Chile-	Capsaicina
Vegetales fibrosos- (Piña, melón etc.)	Fibra vegetal
Ajo-	Organosulfide
Sábila-	Antraquinona
Uvas rojas- Vinos maduros	Flavonoides



Particularmente la clorofila y sus sales las clorofilinas, han sido identificadas como potentes antimutágenos y anticancerígenos en diferentes sistemas, observándose inclusive un mayor potencial comparado con otros componentes que presentan la misma actividad (Lai *et al.*, 1980; Ong *et al.*, 1986; 1989; Whong *et al.*, 1988; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001).

Hoy en día, las clorofilinas y particularmente la cupri-sódica (CFL) son ampliamente estudiadas con los siguientes objetivos: 1) establecer sus posibles mecanismos de protección y con ello deducir los mecanismos de daño de algunos agentes químicos (Neault *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 1999; Kyung-Joo *et al.*, 2000), y 2) utilizarlas como prueba en el tratamiento y la prevención de diferentes cánceres, con la intención de una posible aplicación (Breinholt *et al.*, 1999; Chernomorsky *et al.*, 1999; Peluso *et al.*, 2000).

Hasta el momento los resultados obtenidos con las CFL han sido muy satisfactorios y tienen una gran aceptación, tanto que, en el año 2001, el “National Institute of Environmental Health Science”, USA, respaldó una investigación en la República de China, encabezada por los Doctores Kensler, Groopman y Bailey, en la cual se está probando la CFL en personas voluntarias expuestas de manera natural en su dieta a concentraciones elevadas de aflatoxina B1. Algunas de las observaciones realizadas en este estudio, indican que en las personas tratadas con CFL se reduce al menos el 20 % de la inducción de daño al ADN, aunado a la reducción del riesgo de desarrollar hepatocarcinomas (Bailey, 1998; Egner *et al.*, 2000; 2001; 2003). Este mismo grupo de investigadores está realizando pruebas preclínicas con líneas celulares tumorales, para conocer los mecanismos por los que la CFL suprime el cáncer y determinar las posibles condiciones del tratamiento en humanos (Blum *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2003). Estos resultados generan grandes expectativas para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con daño al ADN, como algunos tipos de cáncer, mediante el uso de sustancias con propiedades antimutágenas y anticarcinógenas.

1.1. Modulación y protección de daño genotóxico

La modulación y protección de daño genotóxico son temas que siempre han llamado la atención, sin embargo, no es sino hasta la década de los noventas cuando inicia el mayor auge de su estudio. En las primeras pruebas, las sustancias que se analizaron resultaron ser tóxicas, por lo que fueron dejadas de lado. Tiempo después, Phillips (1975) publica un estudio epidemiológico en el que concluye que el estilo de vida y los hábitos alimenticios juegan un papel importante en el riesgo de desarrollar cáncer. Con base en sus hallazgos, se planteó la posibilidad de que los constituyentes de la dieta, particularmente la vegetariana, contienen sustancias que de alguna manera controlan o protegen a los organismos de los efectos de algunos agentes inductores de cáncer.

A partir del análisis de Phillips varios investigadores reiniciaron los estudios sobre la modulación y protección del daño contra diversos mutágenos. En estos trabajos probaron preferentemente extractos de frutas y vegetales, observando que ambos tipos de extractos tienen gran actividad antimutágena (Kada *et al.*, 1978; 1984; Morita *et al.*, 1978; Terwel y Van der Hoeven, 1985).

Estudios posteriores permitieron discriminar entre los componentes que presentaban una mayor actividad antimutágena y se encontró que pigmentos como los beta-carotenos y la clorofila, así como las vitaminas A, C, D y E eran los que les conferían esta propiedad a las frutas y a los vegetales (Lai, 1979; Lai *et al.*, 1980; Whong *et al.*, 1988; Ong *et al.*, 1989; Gentile y Gentile, 1991).

De todos estos componentes la clorofila es la más abundante en las plantas verdes (figura 2).

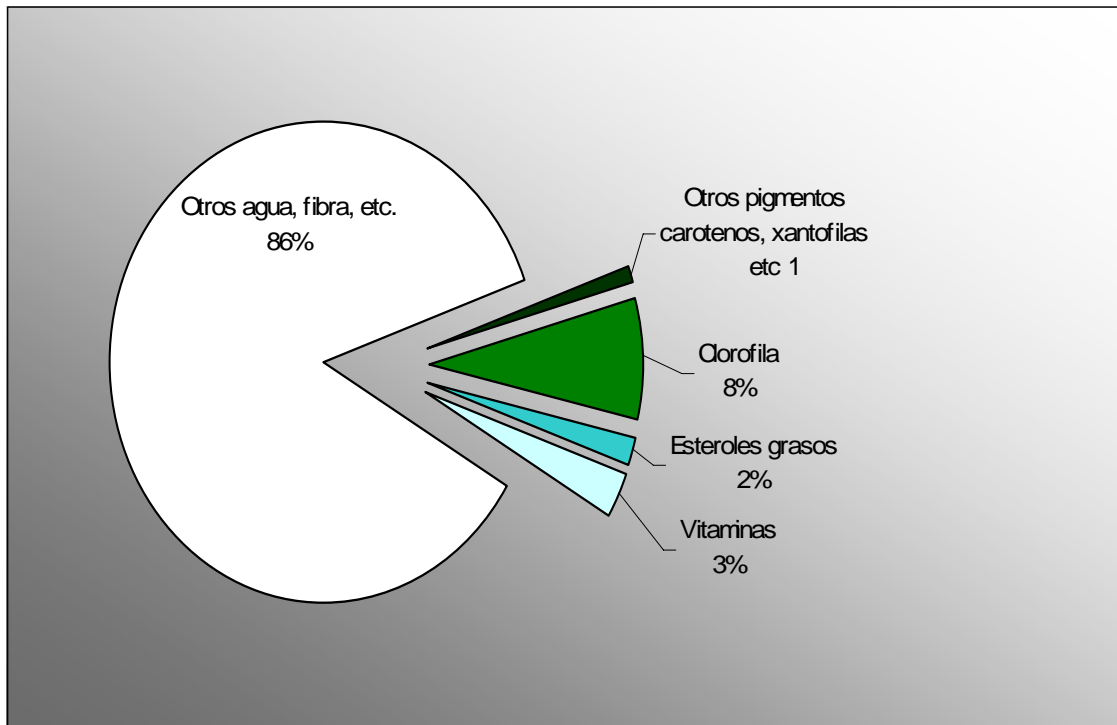


Figura 2. Proporción de componentes en los vegetales verdes.

Actualmente, la lista de los componentes de la dieta con propiedades antimutágenas y anticancerígenas, se ha incrementado considerablemente, de tal suerte que ya se han descrito alrededor de 500 agentes con este potencial, y con base a esos resultados se han podido plantear algunos mecanismos de protección como: a) *Bioantimutagénesis*, b) *Desmutagénesis*, c) *Inactivación de enzimas*, d) *Prevención de la formación de sustancias activadas metabólicamente*, e) *Formación de complejos o captura, mediante la formación de enlaces con el mutágeno o la adsorción* f) *Antioxidación y captura de radicales libres*. (Ferguson, 1994; Lee y Park, 2003). En el cuadro 2 se muestran algunas de las sustancias que componen la dieta y que han presentado propiedades antimutagenas y anticancerígenas, así como el mecanismo de protección propuesto y el órgano blanco (Ferguson, 1994; Lee y Park, 2003).

Cuadro 2. Descripción del posible mecanismo de acción de agentes antimutágenos y anticancerígenos que se encuentran en la dieta (Lee y Park, 2003 actualizada).

Agente Quimiopreventivo	Descripción de posible mecanismo de acción	Órgano blanco
-Beta-carotenos:	-Antioxidante (Desactivación del carcinógeno)	-Pulmón, piel, páncreas
-Vitamina A:	-Antioxidante (Inducción de la diferenciación en la apoptosis)	-Pulmón, piel
-Vitamina E:	-Antioxidante (Inhibe daño oxidativo ADN)	-Pulmón, hígado, piel
-Vitamina C:	-Antioxidante (Inhibición de la formación del carcinógeno)	-Estomago, páncreas
-Carbinol-3-Indol:	-Antioxidante (Inductor de las enzimas del citocromo P-450)	-Flora estomacal, hígado, pulmón, tejido mamario
-Capsacian:	-Desactiva carcinógenos en apoptosis	-Piel, estomago
-Organosulfito:	-Inhibición del citocromo P-450 (Inductor de enzimas de la fase II)	-Piel, colon
-Antraquinona:	-Antigenotóxico en apoptosis	-Estomago, colon, hígado
-2(3)-ter-butil-4-hidroxianisol:	-Inductor de enzimas del citocromo P-450	-Hígado, glándula mamaria, estomago
-Fibras vegetales:	-Capturador de mutágenos	-Estomago
-Clorofilina:	-Capturador de mutágenos y radicales libres	-Páncreas, hígado, estomago
-Vainillina:	-Repara y suprime mutaciones (un "verdadero" antimutágeno)	-Células de médula ósea y linfocitos

--	--	--

En un estudio hecho en el hospital de Turín se analizaron 162 pacientes con cáncer de bazo y 104 individuos testigo, a los cuales se les evaluó la presencia de aductos en el ADN. Durante el estudio se observó que en los pacientes con cáncer que ingirieron diferentes porciones de frutas y vegetales se disminuía la formación de los aductos, de ahí que se planteara la posibilidad de que este tipo de dieta es capaz de proteger contra la inducción de cáncer en el bazo (Peluso *et al.*, 2000). Estas observaciones generan grandes expectativas para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con daño al ADN. Sin embargo, pese a estos resultados las perspectivas para su aplicación aún son limitadas. Si bien se están estudiando los mecanismos de protección que ejercen estos agentes, es necesario conocer el proceso en el cual es más conveniente administrar el agente y obtener una mayor eficacia (Lee y Park, 2003).

El impacto que el estudio de la antimutagénesis y la anticarcinogénesis tiene en la prevención y el tratamiento de las enfermedades humanas ha generado que se desarrollen diferentes eventos internacionales para discutir los principales resultados y avances en el área. Entre estos se encuentra la “International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis”, que se celebra cada tres años, en la cual se ha llegado a las siguientes conclusiones en cuanto al uso de sustancias moduladoras o protectoras del daño al ADN (Lohman *et al.*, 2001; Surh y Ferguson, 2003):

1) El uso de antimutágenos y anticarcinógenos en los humanos, puede ser uno de los procedimientos más efectivos para prevenir el cáncer y las enfermedades genéticas.

2) No se debe descartar la posibilidad de que el daño puede ser incrementado por el agente protector o modulador.

3) *El principal efecto de estos antimutágenos es sobre mutágenos comunes de exposición cotidiana y diaria, lo cual resulta aún de mayor importancia.*

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

1.2. Clorofilina

La clorofila es el pigmento natural que le da el color verde a los vegetales. Fue aislada en 1817 por los químicos Pelletier y Caventou de Francia, quienes la separaron por primera vez y la llamaron clorofila, nombre derivado del adjetivo griego *jlorós* y el sustantivo *fýllon*, que significa “verde de hoja”.

La molécula de clorofila (figura 3a) posee una gran similitud con la de hemoporfirina de la sangre (figura 3c). La clorofila es poco estable y poco soluble en el agua, por lo que se ha preferido trabajar con sus sales (clorofilinas) con mejores resultados (Kephart, 1955; Sarkar *et al.*, 1994a y b).

Las clorofilinas se obtienen por el método de Schertz y Toepfer, mediante la hidrólisis alcalina de la clorofila, en la cual se sustituye el radical fitil y alquil de los grupos carbometoxil. El magnesio del núcleo de la clorofila es inestable, por lo que es reemplazado por otro metal que le confiere estabilidad a la molécula. La introducción del tipo de metal depende del pH del medio en el cual se lleve a cabo la reacción (Kephart, 1955; Sarkar *et al.*, 1994a).

Figura 3. Estructura química de la clorofila (a), de la clorofilina cupri-sódica (b) y de la hemoporfirina (c).

De todas las sales de la clorofila, la más empleada terapéuticamente y en la investigación es la CFL, cuya estructura química está conformada por un anillo tetrapirrólico con puentes dobles conjugados y cobre en el centro (figura 3b). Su fórmula química es $C_{34}H_{31}Na_4CuO_6$. La CFL es una sustancia microcristalina verde-azul oscura que produce el efecto Tyndall en solución acuosa, tiene una banda de absorción característica entre 630 a 688 nm, y es muy soluble en agua y alcohol (Kephart, 1955; Oster *et al.*, 1964; Newmark *et al.*, 1987). Se ha observado que el origen, el grado de purificación y la forma de extracción juegan un papel importante en su actividad (Dashwood, 1997).

1.2.1. Principales usos

El primer uso reconocido de la clorofila en la industria fue dado por Becquerel en 1874, como sensibilizador en fotografía por sus propiedades fotoquímicas. A partir de esa fecha, a la clorofila y sus sales se les han dado muchos y variados usos (cuadro 3) (Kephart, 1955; Ghosh *et al.*, 1992).

1.2.2. Aplicaciones terapéuticas

Dada la semejanza estructural química de la CFL con el pigmento de la sangre (hemoporfirina) (figura 3), las primeras aplicaciones estuvieron encaminadas hacia el tratamiento de la anemia. En un estudio realizado en conejos anémicos por el Dr. Burgi (1932), observó que cuando se les administraba CFL, estos eran capaces de regenerar sus células sanguíneas. Posteriormente, se realizaron estudios con pacientes anémicos y al administrar la CFL por vía oral, se incrementaba la hemoglobina y los eritrocitos en la sangre. A partir de estos datos, se planteó que el cuerpo humano puede emplear sustancias pirrólicas preformadas para la construcción de la hemoglobina (Berlinson, 1969). En la

actualidad la CFL aún se vende en tiendas naturistas como complemento alimenticio para el tratamiento de la anemia.

Cuadro 3. Principales usos descritos para la CFL.

USO	DESCRIPCIÓN	EJEMPLOS
-En los alimentos	Colorante de dulces, chicles, sopas, gelatinas etc., así como de vegetales frescos verdes para mejorar la apariencia.	
-En los cosméticos	Colorante en perfumes, lociones, jabones, pastas dentales, etc.	
-En la conservación de alimentos	Dentro de las bolsas ya que absorbe el oxígeno y otros gases.	
- En la agricultura	Se le usa en el cultivo de las plantas, por ser un buen transportador de micronutrientes, como el cobalto, zinc manganeso, hierro y molibdeno.	
-Agente catalítico	En la oxidación de compuestos orgánicos.	
- Protector solar	En cremas, lociones y pomadas, por su capacidad de absorber la radiación dañina del sol y por lo tanto proteger a la piel.	
-Agente desodorante	Reduce y elimina el olor producido por los cambios metabólicos de los alimentos, las bebidas y el cigarro (bencil mercaptano, ácido tioglicólico y trimetilamina).	

El Dr. Burgi, también estudió a la CFL en el tratamiento de la hipertensión, en 1932 publicó un libro llamado “Chlorophyll as a

Pharmaceutical". A pacientes hipertensos se les trató con CFL por vía oral por un tiempo de dos a seis semanas y se observó que la presión se normalizaba. Por su lado, Nagase (1986) inspirado en estos resultados administró CFL por vía intravenosa o intraperitoneal a ratas y detectó un incremento en el flujo sanguíneo gástrico dado bajo condiciones isquémicas, sin la participación del sistema nervioso autónomo (Kephart, 1955; Nagase, 1986). También se ha observado que la administración de la CFL tiene una débil o casi nula actividad hemolítica y que aceleran la coagulación de la sangre, así como el proceso de cicatrización (Krasnikova, 1974; Kojima, 1978).

Aunado a lo anterior, a la CFL se le han descrito propiedades antiinflamatorias, ya que inhibe las reacciones alérgicas (Nagai *et al.*, 1983), por lo que la CFL ha sido utilizada en el tratamiento de heridas y quemaduras de la piel con buenos resultados, de hecho algunas pomadas la contienen. De igual manera, se ha observado que la CFL disminuye el olor pútrido en las infecciones, esto debido a que produce un ambiente desfavorable para el crecimiento de las bacterias y de los hongos, es por esta razón que ha sido considerada como un agente bacteriostático y fungicida (Nakeeb y Yousef, 1974). También se ha usado con éxito en el tratamiento de infecciones supurativas como la gingivitis severa (piorrea) y las úlceras en general (Krasnikova, 1973; Murakami *et al.*, 1979).

A la clorofila y CFL se les ha propuesto para el tratamiento clínico de la pancreatitis, ya que su administración en pacientes con esta enfermedad disminuye el dolor abdominal, las náuseas y el vómito, además de que los niveles de amilasa en la orina se reducen hasta los valores normales (Oda *et al.*, 1971), y dadas sus propiedades desodorantes y laxantes se les utiliza eficientemente en los cuidados generales de los pacientes geriátricos (Young y Beregi, 1980). Otra de las propiedades de la CFL es que aumenta la oxidación de las grasas de la dieta. En estudios realizados con ratas se observó que la administración combinada de aceite de maíz y CFL, disminuía la absorción del

colesterol en el intestino, por lo que también se ha propuesto su uso en el control de peso (Tsuji *et al.*, 1978; Ebihara y Shuhachi, 1982; Cho, 1984). De igual manera, se ha observado que la CFL presenta capacidad de protección contra la peroxidación lipídica en los microsomas y mitocondrias relacionadas con el envejecimiento, la arteriosclerosis y el daño hepático entre otras (Sato *et al.*, 1984).

Como se puede observar a la clorofila y sus sales se les han atribuido una gran cantidad de propiedades terapéuticas prácticamente desde su descubrimiento. Sin embargo, lo que ha llamado la atención recientemente son sus propiedades antimutágenas y anticarcinógenas, ya que éstas están relacionadas con su posible aplicación en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

1.2.3. Efectos antigenotóxicos y anticancerígenos

La actividad antimutagénica de la clorofila y CFL se ha probado con éxito en diferentes sistemas, desde el ensayo de Ames con *Salmonella* hasta líneas celulares de mamíferos (cuadro 4).

A partir de los estudios en los que se ha demostrado que la clorofila cuando es ingerida por los humanos en su dieta (vegetales verdes) es transformada en feofitina, pirofeofitina y feoforbida, las cuales presentan una actividad antitumorígena y antimutágena contra compuestos como el 3-metilclorantreno, se ha sugerido que los derivados de la clorofila pueden jugar un papel importante en la prevención del cáncer (Chernomosky *et al.*, 1999). Otros resultados que apoyan esta idea son los obtenidos por Sato *et al.*, (1977 y 1986), quienes describen las propiedades antioxidantes de la CFL, al observar que bloquea la peroxidación lipídica en homogenados de hígado de rata, así como la producción de óxido nítrico en cultivos celulares RAW 264.7 (Cho *et al.*, 2000).

Cuadro 4. Actividad antimutágena de la clorofila y CFL (basada en Sarkar et al., 1994b).

AGENTE	SISTEMA DE PRUEBA	AGENTE INDUCTOR DE DAÑO (EFECTO)	REFERENCIA
CFL	<i>S. typhimurium</i>	Benzo[a]pyreno(+) y otros carcinógenos(+)	Arimoto <i>et al.</i> , 1980 ^a
	<i>S. typhimurium</i> /sistema microsómico S9 de hígado de rata	Productos de pirolisis de aminoácidos(+)	Arimoto <i>et al.</i> , 1980 ^b
	Células V59 de hámster Chino	Benzo[a] pirenos (+)	Katoh <i>et al.</i> , 1983
	<i>S. typhimurium</i>	Mezclas complejas de la dieta y ambientales(+)	Ong <i>et al.</i> , 1986
	<i>S. typhimurium</i>	Aflatoxina B ₁ (AFB ₁)	Whong <i>et al.</i> , 1988
	<i>S. typhimurium</i> /ensayo de microsomas	Mezcla de complejos mutagénicos(+)	Ong <i>et al.</i> , 1989
	Ensayo de <i>Salmonella</i> resistente a arabinosa	MNNG, AFB ₁ , B[a]P, 2AA (+)	Warner <i>et al.</i> , 1991
	<i>Salmonella</i> /activación de hígado de trucha	AFB ₁ y 2 aminas heterocíclicas(+)	Dashwood <i>et al.</i> , 1991
	Pruebas de mutagenicidad en <i>Salmonella</i>	2-amino-3-metilimidazol[4,5-f]-quinolina (+)	Dashwood y Liew, 1992
	<i>Drosophila</i>	Oxido de Cromo (VI) (+)	Olvera <i>et al.</i> , 1993
	<i>S. typhimurium</i> (TA1535/pSK 1002)	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol (+) y Mitomicina C (+)	Okai <i>et al.</i> , 1996
	Fibroblastos celulares BALB/c3T3	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato	Okai <i>et al.</i> , 1996
Clorofila + CFL-Cu-Na	<i>S. typhimurium</i>	3 metilclorantreno y B[a]P (+)	Lai, 1979; Lai <i>et al.</i> , 1980
	<i>Salmonella</i> /pruebas de reversión de genes microsómicos	Carcinógenos de acción directa e indirecta	Kimm <i>et al.</i> , 1982

	<i>S. typhimurium</i> TA98 y <i>Drosophila</i> sp	Trp-P-2(+)	Negishi <i>et al.</i> , 1989
--	--	------------	------------------------------

En estudios *in vivo* realizados en salmones, se ha observado que la CFL es capaz de disminuir la hepatocarcinogenicidad inducida por las aflatoxinas B1 y B2 (Breinholt *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999). De igual manera cuando la CFL se administró a ratas en las que se indujo desarrollo de cáncer de colon, esta inhibió el crecimiento del tumor (Blum *et al.*, 2001).

Por otra parte, debido a que uno de los problemas más graves del uso de sustancias antineoplásicas es lo agresivo del tratamiento y las reacciones secundarias, se ha sugerido el uso de la CFL en combinación con estos tratamientos, para disminuir la inducción del daño al ADN provocado por el agente antineoplásico, tal es el caso de la ciclofosfamida, la cual ha mostrado menores efectos genotóxicos y por lo tanto tóxicos en los organismos, sin alterar el efecto antineoplásico cuando se administra con CFL (Te *et al.*, 1997; Gentile *et al.*, 1998).

Otros de los efectos protectores del daño genotóxico de la CFL se muestran en el cuadro 5, como lo son su capacidad para proteger del daño causado por agentes clastógenos y aneuploidógenos, así como del daño inducido por la radiación. Con respecto a la radioprotección, existen datos en los que la administración de 200 mg/kg de peso corporal de CFL, no disminuye la frecuencia de MN inducidos por 1.0 Gy de radiación gamma (Morales-Ramírez *et al.*, 1996).

1.2.4. Mecanismos de protección de daño genotóxico

Se ha propuesto que la CFL protege al ADN de los efectos genotóxicos mediante la inhibición de la función enzimática del sistema de activación metabólica. Esta propuesta se basa en que la CFL inhibe el deterioro de las

funciones microsómicas hepáticas, las cuales forman parte del sistema metabólico de drogas o de xenotoxinas (Sato *et al.*, 1984; Imai *et al.*, 1986).

Cuadro 5. Efectos de protección de la clorofilina (basada en Sarkar *et al.*, 1994b)

EFFECTO DEL AGENTE	SISTEMA DE PRUEBA	AGENTE	REFERENCIA
A. Efectos anticlastogénicos	Células de ovario (hamster)	Tiotepa (+)	Renner, 1990
	Médula ósea de ratón	Nicotina (+) Cloruro de cobalto (+) Cloruro de cesio (+) Cloruro de mercurio (+) Oxido de cromo (VI) (+) Clordano (-)	Sen <i>et al.</i> , 1991 Palit <i>et al.</i> , 1991 Ghosh <i>et al.</i> , 1991a Ghosh <i>et al.</i> , 1991b Sarkar <i>et al.</i> , 1993 Sarkar <i>et al.</i> , 1993
	Sangre periférica de ratón	Oxido de cromo (VI) (+)	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 2001
B. Efecto antianeuplogénico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D61.M	nocodazol (+)	Verma <i>et al.</i> , 1996
C. Efectos radioprotectores	<i>Drosophila</i>	Radiación gamma	Zimmering <i>et al.</i> , 1990 Pimentel <i>et al.</i> , 1999
	Médula ósea de ratón	Radiación gamma	Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994
	Espermatogonias de ratón	Radiación gamma	Morales-Ramírez-Mendiola-Cruz, 1995

De igual manera se ha sugerido que la clorofila y la CFL interactúan directamente con el mutágeno y forman complejos, lo que se traduce en una inactivación de estos agentes inductores de daño (Lai, 1979; Lai *et al.*, 1980; Breinholt *et al.*, 1999; Chernomorsky *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999). Estudios realizados con espectrofotometría muestran que la CFL forma compuestos moleculares no covalentes con aminas heterocíclicas, con lo cual la CFL limita la biohabilidad de carcinógenos y mutágenos (Dashwood y Guo, 1992; 1993).

La CFL también impide la formación de enlaces covalentes de los agentes mutágenos con el ADN, además de que disminuye la absorción de los mutágenos en el intestino y aumenta su eliminación por orina y bilis, por lo que

la CFL *in vivo* puede actuar también como desmutágeno e interceptor de moléculas (Dashwood *et al.*, 1991; Dashwood y Liew, 1992; Amara-Mokrane, *et al.*, 1996; Peluso *et al.*, 2000).

Tomando en consideración algunas de las características fisico-químicas de la CFL, como son su alto grado de resonancia y deslocalización de electrones, se ha planteado que la CFL captura radicales libres (Simic, 1988; Arimoto *et al.*, 1993). Hadnagy y Seemayer (1988), obtuvieron las primeras evidencias directas de que la CFL inactiva radicales libres (entre ellos las especies reactivas de oxígeno). Estas observaciones apoyan la idea de que uno de los mecanismos de radioprotección que posee la CFL es la captura de estos radicales (Kimm *et al.*, 1982; Robins y Nelson, 1989; Bronzetti *et al.*, 1990; Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994).

También se ha observado que la CFL protege del daño causado por agentes clastógenos y aneuploidógenos (Renner, 1990; Sarkar *et al.*, 1993; Verma *et al.*, 1996; García-Rodríguez *et al.*, 2001) y que la protección de la CFL es más efectiva claramente hacia mutágenos de acción indirecta que los de acción directa (Kimm *et al.*, 1982; Terwell y Van der Hoeven, 1985; Chernomorsky *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2001).

1.2.5. Toxicidad

En estudios realizados específicamente para determinar los posibles efectos tóxicos de la CFL se observó que al ser administrada por vía oral (v.o), intraperitoneal (i.p.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) y subcutánea (s.c.), durante varios días a conejos, perros y humanos no producía efectos tóxicos colaterales (Kephart, 1955).

Harrison *et al.*, (1954), administraron CFL en la dieta de ratas a lo largo de toda su vida en una proporción 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. Cuando realizaron la necropsia a estos animales no se detectaron cambios patológicos en el hígado, riñón y bazo, ni se encontraron efectos tóxicos causados por el cobre de la molécula de la CFL. En el cuadro 6 se resume la LD₅₀ (mg/kg de peso corporal) para la CFL en diferentes animales.

En los tratamientos terapéuticos en los cuales se ha administrado CFL en humanos, como ha sido el caso de pacientes geriátricos (100 mg), pacientes con pancreatitis (0.35 mg), pacientes hipertensos (0.8 a 1.5 g) y pacientes anémicos (700 mg), no se han observado efectos tóxicos secundarios, ni se han desencadenado reacciones antigénicas (Oda *et al.*, 1971; Young y Beregi, 1980; Ghosh *et al.*, 1992).

Cuadro 6. LD₅₀ para diferentes animales (FAO/WHO, 1974).

AGENTE	SISTEMA DE PRUEBA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	LD ₅₀ (mg/kg de peso corporal)
CFL-Cu-Na	Ratón	intravenosa	>400
		intramuscular	>500
		intraperitoneal	>1000
	Rata	intravenosa	>250
		intraperitoneal	>1000
	Conejo	intravenosa	>200
intraperitoneal		>500	
Gato	intraperitoneal	>60	
Perro	intravenosa	>200	
	intramuscular	>50	
	intraperitoneal	>200	
Cerdo	intravenosa	>10	
	intramuscular	>20	
	intraperitoneal	>50	



De igual manera, en otros estudios realizados en diferentes sistemas de prueba, se ha concluido que la CFL no produce efectos citotóxicos ni genotóxicos (Lai, 1979; Kimm *et al.*, 1982; Ong *et al.*, 1986; 1989; Negishi *et al.*, 1989; Warner *et al.*, 1991; Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994; Morales-Ramírez y Mendiola-Cruz, 1995).

Sin embargo, cabe mencionar que aunque se ha observado que la CFL no presenta efectos clastógenos cuando es administrada en ratones a dosis de 0.77 a 1.5 mg/kg de peso corporal (Sen *et al.*, 1991), a dosis mayores de 3 mg/kg de peso corporal induce de manera marginal daño genotóxico (Sarkar *et al.*, 1993; 1996). De igual manera Romert *et al.*, (1992), observaron que aunque la administración de altas concentraciones de CFL reduce la mutagenicidad de las nitrosaminas, N-nitrosonorcicotina y del 4-(N-metil-N-nitrosamina)-1-(3piridinil)-2-butanona, la CFL en bajas concentraciones puede potenciar al doble la mutagenicidad de estos compuestos en el ensayo de *Salmonella*, por lo que se ha sugerido que la CFL actúa potenciando o inhibiendo el daño.

En un estudio reciente, realizado en nuestro laboratorio con ratones hembras preñadas, se observó que el tratamiento i.p. con 100 mg/kg de CFL en el día 8 de gestación, induce pérdida total de las camadas. Este efecto se presentó de forma dosis-dependiente, además de que los sitios de implante en el útero eran marcados como “anillos verdes”. A partir de estos resultados se puede inferir que la CFL es capaz de llegar al sitio en donde se está llevando a cabo el desarrollo embrionario y fetal. Así mismo la inyección de CFL indujo la formación de malformaciones externas y esqueléticas de manera marginal, y debido a que las sustancias identificadas como agentes teratógenos son aquellas que incrementan claramente el número de alteraciones, se planteó que la embrioletalidad y las alteraciones del desarrollo observadas con los

tratamientos de 40 y 50 mg/kg de CFL, son debidas a un efecto tóxico más que teratógeno (García-Rodríguez *et al.*, 2002).

Como se ha descrito la CFL es capaz de proteger del daño al ADN y dado que prácticamente no tiene efectos tóxicos, resulta interesante estudiar si las dosis de CFL que no son tóxicas para las hembras preñadas ni para sus crías, son capaces de proteger del daño genotóxico durante la gestación, evaluando tanto a los organismos adultos, como a los fetos. Estos estudios parten del hecho de que algunos mecanismos de inducción de daño genotóxico han sido descritos también como inductores de daño teratógeno.

1.3. Protección de agentes teratógenos

Como ya se describió, en la actualidad se desarrolla intensamente la búsqueda y el estudio de sustancias que pudieran contrarrestar los efectos causados por agentes mutágenos y cancerígenos, así como determinar los mecanismos de protección (Ferguson, 1994; Surh y Ferguson, 2003). Aunado a esto, se han iniciado otras líneas de investigación dirigidas a evaluar si la protección que ejercen los agentes antígenotóxicos también se observan durante la gestación tanto en las madres como en las crías, además de estudiar la posible protección de la inducción del daño teratógeno. Para ello se utilizan agentes que tienen propiedades genotóxicas y teratógenas, y que sus mecanismos de inducción de daño son similares (Eriksson y Borg, 1991; Nosel y Klein, 1992; Desesso *et al.*, 1994).

Los primeros trabajos en los cuales se estudió la posible protección del daño teratógeno se realizaron en la década de los sesentas, pero los agentes que se probaron resultaron ser muy tóxicos. Cuando resurgieron con éxito los trabajos de protección y modulación de daño genotóxico, algunos investigadores retomaron los estudios de protección en el desarrollo embrionario y fetal, para lo cual consideraron aquellas alteraciones de las que

se habían descrito mecanismos similares de inducción de daño teratogénico y genotóxico, con el fin de probar las mismas sustancias descritas como protectoras de daño genotóxico (Friber, 1986; Vogel y Spielmann, 1989; Pillans *et al.*, 1990).

Por su parte Eriksson y Borg (1991), describieron a partir de los resultados obtenidos en un estudio *in vitro*, que las alteraciones del desarrollo pueden disminuir en el tejido embrionario, si este es capaz de capturar radicales libres. A partir de estas observaciones Desesso *et al* (1994), probaron el D-mannitol (un capturador específico de radicales libres de hidroxil), en conejos y observaron que reducía la toxicidad inducida por hidroxiurea durante el desarrollo embrionario.

En otros estudios se ha observado que cuando se les administra a los embriones (*in vivo* e *in vitro*) metionina, se disminuye el efecto embriotóxico causado por el valproato de sodio, así como los defectos del cierre del tubo neural que induce este compuesto en las crías (Nosel y Klein, 1992).

Como se puede observar, la posibilidad de emplear sustancias que pudieran contrarrestar los efectos dañinos causados durante el desarrollo, abre un campo de investigación hasta el momento poco explorado. Considerados los resultados y datos que se tienen hasta el momento es posible iniciar este tipo de estudios, así como el tratar de entender los mecanismos por los cuales se pueden proteger o modular de las alteraciones reproductivas.

1.4. Agentes genotóxicos y teratógenos

Se ha descrito que el daño genotóxico puede ser indicativo indirectamente de riesgo carcinogénico o teratogénico, ya que pueden estar implicados los mismos mecanismos. Los mecanismos de inducción de daño genotóxico han sido ampliamente descritos y aunque los mecanismos del daño teratogénico son más complejos, se ha propuesto que bajo determinadas condiciones se puede

correlacionar el daño genotóxico y teratógeno, lo que resulta ser una hipótesis de gran interés (Kram, 1982; Novotná y Jelinek., 1990; Giavini *et al.*, 1990; Zemlickis *et al.*, 1993).

1.4.1. Metales pesados (cromo)

Los metales pesados, son agentes químicos que han sido identificados como inductores tanto de daño genotóxico como teratógeno. El grado de daño de los metales depende principalmente de sus propiedades químicas, de su estado de oxidación y de su solubilidad (Vouk, 1986; Newman e Intosh, 1991).

Particularmente, los compuestos del cromo (Cr), son sustancias que han sido ampliamente estudiadas, debido a que forman parte de una gran variedad de compuestos utilizados en la industria, pero también por la asociación que tienen con la inducción de cáncer y de alteraciones en recién nacidos (IARC, 1990; Hartwig, 1995).

1.4.1.1. Generalidades y principales usos del cromo

El Cr está de manera ubicua en el ambiente y es muy común encontrarlo en el suelo, en las rocas y en los organismos vivos. Presenta estados de oxidación que van de Cr (2-) a Cr (6+). Se le encuentra principalmente en las formas trivalente (Cr (III)) y hexavalente (Cr (VI)), esta última es producida principalmente por fuentes antropogénicas, rara vez se le encuentra de manera natural en el ambiente. Al Cr y sus compuestos se les emplea en diversas industrias, en la figura 4 se muestran algunos de sus principales usos.



Figura 4. Principales usos de los compuestos de cromo (P.H.S., 2000).

El Cr(III) es un micronutriente esencial, ya que juega un papel importante en el metabolismo de proteínas, azúcares y grasas potenciando la acción de la insulina (Anderson, 1981; CDPC, 1992), por lo que es muy común encontrarlo en suplementos dietéticos.

Se ha estimado que la exposición a elevadas concentraciones de Cr, induce severos daños en la salud, los cuales van desde toxicidad (nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad, genotoxicidad) hasta la inducción de carcinomas que pueden ocasionar la muerte. De igual manera, se ha observado una mayor ocurrencia de malformaciones en los recién nacidos de madres que están ocupacional o accidentalmente expuestas a este metal (Trivedi *et al.*, 1989; IARC, 1990; Liu y Dixon, 1996; P.H.S., 2000).

En nuestro país está documentado un caso de toxicidad por exposición a compuestos de Cr, que es el caso de “Cromatos de México”. En 1958 se estableció en San Francisco Chilpan, municipio de Tultitlán, Estado de México, una empresa procesadora de cromita para obtener cromato de sodio y potasio, los procesos se llevaban a cabo a cielo abierto, no se tenía control de las emisiones de polvos ni de las aguas residuales, por lo que los desechos sólidos se acumulaban en los patios de la empresa. Estos desechos se emplearon durante varios años por las autoridades municipales para el relleno de las calles de dicha zona. En 1977 se reportaron casos de obreros con; Séptum nasal perforado, hipertrofia de cornetes, mucosa nasal hiperémica, irritación conjuntival, dermatosis y cáncer. En cuanto a los recién nacidos hubo un incremento en las alteraciones. Al hacerles el análisis de sangre y pelo a quienes presentaban estos efectos, se encontraron concentraciones de cromo por arriba de los intervalos establecidos (Ortiz-Monasterio *et al.*, 1987).

Desgraciadamente, no se está expuesto a estos compuestos únicamente de manera ocupacional, ya que las emisiones automovilísticas y el consumo de cigarrillos son también una fuente importante a su exposición. Se han encontrado ó concentraciones de entre 0.24 a 6.3 mg Cr/kg en los cigarrillos producidos en los Estados Unidos (IARC, 1990; P.H.S., 2000).

Los efectos biológicos de exposición al Cr están asociados con la forma en la cual se encuentra el compuesto. Las formas metálicas y trivalentes al parecer no inducen efectos tóxicos directos, debido a que estas formas no son

capaces de atravesar la membrana celular *in vivo* (Norseth, 1981; Arslan *et al.*, 1987; Liu y Dixon, 1996; De Flora, 2000; P.H.S., 2000; O'Brien *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que los compuestos del Cr (VI) si son capaces de atravesar la membrana celular *in vivo* y producir daño al ADN. Diversos estudios han documentado el daño genotóxico de los compuestos del Cr (VI), mediante el incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC), de micronúcleos (MN) y de mutaciones puntuales. También se ha observado inducción de Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) y de transformación celular, así como de alteraciones en el ciclo de duplicación del ADN. Cabe mencionar que algunas de estas pruebas fueron evaluadas durante el desarrollo embrionario y fetal, por lo que se planteó que el Cr (VI) tiene la habilidad de atravesar la placenta (EPA, 1984a; De Flora *et al.*, 1990; IARC, 1990; De Flora, 2000; P.H.S., 2000; O'Brien *et al.*, 2003).

Particularmente se ha descrito que el trióxido de cromo (CrO_3) es uno de los compuestos de Cr (VI) con mayor peligrosidad, ya que es capaz de inducir rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN además que se ha confirmado su actividad como inductor de cáncer (Royle, H., 1975; Sarto *et al.*, 1982; Singh *et al.*, 1998; Danadevi *et al.*, 2004).

En el cuadro 7 se muestran algunos de los principales efectos del Cr (VI) evaluados en diferentes sistemas de prueba tanto *in vivo* como *in vitro*. De igual manera en el cuadro 8 se muestran algunas de las alteraciones observadas, cuando los organismos han sido expuestos durante su desarrollo embrionario y fetal a los compuestos de Cr (VI).

Cuadro 7. Estudios citotóxicos y genotóxicos con compuestos de Cr (VI).

Compuesto estudiado	Sistema de prueba	Dosis	Resultados	Referencia
K ₂ CrO ₄	Medula ósea de ratón <i>in vivo</i>	30, 40, 50 mg/kg	clastogenicidad	Trivedi <i>et al.</i> , 1989
K ₂ Cr ₂ O ₇	Células de roedores <i>in vitro</i>	10 ⁻³ mM	Incrementa ICH	Bianchi <i>et al.</i> , 1980
K ₂ Cr ₂ O ₇	Células de ratón <i>in vitro</i>	10 µM	Inhibe la síntesis de ADN	Nishio y Uyeki, 1985
K ₂ Cr ₂ O ₇ CrO ₃ CaCrO ₄	Células <i>in vitro</i>	1,10, 100 µg/ml	Inhibe la síntesis del ADN, induce ICH	Bianchi <i>et al.</i> , 1980; Gomez-Arroyo <i>et al.</i> , 1981
K ₂ Cr ₂ O ₇	Ratas <i>in vivo</i>	2.5 mg/kg	Estrés oxidativo y daño en los tejidos	Bagchi <i>et al.</i> , 1997
K ₂ Cr ₂ O ₇ Na ₂ Cr ₂ O ₇	Algas y plantas	20-10 000 µg/l	Inhibición de la fotosíntesis y retardo en el crecimiento, desbalance en la concentración de K, P, Fe, Mg, Ca.	Cervantes y Moreno, 1999
CrO ₃	<i>Vicia faba</i>	0.001, 0.01, 0.05, 1-3 %	Alteraciones cromosómicas, anomalías en el huso mitótico y MN	Villagómez, 1981 Gómez-Arroyo <i>et al.</i> , 1983
CrO ₃	Sangre periférica de ratón <i>in vivo</i>	20 y 25 mg/kg	Inducción de MN	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 1998; 2000; 2001

Cuadro 8. Daño teratogénico de algunos compuestos del Cr (VI).

Compuesto estudiado	Sistema de prueba	Dosis	Resultados	Referencia
CrO ₃	Hamster <i>in vivo</i>	8 mg/kg	Paladar hendido, reabsorciones	Gale <i>et al.</i> , 1979
Na ₂ Cr ₂ O ₇	Ratones <i>in vivo</i>	10 mg/kg	Inhibe la formación de cartilago	Danielsson <i>et al.</i> , 1982.
Na ₂ Cr ₂ O ₇	Pollos <i>in vitro</i>	0.1 µg/ml	Inhibe condrogenesis	Danielsson <i>et al.</i> , 1982
K ₂ Cr ₂ O ₇	Ratones <i>in vivo</i>	250,500,1000 ppm	Ausencia de sitios de implantación, malformaciones externas y esqueléticas	Trivedi <i>et al.</i> , 1989

1.4.1.2. Mecanismos de inducción de daño

El Cr (VI) es biológicamente activo, sus mecanismos bioquímicos están involucrados en el ciclo redox mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). El Cr (VI) pasa fácilmente la membrana celular por los canales de proteínas, en donde, algunos componentes puede ser reducidos intracelularmente por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la glutatión reductasa, los carbohidratos, el ácido ascórbico, el citocromo P-450, el aldehído oxidasa entre otros. El Cr (VI) al ser reducido produce reactivos intermedios como el Cr(V), Cr(IV) y finalmente Cr(III) (O'Brien *et al.*, 2003). En la figura 5 se ilustran las interrelaciones entre el metabolismo del Cr (VI) y su posible genotoxicidad.

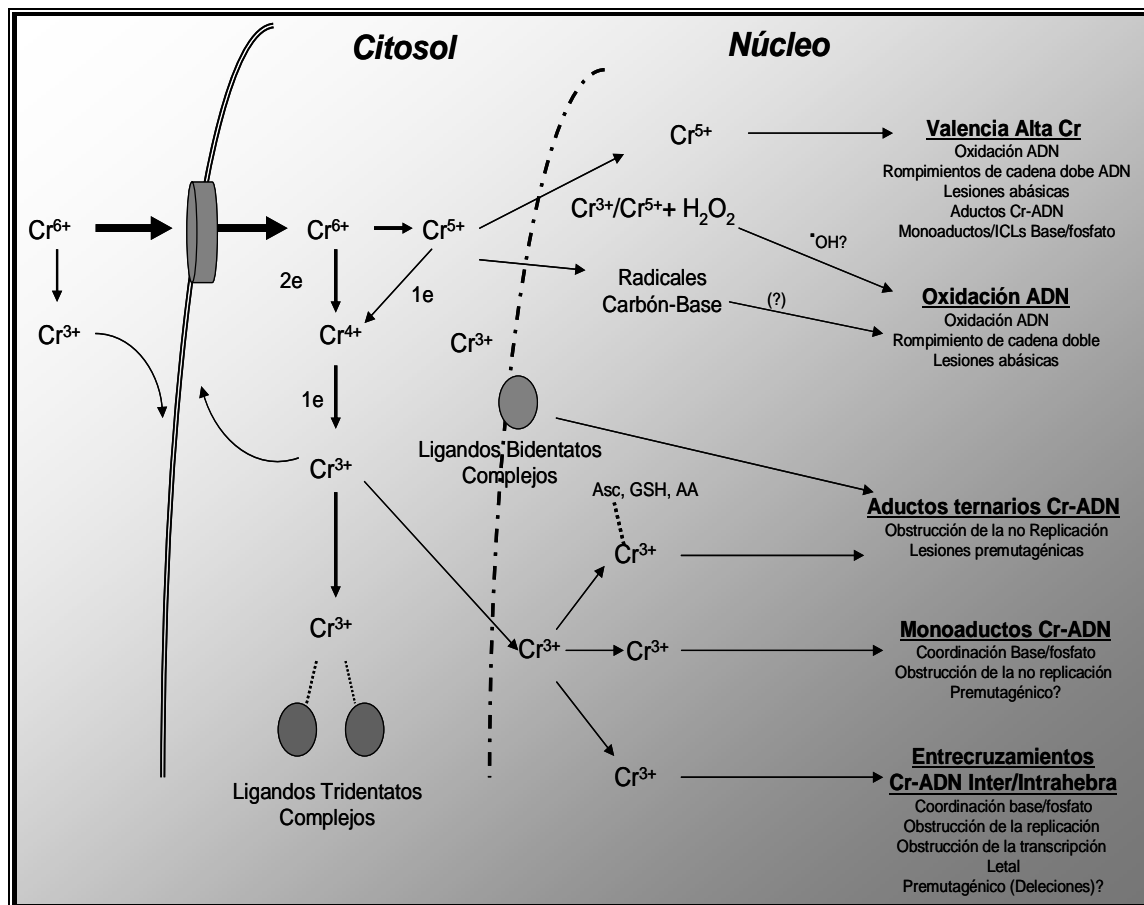


Figura 5. Principales rutas involucradas en las lesiones genéticas causadas por el Cr (O'Brien *et al.*, 2003 modificada).

El mecanismo más importante de activación de oxígeno por metales de transición, involucra la reacción de Fenton/Haber-Weiss generando un poderoso radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), que daña al ADN. En el ciclo de Haber-Weiss (figura 6), se observa que el Cr (VI) puede catalizar la formación de radicales $\text{OH}\cdot$ a partir del radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), esto es, el radical ($\text{O}_2\cdot^-$) puede reducir al Cr (VI) para generar Cr(V), el cual puede reaccionar con el H_2O_2 para producir el radical $\text{OH}\cdot$ y generar nuevamente Cr (VI) (Shi y Dalal, 1992).

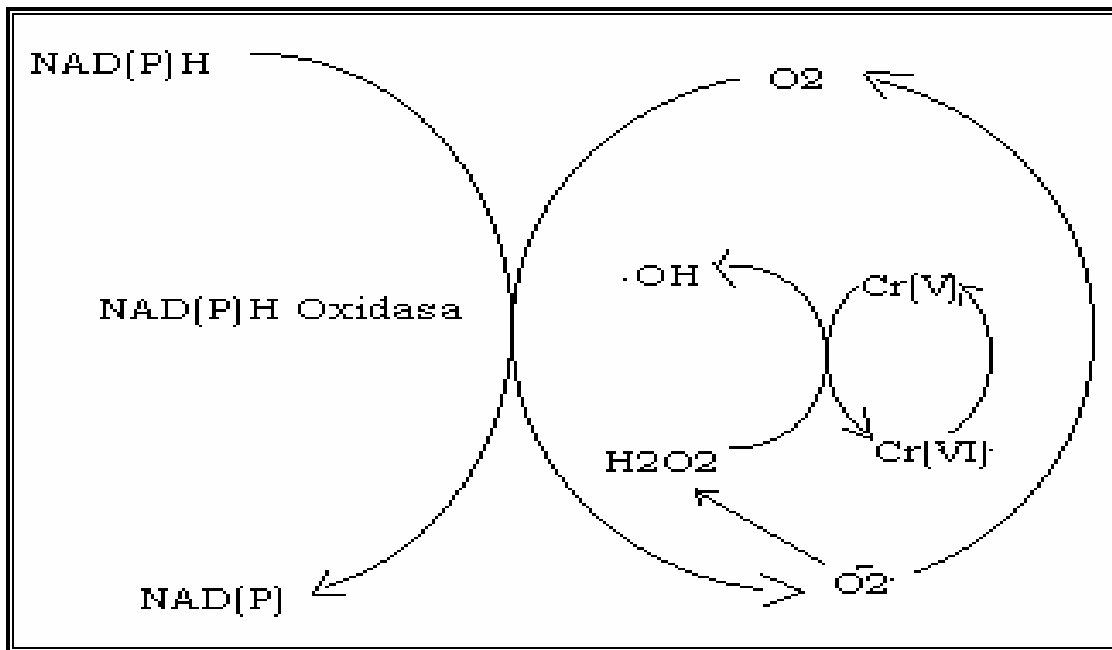


Figura 6. Ciclo de Haber Weiss y la reacción de Fenton (Shi y Dalal, 1992).

La formación del radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) es particularmente importante, debido a que durante la fagocitosis los macrófagos por ejemplo generan grandes cantidades del radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) en el llamado estallido respiratorio. Cabe aclarar que el radical ($\text{O}_2\cdot^-$) es relativamente inerte, pero si algún ión metálico (como el Cr (VI)) está presente en el sitio de formación pierde su inactividad (Shi y Dalal, 1992).

El radical hidroxil es genotóxico, ya que desencadena estrés oxidativo que daña los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, induce rompimientos de la cadena de ADN y enlaces cruzados, forma sitios apurínicos/apirimídicos y provoca daño oxidativo al ADN. Además, se ha observado que dependiendo del sitio intracelular y especialmente de la distancia a molécula del ADN blanco, el proceso de reducción puede llevar a la activación o detoxificación del Cr (Vega y Reynaga, 1990; Shi y Dalal, 1992).

1.5. Evaluación de la genotoxicidad

El término referente a la genotoxicidad fue usado por primera vez para establecer la relación entre la inducción de cáncer y daño genético. Posteriormente, la “Comisión Internacional para la Protección contra los Mutágenos y Carcinógenos Ambientales”, redefinió este término y estableció que sólo sea considerado para aquellos agentes que son capaces de interactuar con el ADN. La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varias etapas. El agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares. Una vez dentro de la célula puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa) o bien puede ser activado por enzimas metabólicas (de acción indirecta). Se da entonces la interacción con el ADN produciéndose un daño que puede ser reparado eficiente o ineficientemente (Ames, 1989).

En términos generales, los ensayos de prueba para la detección de daño genotóxico se agrupan dependiendo del tipo de alteración que detectan y pueden ser:

a) *Mutaciones génicas*; entendidas como sustituciones de pares de bases, adiciones o supresiones. Estas modificaciones pueden llegar a inactivar un gen, aunque normalmente permiten al individuo sobrevivir y reproducirse, con lo cual las mutaciones génicas se pueden establecer y

heredar a las siguientes generaciones. Se detectan mediante procesos de secuenciación de muestras de ADN (Cole y Skopek, 1994).

b) Alteraciones en la integridad del ADN; son lesiones premutagénicas, como la formación de aductos, ligamientos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o dos hebras. Estas alteraciones pueden ser reparadas enzimáticamente, por lo que si esto ocurre no constituyen mutaciones heredables. Algunas de las pruebas que las detectan son la determinación de aductos en el ADN y la electroforesis unicelular alcalina (Hemmink *et al.*, 1994).

c) Aberraciones cromosómicas; que se subdividen a su vez en estructurales y numéricas.

Aberraciones estructurales; consisten en deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Estas modificaciones en los cromosomas son deletéreas y provocan desde el desarrollo de enfermedades genéticas hasta letalidad.

Aberraciones numéricas incluyen aneuploidias, trisomías y poliploidias; estos cambios numéricos comúnmente ocasionan una falta de equilibrio genético drástico, y letalidad en las etapas tempranas del desarrollo, aunque también hay alteraciones numéricas viables.

En ambos casos, un análisis del cariotipo permite detectar este tipo de daños (Bender, 1980).

Dentro de las principales pruebas recomendadas para evaluar daño genotóxico se encuentran; a) ensayos para evaluar mutaciones (bacterias; prueba de AMES), b) ensayos *in vitro*, para evaluar daño cromosómico (células de mamífero; frecuencia de AC) y 3) ensayos *in vivo* (medula ósea o sangre periférica; frecuencia de MN) (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000;

Müller, *et al.*, 1999). Las pruebas para evaluar genotoxicidad no sólo son indispensables para evaluar el daño que puede producir un agente al material genético, sino también, es una herramienta necesaria para determinar el mecanismo de acción.

1.5.1. Micronúcleos

El ensayo de MN ha sido recomendado como batería de prueba para la evaluación genotóxica en la “International Conference on Harmonization (ICH4) of Genotoxicity Guidelines”, así como otras agencias reguladoras tales como la “Environmental Protection Agency” (EPA), la “Food and Drug Administration” (FDA) y la “International Agency for Research on Cancer” (IARC). El propósito del ensayo es identificar sustancias que causan daño citogenético, originado por clastogénesis o aneuploidogénesis (Mavournin, 1990; Krishna y Hayashi, 2000; Müller, *et al.*, 1999).

La técnica de MN fue desarrollada por Schmid y Boller en 1970, y es utilizada como ensayo de corto plazo. Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de AC, evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos y también puede identificar daño citotóxico (Von Ledebur y Schmid, 1973; Krishna y Hayashi, 2000).

Los MN son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que no son incorporados dentro del núcleo después de la mitosis, por lo que se identifican en el citoplasma como pequeños núcleos adicionales (Von Ledebur y Schmid, 1973).

Los MN tienen su origen en alguno de los siguientes eventos:

- a) Aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno).

b) Daño a nivel de las proteínas involucradas, directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtubulos, remoción de cinetocoros, daños al centriolo, centromero inactivado etc. (daño aneuploidógeno).

c) Recientemente, se ha sugerido que también pueden provenir de procesos de amplificación génica (Fenech y Crott, 2002; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Los MN pueden ser evaluados en diferentes tipos celulares como por ejemplo; los mieloblastos, mielocitos, medula ósea de ratón (eritrocitos) o en eritrocitos de sangre periférica, células binucleadas (linfocitos) inducidas mediante citocalacina B, así como también células uroteliales y exfoliadas de la mucosa bucal y nasal. De igual manera, se han iniciado estudios en eritrocitos de hígado y de sangre periférica fetal (Von Ledebur y Schmid, 1973; Heddle *et al.*, 1983).

Los MN pueden ser fácilmente detectados, ya que son de forma redonda con un diámetro de alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito (Mavournin, 1990). Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que estos agentes son inductores de daño cromosómico (Krishna y Hayashi, 2000).

En las células eritroides se distinguen claramente a los eritrocitos jóvenes y a los maduros. Los eritrocitos policromáticos (EPC, eritrocito joven), todavía contiene ARN, son basofilos y el núcleo principal es expulsado, si un MN se ha formado permanece en el citoplasma anucleado. Los EPC, con el tiempo, pierden el ARN y se convierten en eritrocitos normocromáticos (ENC, eritrocitos maduros), más pequeños que los EPC y son acidófilos. Partiendo de esto, los eritrocitos se pueden diferenciar entre ENC y EPC utilizando diferentes

colorantes como May-Gruenwald, Giemsa y Naranja de Acridina (NA) (Von Ledebur y Schmid, 1973; Hayashi, 1990).

Es evidente que la información obtenida por la prueba de MN es menor que la lograda mediante el método tradicional de AC. La presencia de MN indica que hubo daño cromosómico, pero no de que tipo, ni que cromosomas estuvieron involucrados. A pesar de ello, este ensayo posee las siguientes ventajas:

- a) Las características del MN están bien definidas, lo cual reduce el tiempo de observación y el efecto de la subjetividad inherente al observador, que es causa de errores en el ensayo de AC.
- b) Se puede contabilizar mayor cantidad de células en el mismo intervalo de tiempo, lo cual aumenta la confiabilidad del análisis estadístico de la prueba.
- c) La prueba está sujeta a menor posibilidad de errores de manipulación comparada con la de AC, donde la cantidad de metafases de buena calidad limita su estudio.
- d) Permite observar de manera paralela y simultánea rompimientos o pérdidas de cromosomas, posibles retrasos mitóticos, anormalidades nucleares como puentes nucleoplásmicos y apoptosis, aunado a pruebas de Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) permite detectar fenómenos de no disyunción.
- e) Existe una correlación de alrededor del 88% entre los resultados obtenidos con AC y MN cuando se usan para analizar los mismos agentes genotóxicos.

Cabe mencionar que si bien el daño genotóxico es un indicativo importante en la inducción del cáncer, también puede estar relacionado con la aparición de defectos del nacimiento y muerte embrionaria o fetal, por ello es importante detectar a tiempo las implicaciones ocasionadas por algún agente tóxico y para lograrlo se han propuesto pruebas tanto para la evaluación de daño genotóxico como de alteraciones en el desarrollo embrionario y fetal.

1.6. Evaluación de alteraciones durante el proceso reproductivo

Varias organizaciones legisladoras internacionales como la EPA, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) y la OMS, han desarrollado y recomendado diversos protocolos para evaluar los efectos de los agentes químicos sobre el proceso reproductivo, planteando principalmente el uso de la rata y el ratón como modelos experimentales. Éstos en general 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 (FDA, 1966; Baker *et al.*, 1980; ECETOC, 1983; Harkness y Wagner, 1989).

Cada una de las etapas del desarrollo embrionario consiste de una serie de mecanismos secuenciados y específicamente programados. Para poder entender las alteraciones del desarrollo es necesario conocer como se lleva a cabo el desarrollo normal desde la fecundación hasta el nacimiento. En la figura 7 se mencionan las etapas generales del desarrollo.

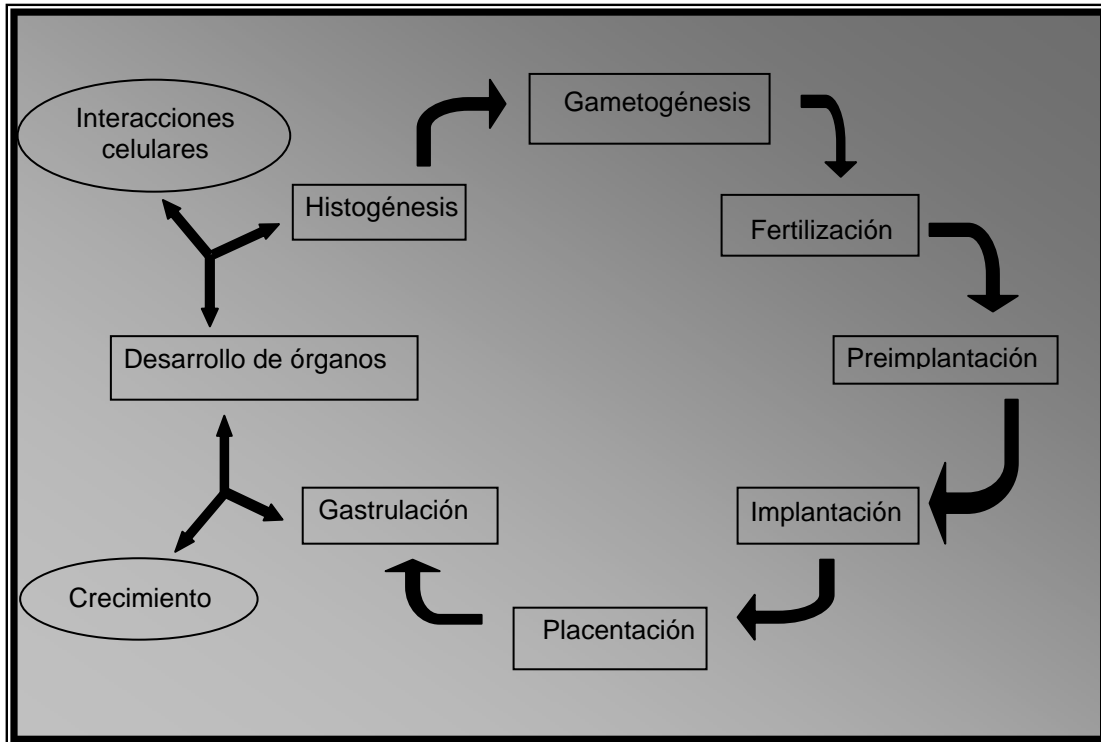



Figura 7. Etapas del desarrollo.

De los trabajos realizados durante las diferentes etapas del desarrollo, se ha concluido que el periodo de la organogénesis es el más sensible a cambios inducidos por los agentes. Las principales alteraciones observadas en la organogénesis se presentan en el sistema nervioso, en los ojos, las orejas, en el paladar, en el esqueleto y en las estructuras urogenitales (King y Wild, 1979; Scialli, 1992). Los agentes que interfieren con el desarrollo normal de los organismos, son llamados teratógenos y sus efectos pueden deberse a la ineficiencia de los mecanismos de detoxificación, a los procesos de eliminación (glucuronidación) y excreción renal o bien a la eficacia del agente inductor de daño (Cole *et al.*, 1979; King y Wild, 1979; Cole *et al.*, 1981). En el cuadro 9 se señalan algunas de las vías por las cuales se puede explicar el efecto de un agente para inducir daño en el desarrollo embrionario y fetal (Scialli, 1992; Wells *et al.*, 1997).

Cuadro 9. Mecanismos de inducción de daño en el desarrollo embrionario y fetal

<ul style="list-style-type: none">-Muerte celular-Deficiencia de sustancias-Daño en el suministro de energía-Alteración de membranas-Genotóxicidad-Interferencia mitótica-Inhibición enzimática	
---	--




Es importante resaltar que la administración de un agente teratogeno puede inducir daño a las crías por dos vías diferentes:

a) directa; el agente atraviesa la placenta y causa toxicidad en el desarrollo del embrión o feto.

b) indirecta; el agente induce alteraciones en la homeostasis de la madre y por lo tanto estos desordenes alteran el desarrollo embrionario o fetal.

Debido a los efectos observados en las crías de hembras que presentan cambios en el estado físico y fisiológico, se ha planteado, que es necesario medir signos de toxicidad y de “comportamiento” materno en la evaluación del daño en el desarrollo embrionario y fetal, tales como los que se muestran en el cuadro 10 (Cole *et al.*, 1979; King y Wild, 1979; Khera, 1991; Chahoud *et al.*, 1999; Rutledge, 2000).

Cuadro 10. Signos de toxicidad en madres y crías.

EFECTOS MATERNOS	EFECTOS EN LAS CRÍAS
<ul style="list-style-type: none"> a) Reducción del peso corporal b) Diarrea, hipoactividad, falta de apetito, etc. c) Disminución en el número de implantes d) Aborto e) Muerte <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">    </div>	<ul style="list-style-type: none"> a) Cambios en el peso de la placenta b) Reducción del peso corporal c) Inducción de malformaciones d) Alteraciones esqueléticas e) Presencia de hematomas f) Muerte

Los organismos podemos estar expuestos a la vez a sustancias potencialmente inductoras de daño mutagénico, carcinogénico y teratogénico, las cuales a su vez pueden inducir daño mediante el mismo mecanismo. Por otra parte, dado que se han descrito que hay sustancias capaces de proteger del daño por diferentes mecanismos, entonces tal vez es posible estudiar la protección de daño genotóxico y teratógeno utilizando el mismo modelo, en el entendido de que las sustancias a probar deben de compartir antagónicamente el mismo o los mismos mecanismos (daño y protección).

La posibilidad de emplear sustancias que pudieran contrarrestar los efectos causados al ADN, abre un campo de investigación muy importante, y dados los datos que se tienen hasta el momento, la aplicación en humanos es casi una realidad. Sin embargo, es necesario continuar este tipo de estudios para avanzar más solidamente en el uso de sustancias que pudieran proteger o modular el daño al ADN. Como parte de nuestro programa de investigación para evaluar sustancias quimiopreventivas y quimioprotectoras en el ratón *in vivo*, en este estudio se evaluaron los efectos de la CFL sobre el daño genotóxico y teratígeno inducido por las sales metálicas del Cr (VI), mediante el análisis de la frecuencia de MN en sangre y de las malformaciones macroscópicas externas y esqueléticas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

Los pigmentos de los vegetales (en especial la clorofila y la CFL) son algunas de las sustancias en las que se ha observado un mayor potencial de protección. Actualmente existen varios grupos de investigación en diferentes países interesados en estudiar las propiedades y los mecanismos de interacción de la CFL con agentes inductores de daño.

Como parte de nuestro programa de investigación para evaluar sustancias quimiopreventivas y quimioprotectoras en el ratón, iniciamos estudios del efecto de la CFL sobre los procesos reproductivos, y observamos que la CFL es capaz de llegar al sitio en donde se está llevando a cabo el desarrollo embrionario y fetal, y modificarlo. De ahí que en el presente estudio se hace un análisis de los efectos de la CFL sobre el daño al ADN inducido por el Cr (VI), en hembras sin preñar, preñadas y en fetos. Además de que se evalúa el efecto de la CFL sobre la inducción de alteraciones en el desarrollo.

3. HIPÓTESIS

Se ha propuesto que la administración previa de sustancias con propiedades protectoras de los mecanismos de inducción del daño al ADN, puede ser uno de los procedimientos más efectivos para prevenir las enfermedades relacionadas con daño genotóxico. La CFL ha mostrado ser un agente protector de la inducción de daño al ADN por diferentes mecanismos. En contraparte, los compuestos del Cr (VI) inducen daño genotóxico, cancerígeno y teratógeno mediante diferentes mecanismos, así entonces se propone que es posible que la administración previa de CFL a hembras de ratón preñadas y sin preñar proteja de la inducción de los daños genotóxico y teratógeno inducidos por el Cr (VI).

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar el efecto de la CFL sobre el daño genotóxico y teratógeno del Cr (VI), mediante los análisis de las frecuencias de MN y de las malformaciones macroscópicas en ratones hembras.

4.2. Particulares

i) Identificar las dosis genotóxicas del Cr (VI) en organismos adultos (hembras sin preñar y preñadas) y en fetos, mediante el análisis de la frecuencia de MN en sangre periférica.

ii) Establecer la cinética de la frecuencia de MN en organismos adultos (hembras sin preñar y preñadas) y en los fetos, mediante la evaluación cada 12 h de los MN en EPC durante 72 horas después de la administración del tratamiento.

iii) Estudiar el efecto de la CFL sobre el daño genotóxico inducido por el Cr (VI), mediante la evaluación de la frecuencia de MN, tanto en los organismos adultos como en los fetos.

iv) Comparar el efecto de la CFL al ser administrada por v.i. y v.o. sobre el daño genotóxico inducido por el Cr (VI), mediante evaluación de la frecuencia de MN, en sangre periférica de organismos tratados con dosis genotóxicas.

v) Estudiar los efectos de la CFL y de los compuestos del Cr (VI) sobre la citotoxicidad, mediante el análisis de la frecuencia de EPC y ENC, en sangre periférica.

vi) Identificar las dosis fetotóxicas y teratógenas del Cr (VI), mediante la evaluación de la muerte fetal, alteraciones del desarrollo e inducción de malformaciones (internas y externas), al ser administrado el agente en el día 15 de gestación por vía i.p.

vii) Estudiar los efectos de la CFL sobre las alteraciones del desarrollo fetal inducidas por la administración del Cr (VI) en el día 15 de gestación, mediante la evaluación de alteraciones en las hembras gestantes y en los fetos obtenidos en el día 18 de gestación.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Animales

Se emplearon ratones sexualmente maduros de la cepa CD-1 entre 45 y 60 días de edad con un peso de 28 a 35 g. Se desarrolló el pie de cría en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, con animales obtenidos del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones se alimentaron con nutricubos (Purina), con libre acceso al agua. Se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire controladas, así como períodos de luz-oscuridad 12-12 horas.

En los protocolos que se emplearon hembras preñadas, las cruces se realizaron durante la noche de 20:00 a 8:00 h en una proporción 2:1, con machos de la misma edad y cepa. Se consideró la presencia de tapón espermático como evidencia de cópula y como día cero de preñez. Las hembras se mantuvieron bajo observación y peso supervisado.

5.2. Reactivos

Al menos que esté indicado, todos los reactivos empleados en el estudio fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO. USA). CFL [CAS No. 110006-34-1], CrO_3 [CAS No. 1333-82-0], $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ [CAS No. 7778-50-9].

5.3. Tratamientos

La CFL y el Cr (VI) fueron preparados en solución mediante su disolución en agua destilada. Una vez preparados los reactivos fueron inmediatamente administrados en un volumen de alrededor de 0.25 ml.

Todos los tratamientos de Cr (VI) fueron aplicados por vía i.p, mientras que los de CFL fueron administrados por vía i.p. y oral (indicado en los protocolos). Los grupos testigos fueron tratados únicamente con el vehículo.

5.4. Establecimiento de las dosis del Cr (VI) y CFL

Se realizó un estudio preliminar en el que se probaron diferentes dosis de Cr (VI), así como las condiciones de trabajo. Estas dosis se seleccionaron de acuerdo a los resultados de estudios previos, en donde se observó que la administración por vía i.p. de 25, 20, 15 y 10 mg/kg de peso corporal eran inductoras de daño genotóxico en diferentes ensayos de prueba (Chorvatovicová *et al.*, 1991; Mikalsen *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1993; Itoh y Shimada, 1996).

La dosis de la CFL se seleccionó a partir de los resultados previos en los que se observó que la dosis de 20 mg/kg de peso corporal administrada por vía i.p. no causa efectos genotóxicos, embriotóxicos, ni teratógenos (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994; Morales-Ramírez *et al.* 1996; García-Rodríguez, 1996; García-Rodríguez *et al.*, 2000; 2002).

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo se establecieron con base a los lineamientos de los programas de la GENOTOX, la EPA, la ECETOC y la FDA (Heddle *et al.*, 1983; Mavournin *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1994; EPA, 1984; FDA, 2000).

5.5. Tiempos de evaluación

5.5.1. Genotoxicidad y citotoxicidad

Una vez establecidas las dosis del Cr (VI), la CFL y las condiciones de trabajo, se evaluó la cinética de MN y la citotoxicidad (Protocolo 1a, figura 8). A hembras sin preñar se les administraron 20 mg/kg de CrO₃ en un tiempo considerado 0, a partir de ese momento se les tomaron muestras cada 12 h. A las hembras preñadas se les aplicó el tratamiento en el día 15 de gestación y se les tomaron las muestras cada 24 h.

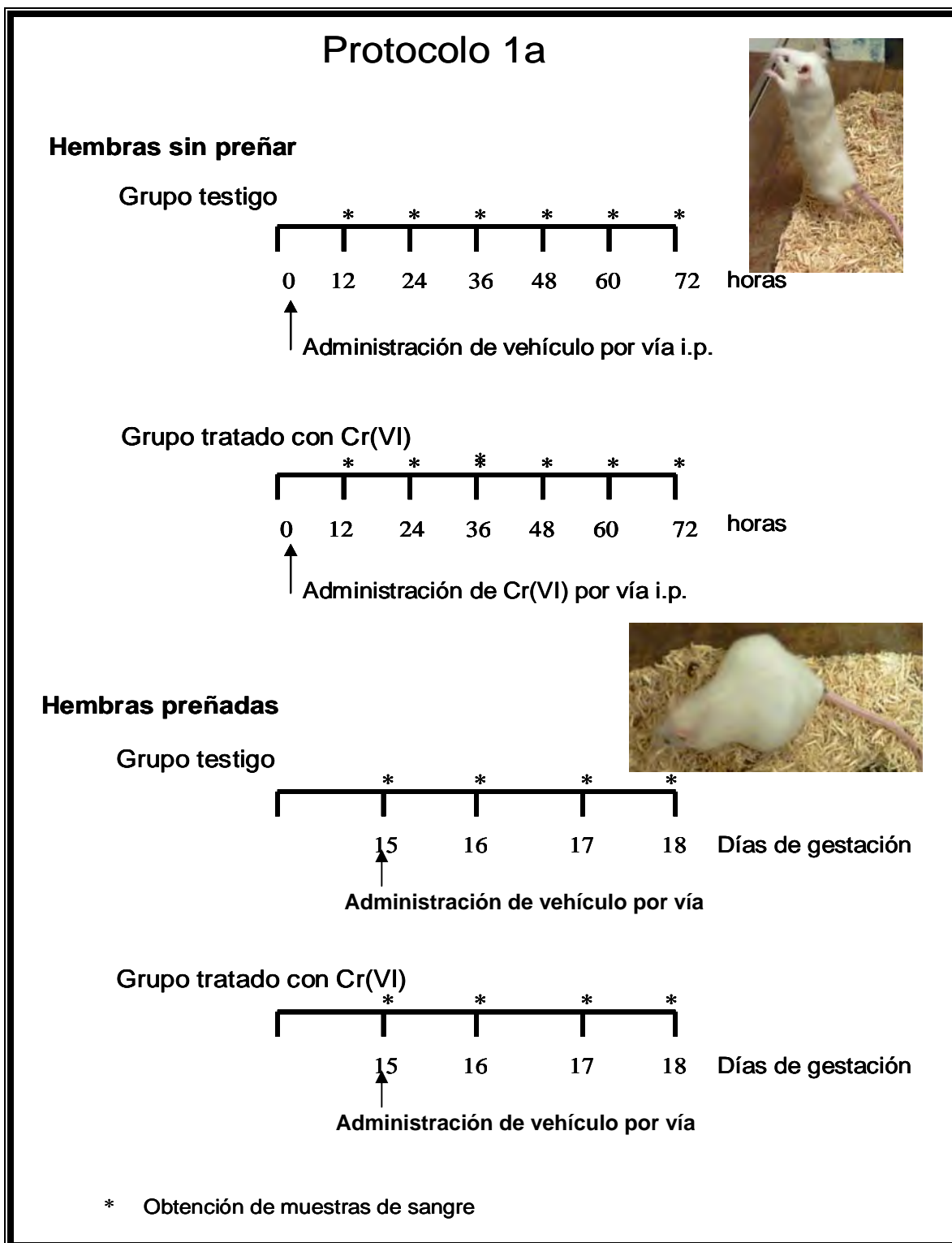


Figura 8. Protocolo empleado para la evaluación del daño genotóxico y citotóxico en hembras sin preñar y preñadas.

De igual manera, la cinética de MN y de citotoxicidad también se realizó en las crías obtenidas de las hembras que fueron tratadas el día 15 de gestación. Diferentes grupos de hembras (4 animales por grupo) fueron sacrificados en diferentes tiempos después de la administración del tratamiento, para obtener los fetos (Protocolo 1b, figura 9). Fueron considerados al menos cuatro fetos por cada hembra para las evaluaciones de genotoxicidad y citotoxicidad.

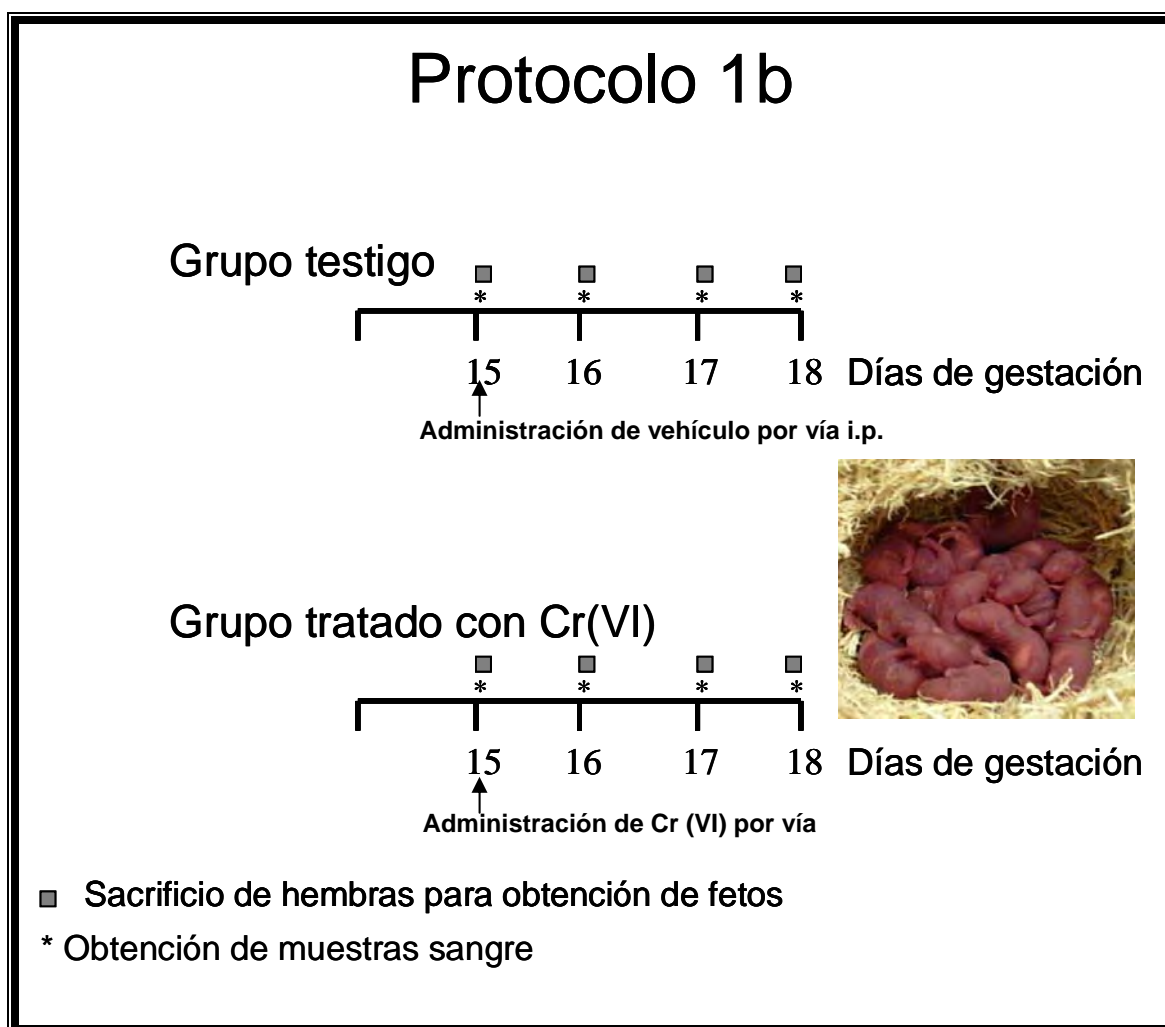


Figura 9. Protocolo empleado para la evaluación del daño genotóxico y citotóxico en fetos.

5.5.2. Fetotoxicidad y teratogenicidad

Los análisis de las alteraciones del desarrollo se realizaron en los mismos fetos donde se evaluó la genotoxicidad y la citotoxicidad, por lo que los tiempos de administración de tratamientos y evaluación son los mismos. Para estos estudios se consideraron como mínimo 8 organismos por grupo y fueron analizadas todas las camadas.

5.6. Evaluaciones

5.6.1. Genotoxicidad y citotoxicidad:

a) Preparación de laminillas

Se prepararon laminillas cubiertas de NA, las cuales se realizaron antes de la toma de las muestras. La NA se preparó en una solución con agua desionizada (1mg/ml). De la solución de NA se tomaron 10 μ l y se colocaron en portaobjetos precalentados (alrededor 70° C), con ayuda de otro portaobjetos se extendió el colorante y se dejó secar a temperatura ambiente. Las laminillas se guardaron en la oscuridad hasta su uso (Hayashi, 1990).

b) Toma de muestras

El daño genotóxico y citotóxico fue evaluado en las muestras de sangre obtenidas de organismos adultos (hembras sin preñar y preñadas) y de organismos en desarrollo fetal. A las hembras adultas, se les cortó la punta de la cola con la ayuda de unas tijeras, se tomaron de 5 a 8 μ l de sangre con una micropipeta y se colocaron directamente en las laminillas previamente preparadas con NA, inmediatamente se colocó un cubreobjetos (24x50mm) y se sellaron con Ruber Cement (figura 10) (Hayashi *et al.*, 1990).

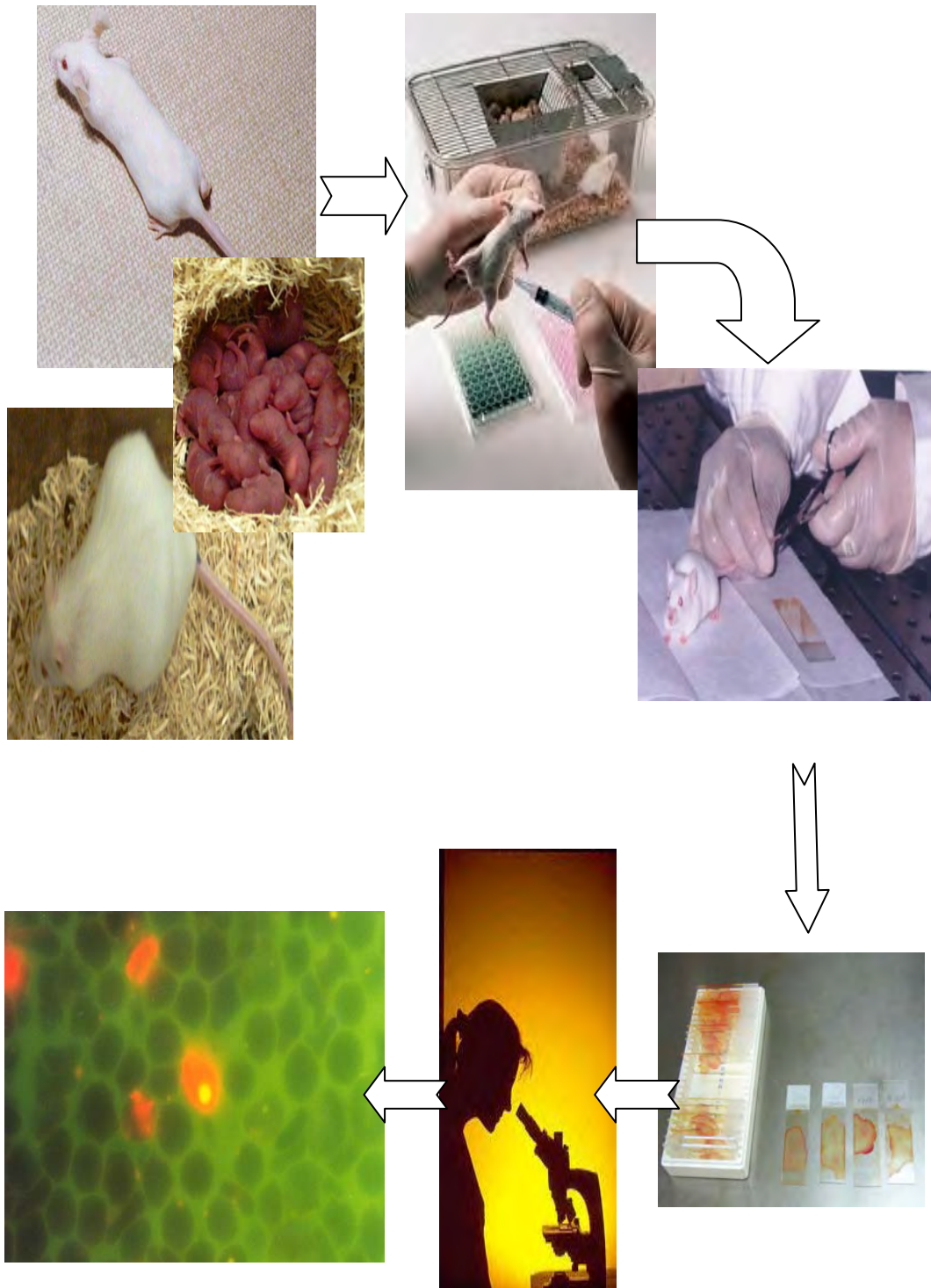


Figura 10. Administración de tratamientos, toma de muestras y evaluación de MN.

Las muestras de sangre periférica fetal, fueron tomadas de los fetos extraídos de las madres, después de haber sido sacrificadas por dislocación cervical. A los úteros aún con fetos, se les colocó en una mezcla fría de solución de Tyrode's y suero fetal de bovino (1:1). Posteriormente los fetos fueron removidos del útero, se lavaron y se mantuvieron en una solución de transferencia fetal fría. Transcurridos algunos minutos los fetos se decapitaron parcialmente y se obtuvieron de 5 a 8µl de sangre (King y Wild, 1979; Cole *et al.*, 1981). Al igual que para las muestras de sangre materna, las muestras fetales se colocaron en laminillas cubiertas con NA y se les dio el mismo tratamiento (figura 10).

Todas las preparaciones se guardaron en cajas de plástico y en oscuridad, a una temperatura de aproximadamente 4° C. El análisis de las preparaciones se realizó después de 12 h de haber sido preparadas, procurando no exceder de 5 días. Se hicieron dos laminillas por cada organismo.

c) Evaluación de laminillas

Las evaluaciones se realizaron en los eritrocitos de las muestras de sangre, los cuales se identificaron bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2). La tinción diferencial que se obtiene con la NA, permitió diferenciar a los EPC de los ENC, ya que los EPC se tiñen de rojo debido al ARN-ribosomal. Así mismo, con esta tinción se pueden identificar los MN debido a que el ADN se tiñe de color amarillo fluorescente (figura 10).

Para la evaluación del daño genotóxico se consideraron únicamente los MN que se encontraban en los EPC. Se analizaron 2000 EPC, en las que se contó el número de MN por célula (Hayashi *et al.*, 2000).

Para la evaluación del daño citotóxico se evaluó de la frecuencia de EPC, la cual consistió en identificar a los EPC de los ENC de 2000 eritrocitos totales.

5.6.2. Alteraciones en el desarrollo

Las hembras se sacrificaron en el día 18 de gestación por dislocación cervical. Los úteros se abrieron y se expusieron para contar el número de implantes, reabsorciones, fetos vivos y muertos (estos últimos identificados por su apariencia y ausencia de movimiento). Los fetos fueron removidos del útero para sexarlos y pesarlos (ECETOC, 1983; Taylor, 1986).

a) Malformaciones externas

Una vez extraídos los fetos de los úteros se examinaron bajo un microscopio de disección para identificar el tipo y frecuencia de las malformaciones externas de manera general e inmediata. Posteriormente, se pasaron a una solución de alcohol al 70 %, donde permanecieron hasta el momento en que se analizaron con detalle. El tipo y la frecuencia de malformaciones externas se evaluaron en el cráneo, en los párpados, en el labio y en las extremidades (Dawson, 1926; Aliverti *et al.*, 1979)

b) Malformaciones internas

Para la evaluación de las malformaciones internas, a los fetos previamente fijados en etanol se les desvisceró y se les trasvasó a una solución de hidróxido de potasio al 1%. Una vez que era posible distinguir el tejido óseo, se les agregaron de dos a tres gotas de solución saturada de rojo de alizarina, por un tiempo no mayor de 24 h. Transcurrido el tiempo de tinción, los fetos fueron colocados en glicerina para quitarles el exceso de colorante y preservarlos (Staples *et al.*, 1964).

Los fetos aclarados y teñidos, se analizaron en un microscopio de disección para identificar las malformaciones internas. Se contaron los puntos de osificación de las extremidades, en la columna y en las esternibras como se muestra en las figuras 11 y 12.



Figura 11. Puntos de osificación y grado de osificación en el desarrollo normal del ratón.

También se contaron el número de costillas y el grado de osificación. Las alteraciones del desarrollo se evaluaron con base a lo propuesto por Taylor (1986) y se nombraron de acuerdo a Wise *et al.*, (1997).

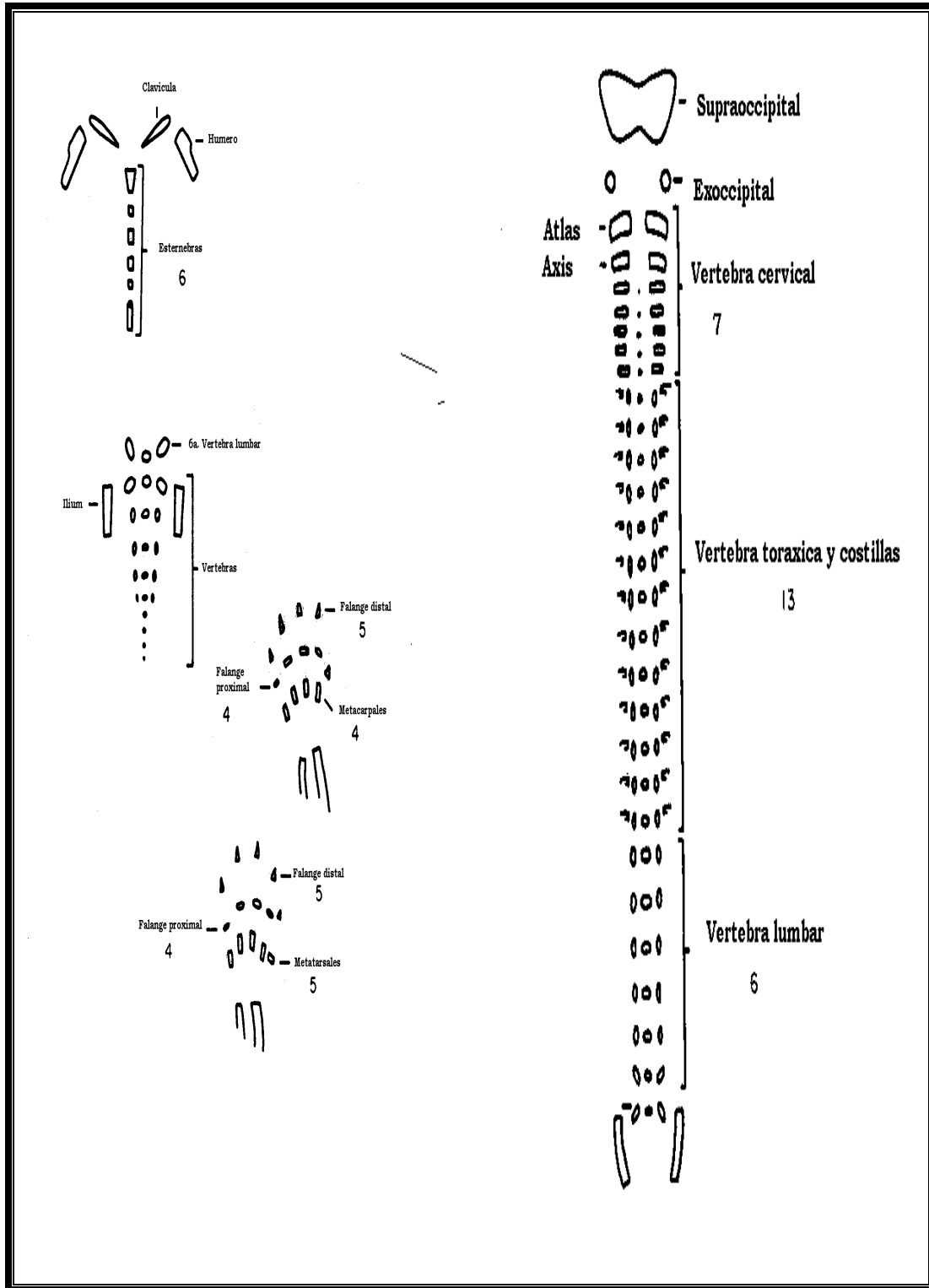


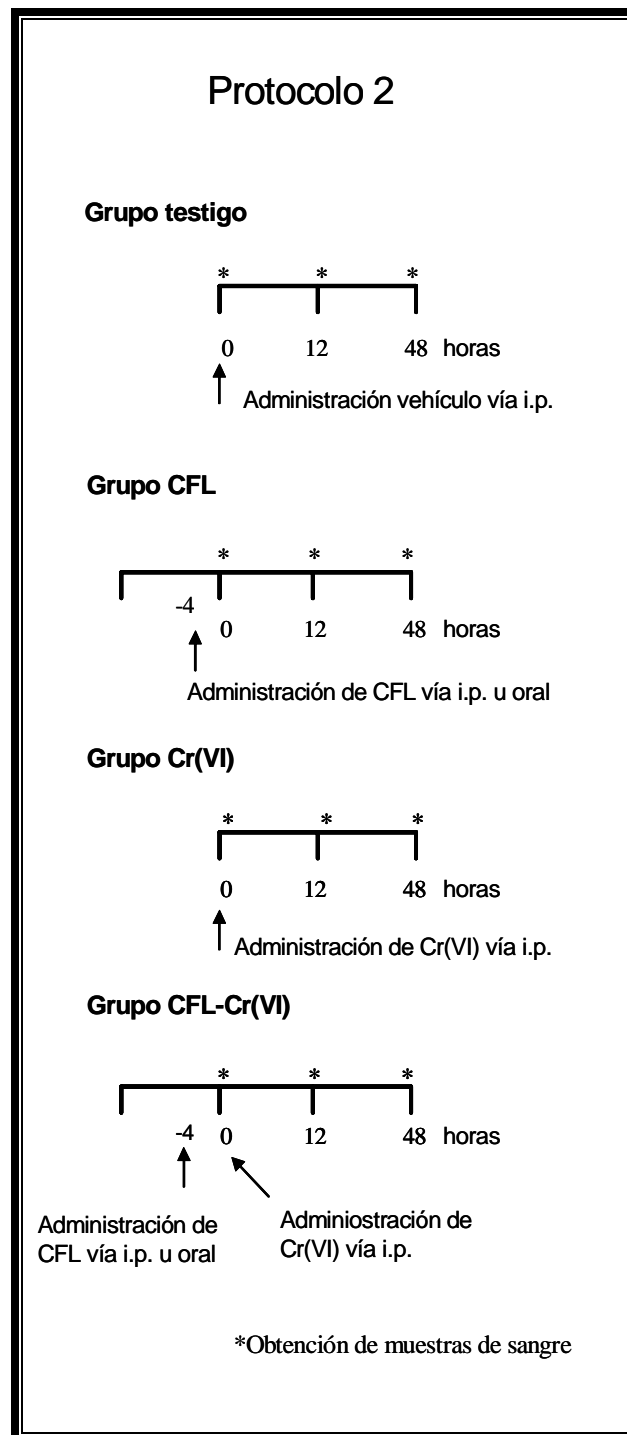
Figura 12. Puntos de osificación en el desarrollo normal del ratón (Taylor, 1986).

5.7. Efecto de la CFL sobre la inducción de daño genotóxico y citotóxico del Cr (VI)

a) Hembras sin preñar

Para la evaluación del efecto de la CFL sobre el daño inducido al ADN por el Cr (VI), se emplearon cuatro grupos de cinco hembras cada uno, divididos de la siguiente forma: a) *testigo*, b) *CFL*, c) *Cr (VI)* y d) *CFL-Cr (VI)*. Los grupos fueron manejados conforme se muestra en la figura 13 (protocolo 2). Los tratamientos de Cr (VI) fueron administrados en un tiempo considerado “cero” y se colectó la primera muestra de sangre. Posteriormente, se tomaron otras dos muestras de sangre (12 y 48 h). En este protocolo el efecto de la CFL se evaluó al ser administrada por vía i.p. y oral. La aplicación de la CFL se realizó cuatro horas antes del tiempo considerado cero.

Figura 13. Protocolo empleado para las evaluaciones del efecto de la CFL sobre el daño genotóxico y citotóxico.



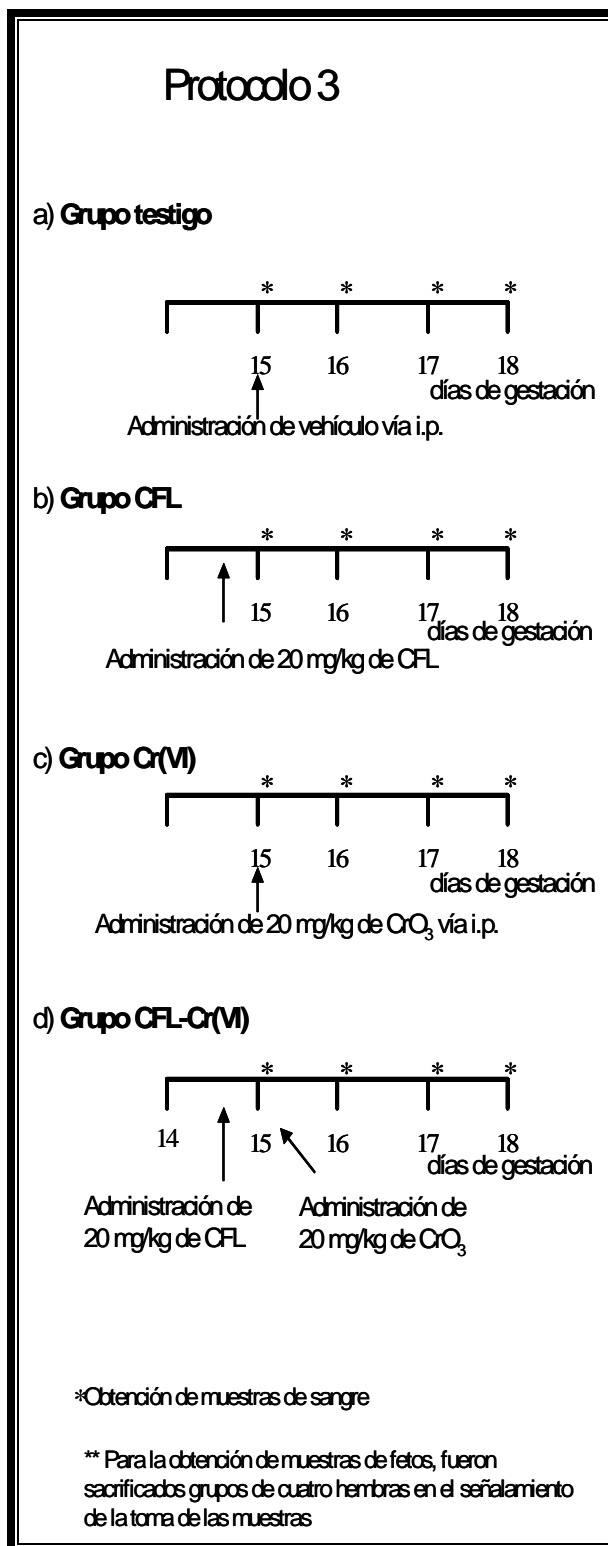
b) Hembras preñadas

Para la evaluación del efecto de la CFL en hembras preñadas (protocolo 3), se manejaron los mismos grupos que en el protocolo anterior, con la salvedad de que las hembras preñadas fueron tratadas en el día 15 de gestación y la toma de las muestras se realizó en los días 15, 16, 17 y 18 de gestación (figura 14).

c) Fetos

Los grupos y protocolos empleados para la evaluación del efecto de la CFL sobre el daño en fetos, fueron los mismos que se emplearon para las hembras preñadas (Protocolo 3, figura 14), solo que, en estos grupos se emplearon más hembras ya que era necesario sacrificarlas para obtener los fetos a los que se les iban tomar las muestras. Se consideraron cuatro hembras para cada tiempo.

Figura 14. Protocolo empleado para la evaluación de daño en hembras preñadas y fetos.



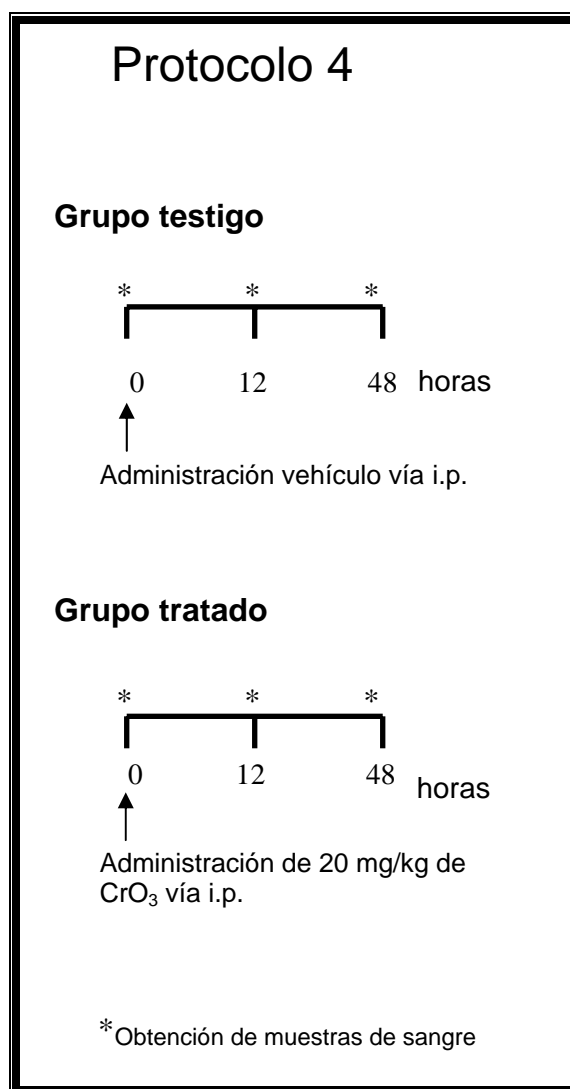
5.8. Relación entre la protección de la CFL y la cinética de inducción de MN por el Cr (VI)

Dado que la CFL fue capaz de disminuir la frecuencia de MN en uno de los tiempos de mayor producción, se buscó establecer las posibles vías de inducción de MN por el Cr (VI). Para realizar estas evaluaciones se empleó la técnica de Hibridación *in Situ* con Fluorescencia (FISH).

Se emplearon dos grupos (testigos y tratados con CrO_3), los cuales fueron manejados como se muestra en la figura 15. Las muestras de sangre fueron tomadas a las 0, 12 y 48 h. Los dos últimos tiempos correspondían a los máximos de inducción de MN observados cuando se administró el CrO_3 .

Con las muestras de sangre se realizaron frotis y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente fueron fijados con metanol absoluto durante 15 minutos y nuevamente se les dejó secar a temperatura ambiente. Las laminillas fueron guardadas en la oscuridad.

Figura 15. Protocolos empleados para la técnica de FISH.



5.8.1. Método de hibridación in situ con fluorescencia

A las laminillas preparadas con las muestras celulares se les aplicó la técnica de FISH (Krishna, *et al.*, 1992), la cual consistió en:

a) incubación; las laminillas fijadas se colocaron en una solución 2xSSC (ph 7 y 37° C) durante 15 minutos.

b) deshidratación; las muestras celulares fueron colocadas en alcoholes graduales (70, 85 y 100%) por un tiempo no mayor a dos minutos en cada uno.

c) desnaturalización del ADN blanco y de la sonda; una vez deshidratadas las células se colocaron en una solución de formamida al 70% (ph 7 y 72° C) durante dos minutos e inmediatamente se colocaron en alcoholes graduales (70, 85 y 100%), los cuales se encontraban a una temperatura de 20° C bajo cero. La sonda fue desnaturalizada al mismo tiempo, para lo cual se colocaron 2.5 µl en un tubo de microcentrífuga y se calentó a 85° C en un baño de agua durante diez minutos. Todo este proceso se realizó a oscuras.

d) hibridación; una vez seca la muestra celular se le colocó la sonda desnaturalizada y se cubrió con cubreobjetos, se selló con ruber cement y se dejó a 37° C en una cámara húmeda durante 48 h. Este proceso también se realizó sin luz blanca.

e) lavados post-hibridación; se marcó la región de hibridación y a las laminillas se les quitó el cubreobjetos, para colocarlas en una solución 2xSSC (ph 7 y 37° C) durante cinco minutos, de ahí se pasaron a una solución al 50% de formamida (37° C) durante cinco minutos y finalmente se colocaron en una solución 2xSSC (ph 7 y temperatura ambiente) durante cinco minutos.

f) contratinción; transcurridos los lavados de posthibridación las laminillas se dejaron escurrir y secar. Se les colocaron 4 µl de yoduro de propídeo con vectaschield y se cubrieron con un cubreobjetos, que fue sellado con rubert cement, de ahí se guardaron en el refrigerador (12 h aproximadamente).

g) observación; transcurrido el tiempo de la contratinción, las evaluaciones de las laminillas se llevaron a cabo con la ayuda de un microscopio de

fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) con filtros DIA-ILL (Doble banda) y D-F-T (triple banda). Se cuantificaron 2000 EPC (teñidos en anaranjado) en los cuales se identificó la presencia de MN (amarillo fluorescente) y se buscó la presencia de señal (sonda) como un brillo rojo fluorescente (figura 16).

También se evaluó la citotoxicidad distinguiendo los EPC de los ENC en 2000 eritrocitos totales.

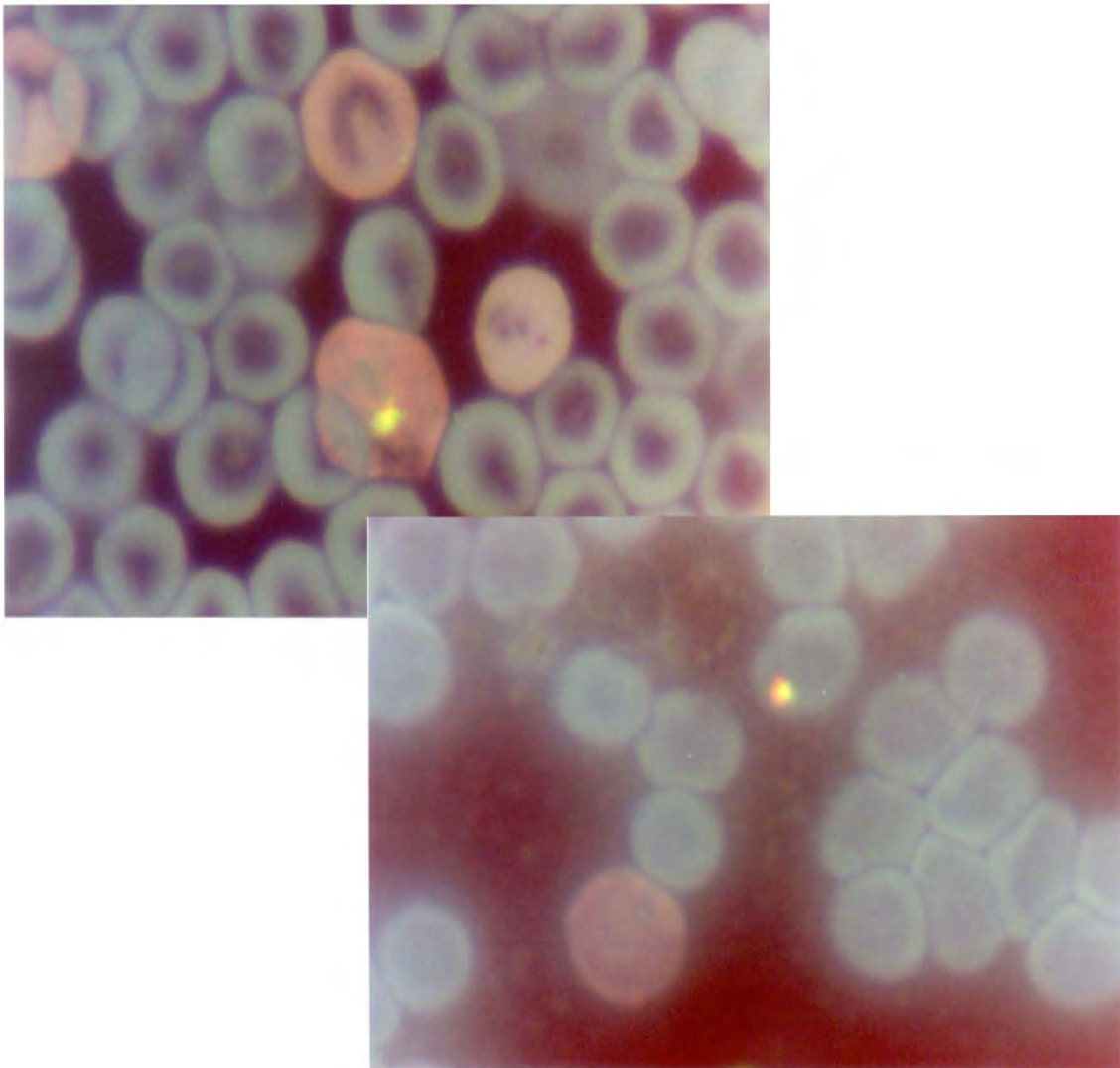


Figura 16. Micronúcleos en eritrocitos normocromáticos y policromáticos de sangre periférica de ratón con señal positiva (centrómero).

5.9. Efecto de la CFL sobre alteraciones del desarrollo

Los grupos empleados para establecer el efecto de la CFL sobre las alteraciones del desarrollo, fueron los mismos que se muestran en la figura 14 (protocolo 3). Los fetos obtenidos fueron analizados bajo un estereoscopio para identificar alteraciones externas y esqueléticas, conforme a lo que se mencionó anteriormente para el manejo de alteraciones en el desarrollo.

5.10. Análisis estadístico

Los resultados de la inducción de MN y de la frecuencia de los EPC se presentan en media \pm desviación estándar y se compararon mediante un análisis de varianza seguida de una prueba de Tukey. Para los casos de la frecuencia neta de la inducción de MN (NIF) y la frecuencia diferencial de la inducción de MN (DIF), se les analizó con una Chi-cuadrada. Para todos los casos se consideró el nivel de significancia de $P < 0.05$. (Adler *et al.*, 1998).

La significancia de las diferencias en la integración del área bajo la curva (ABC) fue determinada por una comparación múltiple de Dunnett (Cheung y Holland, 1992, Morales-Ramírez *et al.*, 1996). El análisis de la cinética de la formación de MN, fue analizada con la frecuencia acumulada, basándonos en el método planteado por Morales-Ramírez *et al.*, (1997).

Los resultados obtenidos de peso fetal, frecuencia de implantes, fetos vivos, reabsorciones y puntos de osificación se presentan en media \pm desviación estándar y se analizan usando la prueba de "t" de Student, mientras que la proporción de sexos se analizó con la prueba Chi-cuadrada.

A todos los datos una vez obtenidos se les aplicó un análisis exploratorio previo al análisis estadístico. Se emplearon los programas SPSS versión 11 y Statistica versión 6.0, para hacer los análisis estadísticos.

6. RESULTADOS

6.1. Cinética de inducción de MN y de la frecuencia de EPC por Cr (VI) (hembras sin preñar).

En el cuadro 11, se muestran los promedios de las frecuencias de MN y de EPC, de acuerdo a las diferentes dosis empleadas (0, 20 y 25 mg/kg de peso corporal) y los tiempos estudiados (de las 0 a las 72 horas). En los datos se puede observar que para ambos grupos tratados con el CrO₃ (20 y 25 mg/kg) se incrementa el número de MN desde las 12 horas, sin embargo, los incrementos resultan estadísticamente significativos a partir de las 36 horas (dosis de 25 mg/kg) y 48 horas (dosis de 20 mg/kg).

Cuadro 11. Frecuencia de EPC y del número de MN en hembras tratadas con CrO₃ (x±de).

Tratamiento CrO ₃ (mg/kg)	N	Hora	EPC/ 1000 células	MN/ 1000 células
0.0	8	0	56.05±21.17	2.38±1.38
		12	51.97±16.14	1.85±0.94
		24	45.05±21.89	3.00±0.72
		36	45.40± 7.30	3.50±1.74
		48	53.84±21.15	3.71±1.53
		60	64.34±17.85	3.36±1.60
		72	78.38±43.03	2.69±1.80
20.0	4	0	45.75±11.52	1.83±1.28
		12	45.43± 7.95	5.48±2.40
		24	44.50±17.80	6.46±1.93
		36	53.34±19.31	5.06±1.79
		48	39.95±16.02	10.58±5.47*
		60	43.31± 6.73	7.40±0.92*
		72	51.24± 8.71	4.94±1.43
25.0	4	0	46.20± 9.36	3.45±1.00
		12	44.72±13.35	5.41±2.60
		24	43.05± 5.35	7.31±1.83
		36	55.75±11.15	13.42±3.54*
		48	66.43±11.07	27.62±8.96*
		60	63.02± 1.42	20.05±6.94*
		72 ⁺	---	---

*: estadísticamente significativo p<0.05. +: muerte de las hembras.

Con relación a la frecuencia de MN, los resultados anteriormente descritos concuerdan con lo observado en los análisis exploratorios, ya que en los grupos tratados hay un ordenamiento en el incremento del número de MN con respecto a las horas de evaluación, lo que indica un efecto por el tratamiento con respecto al tiempo. A diferencia de los análisis de la frecuencia de EPC, en los que no hubo un comportamiento definido ni en los grupos tratados ni en los testigos (cuadro 11).

Cabe aclarar que a todos los datos de este estudio se les realizó un análisis exploratorio durante el desarrollo de los experimentos, para verificar la variabilidad antes de promediarlos y analizarlos con estadística paramétrica o no paramétrica (Daniel, 2002). Los análisis exploratorios de datos son omitidos en esta presentación para no hacer complicado el análisis de los resultados, por lo que, solo serán descritos cuando la variabilidad implique ser considerada para su descripción explícita.

A la inducción de MN se le calculó la integración del área bajo la curva ABC (figura 17), con el análisis propuesto por Morales-Ramírez *et al.* (1996). Los valores del ABC indican que sí hay diferencias entre el total de la inducción de MN en los dos tratamientos, ya que se observan dos máximos de inducción de MN, uno temprano (entre las 12 y 24 horas) y el otro tardío (alrededor de las 48 horas) cuando se administró la dosis de 20 mg/kg de CrO₃. Este comportamiento hace suponer dos respuestas en la inducción de MN, el cual es corroborado al graficar la frecuencia acumulada de MN (figura 18), en donde se observan claramente dos respuestas.

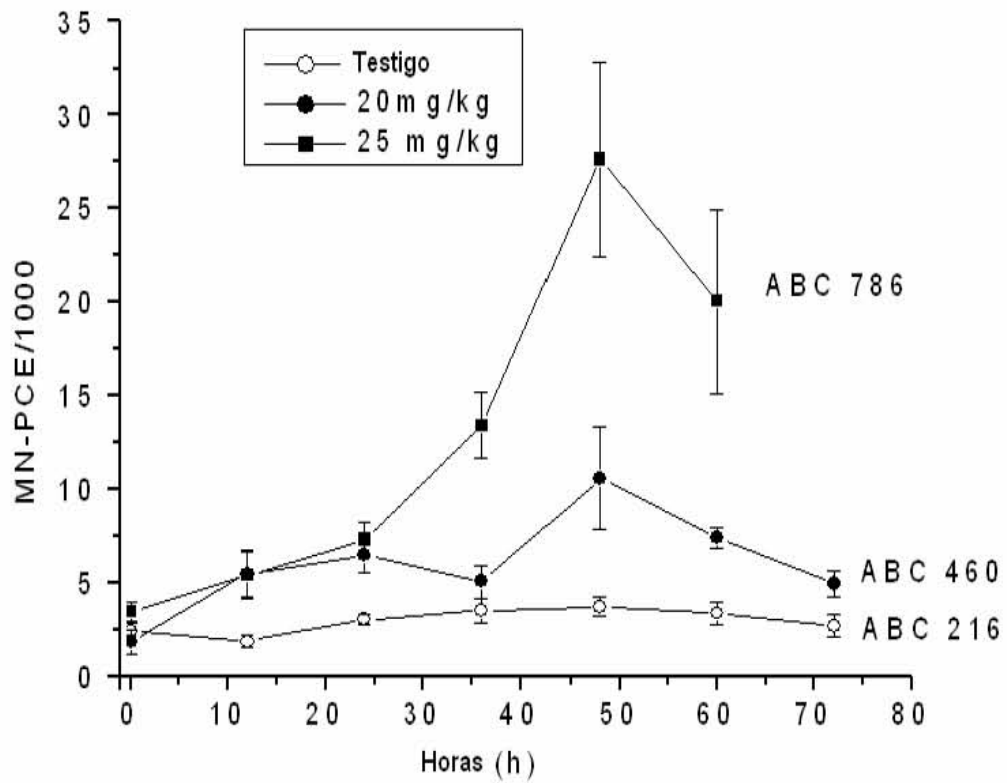


Figura 17. Frecuencia de la inducción de MN en los grupos tratados con CrO_3 e integración del área bajo la curva ($\bar{x} \pm de$).

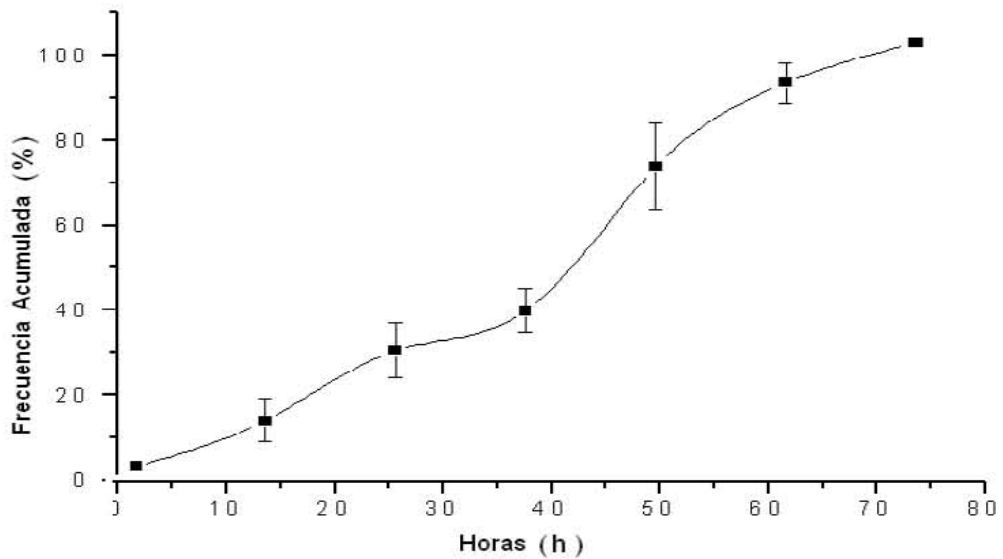


Figura 18. Frecuencia acumulada de la inducción de MN en el grupo tratado con 20 mg/kg de CrO_3 .

A los datos se les calculó el valor absoluto de la frecuencia neta de la inducción de MN (NIF). Esta frecuencia parte de la premisa de que la inducción de los MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que, al restarle el número de MN evaluados en la hora 0 a las siguientes horas, se asume que se obtiene la inducción “neta” de MN (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

$$NIF = | \text{valor observado en grupo "A" a la hora } x_i - \text{valor observado en grupo "A" a la hora 0} |$$

Donde :

A = grupo; x_i = tiempo de evaluación

En la figura 19 se muestra el análisis del NIF, en donde se puede observar que el incremento de MN que aparece desde la hora 12 resulta estadísticamente significativo. Estos datos, hacen suponer la existencia de un mecanismo o una vía diferente de inducción de MN a la que se esperaba según las referencias consultadas (daño clastógeno). Por lo que, debido a que la cinética de inducción de MN se estableció para plantear los tiempos de evaluación en los protocolos donde se pretendía combinar los tratamientos de CFL con Cr (VI), antes de iniciar estos estudios, se buscó el posible origen de los MN.

En cuanto al análisis de la frecuencia de EPC, en la figura 20 se muestra su seguimiento en los diferentes tiempos evaluados y como se puede observar no hay diferencias en los grupos que se administró el CrO₃ al comparar con el grupo testigo, lo cual puede estar relacionado con la variabilidad.

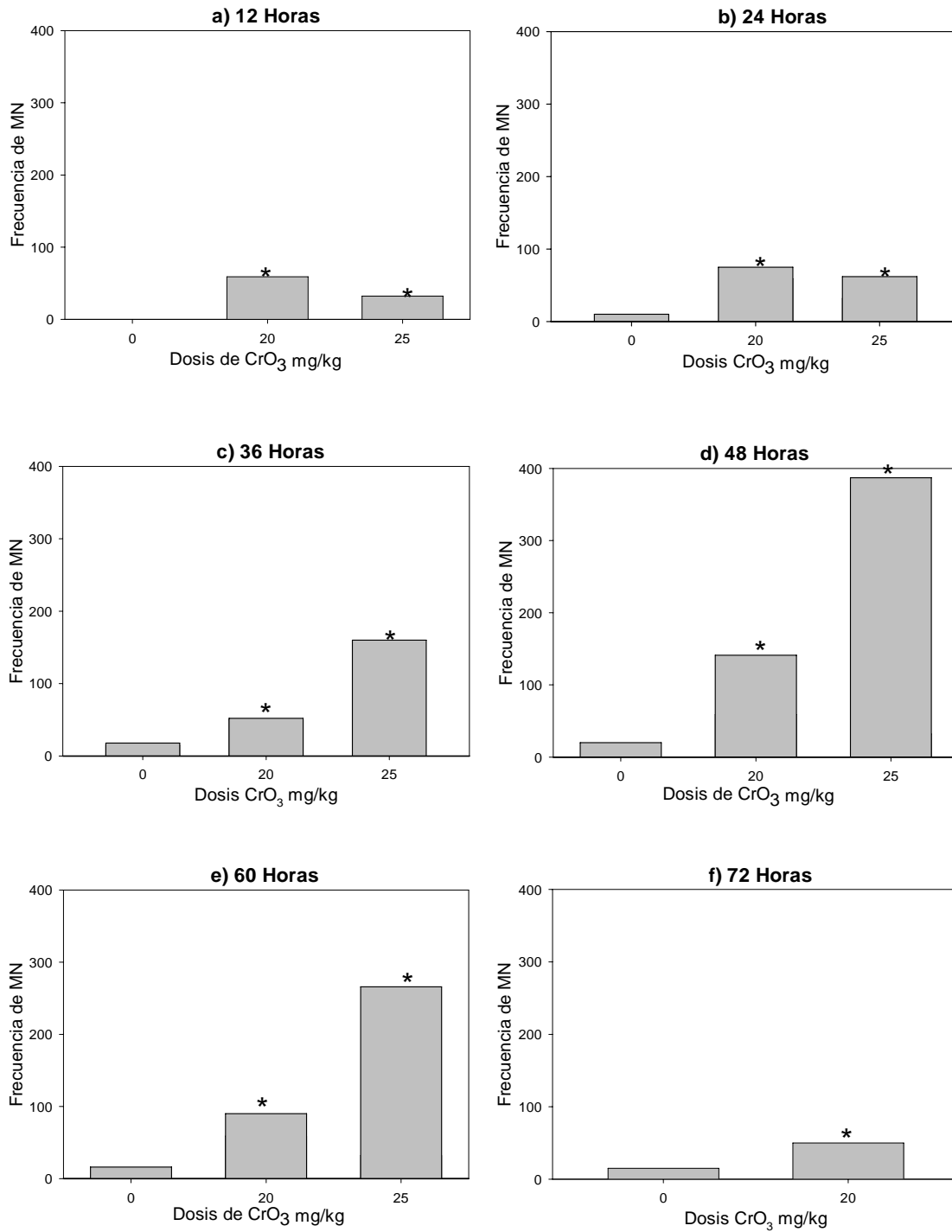


Figura 19. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 16000 EPC (*: estadísticamente significativo $p < 0.05$).

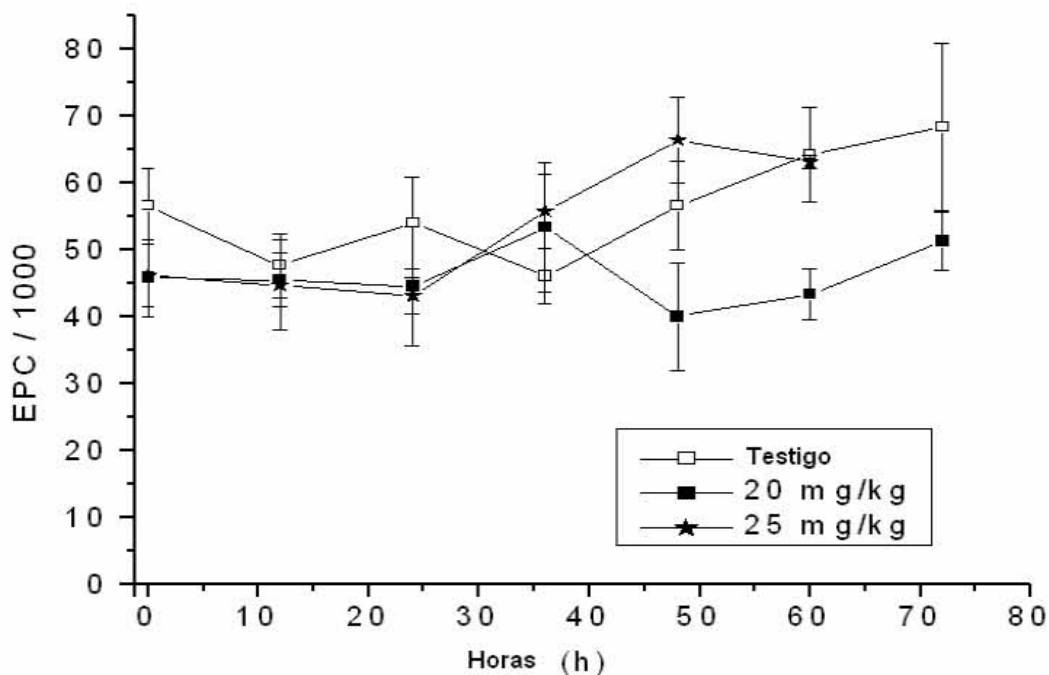


Figura 20. Frecuencia de EPC, en los grupos tratados con CrO₃.

6.2. Origen de MN inducidos por CrO₃

Partiendo de la hipótesis de que los MN observados a las 12 horas después del tratamiento eran efecto de un daño diferente al clastógeno, y dado que se originaban muy temprano, se planteó la posibilidad de que estos MN eran inducidos antes de que se llevara a cabo la fase S del ciclo celular o durante la mitosis. Por lo que, se planteó un protocolo que consistió en identificar la presencia del centrómero en los MN, mediante la técnica de FISH.

En el cuadro 12, se muestran los promedios de la inducción de MN evaluados con la técnica de FISH. Como se puede observar, en algunos de los MN identificados a las 12 horas postratamiento (CrO₃) hay presencia de la señal de centrómero, la cual disminuye ligeramente (%) en los MN evaluados en la hora 48. En el grupo testigo no se identificó ningún centrómero en los MN observados.

Cuadro 12. Promedios de la inducción de MN con centromeros ($\bar{x} \pm de$).

Tratamiento CrO ₃ (mg/kg)	N	Hora	EPC/ 1000 células ^a	MN/ 1000 células ^a	MN con señal/1000 células ^a	MN con Señal positiva/ MN observados (%) ^b
0.0	5	0	35.71±15.53	1.60±1.94	0.00±0.00	0/0 (0.0)
		12	34.80±14.34	1.80±1.64	0.00±0.00	0/0 (0.0)
		48	33.31± 3.80	3.00±1.58	0.00±0.00	0/0 (0.0)
20.0	5	0	29.93± 8.96	1.40±0.55	0.10±0.22	1/7 (14)
		12	26.41±14.86	3.40±1.14	0.90±0.22	5/17 (29)
		48	27.17±15.98	13.40±2.97*	2.80±1.92*	14/67* (21)

*: Estadísticamente significativo $p < 0.05$.

^a: Analizados con ANOVA seguida de Tukey. ^b: Analizados con F exacta de Fisher.

Los datos de las frecuencias acumuladas de MN con y sin señal (centrómero), se muestran en la figura 21. La presencia de MN con señal resultó estadísticamente significativa desde las 12 horas postratamiento. A estos datos se les analizó con una F exacta de Fisher.

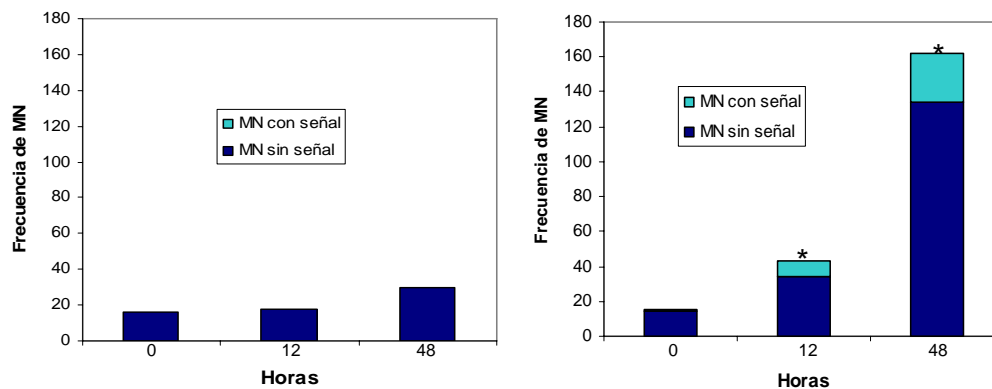


Figura 21. Frecuencias de MN con y sin señal (centrómero) evaluadas en 10000 EPC por tiempo y por grupo (*: estadísticamente significativo $p < 0.05$).

En la figura 22 se muestra el NIF de los datos obtenidos en el protocolo de FISH, en donde el incremento de MN resulta estadísticamente significativo en ambos tiempos evaluados (12 y 48 horas). A partir de estos resultados, en los siguientes protocolos se tomaron las muestras para evaluar inducción de MN a las 0, 12 y 48 horas postratamiento con Cr (VI).

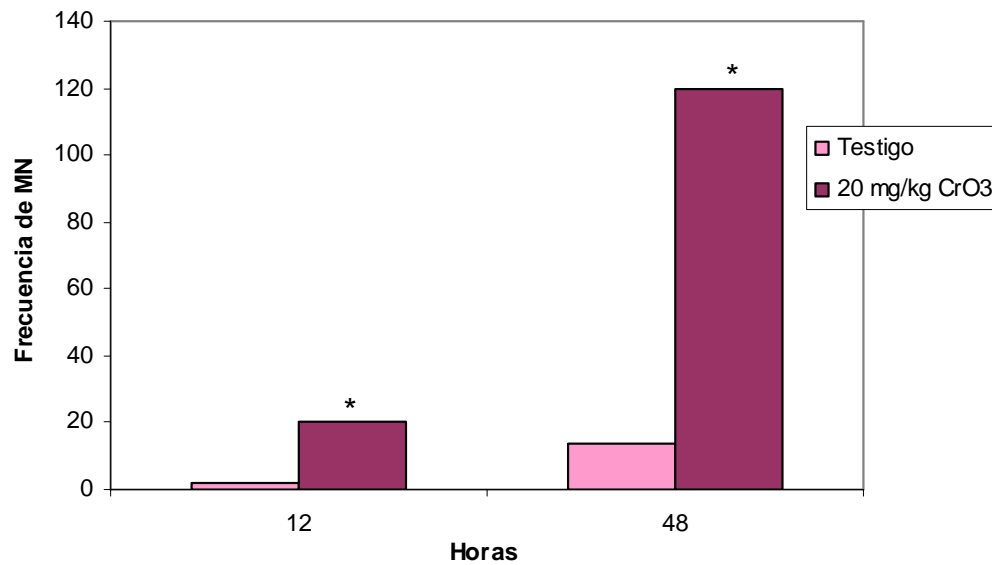


Figura 22. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 10000 EPC (*: estadísticamente significativo $p < 0.05$).

En la figura 23 se muestra el comportamiento de la frecuencia de EPC con respecto a los ENC. Se puede observar un efecto similar del grupo tratado con respecto al testigo.

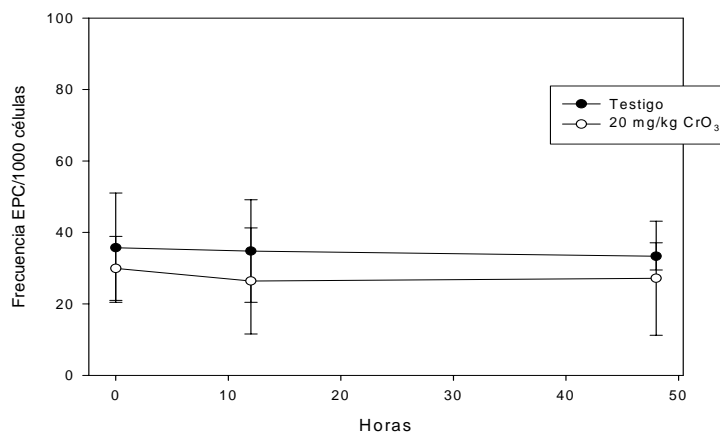


Figura 23. Frecuencia de EPC.

6.3. Efecto de CFL sobre el daño genotóxico

Una vez seleccionados los tiempos de evaluación, se combinaron los tratamientos de 20 mg/kg de CFL con 20 mg/kg de CrO₃. En los resultados obtenidos se pudo observar que el CrO₃ induce MN a las 12 y 48 horas después del tratamiento, que la administración de CFL (20 mg/kg) de peso corporal) no incrementa el número de MN. En cambio, cuando la CFL fue administrada antes del tratamiento con CrO₃, la inducción de MN que se observó a las 12 horas en el grupo tratado con CrO₃ solamente disminuyó significativamente, lo cual no sucedió en los animales estudiados 48 horas después del tratamiento (cuadro 13).

Cuadro 13. Promedios de la frecuencia de PCE y la inducción de MN en hembras tratadas con CrO₃ y CFL ($\bar{x}\pm de$).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N	Hora de análisis	EPC/ 1000 células	MN/ 1000 células
Testigo/vehículo	0	8	0	67.2±19.0	0.93±0.90
			12	71.7±16.2	1.37±0.64
			48	74.7±18.0	1.87±0.79
CFL	20	4	0	51.5±11.9	2.00±0.71
			12	45.3±12.5	2.25±0.64
			48	49.3± 5.5	1.70±0.68
CrO ₃	20	6	0	51.0± 6.4	1.08±1.28
			12	50.9±10.5	3.15±1.22*
			48	41.9±10.3	12.51±2.98*
CFL-CrO ₃	20-20	4	0	58.4±11.0	2.25±0.87
			12	56.5±10.8	2.87±0.63
			48	56.3±10.0	14.70±2.54*
CFL-CrO ₃ -CFL	20-20-20	4	0	79.8±15.2	1.00±0.41
			12	75.5±11.8	1.50±1.47
			48	81.5±13.4	12.25±5.69*

*: estadísticamente significativo p<0.05.

El hecho de que la CFL sólo haya protegido en uno de los tiempos de inducción (12 h), apoya la hipótesis de que los MN que se forman en respuesta al tratamiento con CrO_3 , tienen diferentes vías de inducción y que la CFL tiene efecto sólo sobre los MN inducidos de manera temprana.

Por su parte, dado que la CFL no redujo el incremento de MN observado a las 48 horas, hizo suponer que tal vez la CFL ya había sido metabolizada y eliminada para este tiempo, por lo que, se diseñó un protocolo adicional para comprobarlo. El protocolo consistió en aplicar una segunda dosis de CFL, 12 horas después de su primera aplicación (CFL- CrO_3 -CFL).

En el cuadro 12 se muestran los resultados del doble tratamiento de la CFL y se puede observar que al igual que para el protocolo anterior, la CFL reduce el incremento de MN sólo a las 12 horas. Al calcular el NIF (figura 24), resultan estadísticamente significativos los incrementos de MN obtenidos a las horas 12 y 48 por el tratamiento con el CrO_3 y la protección de la CFL se presenta en la hora 12 para ambos protocolos CFL- CrO_3 y CFL- CrO_3 -CFL.

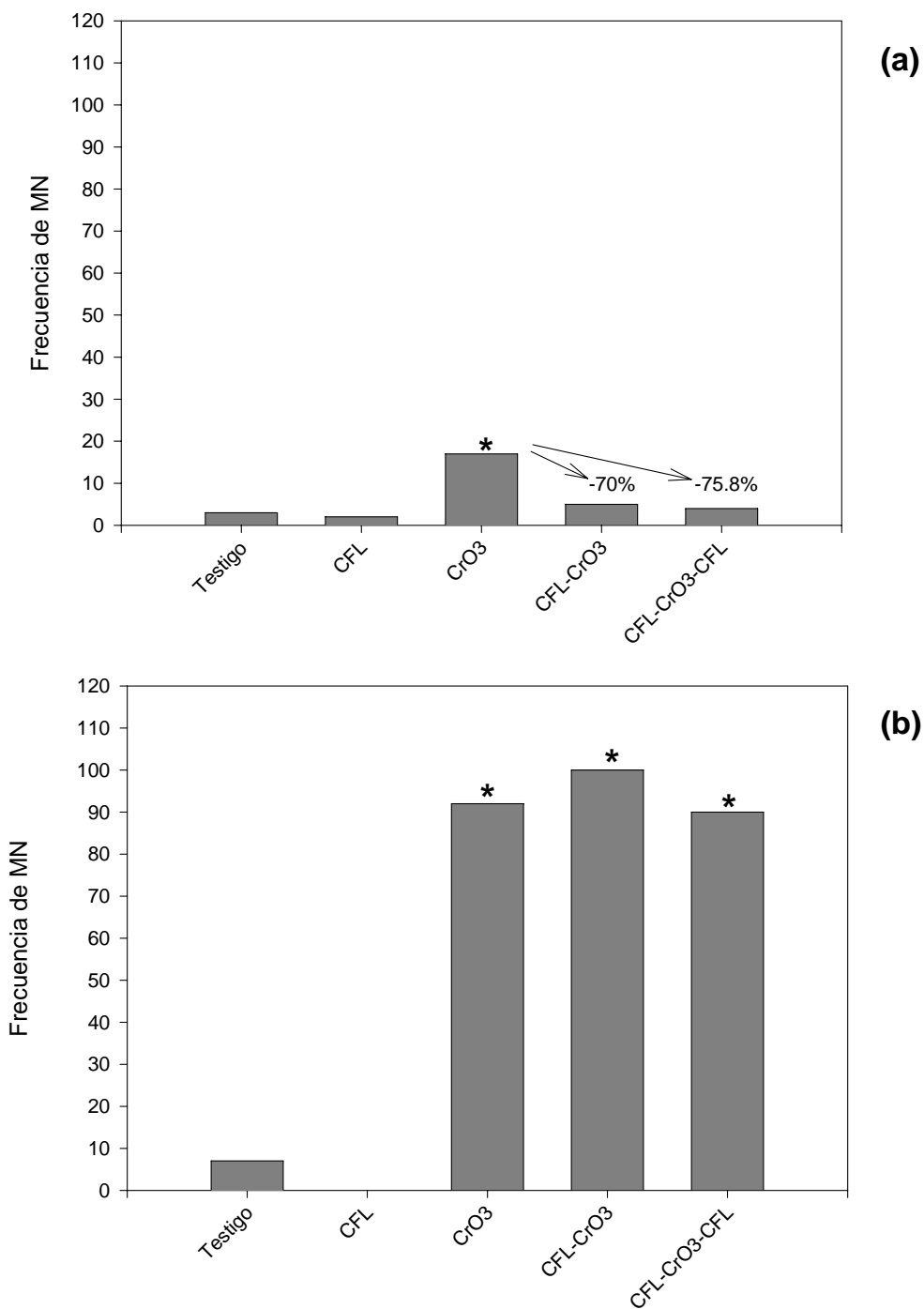


Figura 24. Análisis por tiempo y por grupo del NIF de MN calculado para 8000 EPC (*: estadísticamente significativo $p < 0.05$). a) hora 12 y b) hora 48

En la figura 25 se muestra la frecuencia del EPC y al igual que en las anteriores evaluaciones no se observan efectos del tratamiento con CrO_3 en comparación con los testigos.

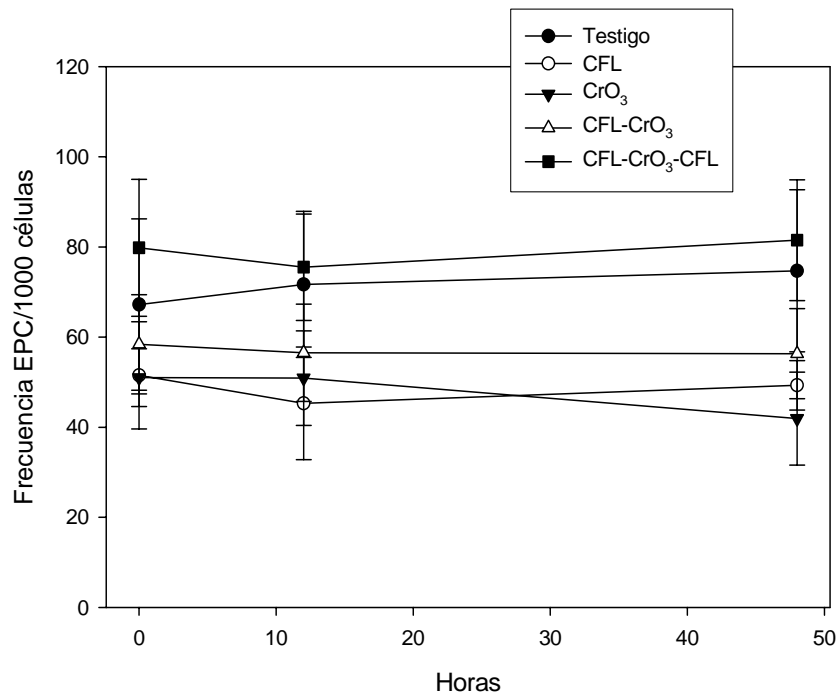


Figura 25. Frecuencia de EPC obtenida cuando se combinaron tratamientos de CFL con CrO_3 .

Para poder estudiar más ampliamente el efecto de la CFL sobre el daño al ADN inducido por el Cr (VI), se repitió el protocolo anterior con dos variantes:

- Se administró la CFL por vía oral, partiendo de la premisa de que la administración oral es la principal vía de contacto que tenemos los humanos con la clorofila y sus sales.

- Se combinó la CFL con otro compuesto de Cr (VI), el cual se seleccionó con base a lo reportado en la literatura (De Flora, 2000; O'Brien *et al.*, 2003).

En el cuadro 14 se muestran los promedios de las frecuencias de MN y de EPC cuando se administró la CFL por vía oral y cuando se combinó con $K_2Cr_2O_7$. Se puede observar que al igual que en los estudios anteriores la CFL por si sola no modifica el número de MN y que a diferencia de nuestro estudio anterior (cuadro 13) cuando se administró el tratamiento de CFL por vía oral protegió a los ratones del aumento en el número de MN inducidos por el CrO_3 , tanto a las 12 como a las 48 horas. Estos resultados hacen suponer que la administración de la CFL por vía oral protege del daño genotóxico, de manera más efectiva que cuando se administró por vía i.p. A partir de estos resultados se puede decir que la vía de administración de la CFL juega un papel importante en sus mecanismos de protección. De igual manera la CFL disminuye el número de MN cuando se combinó con $K_2Cr_2O_7$. En ambos casos la reducción es sólo parcial, ya que pese a que se aprecia un ligero incremento de MN, ya son estadísticamente significativos. Cabe mencionar que el incremento de MN inducido por el $K_2Cr_2O_7$ es menor que el que se induce cuando se administra el CrO_3 , lo que está relacionado con un menor efecto genotóxico.

En la figura 26 se muestra el cálculo del NIF de los datos anteriormente mencionados, en donde el incremento de MN observado a la hora 12 resultó estadísticamente significativo con el tratamiento con CrO_3 . En la hora 48 ambos tratamientos (CrO_3 y $K_2Cr_2O_7$) tuvieron un efecto significativo. En cuanto a la combinación de tratamientos se observa claramente como la CFL disminuye el número de MN en la hora 12, por lo que se corrobora la protección en esta hora en ambos tratamientos. Sin embargo, en el efecto sobre los MN inducidos por el Cr (VI) a la hora 48 varía, ya que para el caso del CrO_3 , si bien se presenta una disminución en el número de MN, el incremento resulta estadísticamente significativo, y en cuanto al tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ ya no resulta estadísticamente significativo el efecto del Cr (VI).

Cuadro 14. Promedios de la frecuencia de PCE y la inducción de MN en hembras tratadas con Cr (VI) y CFL vía oral ($\bar{x}\pm de$).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	n	Hora de análisis	EPC/ 1000 células	MN/ 1000 células
Testigo	0	5	0	49.40±15.01	1.20±0.28
			12	56.60±20.11	1.60±0.65
			48	56.00±21.40	1.30±0.45
CFL	20	5	0	43.20±12.91	1.40±0.74
			12	48.20±18.86	1.10±0.55
			48	46.20±14.02	0.80±0.76
CrO ₃	20	5	0	71.60±10.23	1.75±0.29
			12	63.75±7.89	3.00±0.41
			48	56.±13.22	10.25±2.33*
CFL-CrO ₃	20-20	4	0	78.25±15.33	1.88±0.25
			12	65.00±17.38	1.50±0.41
			48	57.00±18.35	3.80±3.22*
K ₂ Cr ₂ O ₇	20	4	0	49.75±24.50	2.00±0.41
			12	47.25±10.53	2.50±0.41
			48	44.50±5.32	5.63±1.31*
CFL-K ₂ Cr ₂ O ₇	20-20	5	0	56.20±13.61	1.30±0.97
			12	48.00±10.61	2.30±1.09
			48	31.00±3.45	3.20±1.75

*: estadísticamente significativo $p < 0.05$.

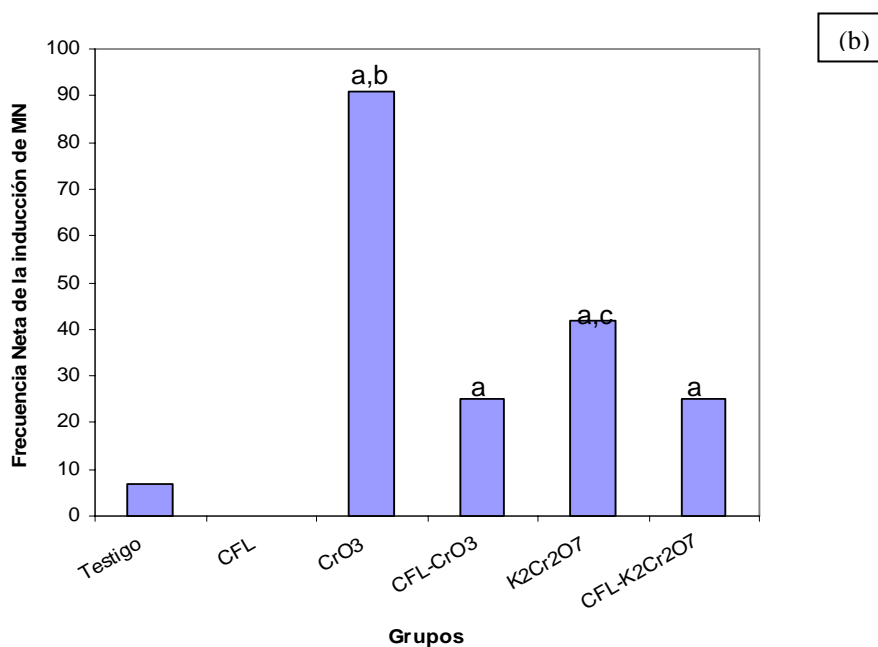
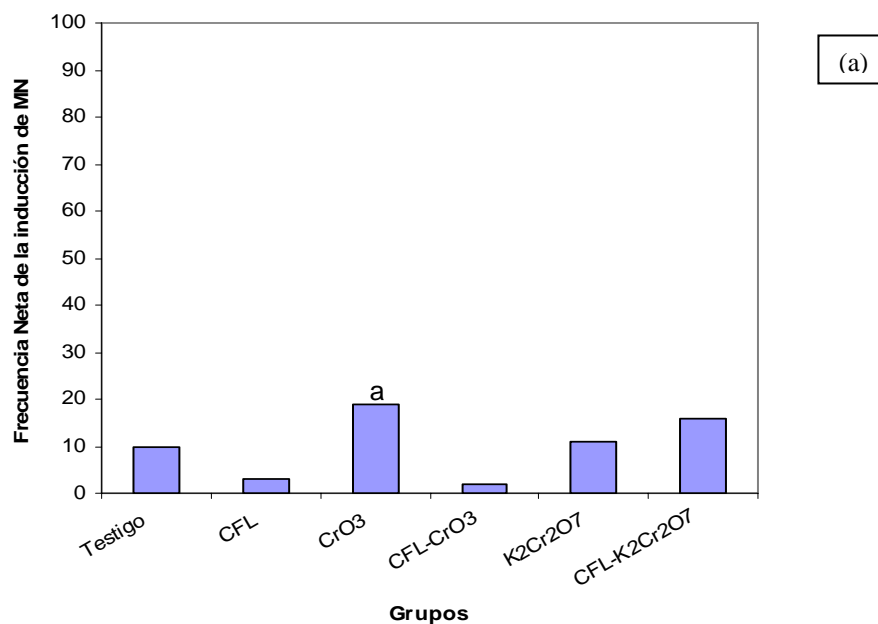


Figura 26. Análisis por tiempo y por grupo del NIF absoluto de MN calculado para 10000 EPC, cuando se combinaron los tratamientos de CFL administrada vía oral con CrO₃ y K₂Cr₂O₇ (^a: vs testigo; ^b: vs CFL-CrO₃; ^c: vs CFL-K₂Cr₂O₇, para todos los casos p<0.05). a) hora 12 y b) hora 48.

En la figura 27 se muestra el comportamiento del EPC, en donde se puede observar que hay una caída en la frecuencia de EPC con respecto a los ENC en los grupos tratados con Cr (VI) y la combinación de CFL y Cr (VI), sin embargo estos valores no resultan estadísticamente significativos. Los otros grupos tienen un comportamiento sin diferencias.

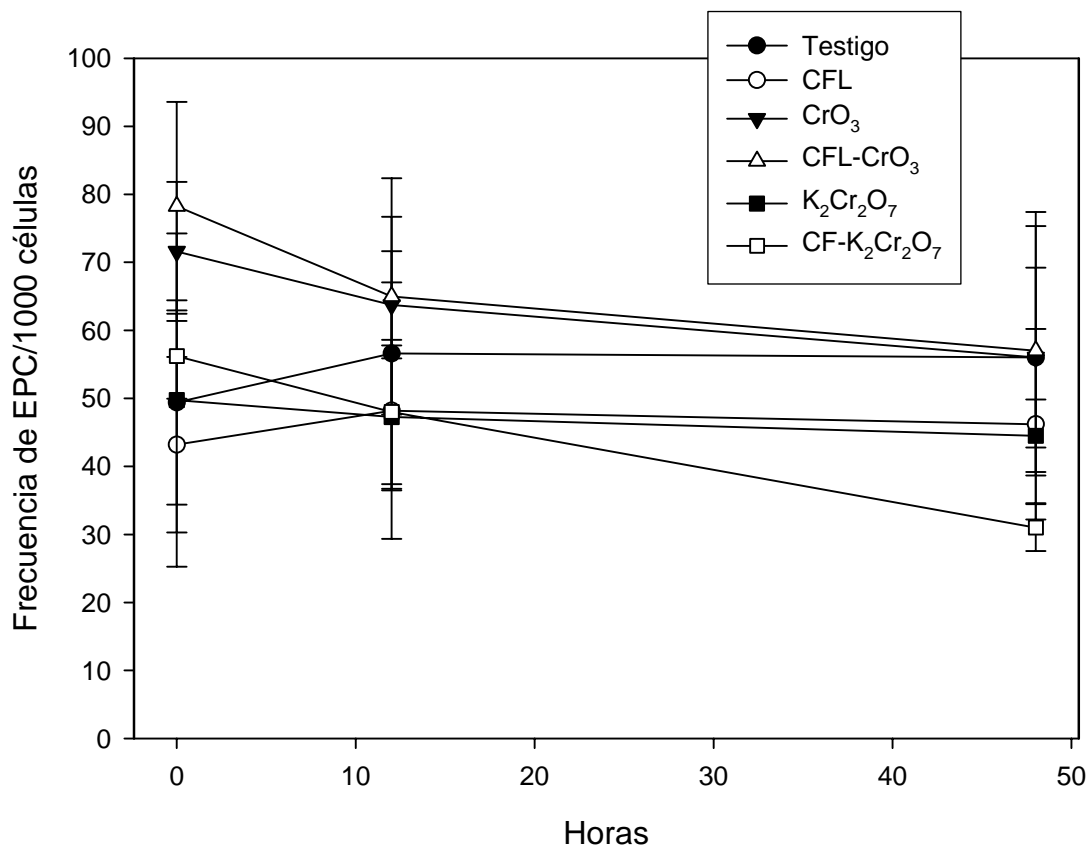


Figura 27. Frecuencia de EPC obtenida cuando se combinaron los tratamientos de CFL administrada por vía oral con CrO₃ y K₂Cr₂O₇.

6.4. Cinética de inducción de MN y de la frecuencia de EPC por CrO₃ (hembras preñadas)

Los resultados del estudio de los efectos de la CFL y de Cr (VI) en la gestación se muestran en el cuadro 15, en donde se observa que el incremento de los MN se presenta sólo a la hora 48 y que dicho incremento de MN en hembras preñadas es menor en comparación con los observados en hembras sin preñar, ya que como se observó en los cuadros anteriores el incremento en hembras sin preñar fue entre 10 y 13 MN, mientras que para las hembras preñadas es de alrededor de 6 MN. Al calcular el NIF a estos datos el incremento de MN inducido por el tratamiento del CrO₃, resulta estadísticamente significativo para los tres tiempos evaluados (figura 28).

Cuadro 15. Promedios de la frecuencia de PCE y la inducción de MN en hembras preñadas tratadas con CrO₃ ($\bar{x} \pm de$).

Tratamiento CrO ₃ (mg/kg)	N	Hora de análisis	EPC/ 1000 células	MN/1000 células
0	4	0	221.42 ± 51.16	0.98 ± 0.79
	4	24	175.04 ± 32.33	0.36 ± 0.45
	4	48	162.64 ± 58.34	0.61 ± 0.63
	4	72	191.66 ± 88.35	0.48 ± 0.03
20	4	0	282.16 ± 41.86	1.25 ± 0.64
	4	24	245.71 ± 124.08	2.52 ± 1.78
	4	48	169.58 ± 91.73	6.70 ± 5.52*
	4	72	122.19 ± 116.96*	2.34 ± 1.8

*: estadísticamente significativo p<0.05.

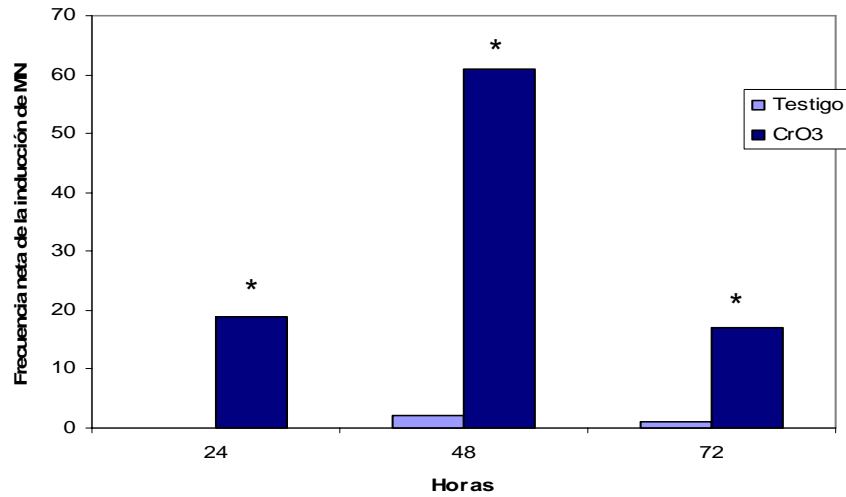


Figura 28. Análisis por tiempo y por grupo del NIF absoluto de MN calculado para 10000 EPC cuando se administró el CrO₃ a hembras preñadas (*: estadísticamente significativo p<0.05).

En la figura 29 se muestra la frecuencia acumulada de los MN evaluados en el grupo tratado con el CrO₃. Como se puede observar hay un incremento similar a lo largo de la curva.

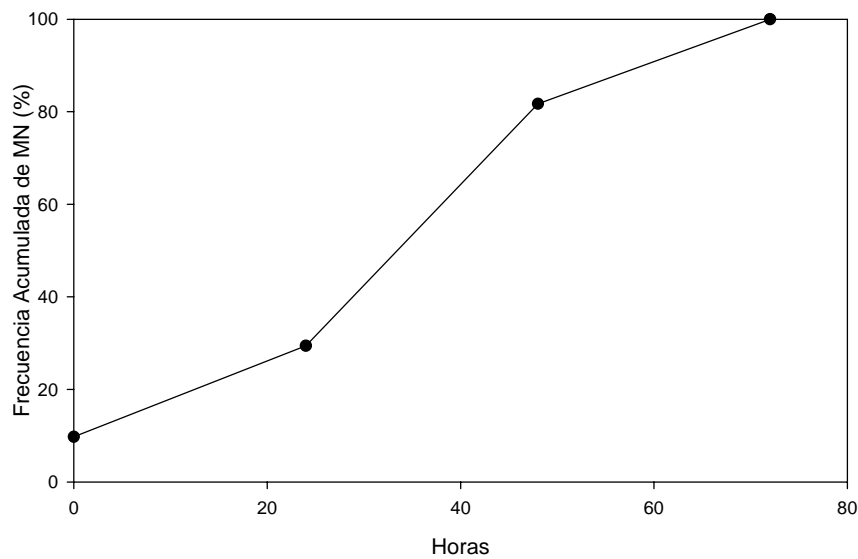


Figura 29. Frecuencia acumulada de la inducción de MN en el grupo de hembras preñadas tratadas con 20 mg/kg de CrO₃.

En cuanto al efecto citotóxico, se observó que la frecuencia de EPC disminuyó con respecto al tiempo en tanto en el grupo testigo como en el tratado con CrO_3 , sin embargo resultado estadísticamente significativo sólo en el grupo tratado (cuadro 14). Cabe mencionar que la variabilidad observada en las muestras el grupo tratado con CrO_3 , no permiten identificar una clara diferencia con respecto al grupo testigo (figura 30). La disminución del EPC podría estar relacionada con una respuesta citotóxica durante la gestación a la manipulación de los organismos y a la administración del CrO_3 .

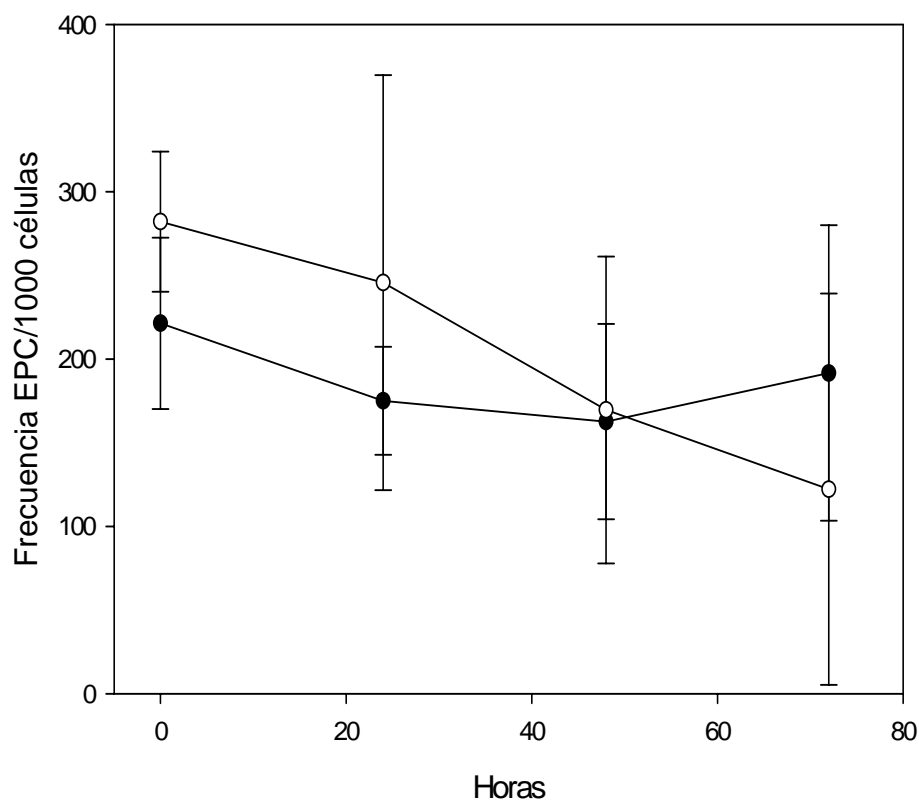


Figura 30. Frecuencia de EPC obtenida cuando se administró el CrO_3 a hembras preñadas

6.5. Efecto genotóxico y citotóxico del CrO₃ en los fetos.

El efecto del daño genotóxico y citotóxico del CrO₃ que fue medido mediante el incremento de MN y la frecuencia de EPC respectivamente, también fue evaluado en las crías de las hembras gestantes tratadas en el día 15 de gestación. En el cuadro 16 se muestran los promedios de las frecuencias de MN y de EPC analizados por grupo y por tiempo, en donde se puede observar un incremento en el número de MN a partir de la hora 24, el cual es significativo hasta la hora 72. Al calcular el NIF a los datos anteriores, el efecto significativo del incremento de los MN persiste solo en la hora 72 (figura 31).

Cuadro 16. Promedios de la frecuencia de EPC y la inducción de MN en fetos obtenidos de hembras tratadas con CrO₃ ($\bar{x} \pm de$).

Tratamiento CrO ₃ (mg/kg)	N	Hora de análisis	EPC/1000 células	MN/1000 células
0	16	0	812.28 ± 73.90	2.96 ± 0.42
	16	24	775.07 ± 36.47*	2.10 ± 0.29
	16	48	681.77 ± 35.32*	1.85 ± 0.54
	16	72	524.18 ± 75.48*	2.48 ± 0.91
20	16	24	765.53 ± 22.53*	3.44 ± 0.96
	16	48	678.26 ± 52.11*	3.65 ± 1.80
	16	72	521.31 ± 138.67*	4.11 ± 0.94*

*: estadísticamente significativo $p < 0.05$.

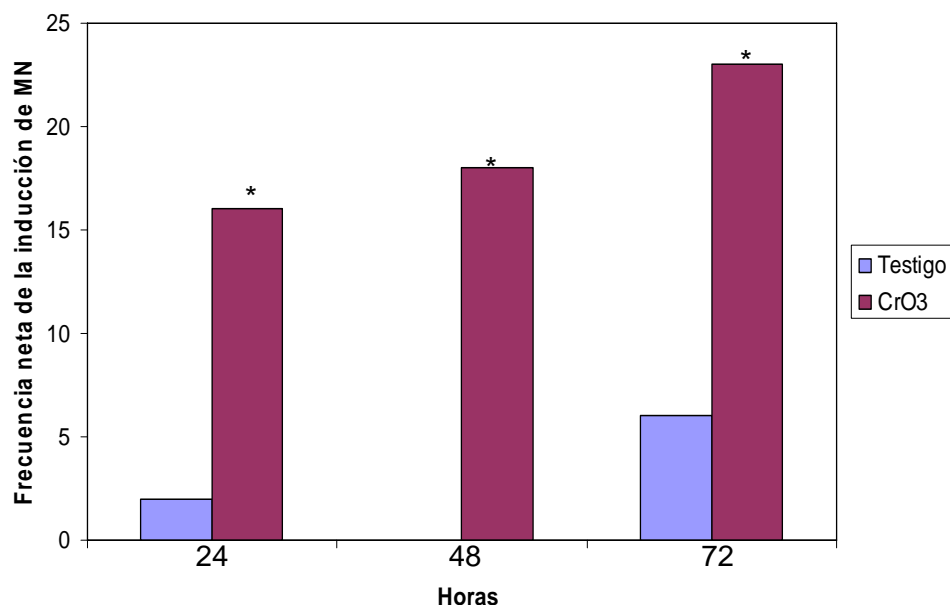


Figura 31. Análisis por tiempo y por grupo del NIF absoluto de MN en fetos, calculado para 10000 EPC cuando se administró el CrO₃ a hembras preñadas (*: estadísticamente significativo p<0.05).

A los valores del incremento de MN en fetos obtenidos de las hembras gestantes tratadas con los 20 mg/kg de CrO₃, también se les calculó la frecuencia diferencial en la inducción de MN (DIF). Este análisis consistió en restarles los valores respectivos de cada hora del grupo testigo a los tratados. La intención de analizar los datos de esta forma fue para “eliminar” la inducción de MN espontánea, asumiendo que los MN evaluados a las diferentes horas en el grupo testigo, es la inducción basal durante el experimento.

$$DIF = \text{valor observado en grupo tratado en la } h_i - \text{valor obtenido en el grupo testigo } h_i$$

Donde:

i = tiempo de evaluación

En la figura 32, se muestra el comportamiento de los datos cuando se les realizó el DIF, en esta se puede observar que la máxima inducción se presenta desde a las 48 horas después del tratamiento.

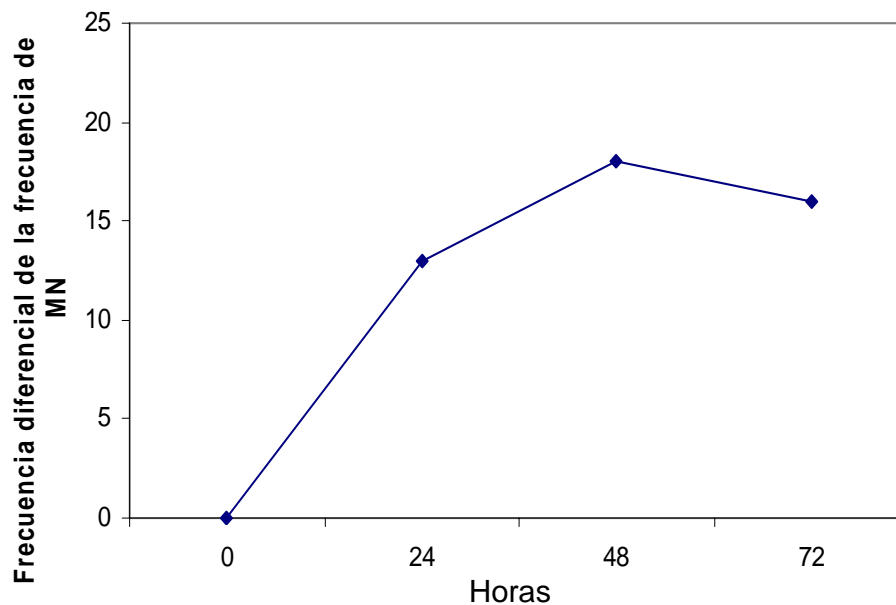


Figura 32. Análisis por tiempo y por grupo del DIF de MN en fetos, calculado para 10000 EPC cuando se administró el CrO_3 a hembras preñadas.

En cuanto a la citotoxicidad se observó que el EPC disminuye conforme transcurre el tiempo de gestación, lo cual resulta estadísticamente significativo para cada uno de los tiempos de análisis tanto en el grupo testigo como en el tratado. En la figura 35 se muestra el comportamiento de los datos cuando se les realizó el análisis exploratorio, como se puede observar a pesar de la variabilidad hay una tendencia a disminuir de la frecuencia de EPC con el tiempo, lo cual permite sugerir que el efecto observado se debe al desarrollo fetal más que al tratamiento del CrO_3 . De igual manera, se puede observar que no existe desplazamiento de las cajas para ninguna de las horas de los grupos tratados con respecto a los testigos (figura 33).

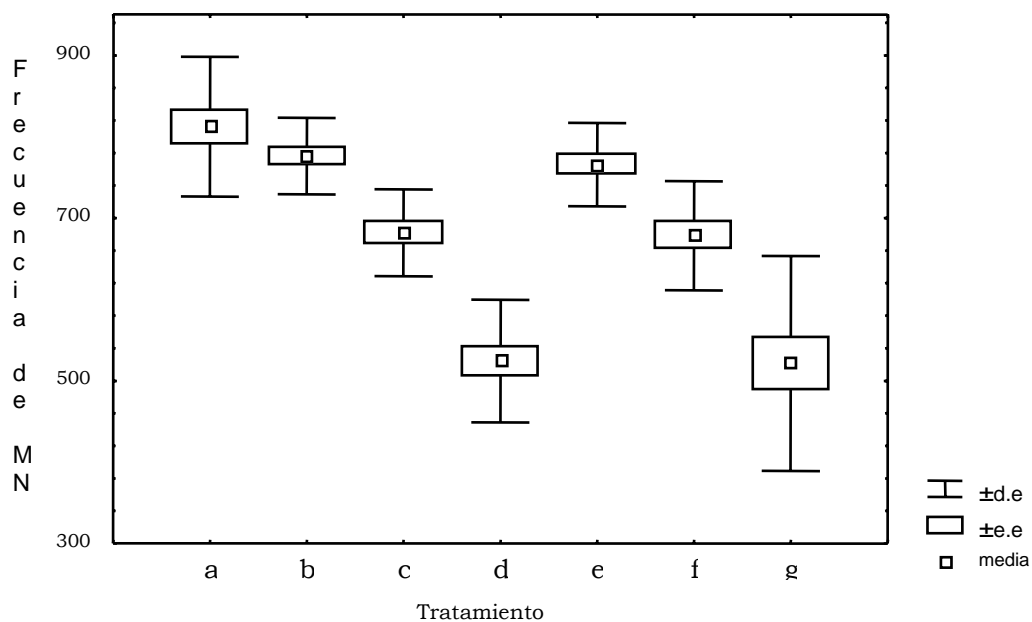


Figura 33. Análisis exploratorio del EPC en sangre periférica fetal de los grupos testigos y tratados. Testigos: a) día 15, b) día 16, c) día 17, d) día 18. Tratados: e) día 16, f) día 17, g) día 18.

6.6. Efecto de la CFL sobre el daño genotóxico del CrO₃ en hembras preñadas

Una vez establecidos los efectos del CrO₃ en la gestación, se combinaron los tratamientos de CFL y CrO₃. En el cuadro 17 se muestran los promedios de las frecuencias de MN y de EPC, en donde se observa que la administración por sí sola de CFL no altera el número de MN en las hembras gestantes, mientras que, el daño genotóxico inducido por el CrO₃ persiste en las hembras preñadas. El tratamiento con CFL previo a la inyección de CrO₃, al parecer no protegió a las 48 horas del incremento de MN en las hembras.

Cuadro 17. Promedios de la frecuencia de PCE y la inducción de MN en hembras preñadas tratadas con con CFL y CrO₃ ($\bar{x} \pm de$)

Tratamiento (20 mg/kg)	Hora de análisis	N	EPC/1000 células	MN/1000 células
Testigo	0	22	52.28±17.22	1.59±1.10
	24	5	43.40±4.28	0.80±0.84
	48	5	51.40±20.73	1.40±0.89
	72	5	48.00±10.48	1.40±0.55
CFL	24	5	52.40±16.90	0.40±0.89
	48	5	41.60±20.11	0.20±0.45
	72	5	67.40±32.43	0.80±1.30
CrO₃	24	5	50.60±19.34	4.8±0.84
	48	5	38.26±9.14	6.80±7.46*
	72	5	29.80±13.91*	4.80±6.30
CFL-CrO₃	24	7	46.85±19.52	3.00±1.73
	48	5 ⁺	50.40±26.18	6.20±2.68*
	72	5 ⁺	34.20±7.12	3.40±2.51

*:estadísticamente significativo, $p < 0.05$. ⁺ Hubo muerte de dos hembras.

Como se observa en el cuadro 16, la combinación de ambos tratamientos (CFL y CrO₃) indujo muerte en dos hembras de este grupo, además de que mostraron signos de toxicidad como el pelo erizado, diarrea y dificultad de movimiento, esta situación no se había observado antes en los grupos de hembras sin preñar cuando se combinaron los tratamientos. Particularmente para este grupo se incrementó el número de hembras tratadas con el fin de poder efectuar un análisis más confiable.

De igual manera a los valores de MN obtenidos se les calculó el NIF (figura 34) y al resultar estadísticamente significativa la inducción de MN en los grupos CrO₃ y CFL-CrO₃, se confirma que la CFL no disminuye la frecuencia de MN inducidos por el CrO₃ en hembras gestantes.

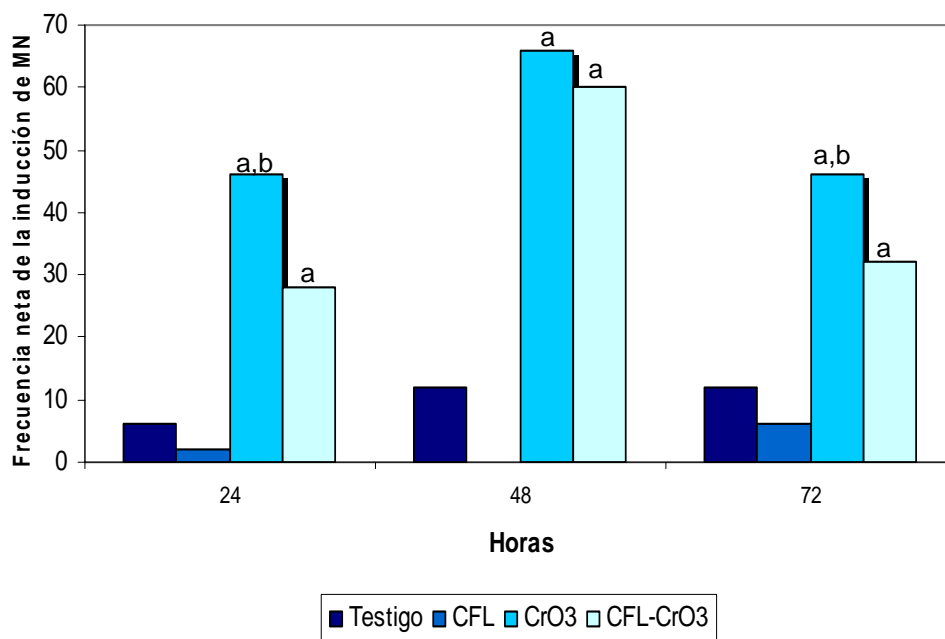


Figura 34. Análisis por tiempo y por grupo del NIF absoluto de MN en hembras preñadas, calculado para 10000 EPC cuando se administró la combinación de los tratamientos de CFL y CrO₃ (^a: vs testigo; ^b: vs CFL-CrO₃, en todos los casos p<0.05).

En la figura 35 se muestra el comportamiento de la frecuencia de EPC en hembras preñadas cuando se combinaron los tratamientos. Como se puede observar en los grupos tratados con CrO₃ y CFL-CrO₃ hay una disminución de la frecuencia de EPC a las 72 horas postratamiento, sin embargo al haber tanta variabilidad en este parámetro no resultan ser estadísticamente significativas, por lo que no hay un claro efecto del CrO₃ sobre la citotoxicidad en hembras gestantes.

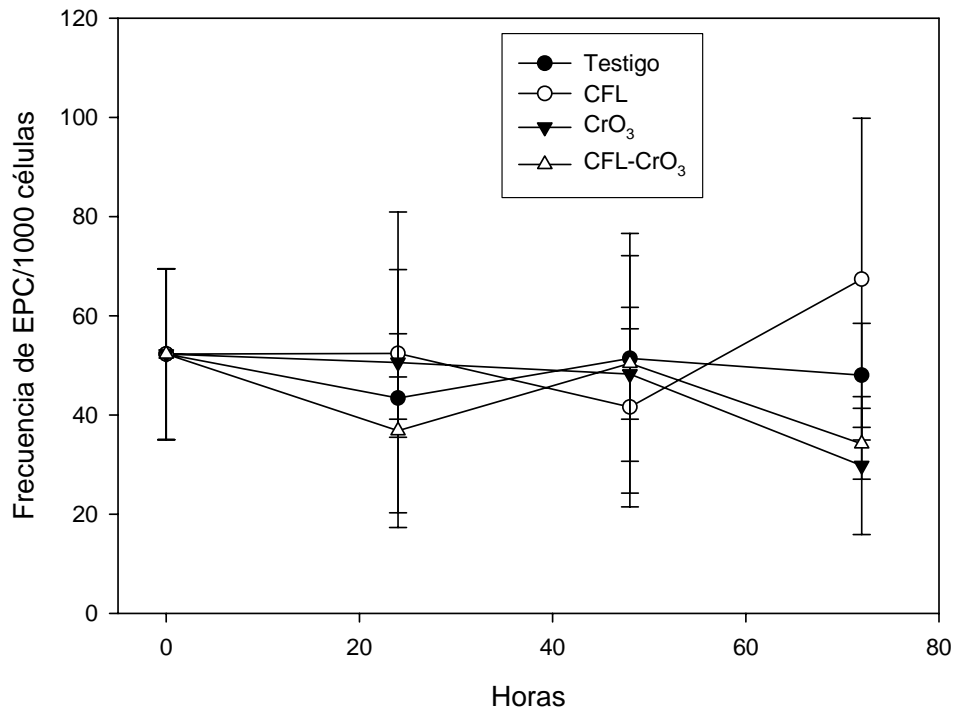


Figura 35. Seguimiento del comportamiento de la frecuencia de EPC en las hembras preñadas tratadas con CFL y CrO₃.

6.7. Efecto de la CFL sobre el daño genotóxico en fetos obtenidos de hembras tratadas con CrO₃.

En el cuadro 18 se muestran las evaluaciones de las frecuencia de MN y de EPC en los fetos obtenidos a las 72 horas después del tratamiento de 20 mg/kg de CrO₃ a sus madres. Como se puede observar la CFL por si sola no modificó el número de MN con respecto al grupo testigo. En los fetos obtenidos de las hembras tratadas con el CrO₃ se incrementó el número de MN, mientras que la frecuencia de MN se disminuyó en el grupo de fetos obtenidos de las hembras que fueron tratadas con CFL antes de la administración del CrO₃.

A partir de estos resultados y los obtenidos en las hembras gestantes se puede decir que la CFL no es capaz de proteger del daño al ADN a las hembras preñadas pero sí a sus crías. Esto podría estar relacionado con la distribución entre madre y feto de la CFL, de donde, la concentración que llega a la madre no fue la suficiente para proteger totalmente el incremento de daño genotóxico, en cambio la que llegó al feto sí fue la suficiente para protegerlo del incremento de MN inducido por el CrO_3 .

Cuadro 18. Promedios de la frecuencia de PCE y la inducción de MN en fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas con CFL y CrO_3 ($\bar{x} \pm de$)

Tratamiento	N	EPC/1000 células $\bar{x} \pm de$	MN/1000 células $\bar{x} \pm de$
Testigo	38	143.68 \pm 58.19	2.81 \pm 1.43
CFL	40	159.10 \pm 59.20	2.60 \pm 2.04
CrO_3	28	149.25 \pm 48.00	5.21 \pm 2.80*
CFL- CrO_3	16	199.87 \pm 23.03	3.75 \pm 1.69

* : estadísticamente significativo, $p < 0.05$.

Al calcular el NIF a los datos anteriores (figura 36) persiste el incremento de MN inducido por el CrO_3 y la disminución de este efecto con la combinación de los tratamientos (CFL y CrO_3).

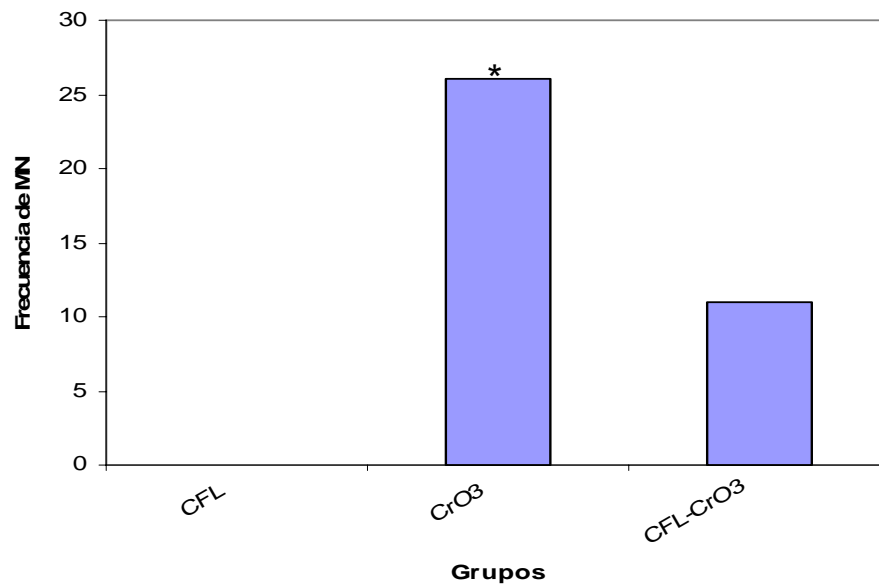


Figura 36. Frecuencias de MN en los fetos obtenidas de hembras tratadas con CFL y CrO₃. Datos calculados mediante la diferencia de los valores del grupo testigo y tratados (*: significativo con una $p < 0.05$).

En cuanto a la citotoxicidad se puede observar que aunque hay un incremento en la frecuencia de EPC en el grupo en el cual se combinaron los tratamientos de CFL y CrO₃ (cuadro 18), no resulta estadísticamente significativo. Este efecto se puede ver más claramente en la figura 37.

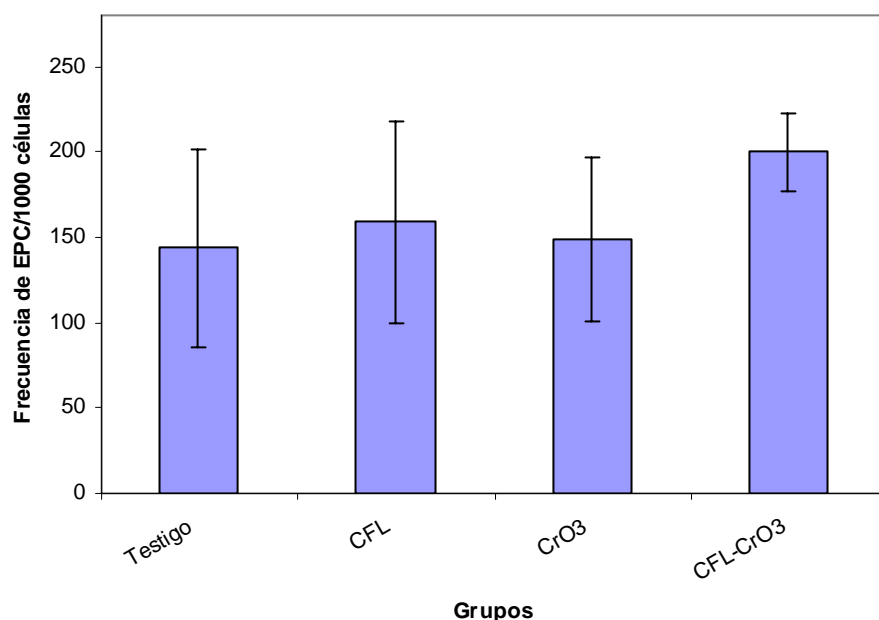


Figura 37. Seguimiento del comportamiento de la frecuencia de EPC en los fetos obtenidos de las hembras preñadas tratadas con CFL y CrO₃.

6.8. Efecto de la CFL sobre el daño causado por el CrO₃ en el desarrollo fetal

En el Cuadro 19 se describen las camadas antes de su nacimiento cuando se administraron los tratamientos de CFL y CrO₃. Se observa que el tratamiento con 20 mg/kg de CrO₃ induce muerte fetal, mientras al grupo que se le administraron 20 mg/kg de CFL no se afectó ninguno de los parámetros evaluados. Cuando se combinaron los tratamientos (CFL y CrO₃), se incrementó el efecto fetoletal observado con la aplicación sola del CrO₃, este efecto tal vez fue ocasionado por la toxicidad materna descrita anteriormente.

Cuadro 19. Comportamiento de las camadas obtenidas a la hora 72 postratamiento ($\bar{x} \pm de$)

	Testigo	CFL	CrO ₃	CFL-CrO ₃
No. Hembras	5	6	5	7
Implantes/Hembra	14.80±2.48	14.50±2.34	13.40±1.74	14.60±4.21
Fetos Vivos	13.00±1.87	13.00±4.33	8.00±5.19	2.00±4.47 *
Fetos Muertos	0.00±0.00	0.00±0.00	2.80±4.02*	4.00±8.94 *
Reabsorciones	1.60±1.81	1.50±2.25	2.60±3.43	8.60±8.17 *

*: estadísticamente significativo, $p < 0.05$.

En el cuadro 20 se muestran las observaciones realizadas al analizar externamente a los fetos obtenidos a la hora 72 después de los tratamientos a hembras gestantes con CFL, CrO₃ ó CFL- CrO₃. En los fetos obtenidos del grupo de hembras tratadas con CFL, no se presentan alteraciones externas. El CrO₃ incrementó alteraciones como hematomas, braquidactilia, cola en gancho. La administración previa de la CFL a la del CrO₃ disminuye la aparición de las alteraciones del desarrollo observadas con el tratamiento del CrO₃ sólo, estos datos hacen suponer que la CFL tiene efecto protector en el desarrollo fetal.

Cuadro 20. Alteraciones externas en los fetos obtenidos a la hora 72 postratamiento

	Testigo	CFL	CrO ₃	CFL-CrO ₃
No. Camadas	5	6	5	2
No. Fetos	66	79	44	30
Fetos Alterados (%)	8 (12.12)	5 (6.32)	13* (29.54)	4 (13.33)
Extremidades Anteriores (%)	2 (3.03)	2 (2.53)	2 (4.5)	1 (3.3)
Extremidades Posteriores (%)	6 (9.09)	3 (3.03)	7* (15.90)	1 (3.3)
Párpados Abiertos	0	0	0	0
Hematomas (%)	0	0	4* (9.09)	2 (6.6)
Deformación en Cola (%)	0	0	4* (9.09)	0

*: estadísticamente significativo, $p < 0.05$.

En la figura 38 se muestran algunos ejemplos de las alteraciones externas que fueron observadas en los fetos obtenidos de las hembras tratadas con CrO₃.

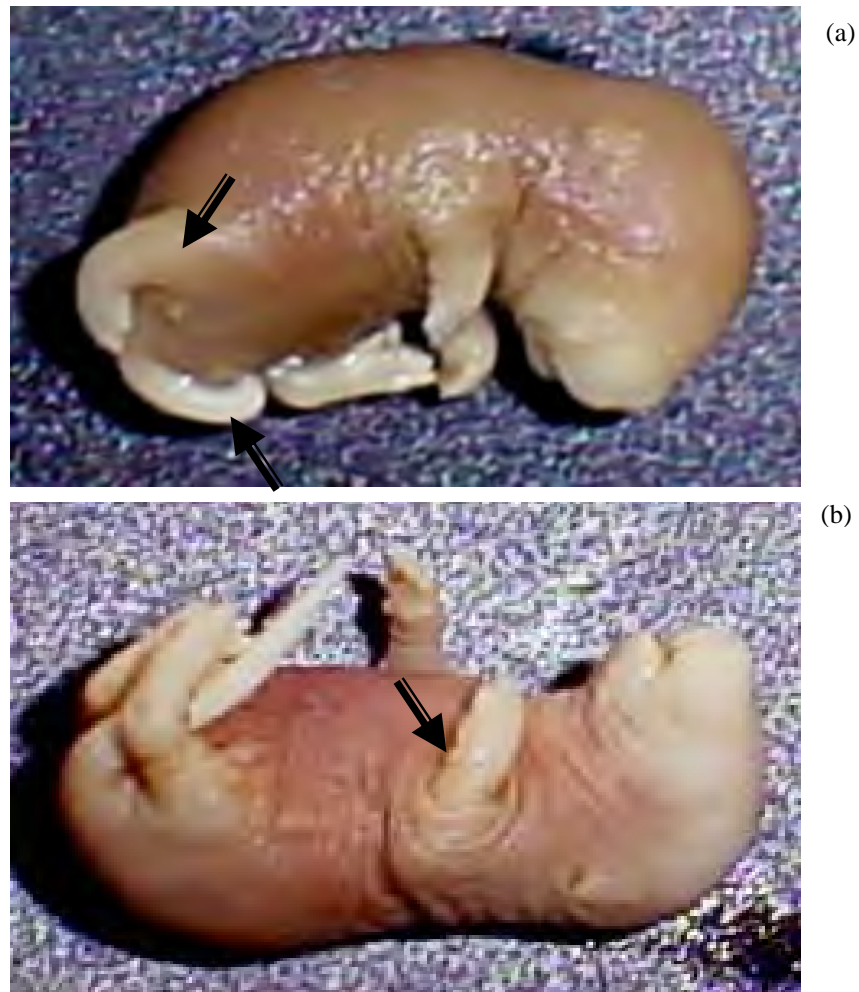


Figura 38. Malformaciones externas observadas en los fetos obtenidos de las hembras preñadas tratadas con CrO_3 : a) pata mal rotada y cola en gancho; b) extremidad anterior acortada.

En el Cuadro 21 se muestran las frecuencias de las alteraciones esqueléticas analizadas en los fetos obtenidos de hembras tratadas con CFL y CrO_3 . Se puede observar que la CFL no modificó el desarrollo esquelético en cuanto a lo evaluado en este estudio. El CrO_3 alteró el desarrollo esquelético fetal mediante el incrementó el número de alteraciones. A diferencia de las alteraciones externas, en el grupo en el cual se combinaron los tratamientos de

CFL y CrO₃, algunas alteraciones persisten tales como el grado de osificación de los huesos (falanges, esternones, cráneo, vértebras, etc.). Esto nos hace suponer que la CFL es capaz “proteger” sólo de algunos tipos de alteraciones inducidas por el CrO₃. En las figuras 39, 40 y 41 se muestran algunos ejemplos de las alteraciones observadas en esqueleto.

Cuadro 20. Alteraciones esqueléticas en los fetos obtenidos a las 72 horas postratamiento

	Testigo	CFL	CrO ₃	CFL-CrO ₃
No. Camadas	5	6	5	2
No. Fetos	66	79	44	30
Fetos Alterados (%)	38 (57)	47 (59)	31 (70)	25 (83)
Extremidades Anteriores (%)	1 (1)	0	18* (41)	15* (50)
Extremidades Posteriores (%)	1 (1)	0	18* (41)	17* (56)
Cráneo (%)	0	2 (2.53)	15* (34)	11* (36)
Columna (%)	0	0	6* (14)	3 (10)
Costillas (%)	20 (30.30)	23 (29.11)	28* (64)	4 (10)
Cola (%)	0	0	11* (25)	7 (10)
Esternebras (%)	34 (51.51)	22 (27.84)	16 (36)	20 (67)

*: estadísticamente significativo, $p < 0.05$.

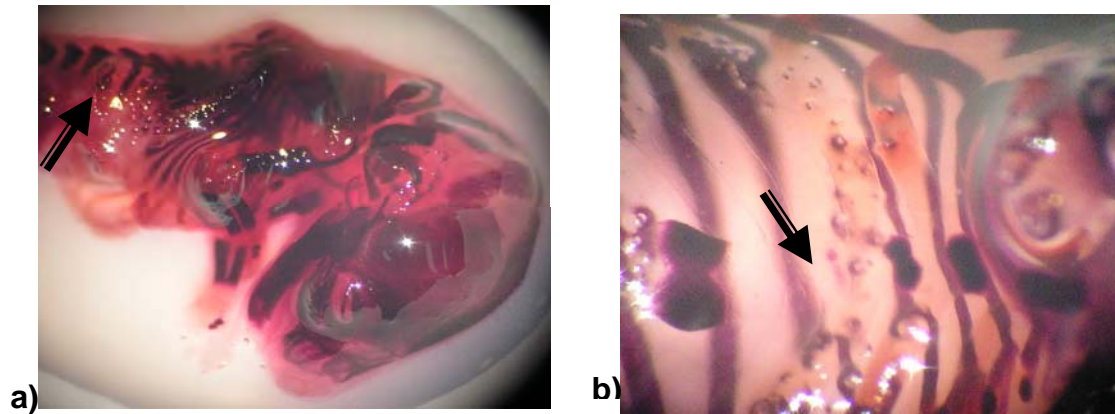


Figura 39. Malformaciones esqueléticas observadas en los fetos obtenidos de las hembras preñadas tratadas con CrO_3 : a) se observan malformaciones múltiples en la columna; b) esternón donde se observa falta de osificación en la sexta esternebra, ausencia de la quinta y cuarta esternebros y la tercera presenta forma de pesa.

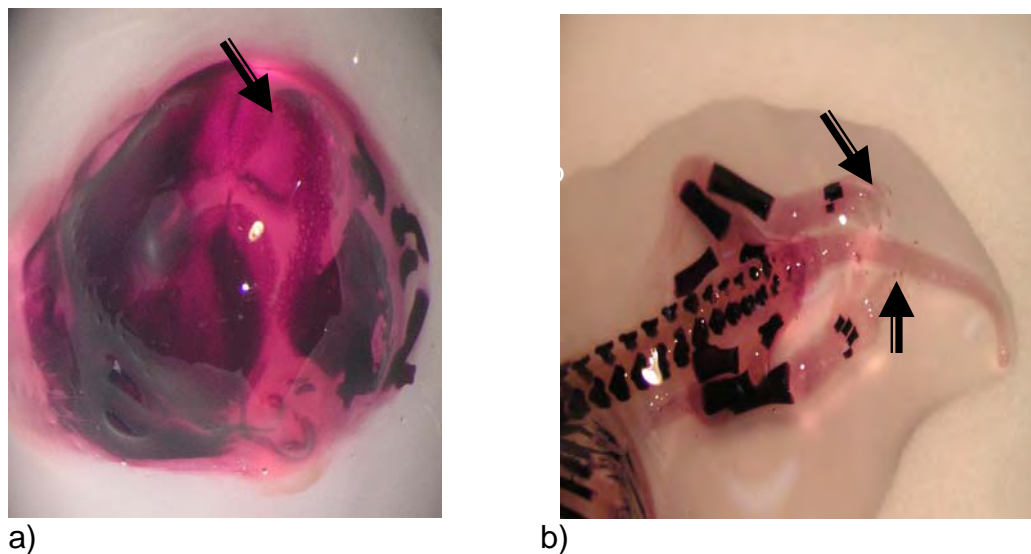
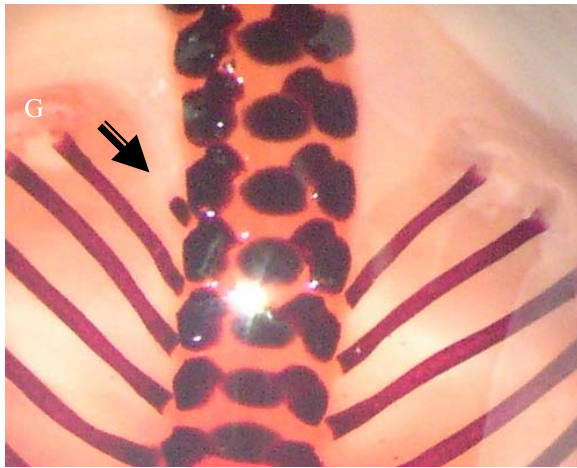
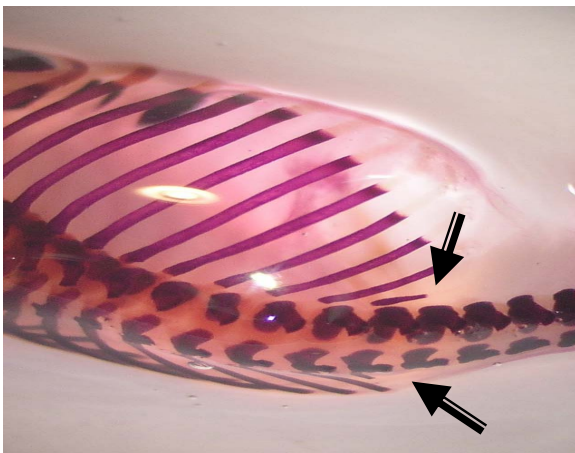


Figura 40. Malformaciones esqueléticas observadas en los fetos obtenidos de las hembras preñadas tratadas con CrO_3 : a) falta de osificación del hueso parietal e interparietal; b) ausencia de las falanges proximales y distales así como las vértebras caudales.



(a)



(b)

Figura 41. Alteraciones esqueléticas observadas en los fetos obtenidos de las hembras preñadas tratadas con CrO_3 : a) una costilla rudimentaria y b) costillas acortadas.

7. DISCUSIÓN

En los resultados de este trabajo se observó que los efectos de la CFL sobre el daño genotóxico inducido por el Cr (VI) dependen de de la vía de administración (i.p. u oral), del protocolo (hembras sin preñar, preñadas u organismos en desarrollo fetal) y del compuesto empleado (CrO_3 ó K_2CrO_7) (figura 42).

Antes de evaluar los efectos de la CFL sobre el daño genotóxico y teratógeno del Cr (VI) se estableció la cinética de inducción de MN, ya que se ha planteado que el estudio de la cinética y la actividad genotóxica es de especial interés para interpretar los estudios sobre genotoxicidad *in vivo*, y que la inducción de MN en EPC de sangre periférica depende de parámetros como: i) el efecto del agente sobre la división celular, ii) la farmacocinética del agente, incluyendo los requerimientos de la activación metabólica y iii) el mecanismo de inducción de MN (Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez 2001).

7.1. Cinética y origen MN inducidos por Cr (VI)

La administración de los compuestos de Cr (VI) a hembras de ratón sin preñar y preñadas, indujo daño al ADN evidenciado mediante el incremento de la frecuencia de MN. Estos datos concuerdan con estudios previos en los que se había descrito que los compuestos de Cr (VI) inducen daño genotóxico (Bianchi y Levis, 1988; IARC, 1990; De Flora *et al.*, 1990; O'Brien *et al.*, 2003). El mecanismo por el cual el Cr (VI) indujo daño puede estar relacionado con el estrés oxidativo, ya que aunque se ha descrito que el Cr (VI) no es capaz de causar daño directo al ADN, una vez que este atraviesa la membrana celular es reducido hasta Cr (III). Como resultado de esta reducción se generan EROs, que interaccionan con el ADN (Stearns y Wetterhahn 1994; Stearns *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2003) y Cr (III) que interacciona con el ADN, aminoácidos simples, proteínas y ARN (Tsapakos y Wetterhahn 1983; Miller *et al.*, 1991; Voitkun *et al.*, 1994; 1998; Zhitkovich *et al.*, 1996; 2001).

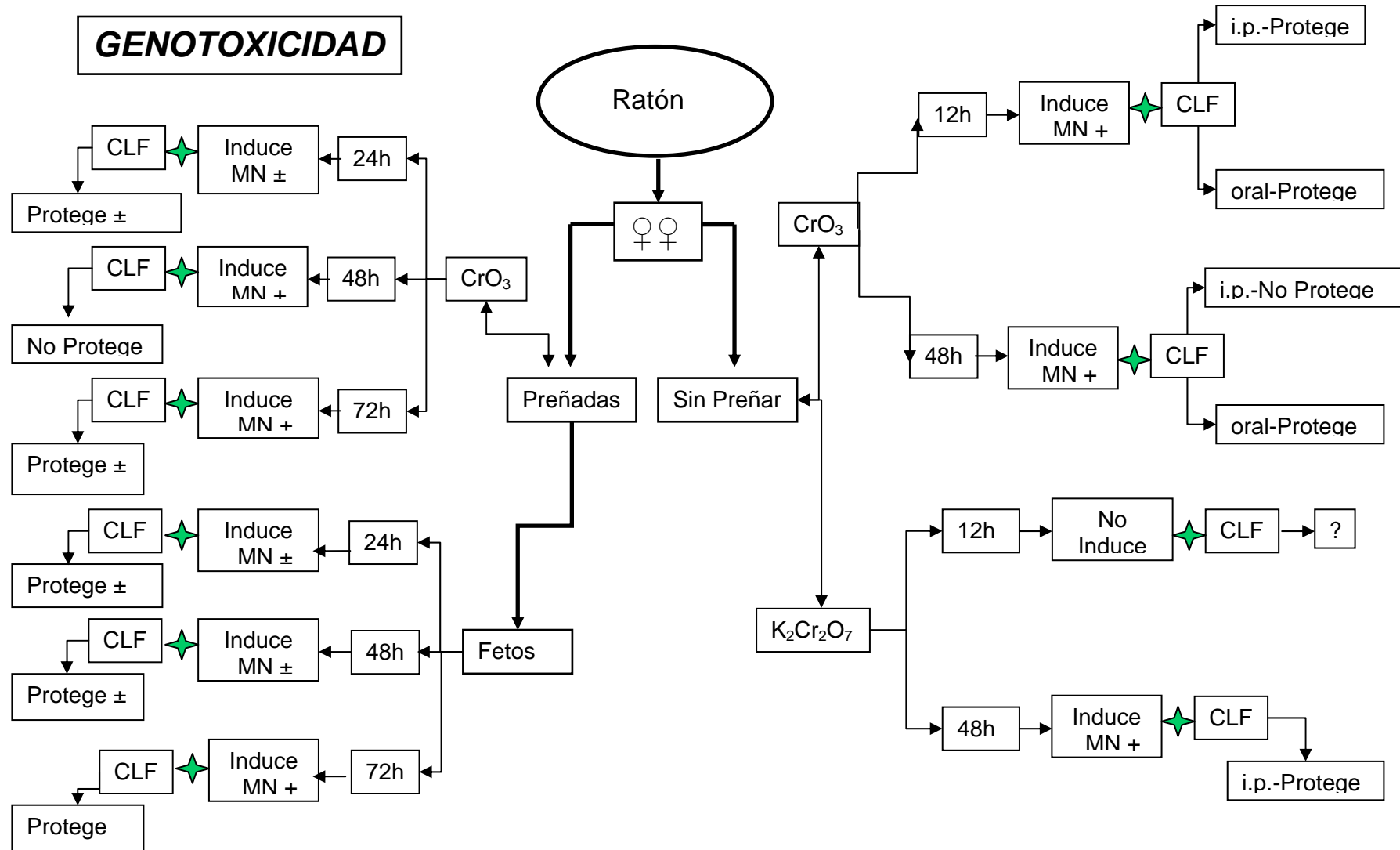


Figura 42. Resumen de resultados de los efectos de la CFL sobre el daño genotóxico inducido por Cr(VI)

El hecho de que se haya observado un incremento temprano de MN (hora 12) cuando se estableció la cinética de inducción de MN, hizo suponer que este daño tenía un origen diferente a la clastogénesis. En nuestros resultados hubo células que presentaron más de un MN, además de que algunos de los MN eran grandes, lo que apoyó la idea de que eran originados por daño aneuploidógeno. En un estudio hecho por Vanderkerken *et al.*, (1998), mostraron que cuando hay un incremento en el número de MN con centrómero, hay también un incremento en el número de MN grandes. Por lo tanto, el tamaño de los MN puede dar indicios del tipo de daño inducido. De igual manera se ha observado que cuando se administran aneugenos es notorio el incremento en el número de células con más de un MN (Nath y Ong, 1990; Rosefort *et al.*, 2004).

Sin embargo, al desarrollar el protocolo para evaluar la presencia de centromero (señal) en los MN observados en la hora 12, se identificaron MN con y sin señal, esto se puede explicar de la siguiente manera:

1. Los MN con señal observados fueron inducidos por daño aneuploidógeno. Esta vía de inducción de daño ya ha sido descrita para los compuestos del Cr (VI), los cuales inhiben la polimerización durante la división celular (Gunaratnam y Grant 2004; Rudolf *et al.*, 2005).

2. Los MN observados sin señal son resultado de rompimientos de cadena doble del ADN, los cuales al ser eventos S independientes podrían explicar el daño temprano del Cr (VI) (Wakeman *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005).

En cuanto a los MN observados en la hora 48, se incrementaron tanto los que presentaban señal, como los que no la tenían, esto se puede deber simplemente al daño acumulado, previamente descrito, y por el daño clastógeno inducido posteriormente, el cual está bien documentado (Vernier *et al.*, 1982; Wise *et al.*, 1994; Balansky *et al.*, 2000).

Una ventaja de este ensayo, es que se puede saber el origen de los MN al ser discriminados visualizando el cinetocoro marcado, ya que estos, son generados como una consecuencia de daño a la estructura del cromosoma o por una distribución incorrecta de los cromosomas (Henning *et al.*, 1988; Lynch y Parry, 1993).

7.2. Efecto de la CFL sobre el daño genotóxico del Cr (VI)

a) hembras sin preñar

Partiendo de los estudios en los que se ha observado que es posible modular el efecto de agentes inductores de daño al ADN mediante la administración previa de agentes antimutágenos (Chorvatovicova, *et al.*, 1991; Alves, 2000; Carlisle *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2000), en este estudio se evaluó el efecto de la CFL sobre la inducción de daño genotóxico del Cr (VI).

Al administrar la CFL a hembras sin preñar por vía i.p. y oral, se observó que no incrementa el número de MN, lo cual concuerda con los datos reportados previamente (Sen *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1996; Bez *et al.*, 2001). Cuando se combinaron los tratamientos de CFL y Cr (VI) se observó que la CFL administrada de forma i.p. reduce sólo la frecuencia de MN inducidos por el CrO₃ en la hora 12, no así de la observada en la hora 48, a partir de esto se plantea que la CFL administrada por esta vía, tiene efecto sólo sobre los MN originados de manera temprana y dado que parte de estos MN son originados por daño aneuploidógeno, cabe la posibilidad de que la CFL sea capaz de proteger de este tipo de daño, lo cual ya fue previamente descrito por Verma *et al.*, (1996) quienes encontraron evidencias de protección del daño aneuploidogénico.

Cuando se administró la misma dosis de CFL por vía oral, la disminución en el número de MN se presentó tanto en la hora 12 como en la 48, por lo que

se puede decir que la vía de administración de la CFL juega un papel importante en sus mecanismos de protección, esto concuerda con las observaciones de Bez, *et al.*, (2001) quienes también observaron que dependiendo de la ruta de administración de la CFL era la capacidad de protección de la misma.

Al probar el efecto del K_2CrO_7 , se observó que este, a diferencia del CrO_3 tiene un menor efecto genotóxico, ya que el incremento en el número de MN fue menor (menos del 50% de inducción), por lo que no fue cuantificable el efecto temprano de inducción de daño (12 horas), estos datos coinciden con lo encontrado por Mirsalis *et al.*, (1996) y Gómez-Arroyo (1981), quienes observaron un bajo incremento de AC e ICH respectivamente al evaluar el daño después del tratamiento con K_2CrO_7 .

Al administrar la CFL previamente al tratamiento con K_2CrO_7 , se observó que disminuye significativamente los MN observados en la hora 48, esto concuerda con los trabajos de Sarkar *et al.*, (1996) quienes sí habían encontrado protección de daño en la hora 24. A partir de estas observaciones se puede decir que la actividad protectora de compuestos como la CFL no puede ser generalizada y depende directamente del tipo o clase de agente inductor de daño al ADN y de la toxicidad del mismo.

Es posible que el mecanismo de protección de la CFL esté relacionado con su actividad antioxidante y por la captura de radicales libres de oxígeno que causan daño al ADN, en contraparte con el elevado potencial oxidante de los compuestos de Cr (VI) que inducen daño mediante EROs.

b) hembras preñadas y fetos

En este trabajo se consideraron hembras sin preñar, preñadas y fetos, como modelos de estudio. La idea de usar estos tres modelos fue con el objeto de evaluar los efectos de la CLF sobre el daño genotóxico y teratógeno del Cr (VI),

con el fin de establecer si los “mismos posibles” mecanismos de protección persisten durante la gestación tanto en las madres como en sus crías.

En las hembras preñadas, la administración de CrO₃ en el día 15 de gestación induce daño genotóxico al igual que en sus crías, sin embargo, estos incrementos en el número de MN son menores en comparación con el efecto en las hembras sin preñar. La disminución de las frecuencias de MN puede estar relacionada con el hecho de que parte del compuesto pueda pasar a los fetos, lo que traería como consecuencia una disminución de la concentración del compuesto en la sangre de la madre. Esto ya ha sido descrito por Ferm *et al.*, 1969; Danielsson *et al.*, 1982 y Trivedi *et al.*, 1989 los cuales observaron que algunos compuestos del Cr (VI) son capaces de atravesar la barrera placentaria y depositarse en los fetos. De ahí que se plantee que dosis bajas de Cr (VI) pueden causar daño moderado al ADN, que puede ser reparado, sin embargo, dosis altas pueden producir daños irreparables al ADN que pueden, incluso, conducir a apoptosis (O’Brien *et al.*, 2003).

El tiempo en el cual se observó la mayor inducción de MN en las hembras preñadas, fue en la hora 48 después de la administración del CrO₃, lo cual concuerda con los estudios realizados con hembras sin preñar (García-Rodríguez *et al.*, 1998; 2000; 2001), esto hace suponer que la gestación no modifica los tiempos en los cuales se detecta inducción de daño al ADN.

En los fetos es posible evaluar daño genotóxico mediante el análisis de los MN (Giavini *et al.*, 1990; Ishikawa *et al.*, 2001). La importancia de evaluar MN durante la gestación se basa en diversas observaciones en las que un incremento en la pérdida de cromosomas (daño aneuploidogénico) o parte de los cromosomas (daño clastógeno) está relacionado con enfermedades genéticas en el recién nacido. Por ejemplo, se ha encontrado que el 1.61% de los nacimientos presentan alteraciones y que el 10.8% de estas alteraciones pueden estar relacionadas con daño aneuploidogénico (Sankaranarayanan, 1979; Hernández *et al.*, 1990). Por otra parte hay antecedentes de que es

posible proteger fetos del daño al ADN con agentes antioxidantes como el ácido ascórbico (Pillans *et al.*, 1990).

El incremento de MN en las crías de las hembras tratadas con CrO_3 , puede estar relacionado con el hecho de que los compuestos de Cr (VI) pueden atravesar la barrera placentaria en hembras preñadas (Trivedi *et al.*, 1989; Kanojia *et al.*, 1996; 1998; Saxena *et al.*, 1990; Elsaieed y Nada 2002).

Cuando se administró la CFL por vía i.p previa a la aplicación del CrO_3 , se observó que si bien se reduce el número de MN, esta reducción no es significativa, por lo que se puede decir que la CFL no protege del daño genotóxico a las hembras tratadas con CrO_3 en el día 15 de gestación. No así en los fetos, en donde se observó que el tratamiento previo de la CFL a la aplicación del CrO_3 en las madres, disminuye el número de MN inducidos por el metal en la hora 72. Estas observaciones hacen suponer que al redistribuirse la CFL entre la madre y sus crías, posiblemente la CFL no es la suficiente para proteger a la madre pero sí a sus crías.

Una de las posibles explicaciones para estos resultados del daño causado por el CrO_3 en hembras preñadas sería que el CrO_3 se distribuyó entre la madre y los fetos, por lo que la concentración del agente genotóxico fue menor y por lo tanto la inducción de daño disminuyó en comparación con nuestros estudios anteriores, donde no empleamos hembras gestantes. Posiblemente lo mismo ocurre con la CFL lo cual explicaría su menor protección del daño genotóxico en las hembras preñadas.

Cabe aclarar que cuando se combinaron los tratamientos de CFL y CrO_3 en las hembras preñadas hubo muerte materna, esto nos hace sugerir que dada la condición de preñez se incrementa la toxicidad materna (Khera, 1991) la cual puede estar relacionada con cambios en la homeostasis de las hembras preñadas que pueden ser hormonales, de la reserva de nutrientes, metabólicos etc. (Saxena *et al.*, 1990; Murthy *et al.*, 1996; Elbeteiha y Al-Hamood 1997; Kanojia *et al.*, 1998 ; Cheng *et al.*, 2002).

7.3. Efecto de la CFL y Cr (VI) sobre la citotoxicidad

Se ha descrito que el efecto citotóxico puede ser determinado por la reducción de la frecuencia de EPC, por lo que se ha sugerido evaluar la relación de EPC con respecto a los ENC (Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez 2001). En la figura 43 se muestra el resumen del análisis de la frecuencia de EPC, en donde se puede observar que en las hembras sin preñar no hubo efectos en los grupos que se administró el Cr (VI) al compararse con el grupo testigo. Estos datos apoyan lo reportado previamente por Mirsalis *et al* (1996) quienes no observaron cambios en la relación entre EPC y ENC. Cabe mencionar que se ha sugerido tomar con reserva este tipo de datos para considerar la citotoxicidad, ya que cuando se presenta toxicidad en la eritropoyesis, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascararse el efecto (Khrisna y Hayashi, 2000).

En las hembras preñadas a diferencia de las hembras sin preñar sí hubo una disminución de la frecuencia de EPC a las 72 horas después del tratamiento con CrO₃, éstas observaciones permiten sugerir que los efectos citotóxicos podrían depender de la condición endocrina de los animales, partiendo de que se ha descrito que los compuestos de Cr (VI) pueden alterar los procesos reproductivos (Cheng *et al.*, 2002).

En los fetos se observó una disminución de la frecuencia de EPC tanto en el grupo tratado como en el testigo, por lo que se sugiere que la disminución se debe al desarrollo fetal y no a los tratamientos.

7.4. Efecto de la CFL sobre las alteraciones del desarrollo inducidas por CrO₃

En la figura 44 se muestra un resumen de los resultados de este trabajo con respecto a los efectos de la CFL sobre las alteraciones del desarrollo inducidas por el Cr (VI).

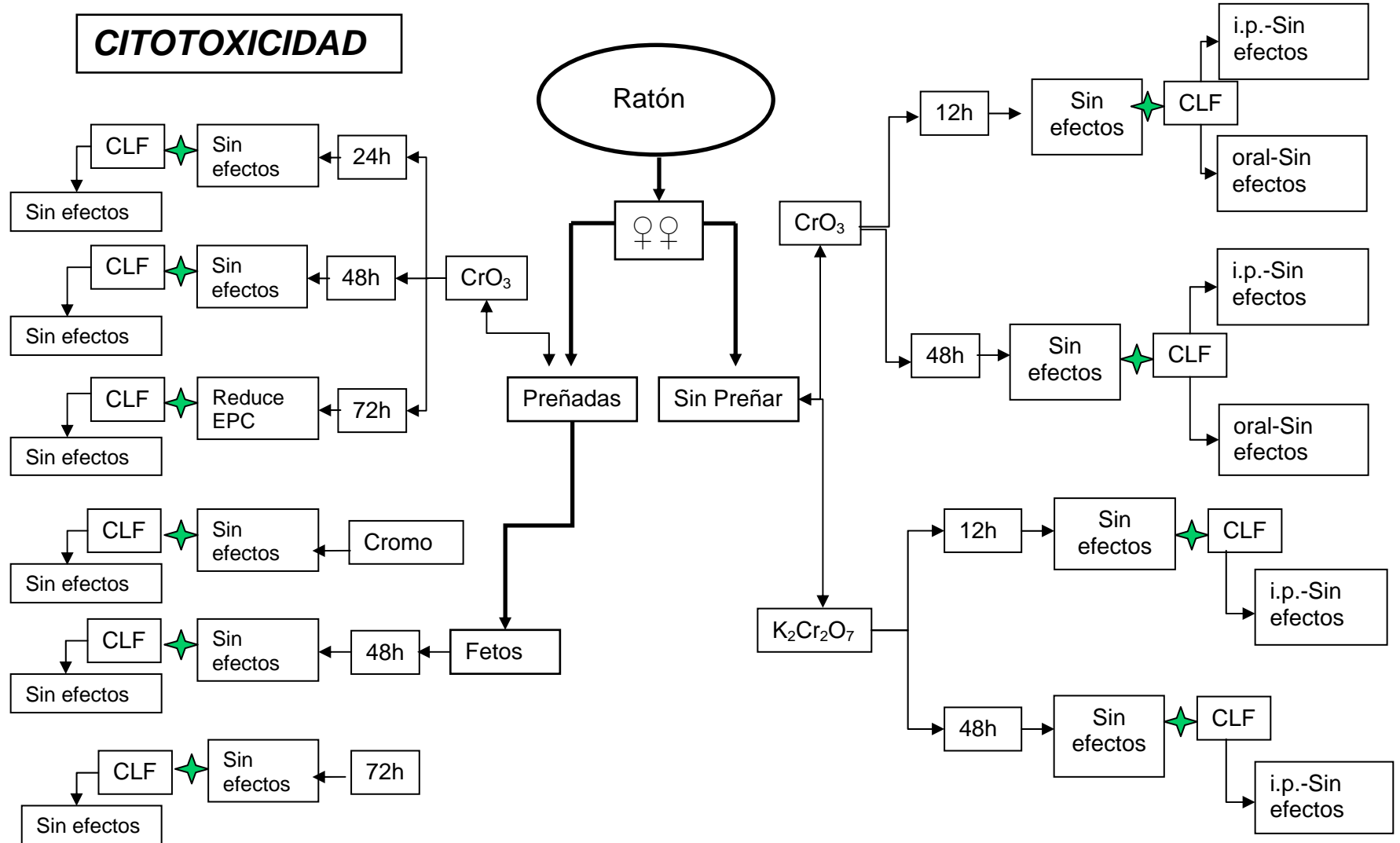


Figura 43. Resumen de resultados de los efectos de la CFL sobre los efectos citotóxicos del Cr(VI)

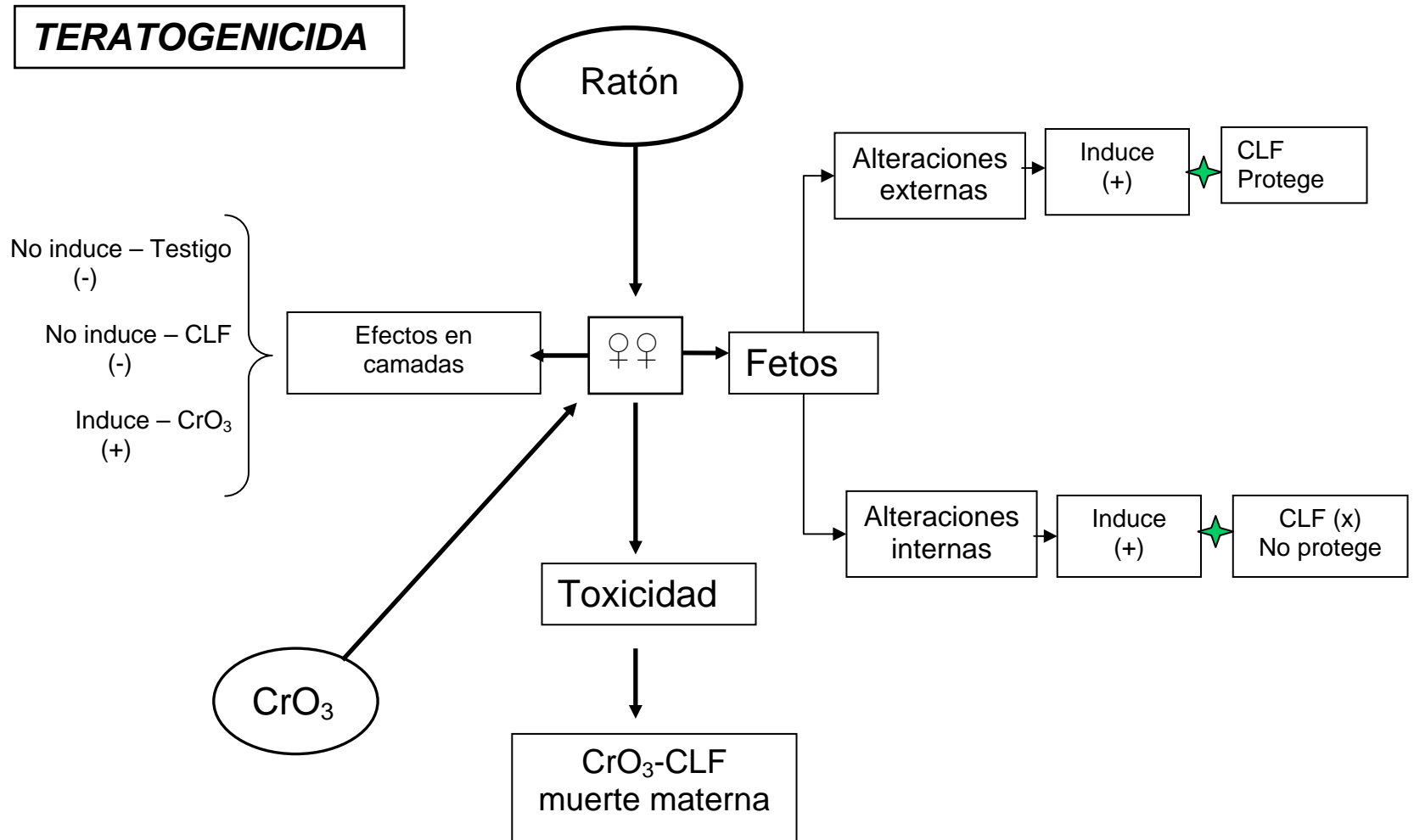


Figura 44. Resumen de resultados de los efectos de la CFL sobre las alteraciones en el desarrollo inducidas por el Cr(VI)

Uno de los resultados más frecuentes observados después de la exposición a agentes tóxicos durante la gestación es la inducción de malformaciones, sin embargo en muchos estudios se reporta muerte y por lo tanto no se pueden evaluar efectos en el recién nacido. Se ha planteado que muchas de las muertes embrionarias y fetales están correlacionadas con daño genotóxico (Giavini *et al.*, 1984; Kola *et al.*, 1986; Ornaghi *et al.*, 1989).

Las observaciones en cuanto a las alteraciones del desarrollo descritas en este estudio coinciden con las previamente reportadas para los compuestos de Cr (VI) (Elbeteiha y AL-Hamood, 1997; Kanojia *et al.*, 1998). Los efectos directos del Cr (VI) pueden ser atribuidos a su acción directa sobre el tejido fetal, ya que se ha observado que al ser acumulado el Cr en este tejido puede conducir a la muerte y por consecuencia inducir la presencia de reabsorciones (Danielsson *et al.*, 1982; Elsaieed y Nada 2002).

La administración previa de la CFL al tratamiento con CrO₃, redujo significativamente las alteraciones externas. Estos resultados nos hacen suponer una relación entre los mecanismos de inducción de daño genotóxico y teratógeno. Hasta el momento el único trabajo realizado en la gestación con CFL para estudiar una posible protección, es el realizado por Singh *et al.*, (1996) en el cual se evaluó el efecto de la CFL en la leche materna, ellos observaron que la CFL ayuda a la detoxificación de los agentes inductores de daño en el neonato (Singh *et al.*, 1996).

Por otra parte ya se ha descrito que sustancias como el “ginseng” pueden reducir los efectos mutagénicos y teratogénicos causados por los compuestos del Cr (VI) (Elsaieed y Nada 2002).

Como se describió anteriormente la CFL no presentó la misma protección en todos los protocolos evaluados en este estudio. El hecho de usar varios protocolos fue considerado con base en las observaciones previas en las que se planteaba que la protección de la CFL depende de factores como: el sistema

de estudio, el modelo, la vía de administración, el agente y la dosis entre otros. Nuestros resultados apoyan estas observaciones.

Finalmente, se puede decir que el uso de anticarcinógenos y antimutágenos resulta una estrategia atractiva para el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con el daño al ADN. La CFL al mostrar capacidad inhibitoria de daño genotóxico en diferentes ensayos, se ha empezado a probar en el tratamiento y la prevención de algunos tipos de cáncer con organismos *in vivo*, como lo son la trucha arcoiris, la rata y el ratón. Los resultados han sido tan alentadores que estas mismas pruebas se han iniciado en humanos con buenos resultados. Sin embargo, es necesario continuar con las investigaciones de dosis-respuesta para así garantizar la supresión en la promoción del cáncer, aunado a la investigación básica que apoye las estrategias para sus aplicaciones.

8. CONCLUSIONES

- i. Los MN que se forman en respuesta al tratamiento con CrO_3 , tienen diferentes vías de inducción y la CFL tiene efecto sólo sobre los MN originados de manera temprana.
- ii. La vía de administración de la CFL juega un papel importante en sus mecanismos de protección.
- iii. La protección de la CFL está relacionada con el agente inductor de daño y con la toxicidad del mismo.
- iv. La administración de CrO_3 en el día 15 de gestación induce daño genotóxico en hembras preñadas y en sus crías.
- v. El efecto genotóxico inducido por el CrO_3 es mayor en las hembras sin preñar que en las hembras gestantes y en los fetos.
- vi. La CFL protege del daño genotóxico en los fetos obtenidos de hembras tratadas con CrO_3 en el día 15 de gestación, pero no a sus madres.
- vii. La condición de gestación afecta la protección del daño genotóxico de la CFL en las hembras.
- viii. El CrO_3 induce de manera marginal malformaciones externas y esqueléticas en los fetos.
- ix. La CFL solo reduce las alteraciones externas en los fetos de hembras tratadas con CrO_3 .

- x. Es posible que exista una relación entre los mecanismos de inducción de daño genotóxico y teratógeno del CrO_3 .
- xi. Es posible emplear sustancias tales como la CFL para proteger del daño genotóxico y teratógeno durante la gestación.

9. REFERENCIAS

- Adler, I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. y Hayashi, M. Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Res.* 417, 19-30 (1998).
- Alves, I., Oliveira, N. G., Iaires, A., Rodrigues, A. S. y Rueff, J. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis* 15, 229-234 (2000).
- Amara-Mokrane, A., Lehucher-Michel, M. P., Balansard, G., Duménil, G. y Botta, A. Protective effects of alfa-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 11, 161-167 (1996).
- Aliverti, V., Bonanomi, L., Giavini, E., Leone, V. G. y Mariani, L. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology* 20, 237-242 (1979).
- Ames, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 224, 1256-1262 (1983).
- Ames, B. Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. *Environ. Mol. Mutag.* 14, 66-77 (1989).
- Anderson, R. A. Nutritional role of chromium. *Sci. Total Environ.* 17, 13-29 (1981).
- Arimoto, S., Negishi, T. y Hayatsu, H. Inhibitory effect of hemin the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.* 11, 29-33 (1980a).
- Arimoto, S., Ohara, Y., Namba T., Negeshi, T. y Hayatsu, H. Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 662-668 (1980b).

- Arimoto, S., Fukuoka, S., Itome, C., Nakano, H., Rai, H. y Hayatsu, H. Banding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutation Res.* 287, 293-305 (1993).
- Arslan, P., Beltrame, A. y Tomasi, A. Intracellular chromium reduction. *Biochim. Biophys. Acta* 931, 10-15 (1987).
- Bagchi, D., Vuchetich, P.J, Bagchi, M., Hassoun E., Tran M. N., Tang L., Stohs. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichomate (Chromium VI) and Cadmium Chloride (Cadmium II) to rats. *Free Radical Biology Medicine* 22, 471-478 (1997).
- Bailey, G. S. Chlorophylls: Can these green food pigments prevent some cancers? (en línea) 1998. Abril 30 (fecha de acceso 07 de septiembre del 2001). URL disponible en <http://www.orst.edu/dept/lpi/f-w97/chrphyl.html>
- Baker, H. J., Lindsey, R.J. y Weisbroth, H. S. The Laboratory Rat: Research applications. Volumen I y II, Academic Press Inc., USA, pp. 276 (1980).
- Balansky, R. M. D'Agostini, F., Izzotti, A. y De Flora, S.. Less than additive interaction between cigarette smoke and chromium(VI) in inducing clastogenic damage in rodents. *Carcinogenesis* 212, 1677-1682 (2000).
- Barone, J., Taioli, E., Hebert, J. R. y Wynder, E. L. Vitamin supplement-use and risk for oral and esophageal cancer. *Nutr. Cancer.* 18, 31-41 (1992).
- Bender, M. Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production, en; Generoso, W., Shelby, F., De Serres, F. DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. Plenum, New York, 245-265 (1980).
- Berlinson, M.Y.A. The use of sodium chlorophyllin in cases of leukopenia in children. *Na auch. Tr. Leningrad. Leso. Tekh. Acad.* 119, 113-116 (1969).

- Bez, G. C., Jordao, B. Q., Vicentini, V. E. P. y Mantovani, M. S. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V7 cells. *Mutation Res.* 497, 139-145 (2001).
- Bianchi, V., Dal, T. R., Debetto, P., Gino, L. A., Luciani, S., Majone, F. y Tamino, G. Mechanism of Chromium Toxicity in mammalian cell cultures. *Toxicology* 17, 219-224 (1980).
- Bianchi, V. y Levis, A. G. Review of genetic effects and mechanisms of action of chromium compounds. *Sci. Total Environ.* 71, 351-355 (1988).
- Block, G., Patterson, B. y Subar, A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18, 1-29 (1992).
- Blum, A. C., Xu, M., Orner, A. G., Fong, T.A., Bailey, S. G., Stoner, D. G., Horio, T. D. y Dashwood, H. R. β -catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 22, 315-320 (2001).
- Breinholt, V., Arbogast, D., Loveland, P., Pereira, C., Dashwood, R., Heendricks, J. y Bailey, G. Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B₁ bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability vs. target organ protective mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158, 141-151 (1999).
- Bronzetti, G., Galli, A. y Della Croce, D. M. Antimutagenic effects of chlorophyllin, en Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II. (Eds., Kuroda, Y., Sankel, D. M. and Waters, M. D.) 463-468 (Plenum Press, Nueva York, 1990).
- Carlisle, D. L., Pritchard, D. E., Singh, J., Owens, B. M., Blankenship, L. J., Orenstein, J. M. y Patierno, S. R. Apoptosis and P53 induction in human lung fibroblasts exposed to chromium (VI): effect of ascorbate and tocopherol. *Toxicology Sciences* 55, 60-68 (2000).
- CDPC Chromium Draft for Public Comment U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry Comment Period Ends: February 18 (1992).

- Cervantes, C. y Moreno, S. R. Contaminación ambiental por metales pesados; ed. AGT Editor, México, pp 157 (1999).
- Chahoud, I., Ligensa A., Dietzel, L. y Faqi, S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod. Toxicol.* 13, 375-381 (1999).
- Chen, J. y Thilly, W. G. Mutational spectrum of chromium(VI) in human cells. *Mutation Res.* 323, 21-27 (1994).
- Cheng, R., Alvord, W., Powell, D., Kasprzak, K. y Anderson, L. Increased serum corticosterone and glucose in the offspring of chromium (III)-treated male mice. *Environ. Health Perspect.* 110, 801-804 (2002).
- Cheung, S. H. y Holland, B. Extension of Dunnett's multiple comparison procedure with differing sample sizes to the case of several groups. *Comput. Stat. Data Anal.* 14, 165-182 (1992).
- Chernomorsky, S. Segelman, A. y Poretz, R. D. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 19, 313-322 (1999).
- Cho, S. Interaction between lignin and pectin and between corn oil and chlorophyllin in lipid metabolism in rats fed a high cholesterol diet. *Kaseigaku Zasshi* 35, 56-60 (1984).
- Cho, K.-J., Han, S.H., Kim, B.Y., Hwang, S.-G., Park, K.-K., Yang, K.-H. y Chung, A.-S. Chlorophyllin suppression of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166, 120-127 (2000).
- Chorvatovicová, D., Ginter, E., Kosinova, A. y Zloch, Z. Effect of vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat and guinea pig. *Mutation Res.* 262, 41-46 (1991).
- Cole, J. y Skopek, T. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogenesis, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutation Res.* 304, 33-106 (1994).

- Cole, R. J., Taylor, N., Cole, J. y Arlett, C. F. Transplacental effects of chemical mutagens detected by micronucleus test. *Nature* 277 (1979).
- Cole, R. J., Taylor, N., Cole, J. y Arlett, C. F. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. 1. Micronucleus in fetal and maternal mouse erythroblast. *Mutation Res.* 80, 141-157 (1981).
- Danadevi, K., Rozati, R., Banu, B. S. y Grover, P. Genotoxic Evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the comet and micronucleus assays. *Mutagenesis* 19, 35-41 (2004).
- Daniel, W.W. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa, 4ª. Edición, México, D.F., p.p. 755 (2002).
- Danielson, B. R., Hassoun, E. y Dencker, L. Embryotoxicity of Chromium: Distribution in pregnant mice and effects on embryonic cell *in vitro*. *Arch Toxicol.* 51, 233-245 (1982).
- Dashwood, R. y Guo, D. Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: Studies of enzyme inhibition and molecular complex formation. *Carcinogenesis* 13, 1121-1126 (1992).
- Dashwood, R y Guo, D. Antimutagenic potency of chlorophyllin in the *Salmonella* assay and its correlation with binding constants of mutagens-inhibitor complex. *Environ. Mol. Mutagen.* 22, 164-171 (1993).
- Dashwood, R. y Liew, C. Chlorophyllin -enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazol[4, 5-f]quinoline. *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 199-205 (1992).
- Dashwood, R. H., Breinholt, V. y Bailey, G. S. Chemo-preventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* 12, 939-942 (1991).

- Dashwood, R. H. The importance of using pure chemicals in (anti) mutagenicity studies: chlorophyllin as a case in point. *Mutation Res.* 381, 283-286 (1997).
- Dawson, A. B. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Citado en caffeine and reduction of ossification in the rat: fact or artifact?. Mother, T.F. (1988) *Teratology* 37, 239-247 (1926).
- De Flora, S., Bagnaso M., Serra, D. y Znacchi, P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Res.* 238, 99-172 (1990).
- De Flora, S. Threshold mechanism and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 533-541 (2000).
- Desesso, J. M., Scialli, R. A. y Goeringer, G. C. D-mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits. *Teratology* 49, 248-259 (1994).
- Díaz, G. D., Qingjie, L., y Daswood, R. H.. Caspase-8 apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res.* 63, 1254-1261 (2003).
- Doll, R. y Peto, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the Unites States today. *J. Natl. Cancer. Inst.* 66, 1191-1308 (1981).
- Ebihara, K. y Shuhachi, K. Protective effect of dietary fibre on growth retardation of rats fed a purified low fibre diet containing toxic doses of sodium iron chlorophyllin. *Nippon. Nogei. Kagaku. Kaishi* 56, 195-202 (1982).
- ECETOC European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre: Identification and assesmente of the effects of chemicals on reproduction and development (reproductive toxicology). Monograph No. 5. Belgium, pp. 32 (1983).
- Egner, P. A., Stansbury, K. H., Snyder, E. P. Rogers, M. E., Hintz, P. A. y Kensler, T. W. Identification and characterization of chlorin e4 ethyl ester in sera of individuals

participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 900-906 (2000).

Egner, P. A., Wang, J. B., Zhu, Y. R., Zhang, B. C., Wu, Y., Zhang, Q. N., Qian, G. S., Luang, S. Y., Gange, S. J., Jacobson, L. P., Helzlsouer, K. J., Bailey, G. S., Groopman, J. D. y Kensler, T. W. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Med. Sci.* 98, 14601-14606 (2001).

Egner, P. A., Muñoz, A. y Kensler, T. W. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutation Res.* 523-524, 209-216 (2003).

Eighteenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Wild Hlth Org. techn. Rep. Ser. FAO Nutrition Meetings Report Series, 54 (1974).

Elbeteiha, A. y Al-Hamood, M. H. Long-term exposure of male and female mice to trivalent and hexavalent chromium compounds: effect on fertility. *Toxicology* 116, 39-47 (1997).

Elsaieed, E. M. y Nada, S. A. Teratogenicity of hexavalent chromium in rats and the beneficial role of ginseng. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 361-368 (2002).

Eriksson, U. J. y Borg, L. A. H. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. *Diabetologia* 34, 325-331 (1991).

EPA Health Assessment Document for Chromium, Environmental Assessment and Criteria Office, US Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NW, (1984).

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Wild Health Org. techn. Rep. Ser. FAO Nutrition meetings report series, 54 (1974).

FDA. Food and Drug Administration: Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA. (1966).

FDA. Food and Drug Administration: Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA. (2000).

- Fenech, M y Crott, J. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage--- fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Res.* 504: 131-136 (2002).
- Ferm, V. H., Hanlon P. y Urban J. The permeability of the hamster placenta to radioactive cadmium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 22, 107-113 (1969).
- Fernandes, M. S. A., Geraldés, C. F. G. C., Oliveira, C. R. y Alpoim, M. C. Cromate-induced human erythrocytes haemoglobin oxidation and peroxidation: influence of vitamin E, vitamin C, salicylate, deferoxamine and N-ethylmaleimide. *Toxicol. Letters* 114, 237-243 (2000).
- Ferguson, L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutation Res.* 307, 395-410 (1994).
- Gale, T. F. y Bunch, J. D. The effect of the time of administration of chromium trioxide on the embryotoxic response in hamsters. *Teratology* 19, 81-86 (1979).
- García-Rodríguez, M. C. Estudio de los efectos de la clorofilina sobre el desarrollo embrionario y fetal del ratón in vivo. Tesis Maestría en Ciencias en Biología, División de Estudios de Posgrado Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM, pp. 80 (1996).
- García-Rodríguez, M. C., López Santiago V. y Altamirano Lozano M. Estudio de la cinética de MN-PCE por CrO₃ en sangre periférica de ratón, usando la técnica de naranja de acridina. *Genet. Mol. Biol.* 21, 146 (1998).
- García-Rodríguez, M. C., López Santiago V. y Altamirano Lozano M. A. Effect of chlorophyllin on the MN-PCE induction in peripheral blood of mice exposed to chromium trioxide *in vivo*. *Environ. Mol. Mutag.* 35 Suppl., 31. (2000).
- García-Rodríguez, M. C. y Altamirano-Lozano, M. Sales de sodio y cobre de la clorofila: Usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígeno. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 4, 77-86 (2001).

- García-Rodríguez, M. C., López-Santiago, V. y Altamirano-Lozano, M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.* 496, 145-151 (2001).
- García-Rodríguez, M. C., Morales-Ramírez, P., Altamirano-Lozano M. Effects of chlorophyllin on mouse embryonic and fetal development *in vivo*. *Teratog., Carcinog. Mutag.* 22, 461-471 (2002).
- Gentile, J. M. y Gentile, G. J. The metabolic activation of 4-nitro-O-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutation Res.* 250, 79-86 (1991).
- Gentile, J. M., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, G. J. y Ferguson, L. R. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutation Res.* 402, 289-298 (1998).
- Ghosh, A., Sen, S., Sharma, A. y Talukder G. Modification of clastogenic effects of mercuric chloride by chlorophyllin in bone marrow cells *in vivo*. *Food. Chem. Toxicol.* 29, 777-779 (1991a).
- Ghosh, A., Sen, A., Sharma, A. y Talukder G. Inhibition of clastogenic effects of cesium chloride in mice *in vivo* by chlorophyllin. *Toxicol. Lett.* 57, 11-18 (1991b).
- Ghosh, A. K., Sharma, A. y Talukder, G. Effects of chlorophyllin on cellular systems. *The nucleus* 35, 63-69 (1992).
- Giavini, E., Bonanomi, L. y Ornaghi, F. Developmental toxicity during the preimplantation period: embryotoxicity and clastogenic effects of chlorambucil in the rat. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 4, 341-348 (1984).
- Giavini, E., Lemonica, I. P., Luo, Y., Broccia, M. L. y Prati, M. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: cyclophosphamide, cis-platinum, adriamycin. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 10, 417-426 (1990).

- Gomez-Arroyo, S., Altamirano, M. y Villalobos, R. Sister-chromatid exchanges induced by some chromium compounds in human lymphocytes *in vitro*. *Mutation Res.* 90, 425-431 (1981).
- Graham, S., Dayal, H., Swanson, M., Mittelman, A. y Wilkinson, G. Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J. Natl. Cancer Res. Inst.* 61, 709-714 (1978).
- Gunaratnam, M. y Grant, M. H. Damage to F-actin and cell death induced by chromium (VI) and nickel in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Toxicol. in vitro* 18, 245-253 (2004).
- Hadnagy, W. y Seemayer N. H. Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. *Mutation Res.* 203, 205-206 (1988).
- Harkness, J. E. y Wagner, J. E. The biology and medicine of rabbits and rodents. Ed. Lean y Febiger, Kondon Inglaterra. (1989).
- Harris, P. J. y Ferguson, L. R. Dietary fiber: its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutation Res.* 290, 97-110 (1993).
- Harrison, J. W. E., Levin, S. E. y Travin, B. The safety and fate of potassium cooper chlorophyllin and other cooper compounds. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 43, 722- (1954).
- Hartwig, A., (1995) Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 8, 3-11 (1995).
- Hayashi, M., Morita T., Kodama, Y. Sofuni, T. y Ishidate, M. Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.* 245, 245-249 (1990).
- Hayashi, M., Tice, R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., Ileson Jr., F. B., Pchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutuo S. y Vannier, B. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Res.* 312, 293-304 (1994).

- Hayashi, T., Schimerlik, M. y Bailey, G. Mechanism of chlorophyllin anticarcinogenesis: dose-responsive inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158, 132-140 (1999).
- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A. y Sutuo, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Env. Mol. Mutagen.* 35, 234-252 (2000).
- Heddle, A. J., Hite, M., Kirkhart, M. K. y Salamone, F. M. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, Ed. Elsevier Science Publisher 83, 165-1110 (1983).
- Hemmink, K., Dipple, A., Shuker, D., Fadlubar, F., Segerback, D. y Bartsch, H. Adducts identification and biological significance. International Agency for Research on Cancer Lyons. IARC Scientific Publications 125: 478 (1994).
- Henning, U. G., Rudd, N. L. y Hoar, D. I. Kinetochores immunofluorescence in micronuclei: a rapid method for the *in situ* detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblast. *Mutation Res.* 203, 405-414 (1988).
- Hernández, A., Reynoso, M. C., Soto, F., Quiñónez, D., Nazara, Z., Rolon, M. E., Jimenez, M. E. y Blancarte, R. Aneuploidies, chromosome aberrations and dominant gene mutations detected in 113913 consecutive newborn children in Mexico. *Mutation Res.* 232, 23-29 (1990).
- IACR Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human, vols 1-42, suppl. 6, pp. 165-168 (1987).
- IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenesis Risk to Humans, Chromium, Nickel and Welding, Lyon, France (1990).
- Imai, K., Aimoto, T., Sato, M., Watanabe, K., Kimura, R. y Murata, T. Effects of sodium metalochlorophyllin on the activity and components of the microsomal drug-metabolizing enzyme system in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 4287-4293 (1986).

- Ishikawa, H., Tian, Y. y Yamauchi, T. Induction of micronuclei formation in preimplantation mouse embryos after maternal treatment with 2-bromopropane. *Reproductive Toxicology* 15, 81-85 (2001).
- Itoh, S. y Shimada, H. Micronucleus induction by chromium and selenium, and suppression by metallo thionein inducer. *Mutation Res.* 367, 233-236 (1996).
- Kada, T., Kato, M., Aikawa, K. y Kiriyaama, S. Adsorption of pyrrolisate mutagens by vegetable fibers. *Mutation Res.* 141, 149-152 (1984).
- Kada, T., Morita, K. y Inoue, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.* 53, 351-353 (1978).
- Kanojia, R. K., Junaid, M. y Murthy, R. C. Chromium induced teratogenicity in female rat. *Toxicology Letters* 89, 207-213 (1996).
- Kanojia, R. K., Junaid, M. y Murthy, R. C. Embryo and fetotoxicity of hexavalent chromium: a long-term study. *Toxicology Letters* 95, 165-172 (1998).
- Kato, Y., Nemoto, N. Tanaka, M. y Takayama, S. Inhibition of benzo [a]pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutation Res.* 121, 153-157 (1983).
- Kephart, J. C. Chlorophyll derivatives their chemistry commercial preparation and uses. *Econ. Bot.* 9, 3-38 (1955).
- Khera, K. S. Chemically induced alterations in maternal homeostasis and histology of conceptus: their etiologic significance in rat fetal anomalies. *Teratology* 44, 259-297 (1991).
- Kimm, S., Tchai, B., Park, S. y Kang, S. Antimutagenic activity of chlorophyll to direct-acting and indirect-acting mutagens and its contents in vegetables. *Korean J. Biochem.* 14, 1-8 (1982).

- King, M. y Wild, D. Transplacental Mutagenesis: The micronucleus test on fetal mouse blood. *Genet.* 51, 183-194 (1979).
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A. y Wakata, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Res.* 540: 153-163 (2003).
- Kojima, R. Inhibitory mechanism of copper chlorophyllin on the hemolytic activity of cabrotoxin. *Igaku to Seibutsugaku* 96, 461-463 (1978).
- Kola, I., Peter, I. F. y Parker, I. Maternal administration of cyclophosphamide induces chromosomal aberrations and inhibits cell number, histone synthesis in preimplantation mouse embryos. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 6, 115-127 (1986).
- Kram, D. In utero analysis of sister chromatid exchange. En Sandberg, A. A. (eds). Sister chromatid exchange. Alan R. Liss. New York. pag. 205-216 (1982).
- Krasnikova, N. A. Proliferation of the epithelium surrounding a skin wound in hairless mice exposed to sodium chlorophyllin. *Byul. Eksp. Biol. Med.* 76, 99-102 (1973).
- Kyung-Joo, C., Han, S. H., Kim, B.Y. Hwang, S.-G., Park, K.-K., Yang, K.-H. y Chung, A.-S. Chlorophyllin suppression of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166, 120-127 (2000).
- Krishna, E., Fiedler, R. y Theiss, J. C. Simultaneous evaluation of clastogenicity, aneugenicity and toxicity in the mouse micronucleus assay using immunofluorescence. *Mutation Res.* 282, 159-167 (1992).
- Lai, C. N. Chlorophyll: the active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. *Nutr. Cancer.* 1, 19-21 (1979).
- Lai, C. N., Butler, M. A. y Matney, T. S. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Res.* 77, 245-250 (1980).

- Lee, B. M. y Park, K. K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutation Res.* 523-524, 265-268 (2003).
- Liu, S. y Dixon, K. Induction of mutagenic DNA by Chromium (VI) and Glutathione. *Environ. Mol. Mutag.* 28, 71-79 (1996).
- Lohman, P. H. M., Gentile, J. M., Gentile, G. y Ferguson, L. R. Antimutagenesis/Anticarcinogenesis: Screening, methods and biomarkers. *Mutation Res.* 496, 1-4 (2001).
- Lynch, A. M. y Parry, J. M. The cytochalasin-B micronucleus/kinetochore assay *in vitro*: studies with 10 suspected aneugens. *Mutation Res.* 287, 71-86 (1993).
- Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C. Salamone, M. F. y Heddle, J. A. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 239, 29-80 (1990).
- Mikalsen, A., Alexander, J., Wallin, H., Ingelman-Sundberg, M., y Andersen, R. A. Reductive metabolism and protein binding of chromium (VI) by P450 protein enzymes. *Carcinogenesis* 12, 825-831 (1991).
- Miller III, C. A., Cohen, M. D. y Costa, M. Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis-diammine-dichloroplatinum(II) and chromium compounds. *Carcinogenesis* 12, 269-276 (1991).
- Mirsalis, C. J., Hamilton, M. C. and Patierno, S. Chromium (VI) at plausible Drinking water concentrations is not genotoxic in the *in vivo* bone marrow micronucleus or liver unscheduled DNA synthesis assay. *Environ. Mol. Mutag.* 28, 60-63 (1990).
- Morales-Ramírez, P. y García-Rodríguez, M. C. *In vivo* effect of chlorophyllin on γ -ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutation Res.* 320, 329-334 (1994).

- Morales-Ramírez, P. y Mendiola-Cruz, M. T. *In vivo* radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cell. *Mutation Res.* 344, 73-78 (1995).
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R. Effect of chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. *Mutation Res.* 367, 51-56 (1996).
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T., Anguiano-Orozco, G. y Rodríguez-Reyes, R. Pharmacokinetic parameters of genotoxic activity inferred by the comparison of the kinetics of MN-PCE induced by chemical agents and ionizing radiation. *Mutation Res.* 391, 127-134 (1997).
- Morita, K., Hara, M. y Kada, T. Studies on natural desmutagens screening for vegetables and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1235-1238 (1978).
- Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T. y Tweats, D. ICH-harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Res.* 436, 195-225 (1999).
- Murakami, M., Ohiki, S. y Ohgo, T. Antiulcerative effects of combination of propantheline bromide copper-chlorophyllin-sodium and magnesium trisilicate. *Oyo. Yakuri* 17, 683-689 (1979).
- Murthy, R. C., Junaid, M. y Saxena, D. K. Ovarian dysfunction in mice following chromium (VI) exposure. *Toxicol. lett.* 89, 147-154 (1996).
- Nagai, H., Nishiyori, T., Diakoku, M. y Koda, A. Immunopharmacological studies of sodium-copper-chlorophyllin. *Jpn. J. Pharmacol.* 33, 819-828 (1983).
- Nagase, M. The effects of thiamine cobalt chlorophyllin complex on the gastric local blood flow in rats. *Yakuri to Chiryō* 14, 4153-4165 (1986).

- Nakeeb, M. y Yousef, R. Antimicrobial activity of sodium copper chlorophyllin. *Pharmazie* 29, 48-50 (1974).
- Nath, C. J. y Ong, T. Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 10, 273-279 (1990).
- Neault, J. F. y Tajmir-Riahi H. A. DNA- Chlorophyllin Interaction. *J. Phys. Chem. B.* 102, 1610-1614 (1998).
- Negishi, T., Arimoto, S. Nishizake, C. y Hayatsu, H. Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4, 3-*b*]indole (Trp-P2). *Carcinogenesis* 10, 145-149 (1989).
- Newman, M. C., Mc. e Intosh, A. W. Metal Ecotoxicology; Ed. Lewis Publishers, p.p. 395 (1991).
- Newmark, H. Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 461-466 (1987).
- Nishio, A., Uyeki E. Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 15, 237-244 (1985).
- Norseth, T. The carcinogenicity of Chromium. *Environ. Health. Perspect.* 40, 121-130 (1981).
- Nosel, G. P. y Klein, N. W. Methionine decreases the embryotoxicity of sodium valproate in the rat: *in vivo* and *in vitro* observations. *Teratology* 46, 499-507 (1992).
- Novotná, B. y Jelínek, R. Mutagenic and teratogenic effects of cyclophosphamide on the chick embryo: chromosomal aberrations and cell proliferation in affected and unaffected. *Wiley-Liss, Inc.* 341-350 (1990).
- O'Brien T. J., Fornsglio, J. L., Ceryak, S. y Patierno, S. R. Effects of hexavalent chromium on the survival and cell cycle distribution of DNA repair-deficient *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)* 1, 617-627 (2003).

- Oda, T., Yokono, O., Yoshida, A., Miyake, K. y Lino, A. 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 (1971).
- Okai, Y., Higashi-Okai, K., Yano, Y. y Otani, S. Suppressive effects of chlorophyllin on mutagen-induced *umu C* gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002) and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c 3T3 fibroblast cells. *Mutation Res.* 370, 11-17 (1996).
- Olvera, O., Zimmering, C., Arceo, C. y Cruces, M. The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* 301, 201-204 (1993).
- Ong, T. M., Whong W. Z., Stewart, J. y Brockman, H. E. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.* 173, 111-115 (1986).
- Ong, T. M., Whong, W. Z., Stewart, J. y Brockman, H. E. Comparative antimutagenicity of five compounds against five mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutation Res.* 222, 19-25 (1989).
- Ornaghi, F. y Giavini, E. Induction of micronuclei in pre-implantation rat embryos *in vivo*. *Mutation Res.* 225, 71-74 (1989).
- Ortiz-Monasterio, P. F., Cortinas de Nava C. y Maffey, G. L. Manejo de los desechos industriales peligrosos en México, Universo veintiuno, México (1987).
- Oster, G., Broyde, S. y Bellin, J. Spectral properties of chlorophyllin. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1309-1313 (1964).
- P. H. S. US Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological Profile for Chromium, September 2000.
- Palit, S., Sen, S., Sharma, A. y Talukder G. Protection by chlorophyllin against induction of chromosomal aberrations by cobalt in bone marrow cells of mice *in vivo*. *Fitoterapia* 42, 425-428 (1991).

- Peluso, M., Airoidi, L., Magagnotti, C., Fiorini, L., Munnia, A., Hautefeuille, A., Malaveille, C. y Vineis, P. White blood cell DNA adducts and fruit and vegetable consumption in bladder cancer. *Carcinogenesis* 21, 183-187 (2000).
- Pillans, P. I., Ponzi, S. F. y Parker, M. I. Effects of ascorbic acid on the mouse embryo and on cyclophosphamide-induced cephalic DNA strand breaks *in vivo*. *Arch. Toxicol.* 64:423-425 (1990).
- Phillips, R. L. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among seventh-day Adventists. *Cancer Res.* 35, 3513-3522 (1975).
- Pimentel, E., Cruces, M.P. y Zimmering, S. On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* 446, 189-192 (1999).
- Renner, H. W. *In vivo* effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 244, 185-188 (1990).
- Robins, E. W. y Nelson, R. L. Inhibition of 1, 2-dimethylhydrazine-induced nuclear damage in rat colonic epithelium by chlorophyllin. *Anticancer Res.* 9, 981-986 (1989).
- Romert, L. Curvall, M. y Jensen, D. Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis* 7, 349-355 (1992).
- Rosefort, C., Fauth, E. y Zankl, H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 19 (4), 277-284 (2004).
- Royle, H. Toxicity of chromic acid in the chromium plating industry. *Environ. Res.* 10, 141-163 (1975).
- Rudolf, E., Cervinka, M., Cerman, J. y Schroterova, L. Hexavalent Chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts. *Toxicol. in vitro* 19, 713-723 (2005).

- Rutledge, J. Preimplantation Teratology and the Placenta. *Teratology* 61, 246-247 (2000).
- Sankaranarayanan, K. The role of non-disjunction in aneuploidy in man; an overview. *Mutation Res.* 61, 1-28 (1979).
- Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder G. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*. *Mutation Res.* 301, 33-38 (1993).
- Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder G. Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium (VI) oxide in mice. *Phytother. Res.* 9, 199-202 (1994a).
- Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutation Res.* 318, 239-247 (1994b).
- Sarkar, D., Sharma, A. y Talukder, G. Chlorophyll and chromosome breakage. *Mutation Res.* 360, 187-191 (1996).
- Sarto, F., Cominato, I., Bianchi, V. y Levis, A. G. Increased incidence of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in workers exposed to chromatic acid (CrO₃) in electroplating factories. *Carcinogenesis* 3, 1011-1016 (1982).
- Sato, M., Iguchi, N. y Murata, T. Effect of sodium cooper chlorophyllin on lipid peroxidation: I Effect on lipid peroxidation in rat liver homogenates in the presence of both Fe²⁺ and L-ascorbic acid. *Yakugaku Zasshi* 97, 268-273 (1977).
- Sato, M., Imai, K., Kimura, R. y Murata, T. Effect of sodium Cooper chlorophyllin on lipid peroxidation: VI Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 716-722 (1984).
- Sato, M., Fujimoto, I., Sakai, T., Aimoto, T., Kimura, R. y Murata, T. Effect of sodium cooper chlorophyllin on lipid peroxidation: IX On the antioxidative components in commercial preparations on sodium cooper chlorophyllin. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 2428-2434 (1986).

- Saxena, D. K., Murthy, R. C. Jain, V. K. y Chandra, S. V. Fetoplacental-maternal uptake of hexavalent chromium administrated orally in rats and mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 430-435 (1990).
- Schmid, W. y Ledebur, M. V. The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Res.* 19, 109-117 (1973).
- Scialli, R. A. A clinical guide to reproductive and developmental toxicology. CRC, Boca Raton Ann Arbor Florida, EUA, p.p. 284 (1992).
- Sen, P. y Costa, M. Incidence and localization of sister chromatide exchanges induced by nickel and chromium compounds. *Carcinogenesis* 7, 1527-1533 (1986).
- Sen, S., Sharma, A. y Talukder G. Inhibition of clastogenic effects of nicotine by chlorophyllin in mice bone marrow cells *in vivo*. *Phytother. Res.* 5, 130-133 (1991).
- Shi, X. y Dalal, N. S. The role of superoxide radical in Chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss cycle. *Biochem. Biophys.* 292, 323-327 (1992).
- Shu, X. O., Gao, Y. T., Yuan, J. M., Ziegler, R. G. y Brinton, L. A. Dietary factors and epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer.* 59, 92-96 (1989).
- Simic, M. G. Mechanism of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* 202, 377-386 (1988).
- Singh, A., Singh, S. P. y Bamezai, R. Postnatal effect of arecoline on chlorophyllin-modulated hepatic biotransformation system enzymes in suckling neonate and lactating mice. *Teratog. Carcinog. And Mutagen.* 16, 89-96 (1996).
- Singh, J., Carlisle, D. L., Pritchard, D. E. y Patierno, S. R. Cromium-induced genotoxicity and apoptosis: Relationship to cromium carcinogenesis (review). *Oncol. Rep.* 5. 1307-1318 (1998).
- Singh, C. B. P., Sharma, A. y Talukder, G. Effects of chromium on cellular system in animals. *Nucleus* 33, 84-106 (1990).

- Stearns, D. M. y Wetterhahn, K. E. Reaction of chromium (VI) with ascorbate produces chromium(V), chromium(IV) and carbon-based radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 21-25 (1994).
- Stearns, D. M., Kennedy, L. J., Courtney, K. D., Giangrande, P. H., Phieffer, L. S. y Wetterhahn, K. E. Reduction of chromium(VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA strand breaks *in vitro*. *Biochemistry* 34, 910-919 (1995).
- Surh, Y.-J. y Ferguson, L. R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potencial—highlights of a symposium. *Mutation Res.* 523-524, 1-8 (2003).
- Staples, R. E. y Schenell, V. L. Refinements in rapid clearing technique in the KOCH-Alizarin Red-S method for fetal bones. *Stain Technol.* 39, 61-64 (1964).
- Sugiyama, M., Wang, X. W. y Costa, M. Comparison of DNA lesions and cytotoxicity induced by calcium chromate in human mouse and hamster cell lines. *Cancer Res.* 46, 4547-4551 (1986).
- Sugiyama, M., Tsuzuki, K. y Ogura, R. Effect of ascorbic acid DNA damage cytotoxicity, glutathione reductase and formation of paramagnetic chromium in chinese hamster V-79 cells treated with sodium chromate (VI). *J. Biol. Chem.* 266, 3383-3386 (1991).
- Taylor, P. Practical Teratology. Academic Press Inc, Orlando Florida, pp. 171 (1986).
- Te, C., Gentile, J. M., Baguley, B. C. y Pearson, A. E. *In vivo* effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide. *Int. J. Cancer.* 70, 84-9 (1997).
- Terwel, L. y Vander Hoeven, C. M. 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 (1985).
- Trivedi, B., Saxena, D. K., Murthy, R. C. y Chamdra, S. V. Embryotoxicity and fetotoxicity of orally administrated hexavalent chromium in mice. *Reprod. Toxicol.* 3, 275-278 (1989).

- Tsapakos, M. J. y Wetterhahn, K. E. The interaction of chromium with nucleic acids. *Chem. Biol. Interact.* 46, 265-277 (1983).
- Tsuji, K., Tsuji, E. y Suzuki, S. Hypocholesterol activities of various chlorophyll constituents and their derivatives. *Eiyogaku Zasshi* 36, 55-60 (1978).
- Ueno, S., Kashimoto, T., Susa, N., Furukawa, Y., Ishii, M., Yokoi, K., Yasuno, M., Sasaki, Y.F., Ueda, J-I., Nishimura, Y. y Sugiyama, M. Detection of Dichromate (VI)-induced DNA strand break and formation of paramagnetic chromium in multiple mouse organs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 170, 56-62 (2001).
- Vallarino-Kelly, T. y Morales-Ramírez, P. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast *in vivo*. *Mutation Res.* 495, 51-59 (2001).
- Vanderkerken, K., Vanparys, P., Verschaeve, L. y Kirsch-Volders. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis* 4, 6-11 (1988).
- Vega G. S. y Reynaga O. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales; Ed. Limusa; México D. F; 727 (1990).
- Verma, A., Brockman, H. E. y Mayer, V. W. Utility of a test for chromosomal malsegregation in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M for the detection of antianeugens: test of the model combination of chlorophyllin and nocodazole. *Mutation Res.* 358, 73-80 (1996).
- Vernier, P., Montaldi, A. Majone, F., Bianchi, V. y Levis, A. G. Cytotoxic, mutagenic and clastogenic effects of industrial chromium compounds. *Carcinogenesis* 3, 1331-1338 (1982).
- Villagómez, M. M. Efectos producidos por el trióxido de cromo sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de Vicia faba, Tesis Facultad de Ciencias, Depto. De Biología, UNAM, 50 (1981).

- Vogel, R. y Spielmann, H. Beneficial effects of ascorbic acid on preimplantation mouse embryos after exposure to cyclophosphamide *in vivo*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 9:51-59 (1989).
- Voitkun, V., Zhitkovich, A. y Costa, M. Complexing of amino acids to DNA by chromate in intact cells. *Environ. Health Perspect.* 102, (Suppl. 3) 251-255 (1994).
- Voitkun, V., Zhitkovich, A. y Costa, M. Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nucl. Acids Res.* 26, 2024-2030 (1998).
- Vouk, V. General chemistry of metals. En: Handbook on the toxicology of metals. Eds. L. Elsevier Cap. 1 (1986).
- Wakeman, T. M., Kim, W-J, Callens, S., Chiu, A. Brown, K. D. and Xu, B. The ATM-SMC1 pathway is essential for activation of the chromium [VI]-induced S-phase checkpoint. *Mutation Res.* 554, 241-251 (2004).
- Warner, J. R. , Joginder, N. y Ong T. Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose resistant assay system. *Mutation Res.* 262, 25-30 (1991).
- Wells, G. P., Kim, M. P., Laposa, R. R., Nicol, J. C., PARman, T. y Winn, N. L. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutation Res.* 396, 65-78 (1997).
- Whong, W. Stewart, J., Brockman, H. E. y Ong, T. Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B₁-induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 8, 215-224 (1988).
- Wise, J. P. Sr., Stearns, D. M., Wetterhahn, K. E. y Patierno, S. R. Cell-enhanced dissolution of carcinogenic lead chromate particles: the role of individual dissolution products in clastogenesis. *Carcinogenesis* 15, 2249-2254 (1994).
- Wise, D., Beck, S., Beltrame, D., Beyer, B., Chahoud, I. Clark, R., Druga, A., Feuston, M., Guittin, P., Henwood, S., Kimmel, C., Lindstrom, P., Palmer, A., Petrere, J., Solomom, H., Yasuda, M. y York, R. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). *Teratology* 55, 249-292 (1997).

- Xie, H., Wise, S. S., Holmes, A. L., Xu, B., Wakeman, T. P., Pelsue, S. C., Singh, N. P. y Wise, J. P. Sr. carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutation Res.* 586, 160-172 (2005).
- Yang, J. L., Hsieh, Y. C., Wu, C. W. y Lee, T. C. Mutational specificity of chromium(VI) compounds in the hprt locus of Chinese hamster ovary-K1 cells. *Carcinogenesis* 13, 2053-2057 (1992).
- Young, R. y Beregi, J. Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. *J. Am. Geriatr. Soc.* 28, 46-48 (1980).
- Zemlickis, D., Lishner, M., Erlich, R. y Koren, G. Teratogenicity and carcinogenicity in a twin exposed *in utero* to cyclophosphamide. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 13, 139-143 (1993).
- Zhitkovich, A., Voitkun, V. y Costa, M. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium *in vitro*: importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochemistry* 35, 7275-7282 (1996).
- Zhitkovich, A., Song, Y., Quievryn, G. y Voitkun, V. Non-oxidative mechanisms are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr (VI) with cysteine: role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. *Biochemistry* 40, 549-560 (2001).
- Zimmering, S., Olvera, O., Hernandez, M. E., Cruces, M. P., Arceo, C. y Pementel, E. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Res.* 245, 47-49 (1990).

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

ABC	Integración del área bajo la curva
AC	Aberraciones cromosómicas
AND	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Asc	Ácido ascórbico
CFL	Clorofilina cupri-sódica
Cr	Cromo
Cr(VI)	CrO ₃ ó K ₂ Cr ₂ O ₇
Cys	Cisteína
DIF	Frecuencia diferencial de la inducción de MN
EPA	Environmental Protection Agency
EPC	Eritrocitos policromáticos
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
GSH	Tripeptido: glutamina, cisteína y glicina
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICH	Intercambios entre cromátidas hermanas
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
LD ₅₀	Dosis letal (50%)
MN	Micronúcleo (s)
NA	Naranja de acridina
NIF	Frecuencia neta de la inducción de MN
s.c.	Subcutánea
SSC	Citrato de sodio salino
v.o	Vía oral

10. PUBLICACIONES GENERADAS DE ESTE TRABAJO

TITULO:"EFFECT OF CHLOROPHYLLIN ON CHROMIUM TRIOXIDE-INDUCED MICRONUCLEI IN POLYCHROMATIC ERYTHROCYTES IN MOUSE PERIPHERAL BLOOD".

AUTORES: GARCÍA-RODRÍGUEZ, M.C., LÓPEZ-SANTIAGO, V. AND ALTAMIRANO-LOZANO, M.

REVISTA: MUTATION RESEARCH.

NÚMERO Y AÑO: 496(2001)145-151.

PAÍS: HOLANDA.

TITULO:"SALES DE SODIO Y COBRE DE LA CLOROFILA: USOS, APLICACIONES, TERAPÉUTICAS, ACTIVIDAD ANTIMUTÁGENA Y ANTICANCERÍGENA".

AUTORES: M. CARMEN GARCÍA-RODRÍGUEZ Y M. ALTAMIRANO-LOZANO.

REVISTA: TIP REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS.

NÚMERO Y AÑO: 4: 2 (2001)77-86.

PAÍS: MÉXICO.

TITULO:" EFFECTS OF CHLOROPHYLLIN ON MOUSE EMBRYONIC AND FETAL DEVELOPMENT IN VIVO".

AUTORES: MA. CARMEN GARCÍA-RODRÍGUEZ, PEDRO MORALES-RAMÍREZ P AND MARIO ALTAMIRANO-LOZANO.

REVISTA: TERATOGENESIS, CARCINOGENESIS AND MUTAGENESIS.

NÚMERO Y AÑO: 22 (2002) 461-471.

PAÍS: INGLATERRA



ELSEVIER

Mutation Research 496 (2001) 145–151



Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis

www.elsevier.com/locate/genotox
Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood

M.C. García-Rodríguez, V. López-Santiago, M. Altamirano-Lozano*

Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, UIBR, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, A.P. 9-020, México city 15000, D.F., Mexico

Received 23 October 2000; received in revised form 20 February 2001; accepted 22 February 2001

Abstract

The effect of chlorophyllin on micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) induction by chromium trioxide (CrO_3) exposure in peripheral blood of mice was studied. Animals were treated with a single intraperitoneal dose of chlorophyllin (CHL) (20 mg/kg), CrO_3 (20 mg/kg), and CHL (20 mg/kg) 4 h before (CHL- CrO_3) or 4 h before and 20 h after chromium treatments (20 mg/kg; CHL- CrO_3 -CHL). Peripheral blood samples were drawn from the caudal vein at 0, 12 and 48 h, and analyzed by the acridine orange (AO) technique. The results obtained in present study shown that CHL injection did not modify the number of MN-PCE. CrO_3 treatment resulted in a significantly increases 12 and 48 h after the injection, reaching a four-fold increase 48 h after CrO_3 administration. Whereas treatment with 20 mg/kg of CHL prior to chromium, decreased the MN frequency induced by chromium in the 12 h samples. When the samples were analyzed 48 h after CrO_3 injection, no significant differences between CHL- CrO_3 and CHL- CrO_3 -CHL in comparison with CrO_3 treatment, were observed. These results indicate that increase of MN-PCE by CrO_3 is CHL-blocked in both protocols used (CHL- CrO_3 and CHL- CrO_3 -CHL) at 12 h after treatment, but it was unable to modify the frequency of MN-PCE measured 48 h after CrO_3 injection. The absence of a protective effect by CHL in the MN-PCE induction by CrO_3 at 48 h, show that CHL has action only on one of the times of MN induction and suggests the possible action of CrO_3 by two different mechanisms, and not by CHL time-limited in vivo. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Chlorophyllin; Chromium trioxide; Antimutagenic; Clastogen; Micronucleus

1. Introduction

Exposure of human populations to different environmental genotoxic agents has generated considerable attention in the use of dietary supplements particularly plant and plant products, following the report of an inverse correlation between the consumption of vegetables and incidence of cancer [1–3]. Great efforts have been made to identify these

chemicals and complex mixtures that can inhibit or reduce the mutagenicity and carcinogenicity of industrial chemicals and environmental pollutants.

Chlorophyllin (CHL), a Na and Cu salt of chlorophyll, is a common component of most plant materials, and It has been identified as the active factor in extracts from various types of plant responsible for inhibiting the mutagenic action of a multitude of chemicals in various short-term bioassays [4–7]. The CHL antimutagenic and anticarcinogenic activity has been demonstrated on live organisms without causing toxic effects [8,9], and a comparative study showed that CHL is a more effective antimutagen than retinol,

* Corresponding author. Tel.: +52-5623-0706.
E-mail address: maal@servidor.unam.mx
(M. Altamirano-Lozano).

β -carotene, Vitamins C and E against certain dietary and environmental complex mixtures in the Ames *Salmonella* microsome assay [10]. The probable mechanisms of action of CHL are scavenging of free radicals [11,12], suppression of metabolic activation [13–15], and complex formation with promutagens or reactive moieties [14,16].

Cytotoxic effects of metals are receiving increasing attention because some of them are potential mutagens, carcinogens and teratogens. Chromium (Cr) is a widespread toxic metal ion present in industrial effluents and wastes. The genotoxic effects of Cr compounds have been extensively studied by using different biological systems and genetic endpoints, as reviewed by De Flora et al. [17]. Nevertheless, the different adverse health effects linked with its exposure, as well as the diverse cellular and molecular effects, makes the study of chromium toxicity, genotoxicity and carcinogenicity very interesting and complex [18].

The toxic and carcinogenic effects of chromate have been attributed to Cr(VI) compounds, which readily cross the cell membranes and enter the cells, being reduced through reactive intermediates to Cr(V), (IV) and the more stable Cr(III), by intracellular reductants, such as ascorbate, glutathione and NADPH-dependent flavoenzymes. This reduction process also causes the generation of reactive oxygen species (ROS) via Fenton or Harber–Weiss type reactions including DNA damage and lipid peroxidation. The toxic and carcinogenic effect of Cr(VI) may be partially associated with the production ROS [19]. Therefore, therapeutic agent that enhance intra- and extra-cellular antioxidant levels and block Cr(VI)-mediated generation of ROS may prevent or attenuate Cr(VI)-induced toxicity and carcinogenesis.

There is evidence that CHL reduces the clastogenic effects of some inorganic metal salts with clastogenic activity, like cesium chloride [20], cobalt chloride [21], and mercuric chloride [22]. CHL also protects against the mutagenic effects of Cr(VI) oxide in somatic cells of *Drosophila* [23] and bone marrow of mouse [11]. As part of our research program to evaluate CHL chemopreventive or chemoprotective potential and its underlying mechanisms, in the present study, the ability of CHL to reduce the MN-PCE induction by CrO₃ in peripheral blood polychromatic erythrocytes of mice was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Unless otherwise indicated, all test chemicals and reagents were obtained from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). CHL [CAS No. 110006-34-1], CrO₃ [CAS No. 1333-82-0], and AO [CAS No. 10127-02-3].

2.2. Animals

Two- to three-month-old CD-1 female mice of 28–30 g were used in the experiments. The animals were bred and maintained in plastic cages under controlled conditions of temperature and light–dark periods, and given Harlan chow for small rodents and water *ad libitum*.

2.3. Treatments

Working solutions of CHL and CrO₃ were prepared in distilled water and immediately injected intraperitoneally (i.p.) in appropriate volumes.

The animals were allotted at random to one of the following groups.

1. Animals injected with vehicle (control group).
2. Animals injected with 20 mg/kg of CHL.
3. Animals injected with 20 mg/kg of CrO₃.
4. Animals injected with 20 mg/kg of CHL and 4 h later with 20 mg/kg of CrO₃ (CHL–CrO₃ group).
5. Animals injected with 20 mg/kg of CHL, 4 h later with 20 mg/kg of CrO₃ and 20 h later with 20 mg/kg of CHL (CHL–CrO₃–CHL group).

Blood samples were obtained by piercing a tail blood vessel at 0, 12 and 48 h after CrO₃ treatment. Blood samples for control and CHL groups were taken at same hours.

2.4. Micronucleus analysis

Preparations of AO-coated glass slides and peripheral blood cells were performed as described previously [24]. Collected blood was placed in the center of an AO-coated glass slide and covered with a 24 mm × 40 mm coverslip. AO supravitaly stained erythrocytes were examined by fluorescence

microscope with a blue excitation and a yellow barrier filter. The frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) were recorded based on 2000 cells per mouse. The frequency of polychromatic erythrocytes in 1000 erythrocytes was also recorded.

Data were compared by one-way variance analysis (ANOVA), and Tukey HSD tests [25] using the statistical package SPSS/PC V10™. The level of significance used in all the analyses was $P < 0.05$.

3. Results

The results obtained in present study are shown in Table 1. Vehicle or CHL injection did not modify the number of MN-PCE in samples analyzed.

CrO₃ treatment resulted in a significantly MN-PCE increases 12 and 48 h after the injection in comparison with its own controls (0 h samples), reaching a four-fold increase 48 h after CrO₃ administration in comparison with 12 h treatment.

In the 12 h samples of CHL–CrO₃ and CHL–CrO₃–CHL treatments, no increase in the frequency of MN-PCE in comparison with the 0 h samples was observed. When the same groups were analyzed 48 h after CrO₃ injection, significant differences in the MN-PCE frequency induction was observed in comparison with the 0 h samples. Cell toxicity was not observed in any sample.

To compare the MN-PCE induction in the treated groups with the control/vehicle group, the net induced frequencies (NIF) were calculated as follow:

$$\text{NIF} = \text{number of MN-PCE measured} \\ - \text{number of MN-PCE measured at 0 time.}$$

Results show that 12 h treatment with CHL–CrO₃ reduces the NIF, from 2.07 to 0.62 (70%) and CHL–CrO₃–CHL treatments also reduced the NIF, from 2.07 to 0.50 (75.84%) in comparison with CrO₃ treatments (100%) (Fig. 1a). Such effects were not observed when the blood was obtained 48 h after treatment (Fig. 1b).

Table 1
Polychromatic erythrocytes frequency and MN-PCE induction in mice treated with CrO₃

Treatment	Dose (mg/kg)	n	Time analysis (h)	MN-PCE 1000 cells (mean ± S.D.)	PCE/1000 cells (mean ± S.D.)
Control/vehicle	0	8	0	0.93 ± 0.90	67.2 ± 19.0
			12	1.37 ± 0.64	71.7 ± 16.2
			48	1.87 ± 0.79	74.7 ± 18.0
CHL	20	4	0	2.00 ± 0.71	51.5 ± 11.9
			12	2.25 ± 0.64	45.3 ± 12.5
			48	1.70 ± 0.68	49.3 ± 5.5
CrO ₃	20	6	0	1.08 ± 1.28	41.0 ± 6.4
			12	3.15 ± 1.22 ^{a,b}	50.9 ± 10.5
			48	12.51 ± 2.98 ^{c,d}	41.9 ± 10.3
CHL–CrO ₃	20–20	4	0	2.25 ± 0.87	58.4 ± 11.0
			12	2.87 ± 0.63	56.5 ± 10.8
			48	14.70 ± 2.54 ^{e,f}	56.3 ± 10.0
CHL–CrO ₃ –CHL	20–20–20	4	0	1.00 ± 0.41	79.8 ± 15.2
			12	1.50 ± 1.47	75.5 ± 11.8
			48	12.25 ± 5.69 ^{g,h}	81.5 ± 13.4

^a $P < 0.05$ CrO₃ 12 h vs. CrO₃ 0 h.

^b $P < 0.005$ CrO₃ 12 h vs. control 12 h.

^c $P < 0.005$ CrO₃ 48 h vs. CrO₃ 0 h.

^d $P < 0.005$ CrO₃ 48 h vs. control 48 h.

^e $P < 0.05$ CHL–CrO₃ 48 h vs. CHL–CrO₃ 0 h.

^f $P < 0.01$ CHL–CrO₃ 0 h vs. control 48 h.

^g $P < 0.05$ CHL–CrO₃–CHL 48 h vs. CHL–CrO₃–CHL 0 h.

^h $P < 0.01$ CHL–CrO₃–CHL 48 h vs. control 48 h.

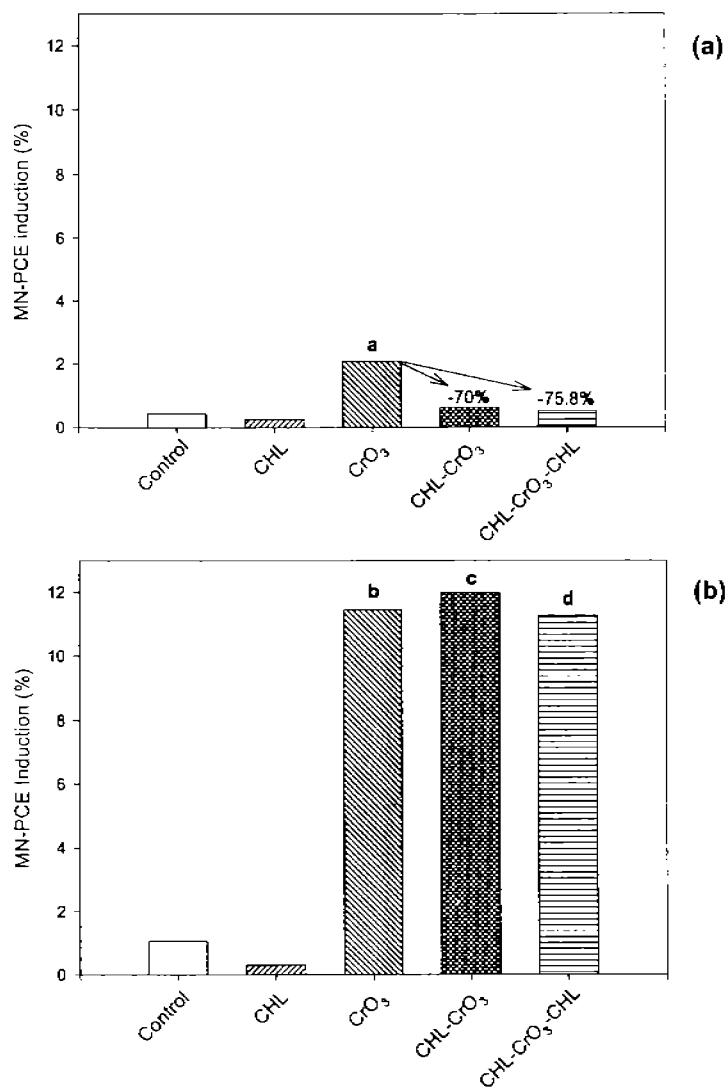


Fig. 1. Effects of CHL on the MN-PCE induction (%) in peripheral blood. Data represent averages of samples of each group obtained at 12 h (a), and 48 h (b) (less than the average of 0 h group) after CrO₃ treatment (^a: $P < 0.05$ CrO₃ vs. control; ^b: $P < 0.005$ CrO₃ vs. control; ^c: $P < 0.005$ CHL-CrO₃ vs. control; ^d: $P < 0.005$ CHL-CrO₃-CHL vs. control).

4. Discussion

Many studies have attempted to assess the hypothesis that CHL might reduce cancer rates. Although not yet proven, this hypothesis has generated a great deal of work with respect to the possible role of CHL as either anticarcinogenic or antimutagenic

compound. In general, CHL have been regarded as non-toxic and non-mutagenic in microbial systems [8,10], non-genotoxic and non-clastogenic in vivo and in vitro systems [8,9]. Present results show that CHL does not modify the mean and NIF of MN-PCE.

Cr(VI) has been reported to be genotoxic in several in vitro test systems [17,26]. Chorvatovicová and

co-workers [27,28] reported induction of MN in bone marrow of male Wistar rats, male guinea pigs, and female ICR mice. It has been also reported that MN induction by Cr(VI) is linked to its clastogenic activity. Data on the induction of abnormal ana-telophase by Cr(VI) in plants, suggest that several chromium compounds induces MN from both chromosome breakage and chromosome loss [29,30].

The toxic and carcinogenic effects of Cr have been attributed to its reduction process, which results in the generation of active oxygen species [19,31]. Indeed, different types of DNA damage during the reduction of Cr(VI) have been reported: DNA strand breaks [32], apurinic/aprimidinic (AP) sites [33], 8-hydroxydeoxyguanosine adducts [34], Cr binding to DNA [35], GSH–Cr–DNA adducts [36], DNA–DNA cross-links [37], and DNA–protein cross-links [38,39]. The induction of these different kinds of DNA damage by Cr compounds suggests a role for two of its chemical properties: the generation of active oxygen species, and Cr–ligand formation with inorganic and organic compounds [40].

We have previously shown that CrO₃ in vivo treatments induces two peaks of MN-PCE at different times (12 and 48 h), which could be correlated with two different ways of MN production, aneuploidogenic–clastogenic or clastogenic–clastogenic [41]. Present results on the induction of MN-PCE by CrO₃ confirm the action of this compound, however, data on the MN-PCE induction by CrO₃ at 12 h is minimal regardless of the statistical significance.

The anticlastogenic effects of CHL have been described in several potent clastogens, including metallic salts [8,11,20–22]. In addition to its anticlastogenic action, CHL caused 90–100% inhibition of the aneugenic activity of some chemical compounds, like nocodazole [42].

The protection given by CHL against the effects of mutagens and clastogens may be attributed to its ability to scavenge free radicals, binding to the active site of mutagen, adsorbing or absorbing toxic compounds [11,12], to suppress metabolic activation, and the formation of complex between CHL and the mutagen through strong π – π interactions between their planar unsaturated cyclic rings [13–15,43].

Present results show that increase of MN-PCE by CrO₃ is CHL-blocked in both protocols used (CHL–CrO₃ and CHL–CrO₃–CHL) at 12 h after

treatment, but it was unable to modify the frequency of MN-PCE measured 48 h after CrO₃ injection. The absence of a protective effect by CHL in the MN-PCE induction by CrO₃ at 48 h, show that CHL has action only on one of the times of MN induction and suggests the possible action of CrO₃ by two different mechanisms, and not by CHL time-limited in vivo (CHL–CrO₃–CHL protocol).

New experiments are necessary to identify the mechanisms of MN-PCE induction by CrO₃.

Acknowledgements

The authors thank Dr. R. Domínguez-Casalá for its insightful suggestions in reviewing this manuscript. We would also like to extent our appreciation to Mtro. J.F. Sánchez for the statistical analysis. This work was supported in part by PAEP-500306, 500406.

References

- [1] R. Peto, R. Doll, J.D. Ruckley, M.B. Sporn, Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* 290 (1981) 201–208.
- [2] D.M. Winn, K.G. Ziegler, L.P. Pickle, G. Gridley, W. Blot, R.N. Hoover, Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from southern United States, *Cancer Res.* 44 (1984) 1216–1222.
- [3] A.K. Ghosh, S. Sen, S. Palit, A. Ghosh, A. Sharma, G. Talukder, Comparative efficacy of chlorophyllin in reducing cytotoxicity of some heavy metals, *Biol. Metals* 4 (1991a) 158–161.
- [4] C.-N. Lai, Chlorophyll: the active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens in vitro, *Nutr. Cancer* 1 (1979) 19–21.
- [5] S.G. Kimm, Y.-J. Surh, J.A. Miller, Inhibitory effects of chlorophyllin on micronucleus formation induced by ethyl carbamate and its proximate and ultimate carcinogenic forms in mouse peripheral reticulocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 34 (1999) 57–60.
- [6] J.M. Gentile, G.J. Gentile, The metabolic activation of 4-nitro-*o*-phenylenediamine by chlorophyll containing plant extracts: the relationship between mutagenicity and antimutagenicity, *Mutat. Res.* 250 (1991) 79–86.
- [7] C. Te, J.M. Gentile, B.C. Baguley, A.E. Pearson, In vivo effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide, *Int. J. Cancer* 70 (1997) 84–89.
- [8] D. Sarkar, A. Sharma, G. Talukder, Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects, *Mutat. Res.* 318 (1994) 239–247.

- [9] P. Morales-Ramírez, M.C. García-Rodríguez, In vivo effect of chlorophyllin on γ -ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutat. Res.* 320 (1994) 329–334.
- [10] T.M. Ong, W.Z. Whong, J. Stewart, H.E. Brockman, Comparative antimutagenicity of five compounds against five mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutat. Res.* 222 (1989) 19–25.
- [11] D. Sarkar, A. Sharma, G. Talukder, Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow in vivo. *Mutat. Res.* 301 (1993) 33–38.
- [12] D. Sarkar, A. Sharma, G. Talukder, Chlorophyll and chromosome breakage. *Mutat. Res.* 360 (1996) 187–191.
- [13] S. Arimoto, S. Fukuoka, C. Itome, H. Nakano, H. Rai, H. Hayatsu, Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenicity. *Mutat. Res.* 287 (1993) 293–305.
- [14] R.H. Dashwood, S. Yamane, R. Larsen, Study of the forces stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 211–218.
- [15] R.H. Dashwood, Chlorophylls as anticarcinogens. *Int. J. Oncol.* 10 (1997) 721–727.
- [16] V. Breinholt, D. Arbogast, P. Loveland, C. Pereira, R. Dashwood, J. Hendricks, G. Bailey, Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B₁ bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability versus target organ protective mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158 (1999) 141–151.
- [17] S. De Flora, M. Bagnasco, D. Serra, E. Zanacchi, Genotoxicity of chromium compounds: a review. *Mutat. Res.* 238 (1990) 99–172.
- [18] J. Sing, D.L. Carlisle, D.E. Pritchard, R.S. Patierno, Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis. *Oncol. Rep.* 5 (1998) 1307–1318.
- [19] X. Shi, A. Chiu, C.T. Chen, B. Halliwell, V. Castranova, V. Vallyathan, Reduction of chromium(VI) and its relationship to carcinogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health* 2 (1999) 87–104.
- [20] A.K. Ghosh, S. Sen, A. Sharma, G. Talukder, Inhibition of clastogenic effects of cesium chloride in mice in vivo by chlorophyllin. *Toxicol. Lett.* 57 (1991) 13–18.
- [21] S. Palit, S. Sen, A. Sharma, G. Talukder, Protection by chlorophyllin against induction of chromosomal aberrations by cobalt in bone marrow cells of mice in vivo. *Fitoterapia* 42 (1991) 425–428.
- [22] A.K. Ghosh, S. Sen, A. Sharma, G. Talukder, Modification of clastogenic effects of mercuric chloride by chlorophyllin in bone marrow cells in vivo. *Food Chem. Toxicol.* 29 (1991) 777–779.
- [23] O. Olvera, S. Zimmering, C. Arceo, M. Cruces, The protective effects of chlorophyllin in treatment of chromium(VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 301 (1993) 201–204.
- [24] M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, M. Ishidate Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245 (1990) 245–249.
- [25] D.P. Lovell, D. Anderson, R. Albanese, G.E. Amphlett, G. Clare, R. Ferguson, M. Richold, D.G. Papworth, J.R.K. Savage, Statistical analysis of in vivo cytogenetic assays. in: D.J. Kirkland (Ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Cambridge University Press, Cambridge, 1989, pp. 184–232.
- [26] International Agency for Research on Cancer, Chromium, nickel and welding, monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human. Vol. 49. IARC, Lyon, France, 1990, pp. 49–256.
- [27] D. Chorvatovicová, E. Ginter, A. Kosinova, Z. Zloch, Effect of Vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat and guinea pig. *Mutat. Res.* 262 (1991) 41–46.
- [28] D. Chorvatovicová, Z. Kováčiková, J. Sandula, J. Navarová, Protective effect of sulfoethylglucan against hexavalent chromium. *Mutat. Res.* 302 (1993) 207–211.
- [29] S. Gómez-Arroyo, R. Villalobos-Pietrini, Chromosomal alterations induced by some chromium salts. *Cytologia* 48 (1983) 185–193.
- [30] S. Gómez-Arroyo, M.L. Villagomez, R. Villalobos-Pietrini, Effects induced by chromium trioxide on root tip chromosomes of *Vicia faba*. *Contam. Ambient* 3 (1987) 55–61.
- [31] X. Shi, N.S. Dalal, The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radical: the Cr(VI) Harber-Weiss cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* 292 (1992) 323–327.
- [32] A. Kortenamp, Z. Ozolins, D. Beyersmann, P. O'Brien, Generation of PM2 DNA breaks in the course of reduction of chromium(VI) by glutathione. *Mutat. Res.* 216 (1989) 19–26.
- [33] M. Casadevall, A. Kortenamp, The generation of apurinic/pyrimidinic sites in isolated DNA during the reduction of chromate by glutathione. *Carcinogenesis* 15 (1994) 407–409.
- [34] X. Shi, Y. Mao, A.D. Knapton, M. Ding, Y. Rojanasakul, P.M. Gannett, N. Dalal, K. Liu, Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydrogen peroxide generates hydroxyl radicals and causes DNA damage: role of a Cr(VI)-mediated Fenton-like reaction. *Carcinogenesis* 15 (1994) 2475–2478.
- [35] K.M. Borges, J.S. Boswell, R. Liebrass, K.E. Wetterhahn, Activation of chromium(VI) by thiols results in chromium(V) formation, chromium binding to DNA and altered DNA conformation. *Carcinogenesis* 12 (1991) 551–561.
- [36] K.M. Borges, K.E. Wetterhahn, Chromium cross-links glutathione and cysteine to DNA. *Carcinogenesis* 10 (1989) 2165–2168.
- [37] L.C. Bridgewater, F.C.R. Manning, S.R. Patierno, Base-specific arrest of in vitro DNA replication by carcinogenic chromium: relation to DNA interstrand cross-linking. *Carcinogenesis* 15 (1994) 2421–2427.
- [38] M.D. Cohen, C.A. Miller, L.S. Xu, E.T. Snow, M. Costa, A blotting method for monitoring the formation of chemically induced DNA-protein complexes. *Anal. Biochem.* 186 (1990) 1–7.
- [39] A. Kortenamp, B. Curran, P. O'Brien, Defining conditions for the efficient in vitro cross-linking of proteins to DNA by chromium(III) compounds. *Carcinogenesis* 13 (1992) 307–308.

- [40] S. Liu, K. Dixon. Induction of mutagenic DNA damage by chromium(VI) and glutathione. *Environ. Mol. Mutagen.* 28 (1996) 71–79.
- [41] M.C. García-Rodríguez, V. López-Santiago, M. Altamirano-Lozano. Estudio de la cinética de MN-PCE inducida por CrO₃ en sangre periférica de ratón usando la técnica de naranja de acridina. *Genet. Mol. Biol.* 21S (1998) 146.
- [42] A. Verma, H.E. Brockman, V.W. Mayer. Utility of a test for chromosomal malsegregation in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M for the detection of anticarcinogens: test of the model combination of chlorophyllin and nocodazole. *Mutat. Res.* 358 (1996) 73–80.
- [43] N. Tachino, D. Guo, W.M. Dashwood, S. Yamane, R. Larsen, R. Dashwood. Mechanisms of the *in vitro* antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutat. Res.* 308 (1994) 191–203.

SALES DE SODIO Y COBRE DE LA CLOROFILA: USOS, APLICACIONES TERAPÉUTICAS, ACTIVIDAD ANTIMUTÁGENA Y ANTICANCERÍGENA

M. Carmen García-Rodríguez y Mario Altamirano-Lozano

*Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN),
Bioterio, Campus II, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
A.P. 9-020, C.P. 15000, México, D.F. E-mail: maal@servidor.unam.mx*

RESUMEN

Hoy en día una de las mayores preocupaciones a nivel salud es la alta incidencia de cáncer en el hombre. El uso de vegetales para modificar la acción de compuestos genotóxicos ambientales peligrosos para la salud ha recibido mucha importancia, sobre todo después de los trabajos en los que se describe una relación inversa entre el consumo de vegetales verdes frescos y la frecuencia de ciertos cánceres humanos. La clorofila y sus sales clorofilinas (CFL) son dos compuestos presentes en algunas partes de las plantas y se han reportado como no tóxicas para los organismos. Las CFL son derivados de la clorofila en las cuales el magnesio es reemplazado por otros metales como el cobre, el cobalto o el hierro.

La sal de sodio y cobre de la clorofila (CFL-Cu-Na), ha sido ampliamente utilizada como aditivo en alimentos, en el tratamiento de pacientes geriátricos y algunas otras aplicaciones industriales. Diversos experimentos han mostrado que la CFL-Cu-Na posee una potente actividad antimutagénica y anticancerígena. Los probables mecanismos de acción de la CFL-Cu-Na son por secuestro de radicales libres, supresión de la activación metabólica o por la formación de complejos con los promutágenos o sus estructuras reactivas.

Dado el actual conocimiento sobre la naturaleza de los mutágenos en la dieta humana, los investigadores ahora están en posibilidad de seleccionar de una manera más precisa antimutágenos que podrían ser adicionados en la dieta, o bien, administrados en terapias, para poder reducir de una forma efectiva el riesgo de cáncer y mutaciones.

Palabras Clave: Anticarcinogénesis, antimutagénesis, clorofila, clorofilina.

ABSTRACT

Nowadays one of the main concerns about human health is a higher cancer incidence. The use of green vegetables to modify the action of genotoxic environmental health hazards has been given a great deal of attention lately, according to the reports of an inverse relationship between the consumption of fresh vegetables and the occurrence of certain kinds of cancer. Chlorophyll and chlorophyllin (CHL), present in green plants, have been reported to be non-toxic. CHL are chlorophyll derivatives in which the central magnesium atom has been substituted for other metals, such as copper, cobalt or iron.

The sodium copper salt of chlorophyll (CHL-Cu-Na) has been widely used as a food additive, in the treatment of geriatric patients and some industrial applications. Several studies have revealed that this salt has a powerful antimutagenic and anticarcinogenic activity. The probable action mechanisms of CHL-Cu-Na consist of a scavenging activity of free radicals, suppression of metabolic activation and complex formation with promutagens or their reactive structures.

According to the current understanding of the mutagenic nature in human diet, scientists are now in a good position to develop a rational selection of antimutagens which could be added to diet or used in therapies, effectively reducing the risk of cancer and mutations.

Key Words: Anticarcinogenic, antimutagenic, chlorophyll, chlorophyllin.

INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que alrededor de una tercera parte de los cánceres conocidos están relacionados con la dieta humana^{1,2}, razón por la cual diversos investigadores se han dado a la tarea de estudiar los componentes de la dieta, y han encontrado que la constituyen, tanto sustancias con actividad mutágena y cancerígena como otras que son capaces de contrarrestar o inhibir estos efectos³⁻⁵, por lo que, la forma en la cual son combinados o consumidos estos componentes por el hombre, juega un papel importante en el incremento del riesgo de desarrollar cáncer o alteraciones hereditarias.

Particularmente se ha observado que el incremento en el consumo de frutas y vegetales disminuye la inducción de algunos tipos de cáncer⁶⁻⁸, esto debido a que contienen sustancias tales como los beta-carotenos, el retinol, el alfa-tocoferol, el ácido ascórbico, el selenio, la fibra, la clorofila y sus sales como las clorofilinas (CFL)⁹⁻¹⁴.

La clorofila, y particularmente su sal de sodio y cobre (CFL-Cu-Na), han sido identificadas como potentes antimutágenos y anticancerígenos, observándose inclusive un mayor potencial comparado con otros compuestos¹⁵⁻¹⁷. En la actualidad, la CFL-Cu-Na es ampliamente estudiada; por una parte, se están tratando de establecer sus posibles mecanismos de protección¹⁸⁻²⁰, mientras que por otra, se está probando en el tratamiento de diferentes cánceres, donde se ha observado una gran efectividad²¹⁻²³, tanto que recientemente el *National Institute of Environmental Health Science*, USA, respaldó una investigación realizada por los doctores Kenler, Groopman y Bailey, en la cual se probó la CFL-Cu-Na en un grupo de 200 voluntarios chinos, los cuales estaban expuestos, de manera natural en su dieta, a concentraciones elevadas de aflatoxina B₁. Las observaciones realizadas en este trabajo indicaron que se redujo al menos el 20% de la inducción de daño en las personas tratadas con CFL-Cu-Na²⁴. Estos resultados abren aún más las expectativas de la posible aplicación de esta sustancia en el tratamiento de algunos cánceres.

Dada la gran cantidad de información que está surgiendo día a día, y la importancia de la misma con respecto a la actividad antimutágena y anticancerígena de la clorofila y las CFL, en el presente trabajo se realizó una recopilación de lo más relevante acerca de estas sustancias y sus propiedades.

GENERALIDADES

La clorofila es un pigmento natural que le da el color verde a las hojas de los vegetales. En 1817 los químicos franceses Pelletier y Caventou la separaron por primera vez y la llamaron clorofila, nombre derivado del adjetivo griego *jlórós* y el sustantivo *fyllon*, que significa "verde de hoja". La clorofila es un componente muy abundante en las plantas verdes, tanto que se ha encontrado que del 6 al 8% es clorofila, mientras que del 0.2 al 0.4% de carotenos, del 0.3 al 0.5% de xantofila, del 1 al 2% de esteroides grasos, del 0.1 al 0.2% de tocoferol y del 2 al 3% de vitaminas en extractos crudos. La molécula de clorofila (Figura 1a) posee una gran similitud con la hemoporfirina de la sangre (Figura 1b), por lo que se le han dado aplicaciones terapéuticas desde su descubrimiento; sin embargo, al ser poco estable, de baja pureza y poco soluble en el agua, se ha preferido trabajar con las CFL con mejores resultados^{25,26}.

Las CFL se obtienen por el método de Schertz y Toepfer, mediante la hidrólisis alcalina de la clorofila, en la cual se sustituye el radical fitil, así como los radicales alquil de los grupos carbometoxil. Debido a que el magnesio del núcleo de la clorofila es muy inestable, es reemplazado por un metal pesado, el cual le confiere la estabilidad a la molécula. La introducción del tipo de metal depende del pH del medio en el cual se lleve a cabo la reacción. Por ejemplo, a pH ácido se reemplaza por cobre, cobalto, hierro, níquel, plata, zinc, manganeso u oro, mientras que a pH alcalino por mercurio, estaño, talio, sodio, potasio, cesio o rubidio^{25,26}.

De todas las CFL, la más empleada terapéuticamente y en la investigación biológica es la CFL-Cu-Na, cuya estructura

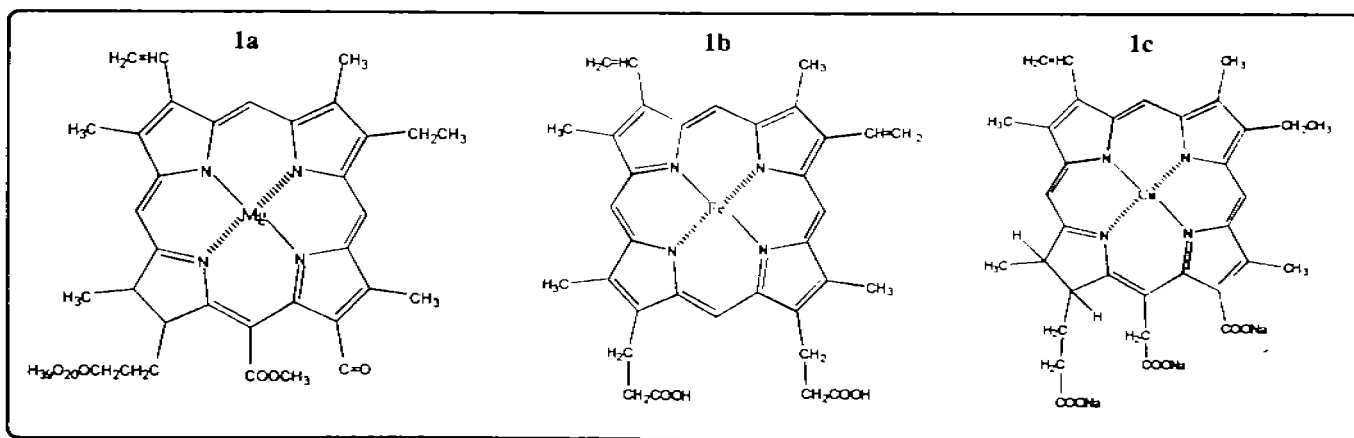


Figura 1. Estructura química de la clorofila (1a), de la hemoporfirina (1b) y de la clorofilina cupri-sódica (1c).

química está conformada por un anillo tetrapirrólico que contiene puentes dobles conjugados con un metal al centro, en este caso cobre (Figura 1c), y su fórmula química es $C_{54}H_{31}Na_4CuO_4$. La CFL-Cu-Na es una sustancia microcristalina verde-azul oscura que produce el efecto Tyndall en solución acuosa, tiene una banda de absorción característica entre 630 a 688 nm, es muy soluble en agua y alcohol^{25,27,28}.

PRINCIPALES USOS

El primer uso reconocido de la clorofila en la industria fue dado por Becquerel en 1874, como sensibilizador en fotografía por sus propiedades fotoquímicas. A partir de esa fecha, a la clorofila y sus CFL se les han dado numerosos y variados usos, como se describe a continuación^{25,29}:

- 1) *En los alimentos*; como colorante de dulces, chicles, sopas, gelatinas, etc., así como de vegetales frescos verdes para mejorar la apariencia.
- 2) *En los cosméticos*; como colorante en perfumes, lociones, jabones, pastas dentales, etc.
- 3) *En la conservación de alimentos*; dentro de bolsas, ya que absorbe el oxígeno y otros gases.
- 4) *En la agricultura*; se le usa en el cultivo de las plantas, por ser un buen transportador de micronutrientes, como el cobalto, zinc, manganeso, hierro y molibdeno.
- 5) *Como agente catalítico*; por ejemplo, en la oxidación de compuestos orgánicos.
- 6) *Como protector solar*; en cremas, lociones y pomadas, por su capacidad de absorber la radiación dañina del sol, y por lo tanto, para proteger a la piel.
- 7) *Agente desodorante*; reduce o elimina el olor del bencil mercaptano, del ácido tioglicólico y de la trimetilamina, a partir de las observaciones en donde al administrar dosis de CFL vía oral, se reducía el mal olor en la boca que era producido por los cambios metabólicos de los alimentos, las bebidas y el cigarro.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Partiendo de la semejanza estructural química de las CFL con el pigmento de la sangre (hemoporfirina), las primeras aplicaciones terapéuticas de estas moléculas estuvieron encaminadas hacia el tratamiento de la anemia²⁵. En estudios realizados con pacientes anémicos se observó que al administrar CFL vía oral se incrementaba la hemoglobina y los leucocitos en la sangre, así como el apetito³⁰, por lo que a partir de estos estudios se planteó que el cuerpo humano puede emplear sustancias pirrólicas preformadas para la construcción de la hemoglobina. En la actualidad, las CFL se venden en tiendas naturistas como complemento alimenticio para el tratamiento de la anemia.

En 1932 el Dr. Burgi, publicó un libro llamado "*Chlorophyll is a Pharmaceutical*" en donde se describen las propiedades de las CFL en el tratamiento de la hipertensión. A pacientes

hipertensos se les trató con CFL vía oral de dos a seis semanas y se observó que la presión se normalizaba. Burgi también describió los resultados de otros colegas, quienes de la misma manera trataron pacientes con presión normal y no se observaron en éstos efectos sobre la presión, además de que se mostró una buena tolerancia a la sustancia y no hubo signos de toxicidad. Estos estudios han llamado mucho la atención y se ha planteado que la disminución de la presión sanguínea puede originarse por el ensanchamiento de las arterias. Por su lado, el Dr. Nagase³¹ (1986) inspirado en estos resultados, administró por vía intravenosa e intraperitoneal CFL a ratas y detectó un incremento en el flujo gástrico sanguíneo dado bajo condiciones isquémicas, sin la participación del sistema nervioso autónomo²⁵.

Aunado a lo anterior, también se ha observado que la administración de las CFL provoca una débil o casi nula actividad hemolítica y que aceleran la coagulación de la sangre, así como el proceso de cicatrización^{28,32,33}, además de que se les han descrito propiedades antiinflamatorias, puesto que se ha observado que inhiben las reacciones alérgicas³⁴, por lo que las CFL también han sido utilizadas en el tratamiento de heridas y quemaduras de la piel con buenos resultados; de hecho, algunas pomadas en la actualidad aún las contienen.

Dado que además se ha observado que las CFL disminuyen el olor pútrido en las infecciones, han sido consideradas como un agente bacteriostático y fungicida, ya que producen un ambiente desfavorable para el crecimiento de las bacterias y de los hongos³⁵. A las CFL también se les ha usado con éxito en el tratamiento de infecciones supurativas como la piorrea y las úlceras en general^{32,36}.

A la clorofila y sus CFL también se les han propuesto para el tratamiento clínico de la pancreatitis, ya que su administración en pacientes con esta enfermedad disminuye el dolor abdominal, las náuseas y el vómito, además de que los niveles de amilasa en la orina se reducen hasta los valores normales³⁷. Las CFL también han sido administradas en pacientes con cálculos, a partir de la observación de que induce la cristalización del oxalato de calcio en orina normal³⁸, y dadas sus propiedades desodorantes y laxantes, se utiliza eficientemente en el cuidado y tratamiento de pacientes geriátricos³⁹.

Por otra parte, las CFL inhiben el crecimiento de animales jóvenes, al aumentar la oxidación de las grasas de la dieta^{40,41}. En ratas la administración combinada de aceite de maíz y CFL, disminuyó la absorción del colesterol en el intestino, por lo que también se les ha propuesto su uso en el control de peso⁴².

Otra de las propiedades estudiadas de las CFL, es su capacidad de protección contra la peroxidación lipídica de microsomas y mitocondrias, relacionadas con el envejecimiento, la arteriosclerosis y el daño hepático, entre otras⁴³.

Dentro de los efectos mostrados, tanto por la clorofila como por la CFL-Cu-Na y que han llamado más la atención, son la antimutagenicidad y anticarcinogenicidad, las cuales están relacionadas con su posible aplicación para el tratamiento de algunos cánceres.

EFFECTOS ANTIMUTAGÉNICOS Y ANTICARCINOGENÉTICOS

A partir de estudios epidemiológicos, en los cuales se mostraba que los vegetarianos tenían un menor riesgo de presentar cáncer⁴⁴, se pensó que los constituyentes de su dieta contenían sustancias anticancerígenas, por lo cual, primero se probaron en *Salmonella typhimurium* y en *Bacillus subtilis* diferentes componentes de los vegetales contra diversos mutágenos como el triptofano pirrolisato, el benzo[a]pireno, los epóxidos policíclicos aromáticos y la aflatoxina B₁, encontrando en todos los casos que los compuestos de los vegetales presentaban actividad antimutágena⁴⁵⁻⁴⁸.

Posteriormente se probó la actividad antimutágena de diferentes extractos de plantas contra compuestos como el 3-metilclorantreno y el benzo[a]pireno, y en estos casos se observó que el potencial antimutágeno aumentaba conforme a la concentración de clorofila^{45,49}.

La CFL-Cu-Na, ha presentado una actividad inhibitoria de mutagenicidad comparable con la de la clorofila e incluso superior. De igual manera se ha descrito una mayor actividad antimutágena de la CFL-Cu-Na comparada con otros compuestos antimutágenos como los beta-carotenos, el selenio y las vitaminas A, C, D y E, para una gran gama de mutágenos^{10,11,17,48}.

La actividad antimutágena, tanto de la clorofila como de la CFL-Cu-Na, se ha probado con éxito en diferentes sistemas de prueba, desde el ensayo de Ames con *Salmonella* y activación con microsomas, hasta líneas celulares de mamíferos (Cuadro I). Por otra parte, se ha observado que el origen (espinacas, alfalfa, algas, etc.), el grado de purificación y la forma de extracción de la CFL-Cu-Na juega un papel importante en la antimutagenicidad de la sustancia⁴¹.

La capacidad de inhibir o disminuir la actividad mutagénica de la clorofila y la CFL-Cu-Na, se ha detectado también para algunos carcinógenos conocidos, tanto de acción directa como indirecta^{22,50,51,57-59}. De hecho, se han iniciado estudios *in vivo*, en donde se observó que la CFL-Cu-Na disminuye la hepatocarcinogenicidad inducida por las aflatoxinas B₁ y B₂ en salmones jóvenes^{19,21}, así como el desarrollo del cáncer en el colon de ratas por la administración post-iniciación de la CFL-Cu-Na⁵⁷.

En un estudio reciente hecho en humanos en el hospital de Turín, se estudiaron 162 pacientes con cáncer de bazo y 104 controles, a los cuales se les evaluó la presencia de aductos aromáticos en el ADN, y se detectó una alta frecuencia de éstos en los pacientes con cáncer, en comparación con los que no lo

padecían. Durante el estudio se observó que al administrar dietas con diferentes porciones de vegetales y frutas a los pacientes, había una disminución en la formación de aductos, por lo que se sugirió que este tipo de dieta es capaz de proteger contra la inducción de cáncer en el bazo²³.

Uno de los problemas más graves de los tratamientos del cáncer es lo agresivo de las quimioterapias, ya que estos compuestos pueden tener efectos secundarios. En algunos estudios realizados se ha observado que la CFL-Cu-Na disminuye la inducción de daño de ciertos antineoplásicos como la ciclofosfamida, por lo que se ha sugerido su uso en combinación con este agente⁶².

Por otra parte, en diversos estudios se ha mostrado que la CFL-Cu-Na también tiene una actividad anticlastogénica (Cuadro II), ya que se ha observado que inhibe la inducción de aberraciones cromosómicas y micronúcleos, causados por sales metálicas inorgánicas y por nicotina. La protección es directamente proporcional a la concentración de la CFL-Cu-Na, y puede variar en función de la ruta y el momento de la administración, observándose una mayor protección cuando se administra simultáneamente con el clastógeno. Cabe señalar que para algunos clastógenos como el clordano y otros compuestos organoclorados, no se observó protección⁶⁷.

También se ha planteado la posibilidad de que la CFL-Cu-Na proteja del daño inducido por agentes aneuploidógenos, ya que en *Saccharomyces cerevisiae* inhibe la actividad aneugénica del nocodazol⁷⁰.

Otra de las propiedades que se ha observado para la CFL-Cu-Na es su capacidad como radioprotector, puesto que es capaz de proteger de algunos efectos inducidos por radiación gamma en *Drosophila melanogaster*, como algunas mutaciones y recombinaciones, y en el ratón de la inducción de intercambios entre cromátidas hermanas, en células de médula ósea y en espermatogonias (Cuadro II).

MECANISMOS

A partir de los resultados obtenidos con respecto a las propiedades de la CFL-Cu-Na, se han propuesto diferentes mecanismos de protección, los cuales al parecer están en función del agente, de los sistemas de prueba (*in vivo*, *in vitro* o *in situ*) y de la dosis.

La clorofila, cuando es ingerida en su dieta (vegetales verdes) por los humanos, es transformada en feofitina, pirofeofitina y feoforbida, las cuales presentan una actividad antitumorígena y antimutágena contra compuestos como el 3-metilclorantreno, por lo que los derivados de la clorofila pueden jugar un papel importante en la prevención del cáncer²². Otros experimentos que apoyan esta idea fueron los realizados por Sato y cols.^{75,76}, en donde se describen propiedades antioxidativas de la CFL-

Agente	Sistema de prueba	Mutágeno (efecto)	Referencia
CFL-Cu-Na	<i>S. typhimurium</i>	Benzo[a]pyreno(+) y otros carcinógenos(+)	50
	<i>S. typhimurium</i> /sistema microsómico S9 de hígado de rata	Productos de pirólisis de aminoácidos(+)	51
	<i>S. typhimurium</i>	Mezclas complejas de la dieta y ambientales(+)	16
	<i>S. typhimurium</i>	Aflatoxin B ₁ (AFB ₁)	17
	<i>S. typhimurium</i> /ensayo de microsomas	Mezcla de complejos mutagénicos(+)	10
	Ensayo de <i>Salmonella</i> resistente a arabinosa	MNNG, AFB ₁ , B[a], P, 2AA (+)	52
	<i>Salmonella</i> /activación de hígado de trucha	AFB ₁ y 2 aminas heterocíclicas(+)	53
	Pruebas de mutagenicidad en <i>Salmonella</i>	2-amino-3-metilimidazol [4,5-f]-quinolina (+)	54
	<i>Drosophila</i>	Óxido de cromo (VI) (+)	55
	Células V59 de hámster chino	Benzo[a]pirenos (+)	56
	Tumores de colon de rata	1,2-dimetilhidrazina y 2-amino-3-metilimidazol[4,5-f]quinolina (+)	57
	<i>S. typhimurium</i> (TA 1535/pSK 1002)	3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol (+) y mitomicina C (+)	58
	Fibroblastos celulares BALB/c3T3	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato	58
Clorofila + CFL-Cu-Na	<i>S. typhimurium</i>	3 metilclorantreno y B[a]P (+)	15,49
	<i>Salmonella</i> /pruebas de reversión de genes microsómicos	Carcinógenos de acción directa e indirecta	59
	<i>S. typhimurium</i> TA98 y <i>Drosophila</i> sp	Trp-P-2(+)	60

Cuadro I. Actividad antimutágena de la clorofila y la CFL-Cu-Na (tomada de Sarkar y cols.⁴⁶, con modificaciones).

Cu-Na, al suprimir la peroxidación lipídica en homogenados de hígado de rata, así como la producción de óxido nítrico en cultivos celulares RAW 264.⁷⁷ Estos datos sugieren que los derivados de la clorofila, los clorín-cúpricos, son los responsables de esta actividad.

Se ha observado una mayor protección de la CFL-Cu-Na hacia mutágenos de acción indirecta que de acción directa^{48,49}, y que en ratas se inhibe el deterioro de las funciones microsómicas hepáticas, las cuales forman parte del sistema de metabolismo de drogas o de xenotoxinas, por lo que se piensa que la CFL-Cu-Na protege mediante la inhibición de la función enzimática del sistema de activación metabólica^{43,78}.

De igual manera, se ha propuesto que la clorofila y la CFL-Cu-Na son capaces de interactuar directamente con el mutágeno y formar complejos^{15,19,21,22,49}. Estudios realizados con espectrofotometría revelan que la CFL-Cu-Na forma compuestos moleculares no covalentes con aminas heterocíclicas, con lo cual la CFL-Cu-Na limita la biohabilidad de carcinógenos y mutágenos para causar daño^{79,80}.

En los estudios realizados por Arimoto y cols.⁸¹, observaron que el metal del centro de la CFL-Cu-Na no juega ningún papel en la absorción del mutágeno. En otros estudios se probó que la CFL-Cu-Na impide la formación de enlaces covalentes de los agentes mutágenos con el ADN, además de que aumenta la eliminación

Agente	Sistema de prueba	Prueba contra clastogenicidad (efecto)	Referencia
A. Efectos anticlastogénicos	Células CHO <i>in vivo</i>	Tiotepa (+)	4
	Aberraciones cromosómicas en ratón (administración oral)	Nicotina (+)	63
		Cloruro de cobalto (+)	64
		Cloruro de cesio (+)	65
		Cloruro de mercurio (+)	66
		Óxido de cromo (VI) (+)	67
		Clordano (-)	67
Micronúcleos en ratón (administración i.p.)	Óxido de cromo (VI) (-)	68	
	Óxido de cromo (VI) (+)	69	
B. Efectos antineuplogénicos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D61.M	Nocodazol (+)	70
C. Efectos radioprotectores	<i>Drosophila</i>	Radiación gamma	71
			72
	Médula ósea de ratón	Radiación gamma	73
	Espermatogonias de ratón	Radiación gamma	74

Cuadro II. Otras actividades de protección de la clorofilina cupri-sódica (tomada de Sarkar y cols.²⁶, con modificaciones).

de los mutágenos por orina y por bilis, y disminuye la absorción de los mutágenos en intestino, con lo que ha propuesto que la CLF-Cu-Na puede también actuar como desmutágeno e interceptor de moléculas *in vivo*^{23,42-54}.

Por otra parte, se ha descrito que la CFL-Cu-Na posee un alto grado de resonancia y deslocalización de electrones; esto sugiere que puede ser un capturador de radicales libres⁴⁵. En los trabajos realizados por Hadnagy y Seemayer⁴⁶, se obtuvieron las primeras evidencias directas de que la CLF-Cu-Na inactiva radicales libres (entre ellos el oxígeno), de los cuales ya se había descrito su papel como posibles promotores de cáncer induciendo rupturas del ADN⁴⁷. Estas observaciones apoyan la idea de que uno de los mecanismos de radioprotección sea por medio de la captura de estos radicales^{18,16,59,73,88,89}.

En los trabajos anteriormente mencionados no se describen efectos tóxicos inducidos por las CFL.

TOXICIDAD

En estudios realizados específicamente para determinar los posibles efectos tóxicos de las CFL, se observó que su administración por diferentes vías (oral, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular y subcutánea), durante varios días a conejos (1 a 2 g), a perros (100 mg) y a humanos (100 a 800 mg) no producía efectos tóxicos colaterales²⁵.

Harrison y cols.⁹⁰, administraron CFL en la dieta de ratas a lo largo de toda su vida y en una proporción 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 realizar la necropsia a estos animales no se detectaron cambios patológicos, ni se encontraron efectos tóxicos causados por el cobre de la molécula de las CLF en el hígado, el riñón y el bazo. El Cuadro III resume la LD₅₀ (mg/kg de peso corporal) para la CLF-Cu-Na en diferentes animales⁹¹.

En los tratamientos terapéuticos, en los que se ha administrado CLF-Cu-Na en humanos, como ha sido el caso de pacientes geriátricos (100 mg 2 ó 3 veces al día), a pacientes con pancreatitis (0.35 mg), a pacientes hipertensos (0.8 a 1.5 g), y a pacientes anémicos (700 mg), no se han observado efectos tóxicos secundarios, ni se han desencadenado reacciones antigénicas^{29,37,39}. Otros estudios han mostrado que al administrar diferentes dosis de CLF-Cu-Na no se presentan efectos citotóxicos^{18,16,49,52,59,60,73,74}.

Aunque se ha observado que la CFL-Cu-Na no presenta efectos clastógenos cuando es administrada en ratones a dosis de 0.77 a 1.5 mg/kg de peso corporal⁴³, a dosis mayores de 3 mg/kg de peso corporal induce aberraciones cromosómicas en baja frecuencia^{47,92}. De igual manera, Romer y cols. (1992)⁹³, observaron en *Salmonella*, y mediante el uso de activación microsómica, que la administración de nitrosaminas, N-nitrosornicotina y del 4-(N-metil-N-nitrosamina)-1-(3piridinil)-2-butanona con bajas concentraciones de CFL-Cu-Na incrementa la mutagenicidad al doble; sin embargo, a dosis altas la reduce. Estos resultados sugieren que la CFL-

Agente	Sistema de prueba	Vía de administración	LD ₅₀ (mg/kg de peso corporal)
CFL-Cu-Na	Ratón	Intravenosa	>400
		Intramuscular	>500
		Intraperitoneal	>1000
	Rata	Intravenosa	>250
		Intramuscular	>250
		Intraperitoneal	>1000
Conejo	Intravenosa	>200	
	Intramuscular	>60	
	Intraperitoneal	>500	
Gato	Intraperitoneal	>60	
Perro	Intravenosa	>200	
	Intramuscular	>50	
	Intraperitoneal	>200	
Cerdo	Intravenosa	>10	
	Intramuscular	>20	
	Intraperitoneal	>50	

Cuadro III. LD₅₀ para diferentes animales calculada por Worden y cols.³².

Cu-Na actúa de ambas formas, potenciando e inhibiendo la mutagenicidad.

Finalmente, si bien se ha descrito que prácticamente las CFL no presentan efectos tóxicos evidentes en los organismos adultos, en un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio con ratones hembras preñadas, observamos que la administración de CFL-Cu-Na en una dosis de 100 mg/kg de peso, induce embriotoxicidad y embrioletalidad (García-Rodríguez y cols. en prep.).

Como podemos observar, dada la alta incidencia de cáncer en el hombre, debido en parte al estilo de vida, los estudios encaminados a la búsqueda de mecanismos para contrarrestar dichos efectos han evidenciado una muy prometedora vía, mediante el uso de componentes de la dieta (vegetales verdes y frutas), para modificar la acción de compuestos genotóxicos ambientales peligrosos para la salud.

La clorofila y las CFL, principalmente la CFL-Cu-Na, han mostrado tener un sorprendente efecto protector, con pocos o nulos efectos tóxicos y colaterales, convirtiéndolas en excelentes elementos para las investigaciones en antimutagénesis y anticarcinogénesis.

En la actualidad, los trabajos desarrollados han ido desentrañando los mecanismos de acción de estas moléculas, lo cual ha permitido que los investigadores puedan dirigir sus esfuerzos de una manera más puntual a terapias encaminadas a controlar y por qué no, a curar algunos tipos de cáncer, y aunque los

avances en esta materia han sido notables, aún falta mucho por investigar sobre los mecanismos de acción de la clorofila y de las clorofilinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos el apoyo técnico para la realización de este trabajo al M. en C. Alejandro Gordillo M.

REFERENCIAS

- Doll, R. & Peto, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer. Inst.* **66**, 1191-1308 (1981).
- Aeschbacher, H-U. Potential carcinogens in the diet. *Mutation Res. Special Issue*, Elsevier, Amsterdam (1991).
- Ames, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* **224**, 1256-1262 (1983).
- Renner, H.W. *In vivo* effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutation Res.* **244**, 185-188 (1990).
- Block, G., Patterson, B. & Subar, A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* **18**, 1-29 (1992).
- Graham, S., Dayal, H., Swanson, M., Mittelman, A. & Wilkinson, G. Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J. Natl. Cancer Res. Inst.* **61**, 709-714 (1978).
- Shu, X.O., Gao, Y.T., Yuan, J.M., Ziegler, R.G. & Brinton, L.A. Dietary factors and epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer.* **59**, 92-96 (1989).
- Barone, J., Taioli, E., Hebert, J.R. & Wynder, E.L. Vitamin supplement-use and risk for oral and esophageal cancer. *Nutr. Cancer.* **18**, 31-41 (1992).

9. Bala, S. & Grover, I.S. Antimutagenicity of some citrus fruits in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* **222**, 141-148 (1989).
10. Ong, T.M., Whong, W.Z., Stewart, J. & Brockman, H.E. Comparative antimutagenicity of five compounds against five mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutation Res.* **222**, 19-25 (1989).
11. Gentile, J.M. & Gentile, G.J. The metabolic activation of 4-nitro-O-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutation Res.* **250**, 79-86 (1991).
12. Goodman, G.E. *et al.* The carotene and retinal efficacy trial (CARET) to prevent lung cancer in high risk populations: pilot study with cigarette smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* **2**, 389-396 (1993).
13. Harris, P.J. & Ferguson, L.R. Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutation Res.* **290**, 97-110 (1993).
14. Kumar, K.P. & Sinha, S.P. Impact of higher doses of vitamin C in modulating pesticide genotoxicity. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **14**, 175-181 (1994).
15. Lai, C.N., Butler, M.A. & Matney, T.S. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Res.* **77**, 245-250 (1980).
16. Ong, T.M., Whong, W.Z., Stewart, J. & Brockman, H.E. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.* **173**, 111-115 (1986).
17. Whong, W., Stewart, J., Brockman, H.E. & Ong, T. Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B1-induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **8**, 215-224 (1988).
18. Neault, J.F. & Tajmir-Riahi, H.A. DNA-Chlorophyllin interaction. *J. Phys. Chem. B.* **102**, 1610-1614 (1998).
19. Hayashi, T., Schimerlik, M. & Bailey, G. Mechanism of chlorophyllin anticarcinogenesis: dose-responsive inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 132-140 (1999).
20. Kyung-Joo, C. *et al.* Chlorophyllin suppression of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **166**, 120-127 (2000).
21. Breinholt, V. *et al.* Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B1 bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability vs. target organ protective mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 141-151 (1999).
22. Chernomorsky, S., Segelman, A. & Poretz, R.D. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **19**, 313-322 (1999).
23. Peluso, M. *et al.* White blood cell DNA adducts and fruit and vegetable consumption in bladder cancer. *Carcinogenesis* **21**, 183-187 (2000).
24. Bailey, G.S. Chlorophylls: Can these green food pigments prevent some cancers? [en línea] 1998. Abril 30 [fecha de acceso 07 de septiembre del 2001]. URL disponible en: <http://www.orst.edu/dept/lpi/f-w97/chrphyl.html>.
25. Kephart, J.C. Chlorophyll derivatives their chemistry commercial preparation and uses. *Econ. Bot.* **9**, 3-38 (1955).
26. Sarkar, D., Sharma, A. & Talukder, G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutation Res.* **318**, 239-247 (1994).
27. Oster, G., Brody, S. & Bellin, J. Spectral properties of chlorophyllin. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1309-1313 (1964).
28. Newmark, H. Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**, 461-466 (1987).
29. Ghosh, A.K., Sharma, A. & Talukder, G. Effects of chlorophyllin on cellular systems. *The Nucleus* **35**, 63-69 (1992).
30. Berlinson, M.Y.A. The use of sodium chlorophyllin in cases of leukopenia in children. *Nauch. Tr. Leningrad. Leso. Tekh. Acad.* **119**, 113-116 (1969).
31. Nagase, M. The effects of thiamine cobalt chlorophyllin complex on the gastric local blood flow in rats. *Yakuri to Chiryō* **14**, 4153-4165 (1986).
32. Krasnikova, N.A. Proliferation of the epithelium surrounding a skin wound in hairless mice exposed to sodium chlorophyllin. *Byul. Eksp. Biol. Med.* **76**, 99-102 (1973).
33. Kojima, R. Inhibitory mechanism of copper chlorophyllin on the hemolytic activity of cabrotoxin. *Igaku to Seibutsugaku* **96**, 461-463 (1978).
34. Nagai, H., Nishiyori, T., Diakoku, M. & Koda, A. Immunopharmacological studies of sodium-copper-chlorophyllin. *Jpn. J. Pharmacol.* **33**, 819-828 (1983).
35. Nakeeb, M. & Yousef, R. Antimicrobial activity of sodium-copper chlorophyllin. *Pharmazie* **29**, 48-50 (1974).
36. Murakami, M., Ohiki, S. & Ohgo, T. Antulcerative effects of combination of propantheline bromide copper-chlorophyllin-sodium and magnesium trisilicate. *Oyo. Yakuri* **17**, 683-689 (1979).
37. Oda, T., Yokono, O., Yoshida, A., Miyake, K. & Lino, A. On the successful treatment of pancreatitis with chlorophyllin-a and inhibitory effect of its derivatives on trypsin and other protease activities *in vitro*. *Gastroenterol. Japonica.* **6**, 49-54 (1971).
38. Tawashi, R., Cousineau, M. & Denis, G. Crystallization of calcium oxalate dihydrate in normal urine in presence of sodium copper chlorophyllin. *Urol. Res.* **10**, 173-176 (1982).
39. Young, R. & Beregi, J. Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. *J. Am. Geriat. Soc.* **28**, 46-48 (1980).
40. Tsuji, K., Tsuji, E. & Suzuki, S. Hypocholesterol activities of various chlorophyll constituents and their derivatives. *Eiyogaku Zasshi* **36**, 55-60 (1978).
41. Ebihara, K. & Shuhachi, K. Protective effect of dietary fibre on growth retardation of rats fed a purified low fibre diet containing toxic doses of sodium iron chlorophyllin. *Nippon. Nogei. Kagaku. Kaishi* **56**, 195-202 (1982).
42. Cho, S. Interaction between lignin and pectin and between corn oil and chlorophyllin in lipid metabolism in rats fed a high cholesterol diet. *Kaseigaku Zasshi* **35**, 56-60 (1984).
43. Sato, M., Imai, K., Kimura, R. & Murata, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 716-722 (1984).
44. Phillips, R.L. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among seventh-day Adventists. *Cancer Res.* **35**, 3513-3522 (1975).
45. Kada, T., Morita, K. & Inoue, T. Anti-mutagenic action of vegetable factors on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.* **53**, 351-353 (1978).
46. Morita, K., Hara, M. & Kada, T. Studies on natural desmutagens screening for vegetables and fruit factors active in inactivation

- of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 1235-1238 (1978).
47. Kada, T., Kato, M., Aikawa, K. & Kiriya, S. Adsorption of pyrrolisate mutagens by vegetable fibers. *Mutation Res.* **141**, 149-152 (1984).
48. Terwel, L. & Van der Hoeven, C.M. 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 (1984).
49. Lai, C. N. Chlorophyll: the active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. *Nutr. Cancer.* **1**, 19-21 (1979).
50. Arimoto, S., Negishi, T. & Hayatsu, H. Inhibitory effect of hemin the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.* **11**, 29-33 (1980).
51. Arimoto, S., Ohara, Y., Namba T., Negishi, T. & Hayatsu, H. Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 662-668 (1980).
52. Warner, J.R., Joginder, N. & Ong, T. Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella arabinose* resistant assay system. *Mutation Res.* **262**, 25-30 (1991).
53. Dashwood, R.H., Breinholt, V. & Bailey, G.S. Chemo-preventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* **12**, 939-942 (1991).
54. Dashwood, R. & Liew, C. 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 (1992).
55. Olvera, O., Zimmering, C., Arceo, C. & Cruces, M. The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* **301**, 201-204 (1993).
56. Katoh, Y., Nemoto, N. Tanaka, M. & Takayama, S. Inhibition of benzo [a]pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutation Res.* **121**, 153-157 (1983).
57. Blum, A.C. *et al.* β -catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* **22**, 315-320 (2001).
58. Okai, Y., Higashi-Okai, K., Yano, Y. & Otani, S. Suppressing effects of chlorophyllin on mutagen-induced umu C gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002) and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c 3T3 fibroblast cells. *Mutation Res.* **370**, 11-17 (1996).
59. Kimm, S., Tchai, B., Park, S. & Kang, S. Antimutagenic activity of chlorophyll to direct-acting and indirect-acting mutagens and its contents in vegetables. *Korean J. Biochem.* **14**, 1-8 (1982).
60. Negishi, T., Arimoto, S., Nishizake, C. & Hayatsu, H. Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4, 3-b]indole (Trp-P2). *Carcinogenesis* **10**, 145-149 (1989).
61. Dashwood, R.H. The importance of using pure chemicals in (anti) mutagenicity studies: chlorophyllin as a case in point. *Mutation Res.* **381**, 283-286 (1997).
62. Te, C., Gentile, J.M., Baguley, B.C. & Pearson, A.E. *In vivo* effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide. *Int. J. Cancer.* **70**, 84-9 (1997).
63. Sen, S., Sharma, A. & Talukder, G. Inhibition of clastogenic effects of nicotine by chlorophyllin in mice bone marrow cells *in vivo*. *Phytother. Res.* **5**, 130-133 (1991).
64. Palit, S., Sen, S., Sharma, A. & Talukder, G. Protection by chlorophyllin against induction of chromosomal aberrations by cobalt in bone marrow cells of mice *in vivo*. *Fitoterapia* **42**, 425-428 (1991).
65. Ghosh, A., Sen, A., Sharma, A. & Talukder, G. Inhibition of clastogenic effects of cesium chloride in mice *in vivo* by chlorophyllin. *Toxicol. Lett.* **57**, 11-18 (1991).
66. Ghosh, A., Sen, S., Sharma, A. & Talukder, G. Modification of clastogenic effects of mercuric chloride by chlorophyllin in bone marrow cells *in vivo*. *Food. Chem. Toxicol.* **29**, 777-779 (1991).
67. Sarkar, D., Sharma, A. & Talukder, G. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*. *Mutation Res.* **301**, 33-38 (1993).
68. Sarkar, D., Sharma, A. & Talukder, G. Comparison of the effects of crude extract of spinach-beet leaves and equivalent amounts of chlorophyll and chlorophyllin in modifying the clastogenic activity of chromium (VI) oxide in mice. *Phytother. Res.* **9**, 199-202 (1994).
69. García-Rodríguez, M.C., López-Santiago, V. & Altamirano-Lozano, M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.* **496**, 145-151 (2001).
70. Verma, A., Brockman, H.E. & Mayer, V.W. Utility of a test for chromosomal malsegregation in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M for the detection of antineoplastic agents: test of the model combination of chlorophyllin and nocodazole. *Mutation Res.* **358**, 73-80 (1996).
71. Zimmering, S., Olvera, O., Hernández, M.E., Cruces, M.P., Arceo, C. & Pimentel, E. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Res.* **245**, 47-49 (1990).
72. Pimentel, E., Cruces, M.P. & Zimmering, S. On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* **446**, 189-192 (1999).
73. Morales-Ramírez, P. & García-Rodríguez, M.C. *In vivo* effect of chlorophyllin on γ -ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutation Res.* **320**, 329-34 (1994).
74. Morales-Ramírez, P. & Mendiola-Cruz, M.T. *In vivo* radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cell. *Mutation Res.* **344**, 73-78 (1995).
75. Sato, M., Iguchi, N. & Murata, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation: I. Effect on lipid peroxidation in rat liver homogenates in the presence of both Fe²⁺ and L-ascorbic acid. *Yakugaku Zasshi* **97**, 268-273 (1977).
76. Sato, M. *et al.* Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation: IX On the antioxidative components in commercial preparations on sodium copper chlorophyllin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **34**, 2428-2434 (1986).
77. Cho, K-J. *et al.* Chlorophyllin suppression of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **166**, 120-127 (2000).
78. Imai, K. *et al.* Effects of sodium metalochlorophyllin on the activity and components of the microsomal drug-metabolizing

- enzyme system in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 4287-4293 (1986).
79. Dashwood, R. & Guo, D. Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: Studies of enzyme inhibition and molecular complex formation. *Carcinogenesis* **13**, 1121-1126 (1992).
80. Dashwood, R. & Guo, D. Antimutagenic potency of chlorophyllin in the *Salmonella* assay and its correlation with binding constants of mutagens-inhibitor complex. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**, 164-171 (1993).
81. Arimoto-Kobayashi, S., Harada, N., Tokunaga, R., Odo, J-I. & Hayatsu, H. Adsorption of mutagens to chlorophyllin-chitosan, an insoluble form of chlorophyllin. *Mutation Res.* **381**, 243-249 (1997).
82. Dashwood, R. & Liew, C. Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazol [4,5-f] quinoline. *Environ. Mol. Mutagen.* **20**, 199-205 (1992).
83. Ait, Amara-Mokrane, Lehucher-Michel, M.P., Balansard, G., Duménil, G. & Botta, A. Protective effects of alfa-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* **11**, 161-167 (1996).
84. Dashwood, R., Breinholt, V. & Bailey, G.S. Chemo-preventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B₁(AFB₁)-DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* **12**, 939-942 (1991).
85. Simic, M.G. Mechanism of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* **202**, 377-386 (1988).
86. Hadnagy, W. & Seemayer, N.H. Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. *Mutation Res.* **203**, 205-206 (1988).
87. Troll, W. & Weisner, R. The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 509-528 (1985).
88. Robins, E.W. & Nelson, R.L. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced nuclear damage in rat colonic epithelium by chlorophyllin. *Anticancer Res.* **9**, 981-986 (1989).
89. Bronzetti, G., Galli, A. & Della Croce, D.M. Antimutagenic effects of chlorophyllin, in Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II. (Eds., Kuroda, Y., Sankel, D.M. & Waters, M.D.) 463-468 (Plenum Press, Nueva York, 1990).
90. Harrison, J.W.E., Levin, S.E. & Travin, B. The safety and fate of potassium cooper chlorophyllin and other cooper compounds. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* **43**, 722- (1954).
91. Eighteenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser.* FAO Nutrition Meetings Report Series, **54**, (1974).
92. Sarkar, D., Sharma, A. & Talukder, G. Chlorophyll and chromosome breakage. *Mutation Res.* **360**, 187-191 (1996).
93. Romert, L. Curvall, M. & Jensen, D. Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis* **7**, 349-355 (1992).

Effects of Chlorophyllin on Mouse Embryonic and Fetal Development In Vivo

Ma. Carmen García-Rodríguez,¹ Pedro Morales-Ramírez,² and Mario Altamirano-Lozano^{1*}

¹UNIGEN (Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental), Bioterio Campo-II, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, D.F., México

²Departamento de Radiobiología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, D.F., México

Chlorophyllin (CHL) has proven that there is antimutagenic and anticarcinogenic activity in several organisms without causing lethal effects. However, there is no information about its effects when it is administered in gestation. In the present study, we assessed possible effects of CHL when it was administered to CD-1 mice on the 8th day of gestation using the same doses and administration route used in our previous antimutagenic and antigenotoxic studies. Females were exposed to a single dose of CHL by i.p. injection (20, 40, 50, or 100 mg/kg b.w.). On day 18 all dams were subjected to cesarean section and the fetuses were examined with common teratological methods. Results show that CHL-treatment induced total litter loss and is dose-dependent, probably due to either the interaction between CHL and some general control mechanisms of embryo development or by an impairment of maternal-fetal interactions. The analysis of uterine horns of the CHL-treated females with total litter loss revealed the presence of *green rings* in the uterus. Results show the inverse relationship between the number of live implants and the frequency of *green rings*, indicating implantation sites where embryo death and early resorptions occurred. Although CHL was given in a single dose on day 8 in this study, the results indicate that CHL is associated with significant embryo lethality. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 22:461–471, 2002.

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: chlorophyllin; embryoletality; litter loss

Contract grant sponsor: Contract grant number: Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP)-500002.

*Correspondence to: Dr. Mario Altamirano-Lozano, UNIGEN-Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Bioterio, Campo-II, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, A.P. 9-020, C.P. 15000, D.F., México. E-mail: maalt@servidor.unam.mx

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/tcm.10042

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Chlorophyllin (CHL) is a sodium-copper chlorophyll salt with a flat porphyrin ring and a metal atom in the center, with sodium or potassium atoms replacing the phytol ester groups [1]; it exhibits antimutagenic activity against a variety of environmental and dietary complex mixtures [2]. Several authors have demonstrated the antimutagenic and anticarcinogenic effects of CHL in live organisms as mice using doses of 50 to 200 mg/kg, without causing toxic effects [1,3-8]. A comparative study showed that CHL is a more effective antimutagen than retinol, β -carotene, and vitamin C and E against certain dietary and environmental complex mixtures in the Ames Salmonella microsome assay [2]. Evidence of delayed MN-PCE appearance after gamma ray exposure caused by CHL was observed; this was explained on the basis of an effect on the progress of cell division, since a late slight reduction on PCE was also observed [9].

According to previous studies, the probable antimutagenic mechanisms of CHL are free radical scavenging [10,11], suppression of metabolic activation [12-14], and formation of complexes with promutagens or reactive moieties [14,15]. Some of these protective mechanisms imply important metabolic effects that could not be deleterious for adults, even by a treatment with relatively high doses of CHL. Previous results obtained in our laboratory show that when CHL was administered in a single i.p. dose of 100 mg/kg, it had a protective effect against genotoxic damage induced by metals such as CrO_3 [8] and ionizing radiation such as gamma rays, without toxicity in the treated animals, in both bone marrow and spermatogonial cells [4,16].

In our laboratory, we were interested in evaluating the antigenotoxic and antimutagenic effect of CHL in the gestation period in both dams and their progeny. For this reason, the study was performed to evaluate the effects of CHL on murine embryo development administered on day 8 of gestation with the same doses and administration route used in our previous antigenotoxic studies in mice *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Sexually mature (28-35 g) virgin female CD-1 mice (from our own stock) were housed in plastic cages, fed with Harlan Teklad Laboratory Rodent Chow and water *ad libitum*, and kept in 12-h light-darkness cycles. Every male was mated with two females and successful copulation was considered when a copulation plug was found (day 0 of gestation). Plug-positive females were weighed and randomly assigned to treatment groups. On day 8 of pregnancy, 20, 40, 50, or 100 mg/kg b.w. Chlorophyllin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) was i.p. injected to groups of 20 females. The control group of pregnant females received an equivalent volume of vehicle.

The general behavior of the dams was observed every day, and the body weight was measured on days 0, 8, 10, 12, and 18 of gestation. On day 18, all females were sacrificed by cervical dislocation; the uterus was opened, and the number of implants, the resorption sites, and the live or dead fetuses were recorded. Live fetuses were removed from the uterus, blotted dry, weighed, examined for external malformations, and sexed under a dissecting microscope. Two thirds of the fetuses from each litter were fixed in 70% ethanol, cleared, and stained with alizarin red S

[17] and examined for skeletal defects under a dissecting microscope; the remaining fetuses were fixed in Bouin's solution for future visceral examination [18]. For the skeletal alterations, we considered damaged ribs (extra ribs, short and rudimentary ribs, ribs fused with vertebral arch, fused ribs or bifurcated ribs), damaged sternbrae (asymmetrical, asymmetrically shaped, displaced or rudimentary, bifurcated, fused, or cleaved), and vertebral column alterations (vertebral bodies displaced, fused, rudimentary or scoliosis).

Finally, groups of pregnant (day 8) and non-pregnant females were treated with a single i.p. injection of 100 mg/kg b.w. of CHL. In each group, 4 animals were sacrificed by cervical dislocation on days 9, 11, 13, 15, or 18 after treatment. A group of pregnant females was treated with the vehicle alone. In all cases, the uterine horns were dissected, and the number of implants, resorptions, and live or dead fetuses were counted.

Statistical Analysis

The unit of comparison was the pregnant female or the litter. Results were analyzed by one-way variance analysis (ANOVA) and Dunnett's test. The incidence of fetal anomalies among litters was compared by means of a two-tailed Fisher exact probability test for pairwise comparison of groups. Significance was set at the 0.05 probability level. All tests were carried out using the statistical package SPSS/PC V10™.

RESULTS

The general appearance and behavior of the animals exposed to CHL were similar to that of the control animals. There were no cases of mortality in either group. CHL given i.p. induced a dose-dependent litter loss and caused a significant increase in the number of early embryo resorptions (Table I). Complete resorption occurred in all dams receiving the highest dose. Figure 1 shows that in some pregnant females treated with CHL there was a body weight loss over the two days after treatment, between days 8 and 10, within the 40, 50, and 100 mg/kg dose groups. In

TABLE I. Reproductive Performance of CHL-Treated CD-1 Female Mice

	Dose (mg/kg b.w.)				
	0	20	40	50	100
Examined dams	18	18	15	19	18
Litters with late resorptions (%)	7/18 (38.9)	9/18 (50)	6/15 (40)	2/19 (10.5)	1/18 (5.5)
Litters with early resorptions (%)	0/18 (0)	1/18 (5.5)	4/15 (23.5)	14/19* (73.7)	17/18* (94.4)
Live fetuses/total implants	217/237	178/208	114/180*	54/239*	0/229*
Dead fetuses/total implants	8/237	2/208	4/180	1/239*	0/229*
No. of early resorptions/total implants	0/237	9/208*	51/180*	182/239*	220/229*
No. of late resorptions/total implants	12/237	19/208	11/180	2/239	9/229
Fetal body weight (g) (mean ± S.E.M)	1.40 ± 0.02	1.40 ± 0.02	1.40 ± 0.02	1.40 ± 0.03	
Sex ratio (♀♀/♂♂)	0.93/1.07	1.07/0.93	0.95/1.05	0.95/1.05	

*Significantly different from the control group ($P < 0.05$).

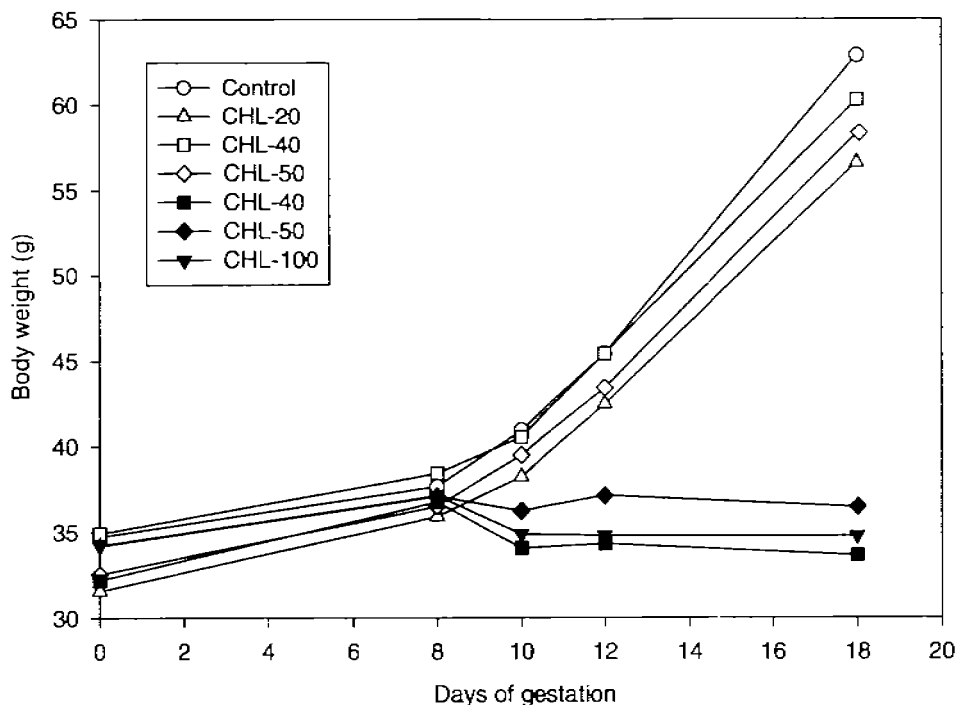


Fig. 1. Mean body weights of pregnant CD-1 females exposed to a different CHL doses on day 8 of gestation (white symbols: females with litters, black symbols: females without litters).

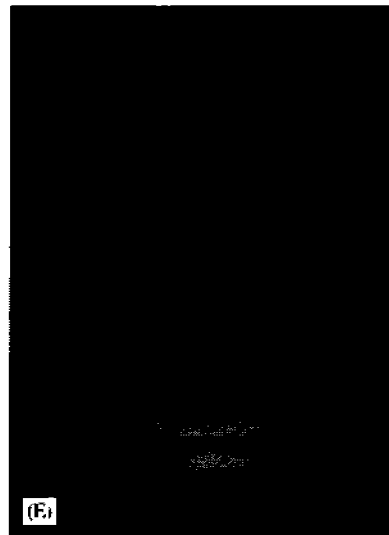
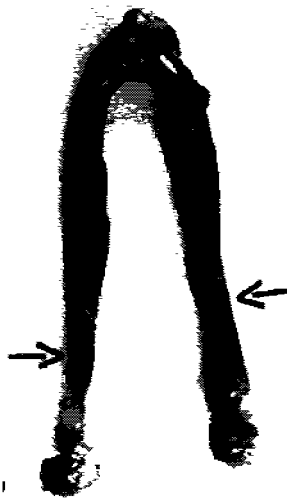
all cases in which pregnant females had litters, a similar weight in such controls was observed.

The analysis of uterine horns of the CHL-treated females revealed the presence of *green rings* in the uterus, which presumably corresponded to early resorptions; this indicates the presence of fetal implantation sites because the rings were similar in number and disposition to those of fetuses in the control females (Fig. 2).

The pregnant females treated with 100 mg/kg/b.w. of CHL on day 8, and sacrificed on day 9 and every two days until day 18 showed that on day 9 the yolk sacs were hemolytic, embryo death had occurred, and the resorption process had begun (Fig. 2A). When the products were analyzed on the following days, the resorption process was clearly observed (Fig. 2B) in comparison with the control uterus (Fig. 2C). The embryonic tissue was not recognizable in the uterus of females sacrificed on days 15, 17, and 18 of pregnancy, and the *green rings* along the uterus clearly corresponded to implantation sites (Fig. 2D). No *green rings* were observed in the uterus of non-pregnant CHL-treated females (Fig. 2E).

Figure 3 shows the inverse relationship between the number of live implants and the frequency of *green rings* in the uterus of CHL-treated females; however, the

Fig. 2. Effects of CHL on embryo and fetal development. Uterine horns of 8th day CHL-treated females showing: (A) embryo death, hemolytic yolk sacs, and initiating resorptions on day 9, (B) exposed with resorptions, *green rings* (arrows), on day 11, (D) total of resorptions and the presence of *green rings* (arrows). E: Uterine horns of CHL-treated non-pregnant females on day 18. C: Uterine horns of control pregnant females on day 11.



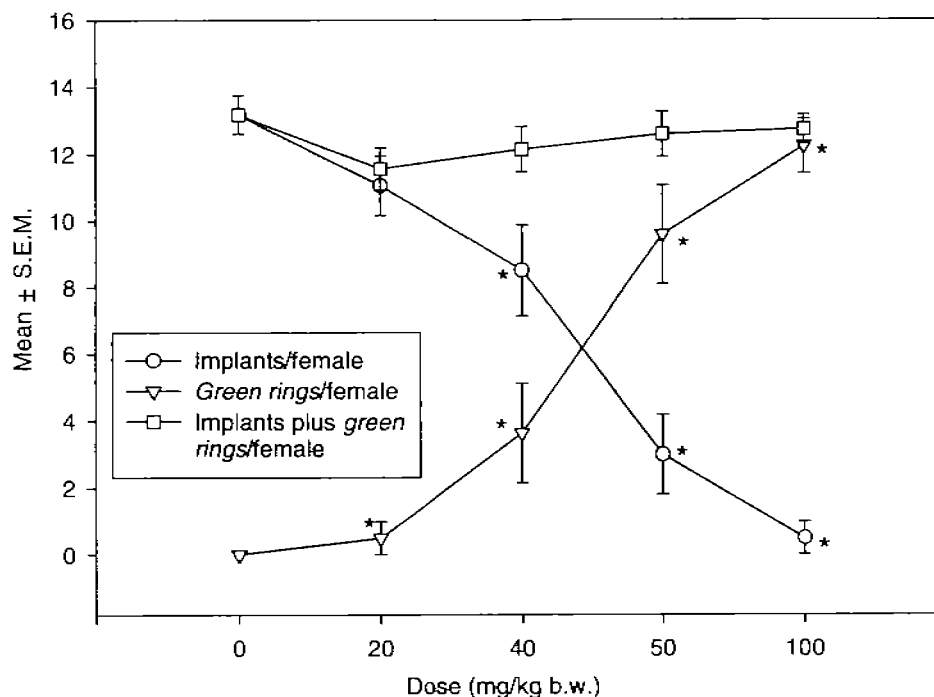


Fig. 3. Correlation between the number of implants and the presence of *green rings* in the pregnant CHL-treated females. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, as compared to the control group.

addition of implants and *green rings* showed no significant differences between treated and control groups.

Pregnant CHL-treated mice with live litters revealed a similar mean fetal weight and litter sex ratio to that of control groups (Table I).

Tables II, III, and IV show the incidence of external and bone alterations in the fetuses of CHL-treated females. The frequency of malformations showed no significant increase in the frequency of cleft lip, cleft palate, exencephaly, and polydactyly. However, the frequency of dolicocephaly was statistically significant only at the 40 mg/kg dose (Table II).

No statistically significant differences were observed in the frequency of ossification points in the anterior and posterior limbs as well as in the sternbrae (Table III), and the frequency of skeletal variations in the fetuses of females treated with 20 mg/kg CHL was not different to that of the controls. However, the frequency of fetuses with minor damaged ribs was observed in the 40 mg/kg group and the fetuses with medium and highly damaged ribs and vertebral column alterations increased significantly in the group treated with 50 mg/kg of CHL (Table IV). These effects were not dose dependent in any case.

DISCUSSION

Many studies have attempted to assess the hypothesis that CHL might reduce cancer rates. Although not yet proven, this hypothesis has generated a great deal of

TABLE II. Incidence of External Anomalies Observed in CHL-Exposed Mouse Fetuses

	Dose (mg/kg b.w.)			
	0	20	40	50
Malformed litters;examined litters (%)	2/18 (11)	1/17 (6)	2/11 (18)	1/5 (20)
No. of malformed fetuses/total examined (%)	2/225 (0.88)	1/180 (0.55)	4/118 (3.39)	2/55 (3.64)
External defects [no. of malformed fetuses/total examined %]				
Cleft lip and cleft palate	0/225 (0)	0/180 (0)	0/118 (0)	1/55 (1.81)
Exencephaly and open eyes	0/225 (0)	0/180 (0)	0/118 (0)	1/55 (1.81)
Dolicocephaly	0/225 (0)	0/180 (0)	3/118* (2.54)	0/55 (0)
Polydactyly	0/225 (0)	0/180 (0)	1/118 (0.84)	0/55 (0)
Hind limb hypoplasia	0/225 (0)	0/180 (0)	1/118 (0.84)	0/55 (0)
Open eyes	2/225 (0.89)	0/180 (0.55)	0/118 (0)	0/55 (0)

*Significantly different from the control group ($P < 0.05$). Three cases in the same litter.

TABLE III. Incidence of Ossification Points Present in Fetuses of CHL-Treated Mice (Mean \pm S.E.M.)

	Dose (mg/kg b.w.)			
	0	20	40	50
No. of fetuses examined	146	120	69	36
Ossification points present in:				
Forelimbs (phalanges)	16.3 \pm 0.09	15.2 \pm 0.19	16.2 \pm 0.11	16.2 \pm 0.12
Hindlimbs (metatarsals)	17.3 \pm 0.14	16.5 \pm 0.14	17.6 \pm 0.15	16.7 \pm 0.27*
Sternbrae	6.0 \pm 0.02	6.0 \pm 0.01	6.0 \pm 0.02	6.1 \pm 0.04

*Significantly different from the control group ($P < 0.05$).

work with respect to the possible role of CHL as either an anticarcinogenic or antimutagenic compound. In general, CHL has been regarded as non-toxic, non-mutagenic, non-genotoxic, and non-clastogenic in vivo and in vitro systems [1,2,8,10].

The results of our study using the same antigenotoxic doses of CHL, administered i.p. on day 8 of gestation reveal that the compound induces embryoletality in a dose-dependent manner as well as some skeletal variations. These data seem to indicate the existence of differential sensitivity, because CHL was non-toxic for adult animals [3-8], but it was toxic for animals in intrauterine development.

One of the most outstanding findings was the presence of *green rings* on the uterus of CHL-treated females. Results obtained in the present study (Figs. 2 and 3) suggest that these rings are related to CHL-induced embryo death and early resorption (Fig. 2).

TABLE IV. Incidence of Skeletal Variations in Fetuses of CHL-Treated Mice

	Dose (mg/kg b.w.)			
	0	20	40	50
No. of fetuses examined	146	120	69	36
Rib damage [no. of damaged fetuses/total examined %]				
Low damage ^a	0/146 (0)	2/120 (1.7)	5/79* (6.3)	0/36 (0)
Medium damage ^b	0/146 (0)	0/120 (0)	1/79 (1.3)	2/36* (5.5)
High damage ^c	0/146 (0)	0/120 (0)	2/79 (2.5)	4/36* (11.1)
Sternebrae damage [no. of damaged fetuses/total examined %]				
Low damage ^d	10/146 (6.85)	16/120 (13.3)	6/79 (7.6)	1/36 (2.8)
Medium damage ^e	20/146 (13.7)	21/120 (17.52)	14/79 (17.7)	4/36 (11.1)
High damage ^f	1/146 (2.7)	0/120 (0)	2/79 (2.5)	2/36 (8.3)
Spine damage	5/146 (3.42)	2/120 (1.67)	7/79 (8.9)	9/36* (24.9)

^a1-2 damaged ribs.^b3-8 damaged ribs.^c9-26 damaged ribs.^ddamaged sternbrae.^e2-3 damaged sternbrae.^f4-6 damaged sternbrae.*Significantly different from the control group ($P < 0.05$).

Similar results have been reported in studies using other substances such as trypan blue, which also induced embryo death and left blue colored rings at implantation sites [19,20]. These colored rings may be related to the presence of endometrial glands found at implantation sites only in rodents. Unlike humans and other mammals, the mouse yolk sac is surrounded by the endometrium, which forms a ring, and there is substance interchange between the yolk sac and the uterus. These glands are indicators of previous resorptions (endometrial gland scars); they are round on the external surface along the uterus (on the endometrial margin) and grow at implantation sites, persisting regardless of embryo or fetal survival [20-22]. On the other hand, the presence of *green rings* can be related to the interaction of CHL with the endometrial glands, indicating the implantation sites in a manner similar to those observed with trypan blue. Our results suggest that embryo death may be due to either the interaction between CHL and some general control mechanisms of embryo development, or to the blocking of some embryo-maternal interactions at the endometrial gland level; this possible interaction, however, needs to be evaluated.

There are no data available in the scientific literature regarding the effects of CHL on embryo development or maternal interactions. Khera [23,24] described that the administration of an exogenous chemical to pregnant animals may exceed the detoxification and elimination capability of the mother, altering certain physiological processes and thus may modify the normal development of the offspring, even

causing death. However, Chahoud et al. [25] demonstrated that developmental effects are not always associated with maternal toxicity.

Dolicocephalia has been described as an indicator of the direct action of teratogenic agents on the central nervous system [26]; in our experiments, all fetuses with this malformation occurred in only one litter (40 mg/kg CHL). Although our results do not suggest that the occurrence of this anomaly was associated with CHL treatment, the matter requires further study.

Although experimental teratology protocols have been well established, in our study we were interested in evaluating the toxic effect of a single high dose of CHL used in our previous studies [4, 8, 9, 16]. Although the choice of a route of administration should consider the expected route of human exposure, we use the i.p. as the route of administration because we know that in antimutagenic experiments, the degree of protection varied with the toxicant and the mode of administration of CHL, and oral administration subjects the test substance to limitations of absorption and metabolism that are similar but not necessarily identical to those humans [27]. On the other hand, we chose gestational day 8 as the treatment day based two facts: that the period of organogenesis begins on that day and that it has been found that the administration of a single dose on days 8 or 9 induces alterations on ossification of the parietal, occipital, xiphoid, and metatarsal phalanges [28-31].

Bone anomalies are good indicators of embryo and fetal developmental damage in both rats and mice. Such anomalies are sensitive indicators because they can be detected in fetuses without external macroscopic malformations [32,33]. The induction of skeletal anomalies was higher than that of external anomalies, which was also unrelated to CHL treatment.

When the pregnant females were treated with 40 and 50 mg/kg of CHL, fetuses with malformed ribs were observed. Spinal alterations (fused or deviated vertebrae, or "S" shaped spine) were found only among the fetuses of mice treated with 50 mg/kg CHL. These results suggest that such alterations may be associated with embryotoxicity [28,34,35].

Because the frequency of both external and internal alterations reported here was low and unrelated to CHL administration, we suggest that they were caused by embryotoxicity probably induced by the interaction between the CHL and the yolk sac, although the spontaneous occurrence of some of these malformations has been reported in mice, particularly in the CD-1 strain [36-38].

Although CHL was given in a single dose on day 8 i.p., the results in this study indicate that CHL is associated with significant embryo lethality in a dose-dependent manner. All of the supposed developmental effects of CHL are only observed at doses that are possibly associated with significant treatment-induced maternal toxicity. Therefore, further research should be done to evaluate the effects of administering CHL for various gestational days through the oral route.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank F. Chávez-Gallegos, and A. Gordillo-Martínez for his excellent technical assistance. We also extend our appreciation to J.F. Sánchez-Ruiz for the statistical analysis.

REFERENCES

1. Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutat Res* 1994;318:239-247.
2. Ong TM, Whong WZ, Stewart J, Brockman HE. Comparative antimutagenicity of five compounds against five mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutat Res* 1989;222:19-25.
3. Ghosh AK, Sen S, Sharma A, Talukder G. Comparative efficacy of chlorophyllin in reducing cytotoxicity of some heavy metals. *Biol Metals* 1991;4:158-161.
4. Morales-Ramírez P, García-Rodríguez MC. In vivo effect of chlorophyllin on γ -ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutat Res* 1994;320:329-334.
5. Singh A, Singh SP, Bamezai R. Postnatal effect of acroline on chlorophyllin-modulated hepatic biotransformation system enzymes in suckling neonate and lactating mice. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1996;16:89-96.
6. Te C, Gentile JM, Baguley BC, Pearson AE. In vivo effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide. *Int J Cancer* 1997;70:84-89.
7. Kimm SG, Surh Y-J, Miller JA. Inhibitory effects of chlorophyllin on micronucleus formation induced by ethyl carbamate and its proximate and ultimate carcinogenic forms in mouse peripheral reticulocytes. *Environ Mol Mutagen* 1999;34:57-60.
8. García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res* 2001;496:145-151.
9. Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Rodríguez-Reyes R. Effect of chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. *Mutat Res* 1996;367:51-56.
10. Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow in vivo. *Mutat Res* 1993;301:33-38.
11. Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Chlorophyll and chromosome breakage. *Mutat Res* 1996;360:187-191.
12. Arimoto S, Fukuoka S, Itome C, Nakano H, Rai H, Hayatsu H. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenicity. *Mutat Res* 1993;287:293-305.
13. Dashwood RH, Yamane S, Larsen R. Study of the forces stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens. *Environ Mol Mutagen* 1996;27:211-218.
14. Dashwood RH. Chlorophylls as anticarcinogens. *Int J Oncol* 1997;10:721-727.
15. Breinholt V, Arbogast D, Loveland P, Pereira C, Dashwood R, Hendricks J, Bailey G. Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B₁ bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability vs target organ protective mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;158:141-151.
16. Morales-Ramírez P, Mendiola-Cruz MT. In vivo radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells. *Mutat Res* 1995;344:73-78.
17. Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol* 1964;39:61-63.
18. Wilson JG. Embryological considerations in teratology. In: Wilson JG, Warkany J, editors. *Teratology: principles and techniques*. Chicago: University of Chicago Press; 1965. p 251-277.
19. Psychoyos A. Hormonal control of ovum implantation. *Vitam Horm* 1973;34:215-242.
20. Hamburg M, Erlich M, Nathanson G, Pesetsky I. Some additional observations relating to the mechanism of trypan blue induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;31:191-200.
21. Schluter G. Ultrastructural changes of the early visceral yolk sac layer of mouse embryos after maternal injection of trypan blue. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977;42:411-416.
22. Gude DW, Cosgrove GE, Hirsch, GP. *Histological Atlas of the laboratory mouse*. New York: Plenum Press; 1982.
23. Khera KS. Maternal toxicity-A possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology* 1984;29:411-416.
24. Khera KS. Maternal toxicity: A possible Etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology* 1985;31:129-153.
25. Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L, Faqi AS. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 1999;13:375-381.

26. Stricker M, Meulen JV, Raphael B, Mazzola R. Craniofacial malformations. Longman Group UK limited, Churchill Livingstone Inc. Pub., New York.1990.
27. CoxGD, Chengelis CHP, editors. Animal models in toxicology. New York: Marcel Dekker, Inc. 1992.
28. Taylor P. Practical teratology. London: Academic Press. 1986.
29. Altamirano-Lozano M, Camacho-Manzanilla C, Loyola-Alvarez R, Roldan-Reyes E. Mutagenic and teratogenic effects of diazinon. *Rev Int Contam Ambient* 1989;5:49-45.
30. Colomina MT, Sanchez DJ, Esparza JL, Domingo JL. Prenatal effects of caffeine and restraint stress in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;220:106-111.
31. Colomina MT, Albina ML, Sanchez DJ, Domingo JL. Interactions in developmental toxicology: combined action of restraint stress, caffeine, and aspirin in pregnant mice. *Teratology* 2001;63: 144-151.
32. Millen JW, Wollman HM. Congenital malformations of the skeletal system. In: effects of drugs on the fetus (Int. Congr. Series No. 64). Amsterdam: Excerpta Medica Foundation. 1963.
33. Aliverti V, Bouanomi L, Giavini E, Leone VG, Mariani L. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology* 1979;20:237-42.
34. Mirkes PE. Cyclophosphamide teratogenesis: a review. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1985;5: 75-88.
35. Campbell JT, Kaplan FS. The role of morphogens in endochondral ossification. *Calcif Tissue Int* 1992;50:283-9.
36. Perraud J. Levels of spontaneous malformations in the CD rat and CDI mouse. *Lab Anim Sci* 1976;26:293-300.
37. Palmer AK. Sporadic malformations in laboratory animals and their influence on drug testing. In: Klingberg A, Abramovici A, Chemke J, editors. Drug and fetal development. Kluwer Acad. Pub. 1972: p 45-60.
38. Fritz H, Grauwiler J, Hummler H, Lindt S, Schön H. Collection of control data from teratologic experiments on mice, rats and rabbits. *Arzneim Forsh* 1978;28:1410-1413.