



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA
CLOROFILINA ADMINISTRADA POR
DIFERENTES VÍAS, SOBRE EL DAÑO AL
ADN Y LAS ALTERACIONES EN EL DESARROLLO
DE FETOS DE RATÓN
TRATADOS CON TRIÓXIDO DE CROMO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

GABRIELA VIANEY LÓPEZ SALINAS

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

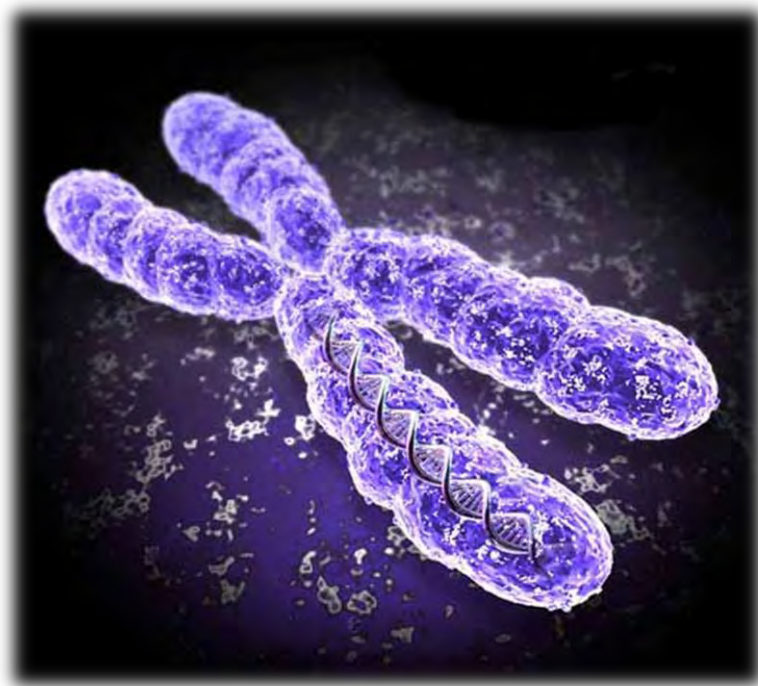


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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 (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Proyecto PAPIIT-IN209309

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Ma. del Carmen García Rodríguez, directora de esta tesis, por el apoyo, conocimiento y comprensión, y sobre todo por todo su tiempo invertido en la dirección y corrección de esta tesis.

A los miembros del Jurado

M.C. Marisela Valdez Ruiz

Dra. Ma. del Carmen García Rodríguez

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Biól. Carlos Martínez Montoya

Dra. Elia Roldan Reyes

Por su contribución a la revisión y mejoramiento de esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos que de manera directa o indirecta participaron leyendo, corrigiendo o simplemente opinando o dando ánimo.

DEDICATORIAS

Con mucho cariño dedico esta tesis principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado en todo momento conmigo. Gracias por todo mamá y papá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome. Los quiero y este trabajo es para ustedes.

A mi hermano Daniel, por estar conmigo, apoyarme siempre y ayudándome con tu atención aunque no entendieras nada.

A mi abuelo Roberto Salinas (Q.D.E.P.) quien pese a su enfermedad, en momentos estuvo al pendiente de mí y de mis estudios.

A mis abuelas, quienes siempre preguntaban como iba en la escuela, por sus cuidados y todo lo que me han enseñado.

A mis tíos Adriana y Oscar, que siempre me han dado su apoyo incondicional, ustedes me han enseñado que siempre hay tiempo para relajarse y sobre todo siempre han estado al pendiente de mí. Muchas gracias por todo. Los quiero.

A mi prima Anne, que es la hermana pequeña que nunca tuve y con quien he compartido muchas cosas, y aunque todavía eres pequeña siempre querías intentar ayudarme en lo que fuera. Siempre estaré ahí para ti. Te quiero mucho.

A mi tío Roberto, quien desde que era pequeña me ayudaste en todo lo que podías.

A mi familia por el cariño y confianza que me brindan en todo momento, pero sobre todo por estar cada uno a su manera, apoyándome para alcanzar mis objetivos.

A Nancy y Paty por escucharme, ayudarme, corregirme y cometer errores juntas, también gracias por todas las risas, diversión y desestress que me han dado. Las quiero mucho.

A mis amigas Ana Rosa, Michelle y Leticia por todos los momentos que hemos compartido desde hace mucho tiempo y con quienes he aprendido que encontrar un buen amigo es difícil, pero aun más olvidarlo.

A todos ustedes les agradezco haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Les agradezco el haberme brindado todo su apoyo, colaboración, ánimo, y sobre todo cariño y amistad. Han sido la fuente de mi inspiración y motivación para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depara un futuro mejor.

Índice de contenido

	Página
Resumen.....	i
Índice de abreviaturas.....	ii
1. Introducción.....	1
1.1 Clorofilina.....	2
1.2. Daño Genotóxico.....	6
1.3 Evaluación de genotoxicidad.....	10
1.4. Alteraciones en el Desarrollo.....	12
2. Planteamiento del problema.....	14
3. Objetivos.....	15
3.1. General.....	15
3.2. Particulares.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Material y método.....	17
5.1. Animales.....	17
5.2. Reactivos.....	17
5.3 Tratamientos.....	17
5.4. Selección de las dosis de CrO ₃ y CFL.....	18
5.5. Tiempos de evaluación.....	18
5.6. Evaluaciones del daño al ADN y citotoxicidad.....	19
a) Preparación de laminillas.....	19
b) Toma de muestras.....	19
c) Evaluación de laminillas.....	21
5.7. Evaluaciones de las alteraciones en el desarrollo fetal.....	22
a) Evaluación de alteraciones externas.....	22
b) Evaluación de alteraciones esqueléticas.....	22
5.8. Análisis estadístico.....	23
6. Resultados.....	24
6.1. Estudios preliminares.....	24
6.2. Efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño genotóxico inducido por CrO ₃ en hembras preñadas.....	25
6.3. Efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño genotóxico inducido por CrO ₃ en fetos obtenidos el día 18 de gestación.....	31

6.4. Efecto de la CFL y del CrO ₃ sobre la frecuencia de EPC con respecto a la frecuencia de ENC en hembras preñadas	32
6.5. Efecto de la CFL y del CrO ₃ sobre la frecuencia de EPC con respecto a la frecuencia de ENC en fetos obtenidos en el día 18 de gestación	34
6.6. Seguimiento del peso materno	35
6.7. Efectos de la CFL administrada por diferentes vías sobre las camadas de hembras tratadas con CrO ₃	37
6.8. Efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre las alteraciones en el desarrollo fetal inducidas por el tratamiento de CrO ₃ a hembras preñadas	39
7. Discusión de resultados	49
8. Conclusiones.....	62
9. Referencias.....	63

Resumen

La clorofila y sus sales de sodio y cobre, llamadas clorofilinas (CFL) han mostrado en diferentes sistemas de prueba una gran actividad antimutágena y anticancerígena. Aunque la clorofila es el principal pigmento que le da el color verde a los vegetales, es más empleada la CFL, debido a que la clorofila es poco estable y poco soluble en el agua. Se ha observado que la administración previa de CFL por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones hembras adultas tratadas con CrO_3 disminuye la frecuencia de micronúcleos (MN), de ahí que en el presente trabajo se estudio si los mecanismos de protección del daño al ADN de la CFL persisten durante la gestación (madres y fetos) al ser administrada por diferentes vías, así como sus efectos sobre las alteraciones del desarrollo inducidas por CrO_3 . Se emplearon grupos de hembras preñadas de ratón de la cepa CD-1, a las que se les trató con CFL (20mg/kg), CrO_3 (20mg/kg) o CFL y CrO_3 . La ruta de administración de la CFL fue vía i.p. u oral (sonda y acceso libre) mientras que la del CrO_3 vía i.p. Todos los tratamientos fueron administrados en el día 15 de gestación. Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal en las hembras adultas a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos, y en los fetos en el día 18 de gestación de la vena aorta por decapitación, las cuales fueron colocadas en laminillas previamente tratadas con naranja de acridina. Para la evaluación del daño al ADN, se consideró la frecuencia de MN y para la citotoxicidad se considero la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) con respecto a los normocromáticos (ENC). El daño en el desarrollo fue evaluado mediante la identificación de alteraciones externas y esqueléticas. La aplicación del CrO_3 en el día 15 de gestación indujo daño genotóxico tanto en las hembras como en los fetos, mediante el incremento en la frecuencia de MN (incremento de alrededor de 8 MN). La administración de CFL solo incrementó de manera marginal la frecuencia de MN (alrededor de 2 MN) en los fetos cuando se administró por vía i.p., lo cual puede estar relacionado con la afinidad de la CFL hacia las glándulas metriales cuando es administrada por esta vía. Cuando se administro previamente la CFL a la aplicación de CrO_3 , se disminuyeron las frecuencias de MN tanto en las hembras como en los fetos, siendo mayor la "protección" cuando se administró por sonda y menor cuando se administró por vía i.p. En cuanto al efecto citotóxico evaluado mediante la frecuencia de EPC, con respecto a los ENC no se observaron efectos estadísticamente significativos en las hembras y en los fetos, solo se incremento la frecuencia de EPC en el grupo tratado con la dosis baja de CFL (vía acceso libre) y CrO_3 . Finalmente, la administración de CrO_3 a hembras preñadas incrementa el número de alteraciones externas y esqueléticas en sus fetos; y la administración de CFL previa al tratamiento del CrO_3 reduce selectivamente algunas de las alteraciones externas, dependiendo de la vía de administración y la dosis.

Índice de abreviaturas

AC	Aberraciones cromosómicas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CFL	Clorofilina cupri-sódica
Cr	Cromo
ECETOC Chemicals	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ENC	Eritrocitos Normocromáticos
EPA	Environmental Protection Agency
EPC	Eritrocitos Policromáticos
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Food and Drug Administration
IARC	International Agency for Research Cancer
i.p.	Intraperitoneal
MN	Micronúcleo(s)
NA	Naranja de Acridina
NIF	Frecuencia Neta de Inducción de MN
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS	Organización Mundial de la Salud
RL	Radicales libres

1. Introducción

La modulación y protección de daño al ADN son temas que han llamado la atención debido al riesgo de exposición a diversos agentes inductores de daño genético. Durante las primeras pruebas las sustancias que se emplearon como los compuestos del selenio resultaron tóxicos, por lo que fueron dejados de lado. Tiempo después, Phillips en 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 estudios, se planteo 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 de daño al ADN (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007). A partir de este estudio resurgen con gran éxito los estudios de la protección y modulación de daño al ADN, para lo cual se han probado principalmente extractos de frutas y vegetales, en los que se ha observado actividad antimutágena (Kada *et al.*, 1978; Morita *et al.*, 1978; Kada *et al.*, 1984; Terwel y Van der Hoeven, 1985).

Posteriormente, se han realizado estudios en los que se identificaron particularmente las sustancias componentes de las frutas y vegetales que presentaban una mayor actividad antimutagénica, tales como los pigmentos (beta-carotenos y la clorofila) así como algunas vitaminas (A, C, D y E), siendo esta propiedad más marcada para el caso de la clorofila (Cuadro 1) (Lai, 1979; Lai *et al.*, 1980; Whong *et al.*, 1988; Ong *et al.*, 1989; Gentile y Gentile, 1991; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001; Ferguson *et al.*, 2004; Mendez-Pinto *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Principales fuentes alimenticias de algunos constituyentes de la dieta descritos como antimutágenos y anticancerígenos (tomado de García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007)

Sustancia protectora de daño mutágeno	Principales fuentes alimenticias
Vitamina A	Margarina, hígado
Beta carotenos	Vegetales rojos y amarillos (zanahoria, jitomate, etc)
Vitamina C	Principalmente en cítricos
Vitamina E	Aceites vegetales y harinas
Selenio	Carnes y huevo
Clorofila y sus sales	Vegetales verdes
Indol-3-carbinol	Crucíferáceas
Capsaicina	Chile
Fibra vegetal	Vegetales fibrosos (piña, melón, etc)
Organosulfuro	Ajo
Antraquinona	Sábila
Flavonoides	Uvas rojas, vinos maduros

1.1 Clorofilina

La clorofila (Figura 1a) es un pigmento natural que le da el color verde a las hojas de los vegetales. Fue aislada en 1817 por los químicos Pelletier y Caventou de Francia. Debido a que es poco estable y poco soluble en agua, en estudios experimentales han preferido trabajar con sus sales llamadas clorofilinas (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 alquíl de los grupos carbometoxíl. Debido a que el magnesio del núcleo de la clorofila es muy inestable, es remplazado 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).

De todas las clorofilinas la más empleada terapéuticamente y en la investigación biológica es la clorofilina cupri-sódica (CFL) (Figura 1b), la cual es una sustancia microcristalina verde-azul oscura que produce el efecto Tyndall en solución acuosa, tiene una banda de absorción característica entre 630 a 688nm, y es muy soluble en agua y alcohol (Kephart, 1955; Oster *et al.*, 1964; Newmark, 1987).

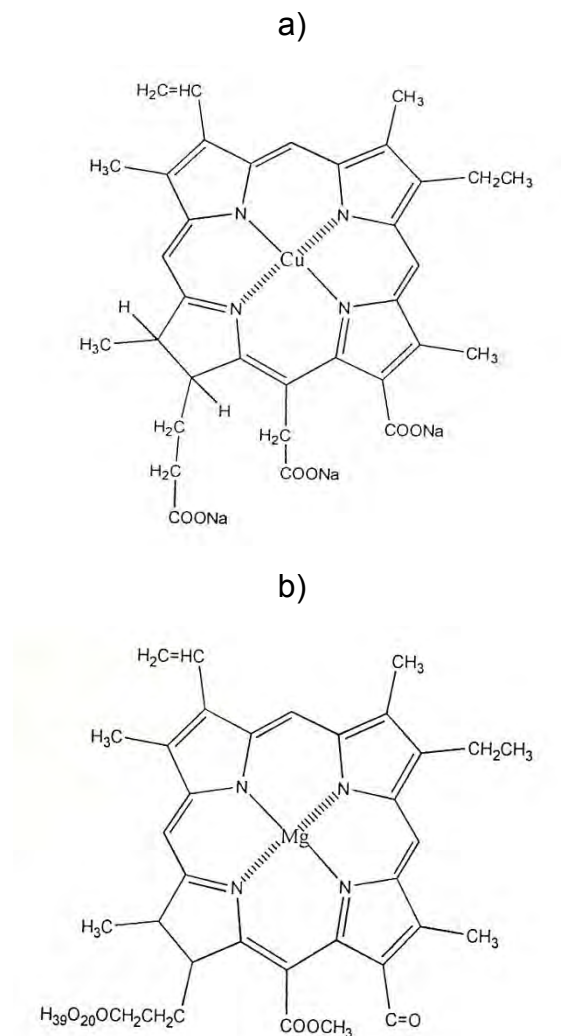


Figura 1. Estructura química de la clorofila (a) y de la clorofilina cupri-sódica (b) (tomada de García-Rodríguez y Altamirano, Lozano 2001)

A lo largo del tiempo las clorofilinas han sido estudiadas ampliamente en diferentes campos y se le han atribuido diferentes propiedades como lo son: tratamiento para la anemia, tratamiento para la hipertensión, acelerador de la

coagulación sanguínea, anti-inflamatorio, agente bacteriostático y fungicida, tratamiento para la pancreatitis, tratamiento para el control de peso y principalmente que es un agente antimutagénico y anticarcinogénico (Kephart, 1955; Oda *et al.*, 1971; Krasnikova, 1973; Nakeeb y Yousef, 1974; Kojima, 1978; Nagai *et al.*, 1983; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2007).

La actividad antimutágena tanto de la clorofila como de la CFL, se ha probado en diferentes sistemas de prueba *in vitro*, como el ensayo de Ames con *Salmonella* y activación de microsomas y en líneas celulares de mamíferos, así como en estudios *in vivo*, en donde se ha observado protección del daño al ADN. De igual manera, en estudios realizados en salmones jóvenes se ha observado que la administración de CFL disminuye la hepatocarcinogenicidad inducida por aflatoxinas B₁ y B₂, así como el desarrollo del cáncer en el colon de ratas (Arimoto *et al.*, 1980; Breinholt *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2001; García-Rodríguez *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha observado que la CFL al ser combinada con ciclofosfamida disminuye los efectos genotóxicos en los organismos sin alterar el efecto antineoplásico (Te *et al.*, 1997).

También, se ha mostrado que la CFL tiene actividad anticlastogénica, ya que se ha observado en medula ósea y sangre periférica de ratón, que inhibe la inducción de aberraciones cromosómicas (AC) y micronúcleos (MN), causado por sales metálicas inorgánicas y por nicotina (Ghosh *et al.*, 1991; Palit *et al.*, 1991; Sen *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1993).

Otra de las propiedades que se han observado es su capacidad como radioprotector, puesto que es capaz de proteger de algunos efectos inducidos por radiación gamma en el ratón de la inducción de intercambios entre cromátidas hermanas, en células de la medula ósea y en espermatogonias (Morales-Ramírez y García-Rodríguez, 1994; Morales-Ramírez y Mendiola-Cruz, 1995; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001). A partir de los resultados obtenidos con respecto a las propiedades de la CFL, se han propuesto diferentes mecanismos

de protección, los cuales al parecer están en función del agente, de los sistemas de prueba (*in vitro*, *in vivo* o *in situ*) y de la dosis (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001).

Principales mecanismos de protección de daño al ADN de la CFL:

a) Inhibición de la función enzimática del sistema de activación de 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 xenotoxinas (Sato *et al.*, 1984; Imai *et al.*, 1986).

b) Interactúa con el mutágeno y forma complejos:

Estudios realizados con espectrofotometría muestran que la CFL forma compuestos moleculares no covalentes con aminas heterocíclicas, con lo cual la CFL limita la biohabilidad e carcinógenos y mutágenos (Dashwood y Guo, 1992; 1993).

c) Impide la formación de enlaces covalentes de los agentes mutagenos 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).

d) Captura de radicales libres:

Hadnagy y Seemayer (1998), obtuvieron las primeras evidencias directas de que la CFL inactiva RL y ERO's. Tomando en consideración algunas de las características físico-químicas de la CFL como lo son su alto grado de resonancia y deslocalización de electrones (Simic, 1988; Arimoto *et al.*, 1993).

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, UNAM, han mostrado que la CFL disminuye o inhibe el daño causado al ADN inducido por metales pesados como lo son algunos compuestos del Cr(VI) en organismos adultos. Por otro lado, también se ha identificado que los compuestos de Cr (VI) son sustancias que han sido ampliamente estudiadas por la asociación que tienen con la inducción de cáncer y de alteraciones en recién nacidos (Hartwig, 1995; García-Rodríguez *et al.*, 2001; O’Brien, *et al.*, 2003; García-Rodríguez, 2006).

1.2. Daño Genotóxico

Los agentes químicos son compuestos capaces de modificar el material hereditario de las células vivas, como se sabe los cambios genéticos están asociados con efectos adversos a la salud humana, estos incluyen mutaciones genéticas, reordenamientos y AC (FDA, 2000). La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varios pasos. Durante ellos, 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 si mismo, o puede ser activado por las enzimas metabólicas, en cuyo caso es de acción indirecta. Se da entonces la interacción con el ADN produciéndose un daño, que puede ser reparado eficiente o deficientemente (Ames, 1989).

El daño genotóxico es un proceso crítico en la inducción del cáncer y también puede intervenir en la aparición de defectos de nacimiento y muerte fetal, por ello es importante detectar a tiempo los posibles daños ocasionados por algún agente genotóxico, y para lograrlo se han generado pruebas como: evaluación de mutaciones génicas, alteraciones en la integridad del ADN, AC y MN (Bender, 1980; Cole y Skopek, 1994; Hemmink *et al.*, 1994).

A la inducción de cáncer y daño genotóxico se la ha relacionado con el estrés oxidante, ya que la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y los radicales libres (RL) afectan macromoléculas biológicas como los lípidos, los carbohidratos y el ADN. Particularmente, las ERO's pueden producir rupturas en el ADN y el daño permanente al ADN puede ocasionar errores en su replicación e inestabilidad genómica, las cuales también se observan en la carcinogénesis y alteraciones del desarrollo embrionario y fetal (Eriksson y Borg, 1991; Desesso *et al.*, 1994; Klauning y Kamendulis, 2004).

Así como en la dieta podemos encontrar sustancias benéficas para nuestro organismo, también existen componentes a los que estamos expuestos como el tabaco, el alcohol, la contaminación, los químicos industriales y los metales pesados etc. que causan daño al ADN (World Cancer Research Fund, 2008). Estos agentes pueden ocasionar no solo cáncer sino también enfermedades crónicas degenerativas, autoinmunes, inflamatorias, cardiovasculares y neurodegenerativas (Surh y Ferguson, 2003).

Particularmente, los metales pesados son sustancias que han sido ampliamente estudiadas, debido a que forman parte de una variedad de compuestos utilizados en la industria, pero también con la asociación que tienen con la inducción de cáncer y de alteraciones en recién nacidos. Dentro de los metales pesados más estudiados se encuentran los compuestos de Cr (VI) (IARC, 1990; Hartwig, 1995).

Los compuestos de cromo tienen un papel importante en la vida de los seres vivos ya que son elementos esenciales en funciones bioquímicas como por ejemplo para el metabolismo de lípidos y glucosa, también se ha demostrado que tiene efectos sobre la actividad enzimática, además de que interviene en el crecimiento de los seres vivos (Mertz, 1969; Carson *et al.*, 1987; ATSDR, 2000; O'Brien *et al.*, 2003; García-Rodríguez, 2006).

El Cr está de manera ubicua en el ambiente y se encuentra naturalmente en el suelo, rocas y organismos vivos. Existe principalmente en dos estados de valencia, trivalente (Cr (III)) y hexavalente (Cr (VI)), esta última es producida principalmente por fuentes antropogénicas. El Cr (III) es un micronutriente importante en la actividad biológica de la insulina (Anderson, 1981), y en consecuencia puede ser encontrado en suplementos dietéticos (O'Brien *et al.*, 2003).

El Cr se encuentra en todos los tejidos humanos desde la vida fetal. Se ha observado que existe una alta concentración de Cr durante el segundo y séptimo mes del desarrollo fetal, esto debido posiblemente a la alta transferencia de este metal de la madre al feto, por lo que se cree que el Cr juega un papel importante en el desarrollo (Gómez y Villalobos, 1983).

Los efectos biológicos de la 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; Lui y Dixon, 1996; De Flora 2000; P.H.S., 2000; O'Brien *et al.*, 2003)

El Cr (VI) es biológicamente activo y sus mecanismos bioquímicos están relacionados en el ciclo redox mediante la producción de ERO's. El Cr (VI) pasa fácilmente la membrana celular por los canales de proteínas, en donde, algunos componentes pueden ser reducidos intracelularmente por el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), la glutatión reductasa, los carbohidratos, el ácido ascórbico, el citocromo P-450, el aldehído oxidasa entre otros, produciendo reactivos intermedios como el Cr (V), Cr (IV) y finalmente Cr (III), liberando ERO's las cuales inducen daño genotóxico (Figura 2) (Shi y Dadal, 1992; O'Brien *et al.*, 2003).

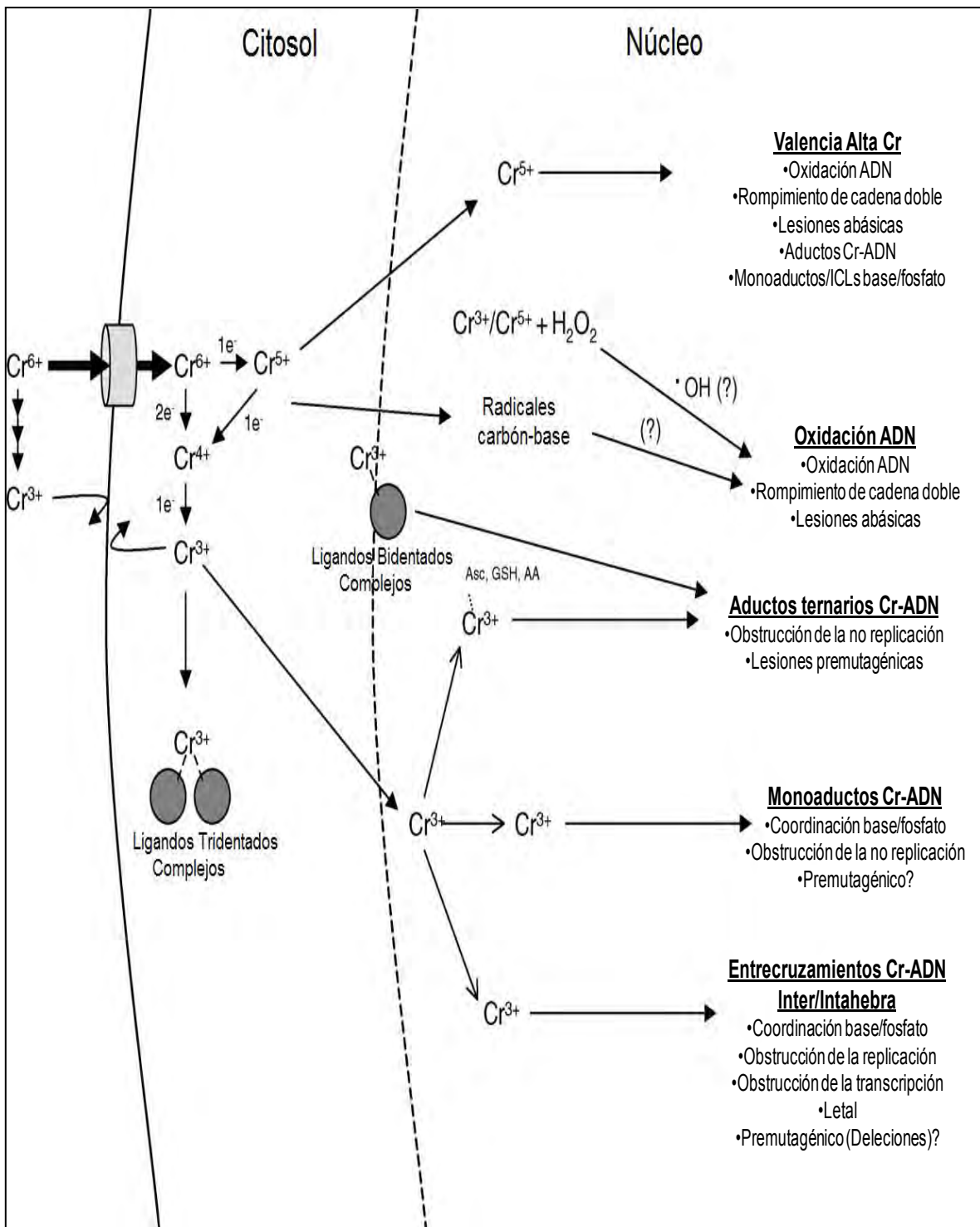


Figura 2. Principales rutas involucradas en las lesiones genéticas causadas por el Cr (VI) (O'Brien et al., 2003 modificada)

Se ha estimado que la exposición a elevadas concentraciones de Cr, inducen 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 frecuencia de malformaciones en 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).

Diversos estudios han documentado el daño genotóxico de los compuestos de Cr (VI), en diferentes sistemas de prueba mediante el incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC), de MN y de mutaciones puntuales. También se ha observado inducción de intercambios de cromátidas hermanas y de transformación celular, así como 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 planteo que el Cr (VI) tiene la habilidad de atravesar la placenta (EPA, 1984; Trivedi *et al.*, 1989; De Flora *et al.*, 1990; IARC, 1990; De Flora, 2000; P.H.S., 2000; O'Brien *et al.*, 2003).

1.3 Evaluación de genotoxicidad

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 c) ensayos *in vivo* (médula ósea o sangre periférica; frecuencia de MN). 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 (Mavournin, 1990; Müller *et al.*, 1999).

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; Müller *et al.*, 1999; Krishna y Hayashi, 2000).

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 núcleos formados por cromatina cuando fragmentos de cromosomas o cromosomas completos se separan durante la anafase y no son incorporados al núcleo de la célula hija durante la división celular (FDA, 2000).

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

- a) Rompimientos cromosómicos que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno).
- b) Daño a nivel de proteínas involucradas directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas (daño aneuploidógeno).

1.4. Alteraciones en el Desarrollo

Se ha descrito que el daño genotóxico puede ser indicativo indirectamente de riesgo carcinogénico o teratogénico, ya que pueden estar implicados los mismos mecanismos de inducción de daño. Un estudio realizado *in vitro* por Eriksson y Borg en 1991, refleja que las alteraciones del desarrollo pueden disminuir en el tejido embrionario, si este es capaz de capturar radicales libres, y a partir de esto, Desesso *et al.*, en 1994 probaron el D-mannitol en conejos y observaron que reducía la toxicidad inducida por hidroxurea durante el desarrollo embrionario.

Varias organizaciones legisladoras internacionales como la EPA, la FDA y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han desarrollado y recomendado diversos protocolos para evaluar los efectos de los agentes químicos sobre el proceso reproductivo, plateando principalmente el uso de la rata y el ratón como modelos experimentales. Estos 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)

Debido a que el organismo materno provee el desarrollo embrionario con el ambiente físico, los nutrientes y mecanismos para la eliminación de los desechos metabólicos, el estado fisiológico de la madre afecta su habilidad para proveer estos requerimientos para el desarrollo del embrión (Desesso, 1987). Ciertamente las alteraciones en el material genético pueden resultar en muerte celular, pero es importante considerar la posibilidad de que estas mutaciones producidas por algunos agentes pueden afectar a células vivas tanto de la madre como del embrión y en consecuencia al desarrollo embrionario (Scialli, 1992; García-Rodríguez, 2006).

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

- 1) Directa; el agente atraviesa la placenta y causa toxicidad en el desarrollo del embrión o feto.
- 2) Indirecta; el agente induce alteraciones en la homeostasis de la madre y por tanto estos desordenes alteran el desarrollo embrionario o fetal (García-Rodríguez, 2006).

Debido a los efectos observados en las crías de hembras que presentan cambios en el estado físico y fisiológico, se ha planeado que es necesario medir signos de toxicidad y de comportamiento materno en la evaluación del daño en el desarrollo embrionario y fetal (Cuadro 2) (Cole *et al.*, 1979; King y Wild, 1979; Khera, 1991; Chahoud *et al.*, 1999; Rutledge, 2000).

Cuadro 2. Signos de toxicidad (Tomada de García-Rodríguez, 2006).

Efectos Maternos	Efectos en los embriones y/o fetos
<ul style="list-style-type: none">• Reducción en el peso corporal• Diarrea, Hipoactividad, etc• Falta de apetito• Disminución en el número de implantes• Aborto• Muerte	<ul style="list-style-type: none">• Cambios en el peso de la placenta• Reducción del peso corporal• Inducción de malformaciones• Alteraciones esqueléticas• Presencia de hematomas• Muerte

2. Planteamiento del problema

Los seres humanos estamos expuestos al daño oxidante en procesos como la respiración, y en la exposición a agentes químicos que generan ERO's. Particularmente, los compuestos de cromo (VI) han sido ampliamente estudiados por estar relacionados con la inducción de daño genotóxico, cáncer y alteraciones del desarrollo embrionario y fetal, describiéndose como el principal mecanismo de daño la liberación de ERO's y RL durante la reducción de Cr (VI) a Cr (III).

Por otra parte, el uso de antimutágenos y anticancerígenos se ha planteado como una alternativa para prevenir enfermedades relacionadas con daño genético como el cáncer debido a la exposición a diversos agentes inductores de daño al ADN. La clorofila y sus sales, han mostrado en diferentes sistemas de prueba un gran potencial de protección antimutágena y anticancerígena siendo uno de los mecanismos de protección descritos la captura de ERO's y RL.

Se ha sugerido que los mecanismos de daño genotóxico y teratógeno pueden estar relacionados, por lo que se han iniciado estudios sobre protección de daño teratógeno. De ahí que resulte interesante estudiar el efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño inducido al ADN en fetos de hembras tratadas con CrO_3 , así como evaluar si la CFL es capaz de reducir las alteraciones del desarrollo embrionario y fetal inducidas por el CrO_3 .

3. Hipótesis

Se ha mostrado que la administración previa de CFL a ratones hembras adultas tratadas con CrO_3 , es capaz de disminuir el daño inducido al ADN. Si el daño genotóxico es un indicativo indirecto de riesgo carcinogénico o teratogénico, ya que pueden estar relacionados los mecanismos de inducción, entonces si se administra previamente CFL a hembras preñadas tratadas con CrO_3 , se espera que la CFL proteja del daño al ADN producido por el CrO_3 en los fetos y que disminuya la frecuencia de alteraciones del desarrollo embrionario y fetal inducidas por el CrO_3 .

4. Objetivos

4.1. General

Comparar los efectos de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño al ADN y las alteraciones en el desarrollo embrionario y fetal inducido por el CrO_3 , mediante el análisis de la frecuencia de MN y de alteraciones esqueléticas y externas en ratones de la cepa CD-1 obtenidos de hembras tratadas con CrO_3 , en el día 15 de gestación.

4.2. Particulares

- Estudiar el efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño al ADN inducido por el CrO_3 , mediante la evaluación de la frecuencia de MN en fetos.
- Evaluar los efectos del CrO_3 y de la CFL administrada por diferentes vías sobre la citotoxicidad, mediante el análisis de la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) y eritrocitos normocromáticos (ENC) en sangre periférica de fetos.
- Estudiar el efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre el desarrollo embrionario y fetal, mediante la evaluación de alteraciones externas e internas en los fetos de hembras tratadas con CrO_3 .
- Comparar los efectos de la CFL administrada vía i.p. y oral (sonda y acceso libre), sobre el daño al ADN y a las alteraciones en el desarrollo embrionario y fetal, inducidas por la administración del CrO_3 en el día 15 de gestación, mediante la evaluación de alteraciones externas e internas 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 de agua. Se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire controladas, así como periodos de luz oscuridad 12-12 horas.

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 copula y como día cero de preñez. Las hembras se mantuvieron bajo observación y peso supervisado. El registro del peso de las hembras preñadas fue cada tercer día a partir del día cero hasta el día 18 de gestación. A las hembras se les mantuvo bajo observación para identificar signos de toxicidad materna aparentes como la reducción en el peso corporal, diarrea y/o falta de apetito.

5.2. Reactivos

Se utilizó: CFL [CAS No. 110006-34-1] y CrO_3 [CAS No.1333-82-0] obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO. USA)

5.3 Tratamientos

La CFL y el CrO_3 fueron preparadas en solución mediante su disolución en agua destilada estéril. Una vez preparados los reactivos fueron inmediatamente administrados en un volumen de alrededor 0.25ml. En el caso de administración

por acceso libre, la CFL fue diluida en agua potable y la dilución fue colocada en un bebedero obscuro y se midió el consumo cada 24 horas.

Los tratamientos fueron administrados por vía i.p. y oral (sonda y acceso libre). Los grupos testigo fueron tratados únicamente con el vehículo.

5.4. Selección de las dosis de CrO₃ y CFL

Las dosis de CrO₃ y CFL se seleccionaron de acuerdo a los resultados de estudios previos, en donde se observó que la administración de cromo por vía i.p. de 20mg/kg de peso corporal era inductora de daño genotóxico (Chorvatovicová *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1993; García-Rodríguez *et al.*, 2001), mientras que la dosis de 20mg/kg de peso corporal de CFL, 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, 2006).

Se realizó un estudio preliminar para medir la cantidad de agua que consumieron en promedio al día los ratones para calcular la concentración de la solución de CFL que se administró por acceso libre (similar a la administrada por vía i.p. y sonda).

5.5. Tiempos de evaluación

Una vez seleccionadas las dosis del CrO₃, la CFL y las condiciones de trabajo, a grupos de 5 hembras preñadas se les aplicó el tratamiento en el día 15 de gestación con base a los lineamientos de la European Centre Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) y se tomaron muestras cada 24 h hasta el día 18 de gestación (ECETOC, 1983). A las hembras de los grupos CFL y CrO₃ se les administró una dosis de 20mg/kg en un tiempo considerado 0, en el caso del grupo combinado la administración de la CFL fue 4 h antes de la administración de CrO₃ en los grupos i.p. y sonda y para el grupo acceso libre 48 h antes (Figura 3).

5.6. Evaluaciones del daño al ADN y citotoxicidad

a) Preparación de laminillas

Se prepararon laminillas cubiertas de naranja de acridina (NA), las cuales se realizaron antes de la toma de muestras. La NA se preparó en una solución de agua desionizada (1mg/ml). De la solución de NA se tomaron 10µl y se colocaron en portaobjetos precalentados (alrededor de 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

Las muestras de sangre fueron obtenidas de hembras preñadas y de los fetos. A las hembras adultas, se les cortó la punta de la cola con ayuda de unas tijeras, se tomaron de 5 a 8 µl de sangre con una micropipeta y se colocaron directamente en las laminillas previamente preparadas con NA, inmediatamente se colocó un cubreobjetos y se sellaron (Hayashi, 1990). 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 aun 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 (Sigma Chemicals Co.). Transcurridos algunos minutos los fetos fueron decapitados parcialmente y se obtuvieron de 5 a 8 µl de sangre (King y Wild, 1979; Cole *et al.*, 1981), las cuales fueron colocadas en laminillas cubiertas con NA, inmediatamente se colocó un cubreobjetos y se sellaron (Figura 4).

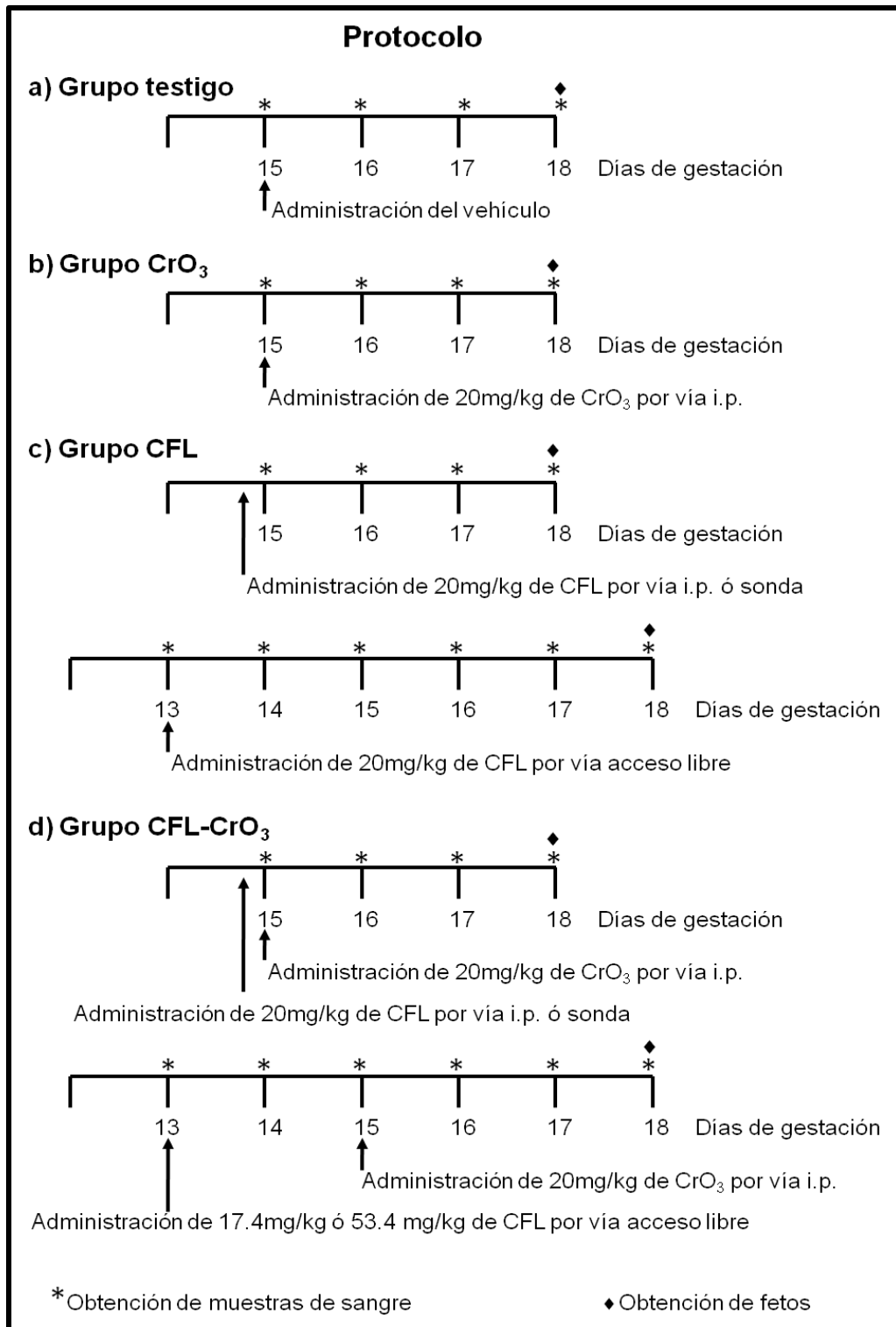


Figura 1. Protocolo empleado para la evaluación de daño en hembras preñadas y fetos

Todas las preparaciones se guardaron en cajas de plástico y en oscuridad, a una temperatura aproximada de 4 °C. El análisis de las preparaciones se realizó después de 12 h de haber sido preparadas, procurando no exceder de 5 días. Se elaboraron 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. La tinción con NA permite diferenciar a los EPC de los ENC, debido a que los primeros se tiñen de color rojo debido a la presencia de ARN ribosomal. Además con esta tinción se pueden identificar los MN, estos contienen ADN el cual se tiñe de color amarillo fluorescente (Figura 4). Para evaluar el daño genotóxico se analizaron 2000 EPC en los que se contaron el número de MN por célula (Hayashi *et al.*, 2000).

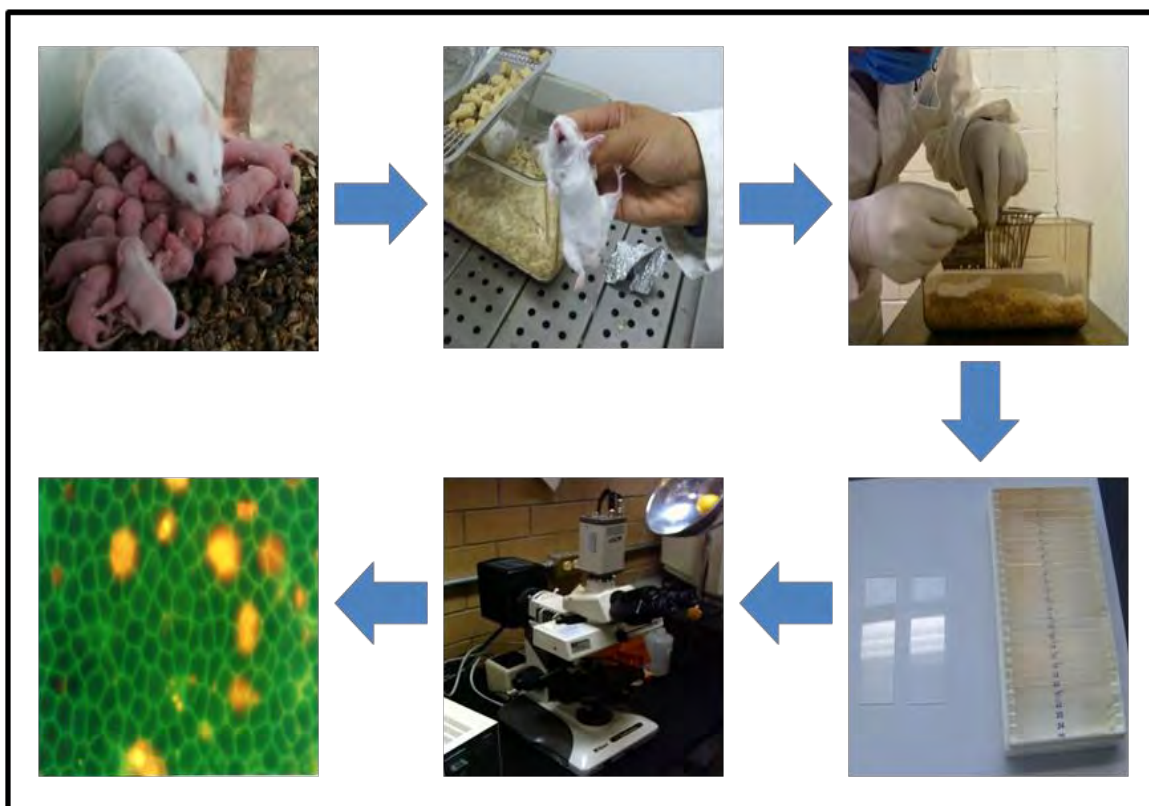


Figura 2. Administración de tratamientos, toma de muestras de MN

5.7. Evaluaciones de las alteraciones en el desarrollo fetal

Las hembras fueron sacrificadas 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 fueron identificados por su apariencia y ausencia de movimiento). Los fetos fueron removidos del útero para sexarlos y pesarlos basados en los lineamientos de la ECETOC, (ECETOC, 1983; Taylor, 1986).

a) Evaluación de alteraciones externas

Una vez extraídos los fetos se examinaron bajo un microscopio de disección para identificar el tipo y frecuencia de las alteraciones 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 alteraciones se evaluaron en el cráneo, párpados, labios y extremidades (Dawson, 1926; Aliverti *et al.*, 1979).

b) Evaluación de alteraciones esqueléticas

Para la evaluación de malformaciones esqueléticas, los fetos previamente fijados en etanol fueron desvicerados y se colocaron en una solución de hidróxido de potasio al 1%, hasta que se pudo distinguir el tejido óseo, se les agregó de dos a tres gotas de rojo de alizarina por un tiempo no mayor a 24h. Posteriormente fueron colocados en glicerina para quitarles el exceso de colorante y preservarlos con glicerina (Staples *et al.*, 1964).

Los fetos aclarados y teñidos, se analizaron en un microscopio de disección para identificar las alteraciones esqueléticas y contar los puntos de osificación de las extremidades, columna y estenebras.

5.8. Análisis estadístico

Los resultados de la inducción de MN y de la frecuencia de EPC se presentan en media \pm desviación estándar y se analizaron mediante una ANOVA seguida por una prueba de Tukey o una prueba de Dunnett, dependiendo de la homogeneidad de las varianzas.

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

Para el análisis estadístico se emplearon los programas SPSS v13 y Statistica v6.

6. Resultados

La administración por vía oral (sonda; 20mg/kg y acceso libre; 17.4-54.3mg/kg) y por vía i.p. (20 mg/kg) de CFL en el día 15 de gestación no indujo daño genotóxico en las hembras ni en sus fetos. La aplicación de 20 mg/kg de peso corporal de CrO_3 por vía i.p. incrementó la frecuencia de MN tanto en las madres como en los fetos. Cuando se combinaron los tratamientos de la CFL administrada por diferentes vías y del CrO_3 se disminuyó el número de MN en comparación con el grupo tratado solo con CrO_3 . En los fetos obtenidos en el día 18 de gestación de hembras tratadas con 20 mg/kg de CrO_3 en el día 15 de gestación, se observaron alteraciones en extremidades anteriores como micromelia, ectrodactilia y falta de osificación en cráneo, columna, costillas, cola y estenebras. La administración previa por vía i.p. y oral (sonda y acceso libre) de la CFL, a la aplicación de CrO_3 disminuyó algunas de las frecuencias de las alteraciones observadas cuando se administró solo el tratamiento de CrO_3 como; la micromelia, la ectrodactilia, la falta de osificación en cráneo, costillas cortas y/o rudimentarias, estenebras gruesas y asimétricas.

6.1. Estudios preliminares

Para la preparación de la solución de CFL que se administró vía acceso libre, se midió el consumo aproximado diario de agua. En el cuadro 3 se muestra que el promedio del consumo diario es de 9 ml. Este volumen se tomo en cuenta para el cálculo de las dosis que se administraron por vía i.p. y sonda.

Cuadro 1. Consumo promedio diario de agua

N	Consumo promedio (ml) ($\bar{x} \pm \text{d.e.}$)
6	9.08 \pm 1.83

6.2. Efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃ en hembras preñadas

En el cuadro 4, se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluadas en las muestras de sangre de hembras preñadas tomadas a las 0, 24, 48 y 72 horas. Se observa que la administración solo de la CFL por vía oral (sonda y acceso libre) y por vía i.p. no incrementa la frecuencia de MN. Mientras que, la administración de 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. incrementa la frecuencia de MN de manera estadísticamente significativa en las horas 24, 48 y 72 alrededor de 3, 9 y 6 MN respectivamente. Cuando se combinaron los tratamientos de CFL y CrO₃ se disminuyó la frecuencia de MN con respecto al grupo tratado solo con CrO₃. Sin embargo, en el grupo combinado donde la CFL se administró vía i.p. aunque también se presentó una disminución en la frecuencia de MN (alrededor de 7) con respecto al grupo tratado con CrO₃, el incremento resultó estadísticamente significativo en la frecuencia de MN en la hora 48 al ser comparado con la hora 0. Como se puede observar en el cuadro 4, las frecuencias basales varían entre grupos, por lo que se calculó la frecuencia neta de inducción de MN (NIF), partiendo de la premisa de que la inducción de MN en la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, dado que aún no se administraban los tratamientos. El cálculo consistió en restar la frecuencia de MN de la hora 0 de cada grupo a las siguientes evaluaciones del mismo grupo (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

$$\text{NIF} = \text{MN}_a t_i - \text{MN}_a t_0$$

Donde:

a= grupo

x_i= tiempo de evaluación

t₀= tiempo 0

Cuadro 2. Promedios de la frecuencia de MN en hembras preñadas tratadas con CrO₃ por vía i.p. y CFL administrada por diferentes vías

Tratamiento	Vía de Administración de CFL	Dosis (mg/kg)	N	Hora	MN (x ± d.e.)
Testigo	-----	----	5	0	0.60±0.89
				24	0.60±0.54
				48	0.60±0.89
				72	1.00±0.81
CFL	I.P.	20	6	0	1.20±0.83
				24	0.40±0.89
				48	0.20±0.45
				72	0.80±1.30
	Sonda	20	5	0	0.80±0.44
				24	0.80±0.83
				48	1.60±0.89
				72	1.00±1.00
	Acceso Libre	19.6	5	0	0.20±0.44
				24	0.40±0.54
				48	0.40±0.54
				72	0.60±0.54
CrO ₃	-----	20	8	0	0.50±0.75
				24	3.62±1.18 ^{a,c}
				48	9.37±2.26 ^{a,d,f,g}
				72	6.12±2.41 ^{a,e}
CFL-CrO ₃	I.P.	20-20	5	0	0.20±0.44
				24	1.80±0.44
				48	2.60±0.54 ^b
				72	1.20±0.83
	Sonda	20-20	7	0	0.71±0.75
				24	1.85±0.69
				48	2.00±1.00
				72	1.57±0.53
	Acceso Libre	17.4-20	5	0	0.80±0.83
				24	2.00±0.70
				48	4.40±2.50
				72	2.40±1.14

^a p<0.05 vs CrO₃ hora 0; ^b p<0.05 vs CFL-CrO₃ i.p. hora 0; ^c p<0.05 vs Testigo hora 24; ^d p<0.05 vs Testigo hora 48; ^e p<0.05 vs Testigo hora 72; ^f p<0.05 vs CFL- CrO₃ i.p. hora 48; ^g p<0.05 vs CFL- CrO₃ Sonda hora 48.

En la figura 5 se muestra el análisis del NIF a las 24 (a), 48 (b) y 72 (c) después de la administración de los tratamientos con CFL, CrO₃ y la combinación de ambos, se puede observar que la administración previa de la CFL al tratamiento del CrO₃ disminuye el daño al ADN, mientras que el tratamiento oral vía sonda es el que presenta un mayor porcentaje de disminución de daño al ADN (entre 63 a 85%). En todos los casos se alcanzó la mayor protección a las 72 (entre el 82% al 85%).

Como se muestra en la figura 5, la menor protección de la CFL se observó cuando se administró el tratamiento de CFL por acceso libre, por lo que se aumentó la dosis. En el cuadro 5, se muestra la concentración del consumo de CFL y la dosis a la cual correspondía, se puede observar que la dosis que consumieron las hembras en el tratamiento CFL-CrO₃ 1 fue menor (17.4mg/kg) a la administrada por vía i.p. y sonda. La dosis de CFL-CrO₃ 2 (20 mg/kg) se administro tres veces al día, para calcular la concentración de CFL que las hembras consumieron durante el tratamiento se midió cada 24h el consumo de la solución de CFL por grupo.

Cuadro 3. Consumo promedio de CFL vía acceso libre

Tratamiento	N	Consumo promedio diario (ml) (x±d.e.)	Concentración (mg/kg)
Testigo	15	8.36±1.02	-----
CFL	5	9.08±1.42	19.6
CFL-CrO₃ 1	5	9.12±3.03	17.4
CFL-CrO₃ 2	5	8.59±2.63	53.4

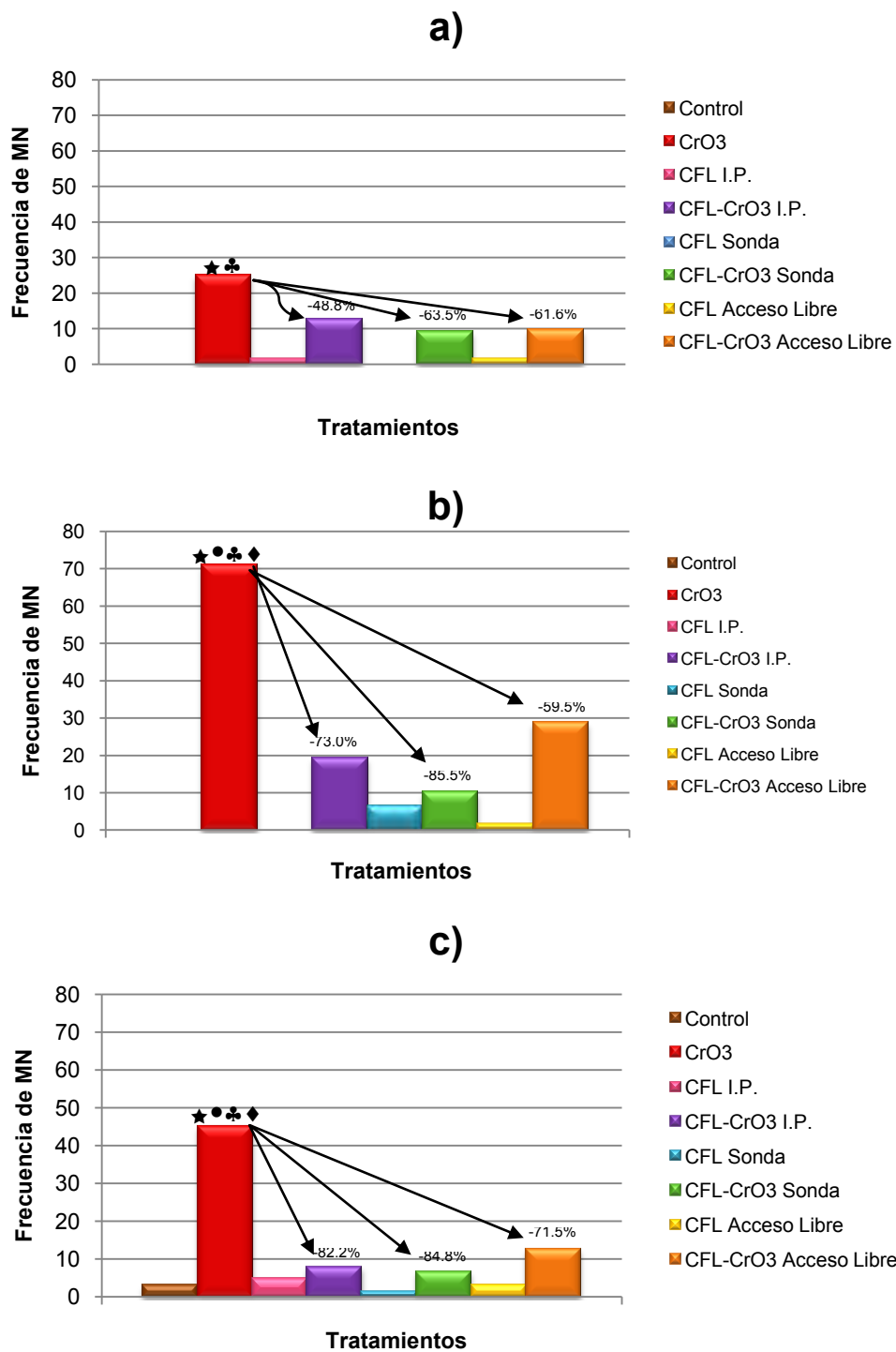


Figura 1. Frecuencia de MN en sangre periférica de hembras preñadas observados en los diferentes tiempos de evaluación a) 24h, b) 48h y c) 72h (significancia de $p < 0.05$; ★ : vs Testigo, ● : vs CFL-CrO3 I.P., ♣ : vs CFL-CrO3 sonda, ◆ : vs CFL-CrO3 acceso libre)

En el cuadro 6 se muestran las frecuencias de MN cuando se administró la dosis alta de CFL (53.4mg/kg) a las hembras preñadas, se observa una mayor disminución de la frecuencia de MN, la cual ya no resulta estadísticamente significativa en ninguna de las horas evaluadas.

Cuadro 4. Promedios de la frecuencia de MN en hembras preñadas tratadas con CrO₃ y con una dosis mayor de CFL administrada acceso libre

Tratamiento	N	Dosis (mg/kg)	Hora	MN (x ± d.e.)
Testigo	5	-----	0	0.60±0.89
			24	0.60±0.54
			48	0.60±0.89
			72	1.00±0.81
CFL	5	19.6	0	0.20±0.44
			24	0.40±0.54
			48	0.40±0.54
			72	0.60±0.54
CrO ₃	8	20	0	0.50±0.75
			24	3.62±1.18 ^a
			48	9.37±2.26 ^{a,b}
			72	6.12±2.41 ^a
CFL-CrO ₃	5	53.4-20	0	1.40±0.54
			24	1.40±0.54
			48	2.20±0.83
			72	1.80±1.30

^a p<0.05 vs CrO₃ hora 0, ^b p<0.05 vs CFL-CrO₃ hora 48

De igual manera, que a las frecuencias de MN obtenidos anteriormente se les calculó el NIF. En la figura 6, se muestran los porcentajes de la disminución de MN, se observa que la disminución va desde un 62% (hora 24) hasta el 93% (hora 72). Al igual que en los tratamientos anteriores en la hora 72 fue donde se observó la mayor disminución de MN inducidos por el CrO₃ y al comparar con la dosis baja de CFL se observa que la disminución en la hora 72 aumentó alrededor de un 20%.

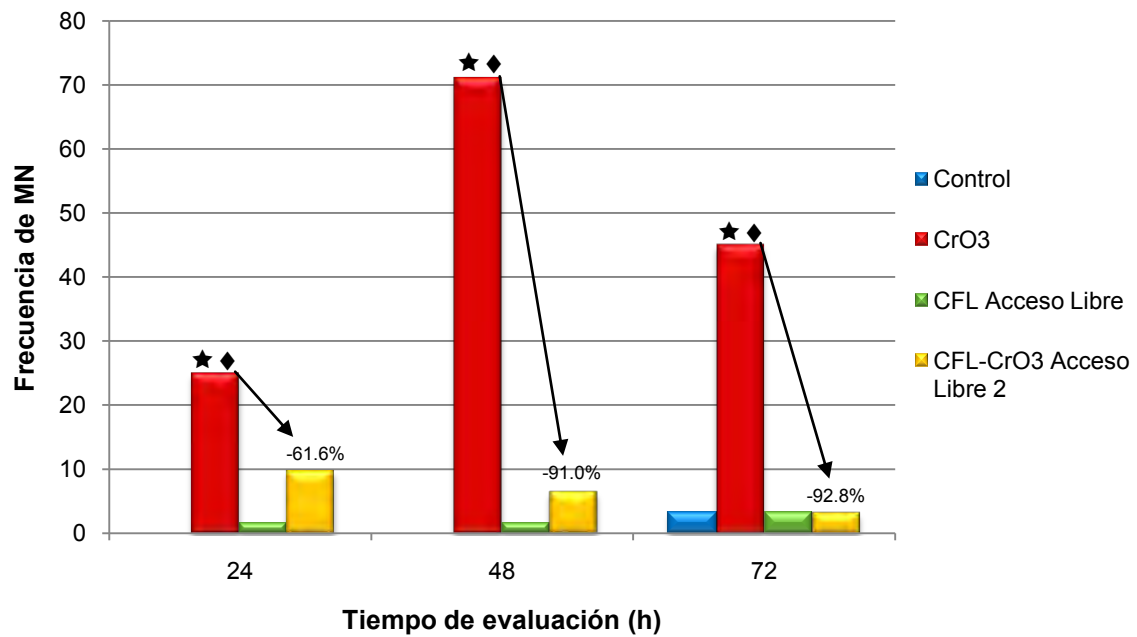


Figura 2. Frecuencia de MN en sangre periférica de hembras preñadas para el grupo CFL-CrO₃ 2 observados en los diferentes tiempos de evaluación (significancia de p<0.05; ★: vs Testigo, ◆: vs CFL-CrO₃ acceso libre 2)

6.3. Efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño genotóxico inducido por CrO₃ en fetos obtenidos el día 18 de gestación

En el cuadro 7, se muestran las frecuencias de MN de los fetos obtenidos en el día 18 de gestación de las hembras gestantes tratadas con CFL, CrO₃ y con la combinación de ambos tratamientos en el día 15 de gestación, se observa que cuando se administró la CFL sola por vía oral (sonda y acceso libre) a las madres las frecuencias de MN no resultaron estadísticamente significativas al compararlas con el grupo testigo en los fetos. Sin embargo, cuando la CFL se aplicó por vía i.p. se incrementaron alrededor de 2 MN, mismos que resultaron estadísticamente significativos con respecto al grupo testigo. La administración sola de CrO₃ incrementó la frecuencia de MN (alrededor de 8). Cuando se les administraron a las hembras gestantes ambos tratamientos (CFL y CrO₃), se disminuyó la frecuencia de MN en todos los casos.

Cuadro 5. Promedios de la frecuencia de MN en fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas con CrO₃ y CFL administrada por diferentes vías

Tratamiento	Vía de Administración de CFL	Dosis (mg/kg)	N	MN (x ± d.e.)
Testigo	-----	-----	20	1.30±1.03
CFL	I.P.	20	25	3.00±2.32 ^a
	Sonda	20	20	2.95±1.79
	Acceso Libre	19.6	17	1.76±1.03
CrO ₃	-----	20	13	9.30±3.19 ^{a,b,c,d,e}
CFL-CrO ₃	I.P.	20-20	15	2.53±1.06
	Sonda	20-20	18	3.22±2.55
	Acceso Libre 1	17.4-20	15	2.46±1.35
	Acceso Libre 2	53.4-20	13	2.15±1.21

^a p<0.05 vs Testigo

^b p<0.05 vs CFL-CrO₃ i.p.

^c p<0.05 vs CFL-CrO₃ sonda

^d p<0.05 vs CFL-CrO₃ acceso libre 1

^e p<0.05 vs CFL-CrO₃ acceso libre 2

Para conocer la disminución neta de las frecuencias de MN al igual que para las madres, a las frecuencias obtenidas de MN de los fetos, también se les calculó el NIF. En la figura 7 se muestra el porcentaje de disminución de MN, se puede observar que los porcentajes de disminución de MN van desde un 76% (CFL administrada vía sonda), hasta un 98% (CFL dosis alta administrada por acceso libre), estos porcentajes representan una mayor protección de la CFL en fetos que en sus madres.

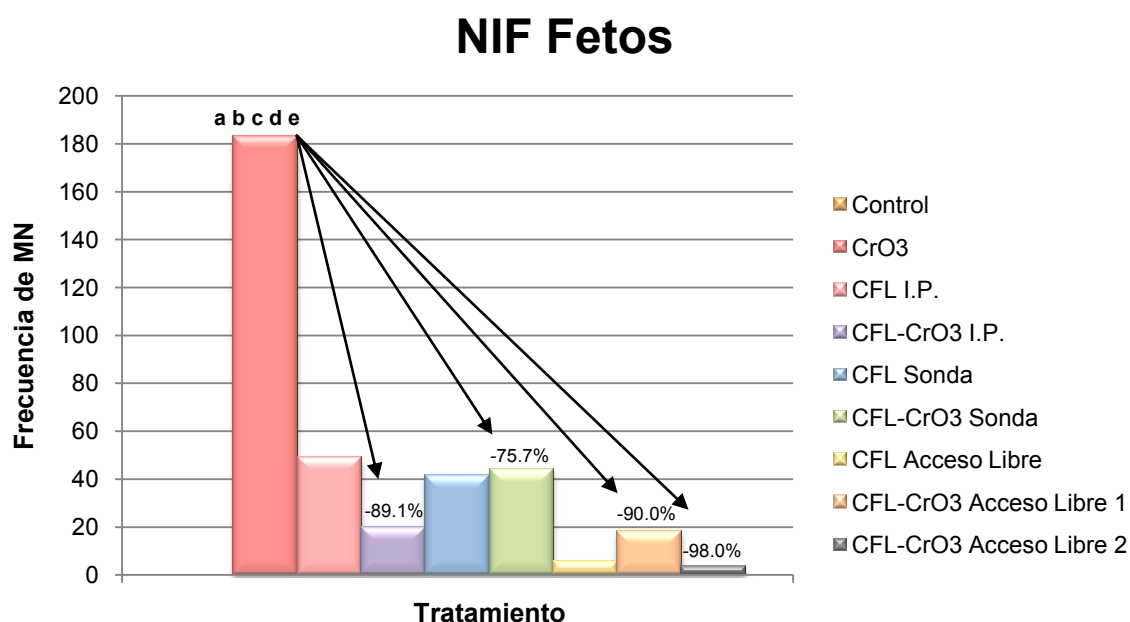


Figura 3. Frecuencia de MN en sangre periférica fetal observados en los diferentes tratamientos (significancia de $p < 0.05$; a: vs Testigo, b: vs CFL-CrO₃ i.p., c: vs CFL-CrO₃ sonda, d: vs CFL-CrO₃ acceso libre 1, e: vs CFL-CrO₃ acceso libre 2)

6.4. Efecto de la CFL y del CrO₃ sobre la frecuencia de EPC con respecto a la frecuencia de ENC en hembras preñadas

En el cuadro 8 se muestran los promedios de la frecuencia de EPC con respecto a la frecuencia de ENC en hembras preñadas tratadas con CFL, CrO₃ y con ambos tratamientos (CFL y CrO₃), se observa que no se presentaron modificaciones estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos.

Cuadro 6. Promedios de la frecuencia de EPC en hembras preñadas tratadas con CrO₃ y CFL administrada por diferentes vías

Tratamiento	Vía de Administración de CFL	Dosis (mg/kg)	N	Hora	EPC (x ± d.e.)
Testigo	-----	----	5	0	85.20±5.93
				24	93.20±6.14
				48	89.80±6.41
				72	77.50±14.05
CFL	I.P.	20	6	0	84.40±10.99
				24	90.60±10.50
				48	89.60±8.84
				72	87.00±6.24
	Sonda	20	5	0	60.60±6.50
				24	74.60±20.25
				48	68.80±18.78
				72	70.40±18.28
	Acceso Libre	19.6	5	0	89.60±8.98
				24	94.00±8.06
				48	97.00±9.08
				72	109.80±11.34
CrO ₃	-----	20	8	0	85.62±12.27
				24	68.87±11.25
				48	80.50±19.46
				72	79.00±8.79
CFL-CrO ₃	I.P.	20-20	5	0	84.40±10.99
				24	90.60±10.50
				48	89.60±8.84
				72	87.50±10.60
	Sonda	20-20	7	0	93.42±16.60
				24	84.14±18.05
				48	77.00±17.41
				72	80.42±10.09
	Acceso Libre 1	17.4-20	5	0	95.60±7.02
				24	99.60±11.23
				48	99.00±14.33
				72	88.80±26.24
	Acceso Libre 2	53.4-20	5	0	98.80±13.51
				24	101.00±11.46
				48	92.20±7.88
				72	99.60±9.73

6.5. Efecto de la CFL y del CrO₃ sobre la frecuencia de EPC con respecto a la frecuencia de ENC en fetos obtenidos en el día 18 de gestación

En el cuadro 9, se muestran los promedios de la frecuencia de EPC en los fetos obtenidos a las 72 horas después de los tratamientos con CFL, CrO₃ ó ambos en el día 15 de gestación, se observa que el incremento de EPC solo resulta estadísticamente significativo en el grupo tratado tanto con la CFL (dosis baja por acceso libre) como con el CrO₃, ya que cuando se administró la dosis alta de la CFL no se presentó un incremento estadísticamente significativo.

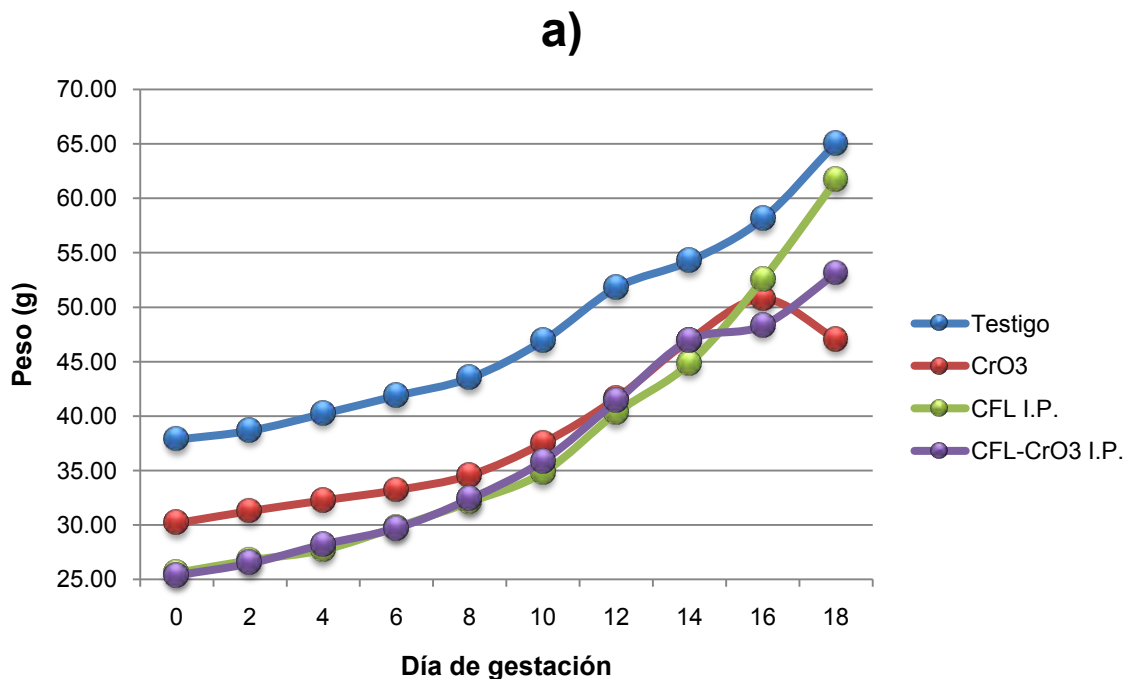
Cuadro 7. Promedios de la frecuencia de EPC en fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas con CrO₃ y CFL administrada por diferentes vías

Tratamiento	Vía de administración de CFL	Dosis (mg/kg)	N	EPC (x ± d.e.)
Testigo	-----	-----	20	194.60±23.17
CFL	I.P.	20	25	175.24±66.57
	Sonda	20	20	171.40±33.15
	Acceso Libre	19.6	17	193.41±13.33
CrO ₃	-----	20	13	214.15±43.38
CFL- CrO ₃	I.P.	20-20	15	191.33±31.73
	Sonda	20-20	18	201.44±27.10
	Acceso Libre 1	17.4-20	15	248.26±51.38*
	Acceso Libre 2	53.4-20	13	184.92±18.11

* p<0.05 vs Testigo

6.6. Seguimiento del peso materno

En la figura 8 se muestra los pesos de las hembras a partir del día 0 de preñez, los cuales fueron medidos cada tercer día después de la identificación del tapón espermático. A partir del día 15 de gestación fueron administrados los tratamientos de CFL por vía oral (sonda y acceso libre) y aplicados los vía i.p. la CFL y/o CrO_3 . Como se observa la figura 8 cuando fue administrado el tratamiento con CrO_3 en todos los casos se presenta una disminución en el peso, inclusive en los grupos en los que se combinó el tratamiento con CFL, salvo que cuando se administro vía i.p. y oral (acceso libre) con baja dosis las hembras presentaron una recuperación en los pesos para el día 18 de gestación. Cuando se combinó el tratamiento y la CFL fue administrada por vía oral (sonda) el peso se mantiene constante y por acceso libre alta dosis de CFL las hembras no recuperaron el peso.



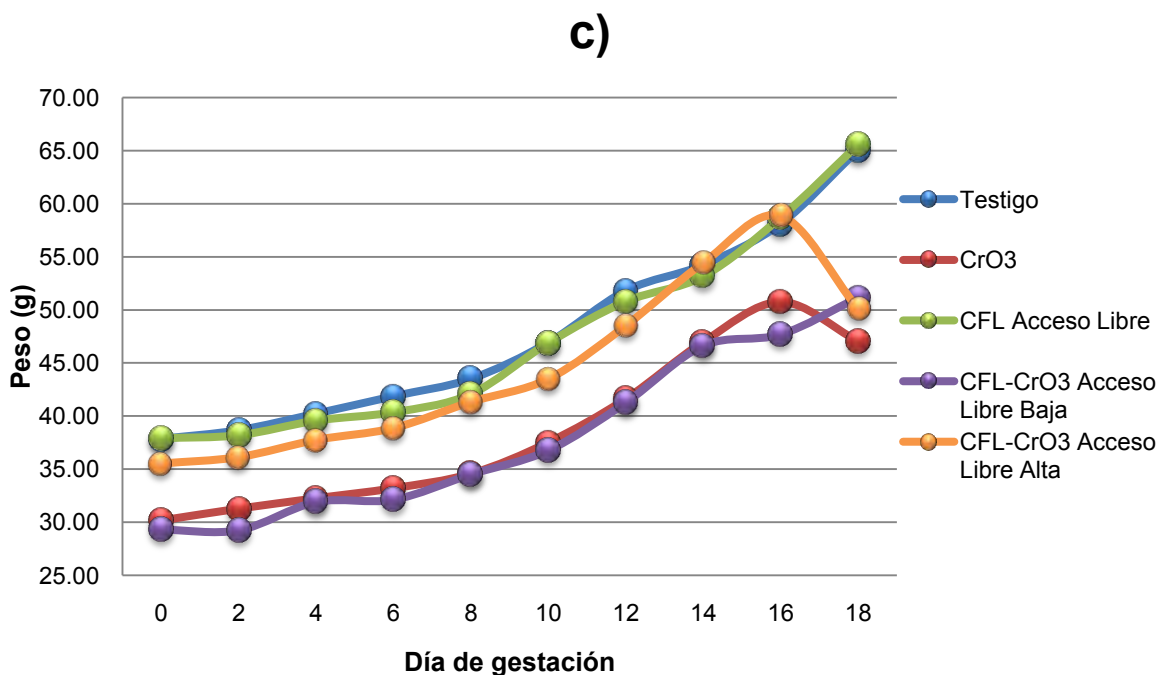
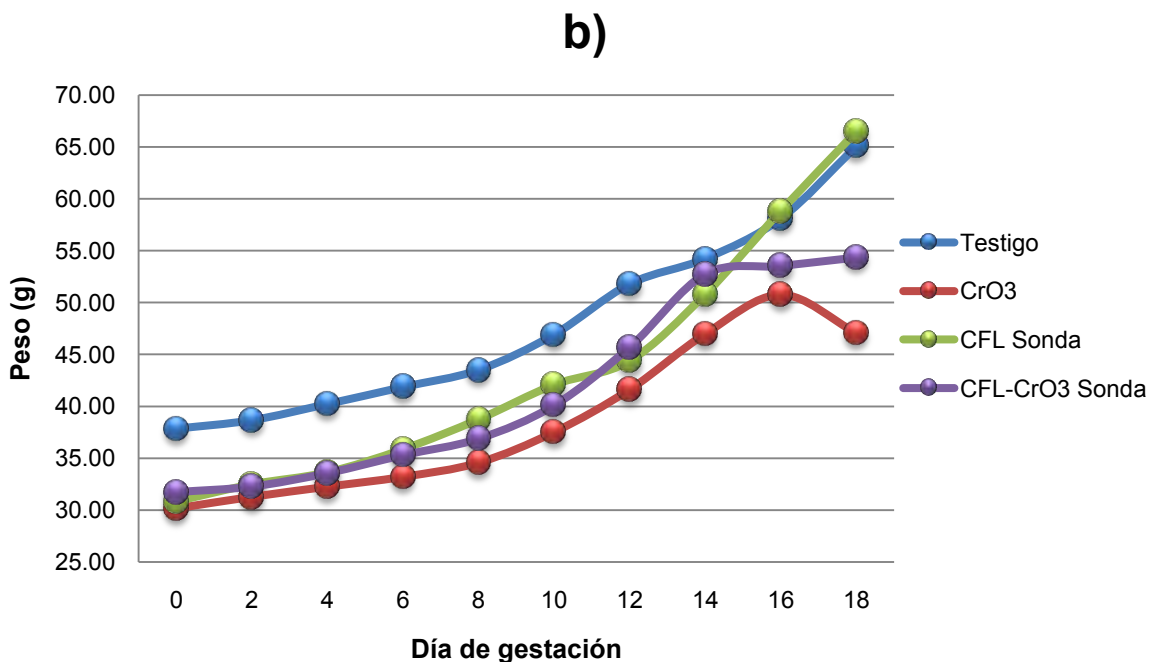


Figura 4. Promedios del aumento de peso en hembras preñadas registrados cada tercer día a partir del día 0 de gestación; a) Comparación de pesos cuando la CFL se administró vía i.p., b) Comparación de pesos cuando la CFL se administró vía oral (sonda) y c) Comparación de pesos cuando la CFL se administró vía oral (acceso libre).

6.7. Efectos de la CFL administrada por diferentes vías sobre las camadas de hembras tratadas con CrO₃

En el cuadro 10, se muestra el número de implantes, reabsorciones, fetos vivos y muertos de las hembras tratadas con CFL (vía i.p. y oral), CrO₃ vía i.p o con ambos tratamientos. Se observa que la administración de CFL sola no presenta efectos estadísticamente significativos el número de fetos muertos y reabsorciones. Mientras que, la administración de 20mg/kg de CrO₃ a las madres incrementa de forma estadísticamente significativa la muerte fetal, al igual que cuando se administro la dosis alta de CFL (53.4mg/kg) con el CrO₃. Cabe aclarar que se adelantaron camadas cuando se administró la CFL sola por vía sonda se adelanto una camada y cuando se combinaron los tratamientos con CrO₃ (vía i.p. y acceso libre), al igual que cuando se administró solo el CrO₃, estas camadas no fueron consideradas para las evaluaciones que se presentan en el cuadro. Solo cuando se administró el tratamiento con CrO₃ dos hembras presentaron muerte total de las camadas. A los fetos obtenidos de las camadas también se les midió el peso y se les identificó el sexo. En cuanto a estos dos parámetros ninguno de los tratamientos presentó efectos estadísticamente significativos (cuadro 11).

Cuadro 8. Comportamiento de las camadas obtenidas en el día 18 de gestación

Tratamiento	Vía de administración de CFL	Dosis (mg/kg)	♀ preñadas/camada evaluadas	Implantes (x ± d.e.)	Fetos Vivos (x ± d.e.)	Fetos Muertos (x ± d.e.)	Reabsorciones (x ± d.e.)
Testigo	-----	-----	5/5	15.60±4.04	14.40±3.65	0.20±0.44	0.00±0.00
	I.P.	20	6/6	14.50±2.34	13.00±4.33	0.00±0.00	1.50±2.25
CFL	Sonda	20	5/4 [^]	17.50±3.31	16.00±3.26	0.00±0.00	0.00±0.00
	Acceso Libre	19.6	5/5	13.20±6.30	10.60±5.55	0.00±0.00	0.00±0.00
CrO ₃	-----	20	8/5 ^{^+}	11.80±3.03	8.40±4.92	1.40±1.51*	1.00±0.71
	I.P.	20-20	5/3 [°]	12.33±3.51	9.00±4.58	0.66±1.15	1.00±1.00
CFL-CrO ₃	Sonda	20-20	7/5 ⁺	12.80±4.91	11.40±4.50	0.20±0.45	0.40±0.90
	Acceso Libre 1	17.4-20	5/4 [^]	14.00±2.94	11.50±2.51	0.25±0.50	0.50±0.58
	Acceso Libre 2	53.4-20	5/5	11.20±1.92	7.80±4.49	2.80±5.22*	0.20±0.45

* p<0.05 vs Testigo

^a p<0.05 vs CFL Sonda

[°] a dos hembras se les adelanto el parto

[^] a una hembra se le adelanto el parto

⁺ dos hembras presentaron perdida de camada

**Cuadro 9. Promedio del peso fetal y proporción de sexo de las camadas
obtenidas en el día 18 de gestación**

Tratamiento	Vía de administración de CFL	Dosis (mg/kg)	No. de camadas	Peso (x ± d.e.)	Proporción de Sexo (♀/♂)
Testigo	-----	-----	5/5	1.43±0.13	1.03/0.97
CFL	Sonda	20	5/4 ¹	1.27±0.03	1.04/0.96
	Acceso Libre	19.6	5/5	1.46±0.26	1.06/0.94
CrO ₃	-----	20	8/5 ^{1,+}	1.37±0.41	1.09/0.91
CFL- CrO ₃	I.P.	20-20	5/3 ²	1.19±0.11	1.05/0.95
	Sonda	20-20	7/5 ⁺	1.50±0.23	1.23/0.77
	Acceso Libre 1	17.4-20	5/4 ¹	1.36±0.16	1.13/0.87
	Acceso Libre 2	53.4-20	5/5	1.42±0.24	0.94/1.06

² a dos hembras se les adelanto el parto

¹ a una hembra se le adelanto el parto

⁺ dos hembras presentaron perdida de camada

6.8. Efecto de la CFL administrada por diferentes vías sobre las alteraciones en el desarrollo fetal inducidas por el tratamiento de CrO₃ a hembras preñadas

En el cuadro 12, se muestran las frecuencias de las alteraciones externas observadas en los fetos obtenidos de las hembras tratadas con por vía i.p. y oral (sonda y acceso libre) de CFL, CrO₃ por vía i.p. y ambos tratamientos (en el cuadro 13 se detalla el tipo de alteración y algunos ejemplos se muestran en la figura 9). La administración sola de la CFL (vía oral e i.p.) no modificó la frecuencia de alteraciones externas de forma estadísticamente significativa. La aplicación del CrO₃ incrementa de forma estadísticamente significativa la frecuencia de alteraciones como micromelias (derecha e izquierda), ectrodactilia y rotación en las extremidades anteriores. Cuando se administraron los tratamientos de CFL previo a la aplicación del CrO₃ el incremento en las frecuencias ya no resultó estadísticamente significativo, pero si se puede apreciar en algunos casos que persisten las alteraciones.

Cuadro 10. Frecuencia de las alteraciones externas observadas en los fetos obtenidos en el día 18 de gestación

Tratamiento	Testigo	CrO ₃	I.P.		Sonda		Acceso Libre			
			CFL	CFL- CrO ₃	CFL	CFL- CrO ₃	CFL	CFL- CrO ₃ 1	CFL- CrO ₃ 2	
Característica										
Dosis (mg/kg)	-----	20	20	20-20	20	20-20	19.4	17.4-20	53.4-20	
Nº Fetos	72	44	79	40	76	56	53	53	37	
Alteraciones Extremidades Anteriores (%)	0	6 ⁺⁺ (13.64)	0	5 (12.50)	4 (5.26)	2 (3.57)	1 (1.88)	0	2 (5.40)	
Alteraciones Extremidades Posteriores (%)	0	1 (2.27)	0	1 (2.5)	3 (3.95)	1 (1.78)	1 (1.88)	0	1 (2.70)	
Hematomas (%)	1 (1.4)	0	0	0	1 (1.33)	1 (1.8)	0	3 (5.7)	3 (8.10)	
Parpados abiertos (%)	0	1 (2.27)	0	0	3 (3.95)	0	0	0	0	
Alteraciones en cola (%)	0	1 (2.27)	0	1 (2.5)	0	1 (1.78)	1 (1.88)	0	0	

* p<0.05 vs Testigo

* p<0.05 vs CFL-CrO₃ Acceso Libre 1

◆ p<0.05 vs CFL-CrO₃ Acceso Libre 2

Cuadro 11. Frecuencia de las alteraciones externas encontradas en los fetos obtenidos en el día 18 de gestación

Tratamiento (dosis mg/kg)	Nº de Fetos Alterados	Ubicación	Nº Fetos-Alteración
Testigo	6	Torso	6 hematomas
CFL I.P. 20	0	-----	-----
CFL Sonda 20	9	Extremidades anteriores	1 mal rotada
			1 micromelia derecha
			1 micromelia en ambos lados
			1 ectrodactilia
		Extremidades posteriores	2 mal rotada
			1 dedo chueco
Torso	1 hematomas		
Parpados	3 abiertos		
CFL A.L. 19.6	3	Extremidades anteriores	1 micromelia derecha
		Extremidades posteriores	1 micromelia derecha
		Cola	1 en gancho
CrO ₃ 20	9	Extremidades anteriores	2 ectrodactilia
			3 micromelia derecha
			1 micromelia izquierda
			1 mal rotada
		Extremidades posteriores	1 micromelia derecha
Parpados	1 abiertos		
Cola	1 enroscada		
CFL-CrO ₃ I.P. 20-20	7	Extremidades anteriores	2 micromelia derecha
			1 micromelia en ambos lados
			3 ectrodactilia
		Extremidades posteriores	1 mal rotada
Cola	1 enroscada		
CFL-CrO ₃ Sonda 20-20	8	Extremidades anteriores	2 micromelia derecha
		Extremidades posteriores	1 micromelia izquierda
			1 micromelia derecha
		Torso	4 hematomas
Cola	1 enroscada		
CFL-CrO ₃ 1 A.L. 17.4-20	9	Torso	9 hematomas
CFL-CrO ₃ 2 A.L. 53.4-20	6	Extremidades anteriores	2 micromelia derecha
		Extremidades posteriores	1 micromelia izquierda
		Torso	3 hematomas

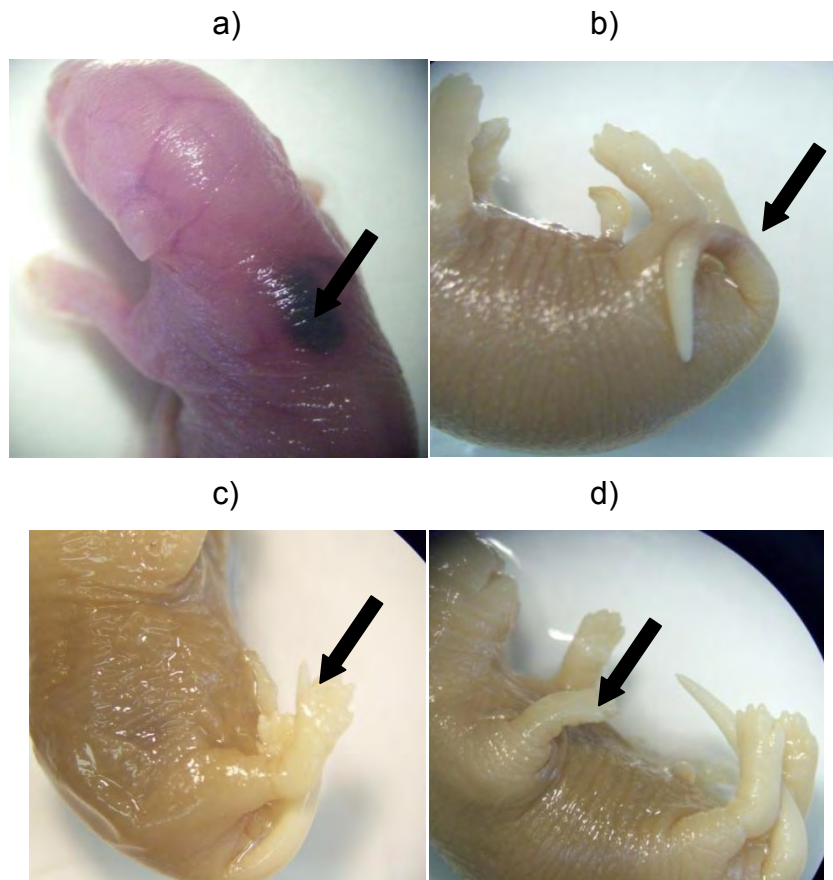


Figura 5. Alteraciones externas observadas en los fetos obtenidos de las hembras tratadas: a) hematoma; b) cola enroscada; c) pata mal rotada; d) micromelia.

Una vez observados los fetos externamente fueron transparentados para identificar alteraciones esqueléticas. En el cuadro 14 se muestran las frecuencias de las alteraciones observadas en los fetos (en el cuadro 15 se muestra su descripción y en las figuras 10 y 11 algunos ejemplos). La administración sola de la CFL no incrementó de forma estadísticamente significativa la frecuencia de estas alteraciones. En los fetos obtenidos de las hembras que se les aplicó CrO_3 , se incrementaron las alteraciones en cráneo (falta de osificación), costillas (costillas rudimentarias y cortas) y esternón (estenebras asimétricas, cortas y poco osificadas) de manera estadísticamente significativa), mismas que, persisten cuando se administraron la CFL por vía oral previo al tratamiento con CrO_3 , aunque solo resultan preferentemente estadísticamente significativas cuando se administró por sonda.

Cuadro 12. Frecuencia de las alteraciones esqueléticas observadas en los fetos obtenidos en el día 18 de gestación

Tratamiento Característica	Testigo	CrO ₃	I.P.		Sonda		Acceso Libre		
			CFL	CFL- CrO ₃	CFL	CFL- CrO ₃	CFL	CFL- CrO ₃ 1	CFL- CrO ₃ 2
Dosis (mg/kg)	-----	20	20	20-20	20	20-20	19.4	17.4-20	53.4-20
Nº Fetos	72	44	79	40	76	56	53	53	37
Alteraciones en Cráneo (%)	0	5* (11.4)	2 (2.5)	1 (2.5)	2 (2.6)	5* (8.9)	0	2 (3.8)	2 (5.4)
Alteraciones en Columna (%)	0	1 (2.3)	0	0	1 (1.3)	2 (3.6)	3 (5.7)	5* (9.4)	1 (2.7)
Alteraciones en Costillas (%)	7 (9.7)	12* (27.3)	8 (10.1)	8 (20.0)	16 (21.0)	14* (25.0)	13 (24.5)	13 (24.5)	9 (24.3)
Alteraciones en Estenebras (%)	10 (13.9)	14* (31.8)	6 (7.6)	5 (12.5)	12 (15.8)	21* (37.5)	11 (20.7)	13 (24.5)	11* (29.7)

- * p<0.05 vs Testigo
- * p<0.05 vs CFL-CrO₃ Acceso Libre
- ♦ p<0.05 vs CFL-CrO₃ Sonda

Cuadro 13. Frecuencia de las alteraciones esqueléticas encontradas en los fetos obtenidos en el día 18 de gestación

Tratamiento	Nº de Fetos Alterados	Ubicación	Nº Fetos-Alteración
Testigo	15	Costillas	6 Rudimentarias
			4 Cortas
		Esternón	8 Asimétrica
			2 Gruesa
CrO ₃	24	Costillas	5 Rudimentarias
			7 Cortas
			2 Extras cortas
			1 Extras rudimentarias
		Estenebras	8 Asimétrica
			5 Gruesa
			3 Parcial osificada
			1 Escalonada
		1 Bifurcada	
		Cráneo	5 Poco osificado
Columna	1 Desviada		
CFL I.P.	47	Costillas	8 rudimentarias
		Estenebras	22 gruesas
		Cráneo	2 Poco osificado
CFL-CrO ₃ I.P.	11	Costillas	7 Rudimentaria
			1 Corta
			1 Ausente
		Estenebras	5 Asimétrica
3 Gruesa			
Cráneo	1 Poco osificado		
CFL Sonda	23	Costillas	6 Rudimentarias
			6 Cortas
			3 Extra corta
			1 Extra rudimentaria
			1 Flotante
		Estenebras	8 Asimétrica
			5 Gruesa
			1 Escalonada
			4 Parcial osificada
		1 Desplazada	
Cráneo	2 Poco osificado		
Columna	1 Ausencia vertebras lumbares		
CFL-CrO ₃ Sonda	26	Costillas	2 Flotante
			4 Corta
			3 Rudimentaria
			4 Extra corta
			2 Extra rudimentaria
			2 Entre vertebras
		Cráneo	5 Poco osificado
Columna	2 Vertebras desplazadas		

Cuadro 15 (Continuación). Descripción de las alteraciones internas encontradas en los fetos obtenidos en el día 18 de gestación

Tratamiento	Nº de Fetos Alterados	Ubicación	Nº Fetos-Alteración
CFL-CrO₃ Sonda (cont.)	26	Estenebras	16 Asimétrica
			8 Gruesa
			2 Escalonada
			1 Bifurcada
			3 Parcial osificada
			2 Extras
CFL Acceso libre	16	Costillas	1 Corta
			4 Extra corta
			2 Extra rudimentaria
			2 Flotante
			1 Desplazada
			3 Entre vertebras
		Estenebras	7 Asimétrica
			6 Gruesa
			1 Parcial osificada
			1 Bifurcada
			3 Escalonada
			1 Desplazada
		1 Rudimentaria	
Columna	4 Vertebrae desplazadas		
CFL-CrO₃ Acceso libre dosis baja	22	Costillas	3 Corta
			2 Rudimentaria
			8 Entre vertebras
			1 Desplazadas
		Estenebras	9 Asimétrica
			2 Gruesa
			1 Escalonada
		1 Extra rudimentaria	
Cráneo	2 Poco osificado		
Columna	7 Vertebrae Desplazadas		
CFL-CrO₃ Acceso libre dosis alta	19	Costillas	2 Corta
			1 Rudimentaria
			1 extra corta
			1 flotante
			3 Entre vertebras
		Estenebras	8 Asimétrica
			9 Gruesa
			1 Parcial osificada
		Cabeza	1 Poco osificada
		Columna	4 Vertebrae Desplazadas
			1 Cuerpos vertebrales alargados

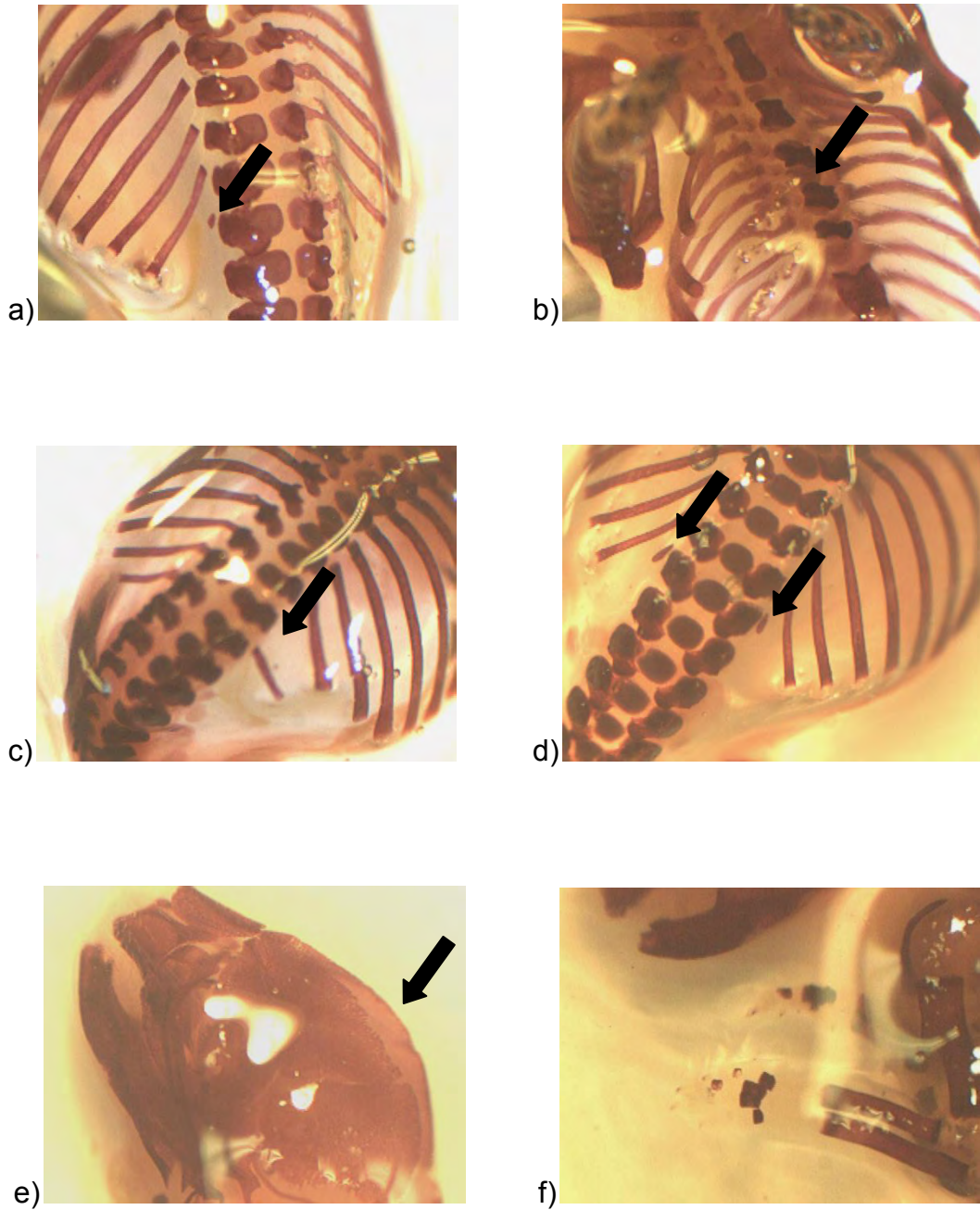


Figura 6. Alteraciones esqueléticas observadas en los fetos obtenidos de hembras tratadas: a)costilla rudimentaria; b)estenebras escalonadas; c)ausencia de una costilla; d) costillas cortas; e) cráneo poco osificado; f)falta de osificación

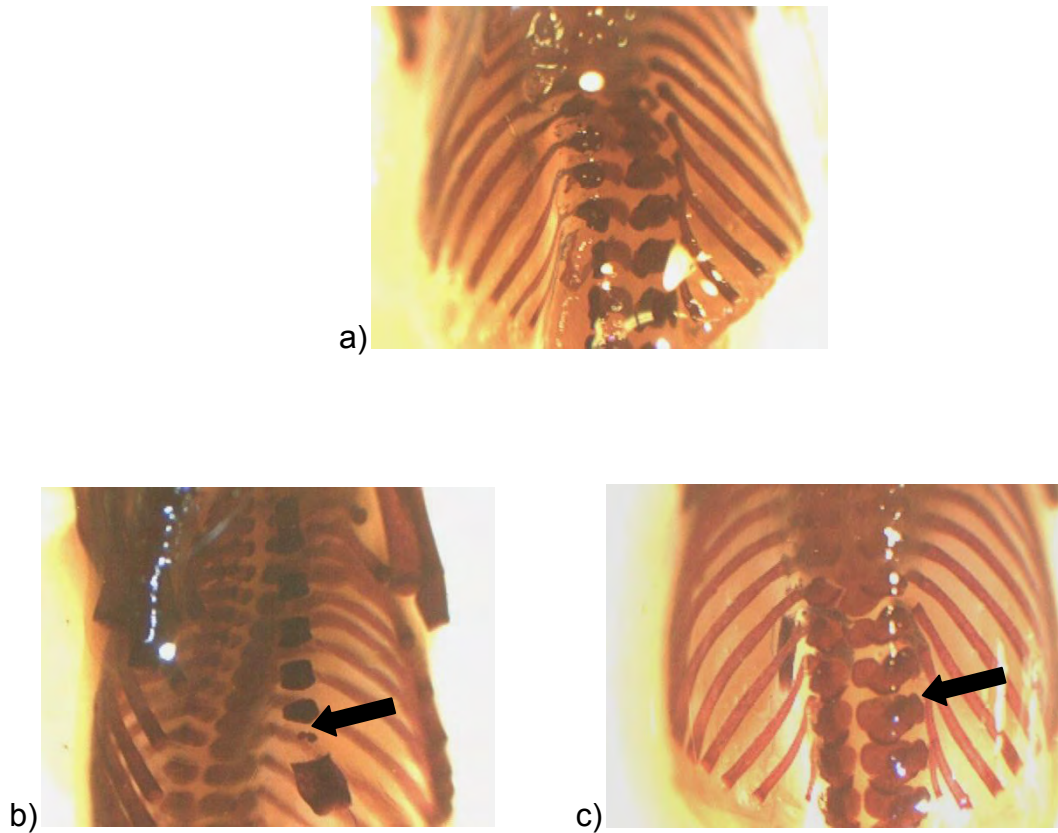


Figura 11. Alteraciones esqueléticas observadas en los fetos obtenidos de hembras tratadas: a) vertebras desplazadas; b) estenebra adicional; c) cuerpos vertebrales alargados

En cuanto a la frecuencia de los puntos de osificación de extremidades anteriores y posteriores evaluadas en los fetos (cuadro 16) no se observaron modificaciones estadísticamente significativas cuando fueron administrados los tratamientos de CFL por vía i.p. y oral (sonda y acceso libre), CrO_3 por vía i.p. y ambos tratamientos en el día 15 de gestación a hembras preñadas.

Cuadro 14. Promedios de la frecuencia de puntos de osificación

Tratamiento	Vía de administración de CFL	Dosis (mg/kg)	Nº Fetos	Extremidades anteriores (x ± d.e.)		Extremidades posteriores (x ± d.e.)	
				Falanges	Metacarpales	Falanges	Metatarsales
Testigo	-----	-----	63	8.56±1.79	8.00±0.00	8.56±1.79	10.00±0.00
	I.P.	20	79	8.77±1.42	8.00±0.00	8.66±1.73	8.00±0.00
CFL	Sonda	20	64	9.00±0.00	8.00±0.00	8.94±0.50	10.00±0.00
	Acceso Libre	19.6	51	8.74±1.37	7.84±1.12	8.65±1.76	9.80±1.40
CrO ₃	-----	20	38	7.24±2.77	7.79±1.30	7.53±2.85	9.46±2.29
	I.P.	20-20	37	7.78±3.12	7.84±0.99	7.54±3.36	10.00±0.00
CFL- CrO ₃	Sonda	20-20	47	7.23±3.23	7.82±1.17	7.57±2.98	9.57±2.04
	Acceso Libre 1	17.4-20	44	6.91±3.46	7.81±1.21	6.73±3.84	9.77±1.51
	Acceso Libre 2	53.4-20	31	7.83±2.84	8.00±0.00	7.55±3.16	10.00±0.00

7. Discusión de resultados

Se ha observado que la CLF es capaz de proteger del daño al ADN inducido por CrO_3 en hembras de ratón adultas (García-Rodríguez, *et al.*, 2001; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006). Al daño genotóxico se le considera como indicativo indirectamente de riesgo carcinogénico y teratogénico, ya que puede ser inducido por los mismos mecanismos de daño (Kram *et al.*, 1980; Novotná y Jelinek, 1990; Giavini *et al.*, 1990; Zemlickis *et al.*, 1993). En este estudio se compararon los efectos de la CFL al ser administrada por diferentes vías sobre el daño al ADN en hembras preñadas y sus crías, así como su efecto sobre las alteraciones en el desarrollo fetal inducido por el CrO_3 . El daño al ADN se evaluó mediante el análisis de la frecuencia de MN y las alteraciones del desarrollo mediante análisis de alteraciones esqueléticas y externas.

Cuando se administraron 20 mg/kg de CFL por vía i.p. y oral (sonda y acceso libre) a las hembras preñadas en el día 15 de gestación, no se observó daño genotóxico ya que la frecuencia de MN no se incremento de forma estadísticamente significativa al compararse con el grupo testigo. Estos resultados concuerdan con lo previamente observado en hembras adultas sin preñar, a las que se les administró CFL y no se observó daño genotóxico (Sen, *et al.*, 1991; García-Rodríguez, *et al.*, 2001; García-Rodríguez 2006), por lo que la CFL administrada a hembras preñadas en el día 15 de gestación no tiene efectos genotóxicos. En el grupo donde se administró solo el CrO_3 se indujo daño genotóxico, mediante el incremento de MN, lo cual indica que el CrO_3 induce daño genotóxico en hembras preñadas al ser administrado en el día 15 de gestación. Los efectos genotóxicos del cromo ya han sido descritos para los compuestos de Cr (VI) tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (De Flora *et al.*, 1990; IARC, 1990), donde se ha observado que la administración de compuestos como el CrCl_3 y el K_2CrO_4 incrementa la frecuencia de MN en médula ósea de ratones macho (Itoh y Shimada, 1996) y de MN en sangre periférica de hembras adultas de ratón sin preñar tratadas con CrO_3 (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

Cuando se administraron los tratamientos de CFL previos a la aplicación de CrO_3 a hembras preñadas, se observó una disminución en la frecuencia de MN, lo cual sugiere que los mecanismos de protección de la CFL en hembras adultas sin preñar persisten durante la gestación, mediante la modulación o protección del daño genotóxico inducido por el CrO_3 . La disminución observada de la frecuencia de MN cuando la CFL se administró por oral (sonda) fue mayor que la observada cuando se administró por vía i.p. en las hora 24 y 48 después de la aplicación del CrO_3 , sin embargo a la hora 72 la protección fue similar, esto puede estar relacionado con lo descrito anteriormente respecto a que la CFL tiene afinidad con los sitios de implante al ser administrada por vía i.p. (García-Rodríguez *et al.*, 2002), aunado a que se ha reportado que por esta vía de administración llega mayor concentración del compuesto a los fetos en comparación con otras vías de administración (Nau y Bass, 1981) y de la cinética de distribución del CrO_3 (García-Rodríguez *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003) por lo que la concentración que llega a la madre tal vez no es la suficiente para protegerla totalmente en las primeras horas. Cuando se administro la CFL por vía i.p. hay una disminución de los MN a la hora 72 con respecto al grupo tratado con CrO_3 , al realizar el análisis estadístico resulto significativo, sin embargo, dado que el incremento es de alrededor de 2 MN, este es marginal con base a los lineamientos de la FDA y la OECD, que señalan que para que un compuesto sea considerado como un agente genotóxico, este debe de inducir más de 4 MN (Heddle *et al.*, 1983; Tophan *et al.*, 1983; y Racine y Matter 1984), por lo que se puede decir que también en este caso se presento protección. Los incrementos en el número de MN observados en hembras preñadas tratadas con CrO_3 en este estudio son menores a los reportados previamente en hembras sin preñar (García-Rodríguez, *et al.*, 2001). La disminución en la protección del daño genotóxico observada en hembras preñadas con respecto a las hembras sin preñar puede estar relacionada con la distribución del CrO_3 entre la madre y el feto, lo que traería como consecuencia una disminución en la concentración del compuesto en las madres. En la figura 11 a manera de conclusión se presentan los efectos observados del análisis de la frecuencia de MN en hembras preñadas.

Genotoxicidad Hembras Preñadas

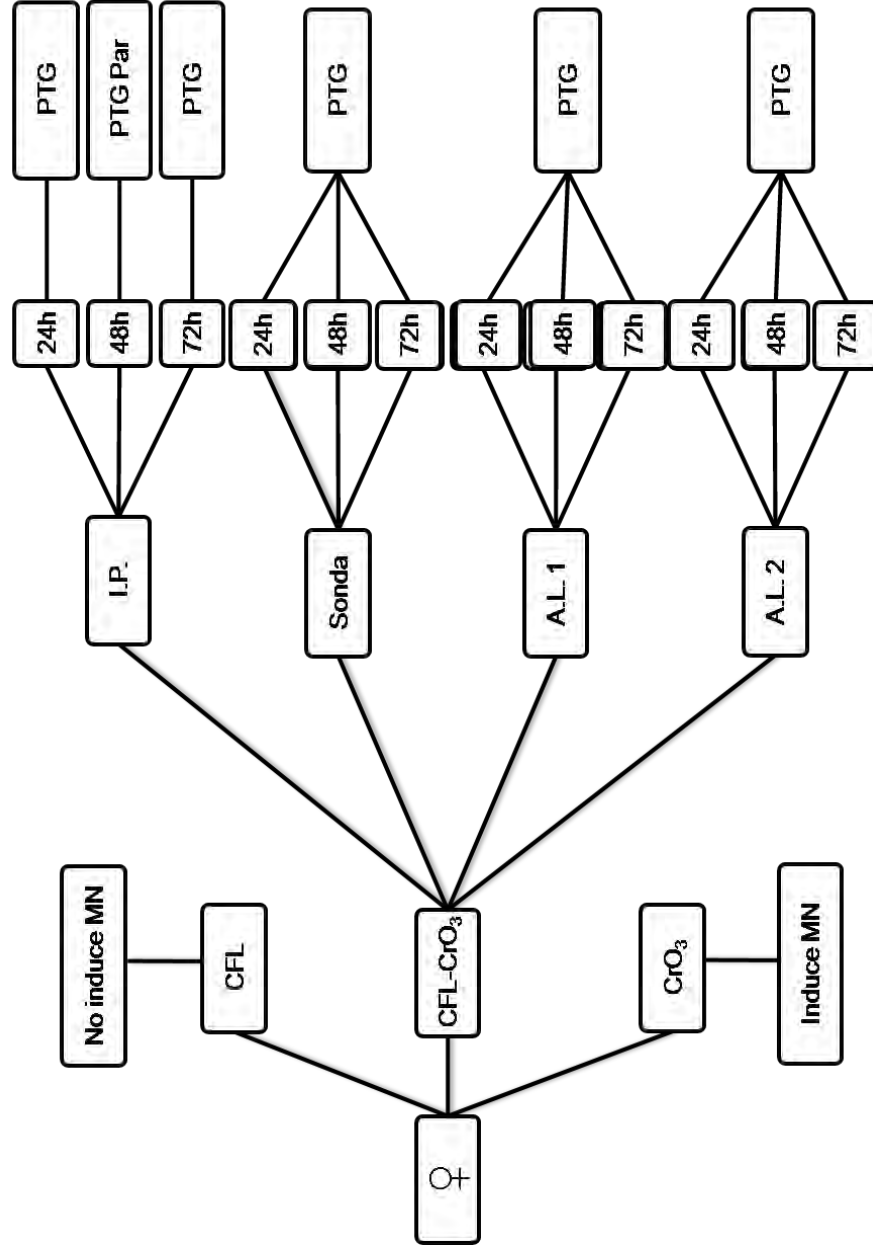


Figura 1. Resumen de resultados de los efectos de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño genotóxico en hembras preñadas inducido por el CrO₃. Indicado con PTG-Par cuando la disminución de MN aun resulta estadísticamente significativa y PTG cuando la disminución ya no es estadísticamente significativa cuando es comparada con el testigo.

Al evaluar las frecuencias de MN en los fetos obtenidos de las hembras tratadas con CFL solo se incremento la frecuencia de MN de forma estadísticamente significativa en las muestras obtenidas cuando se aplicó el tratamiento por vía i.p., esto al igual que para el caso anterior puede deberse a que por esta vía de administración los fetos se encuentran más expuestos a los compuestos en comparación con otras vías de administración (Nau y Bass, 1981) y por la afinidad que presenta la CFL hacia los sitios de implante cuando se administra en el área peritoneal (García-Rodríguez *et al.*, 2002) al igual que otros como el azul de tripano que se emplea precisamente para identificar sitios de implante (Scialli, 1992). Esta afinidad de la CFL con los sitios de implantación sugiere que al administrar CFL en el peritoneo de las hembras preñadas, la CFL se une a los sitios de implantación mediada por las glándulas metriales.

En el grupo de hembras preñadas que se les administró solo el CrO_3 se presento daño genotóxico en los fetos mediante el incrementó estadísticamente significativo de la frecuencia de MN. Estos datos concuerdan con estudios en los que se han administrado compuestos como $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ por vía i.p. en el día 17 de gestación y se observaron incrementos en la frecuencia de MN de manera estadísticamente significativa en hepatocitos de hígado de fetos obtenidos en el día 18 de gestación (De Flora *et al.*, 2006) y en EPC de sangre periférica de fetos obtenidos de hembras tratadas con CrO_3 (García-Rodríguez 2006; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano 2006), por lo que el CrO_3 induce daño genotóxico transplacentario. La inducción del daño genotóxico en los fetos inducido por el CrO_3 administrado a las madres gestantes concuerda con los resultados de estudios previos en donde se describe que algunos compuestos de Cr (VI) son capaces de atravesar la barrera placentaria y llegar a los tejidos fetales donde se reduce hasta Cr (III) liberando ERO's, las cuales pueden inducir daño al ADN (Danielsson *et al.*, 1982; Trivedi *et al.*, 1989; Kanojia *et al.*, 1998; Elsaieed y Nada, 2002).

Cuando se combinaron los tratamientos de CFL administrada por vía i.p y oral (sonda y acceso libre) y CrO_3 a hembras preñadas, se observó que la administración previa de CFL disminuye la frecuencia de MN en los fetos, en comparación con el grupo tratado solo con CrO_3 , por lo que se puede decir que la CFL puede proteger del daño genotóxico inducido por el CrO_3 en los fetos de hembras tratadas previamente con CFL tanto por vía i.p. como por vía oral. Cabe aclarar que, el efecto protector de la CFL administrada vía acceso libre depende de la dosis administrada, ya que al aumentar la dosis a 53.4mg/kg, el efecto protector de la CFL es de casi el 100% tanto en hembras preñadas como en fetos. En la figura 12 se muestra el a manera de conclusión el análisis de los efectos observados de daño genotóxico en fetos evaluado mediante el análisis de la frecuencia de MN.

Genotoxicidad Fetos

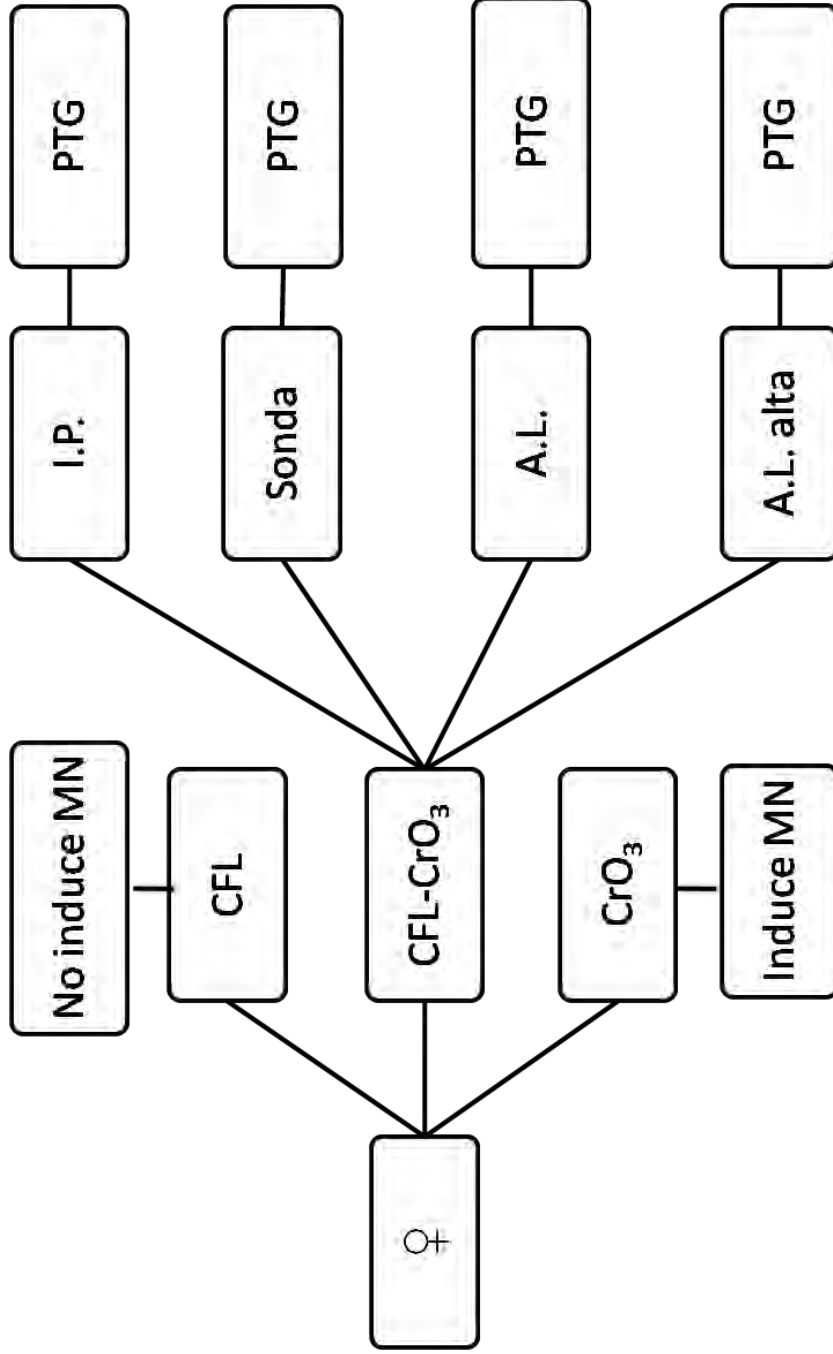


Figura 2. Resumen de resultados de los efectos de la CFL administrada por diferentes vías sobre el daño genotóxico inducido por CrO_3 en fetos obtenidos de hembras tratadas. Indicado con PTG cuando la disminución ya no es estadísticamente significativa cuando es comparada con el testigo.

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 ENC (Vallarino-Kelly y Morales-Ramírez 2001). En la figura 13 y 14 se muestra el resumen del análisis de la frecuencia de EPC en hembras preñadas y fetos, donde se puede observar que no hubo efectos sobre la frecuencia de EPC en los grupos donde se administró CrO₃ al compararse con el grupo control (figura 13), estos datos concuerdan con lo reportado por De Flora *et al.*, (2006) quienes observaron que la administración de Cr (VI) no altera la frecuencia de EPC/ENC. En cuanto a las evaluaciones de EPC en fetos se observó un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de EPC en el grupo combinado donde la CFL se administró vía acceso libre a las madres. 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 también activarse los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarse el efecto (Khrisna y Hayashi, 2000).

Citotoxicidad Hembras Preñadas

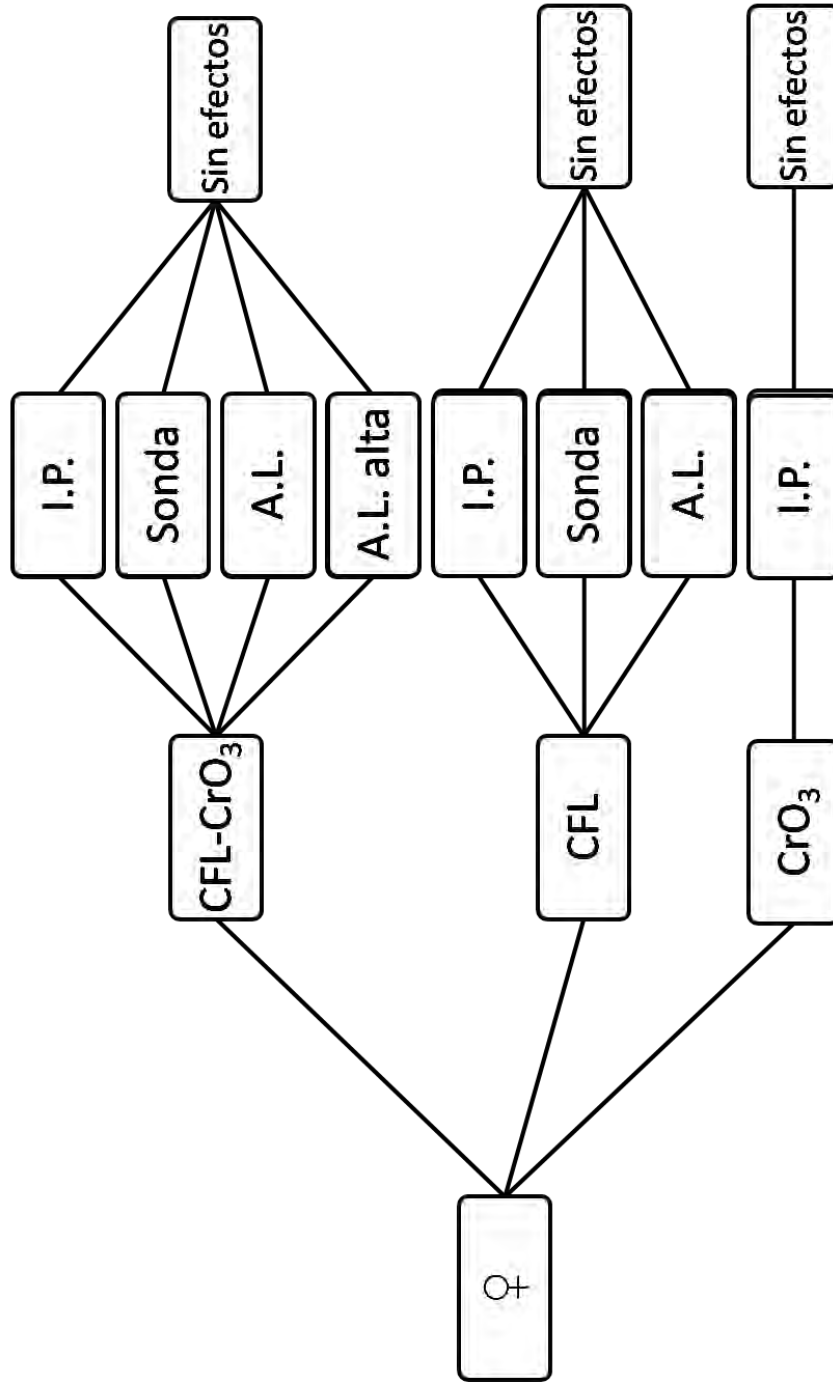


Figura 3. Resumen de resultados de los efectos de la CFL sobre el efecto citotóxico del CrO₃ en hembras preñadas

Citotoxicidad Fetos

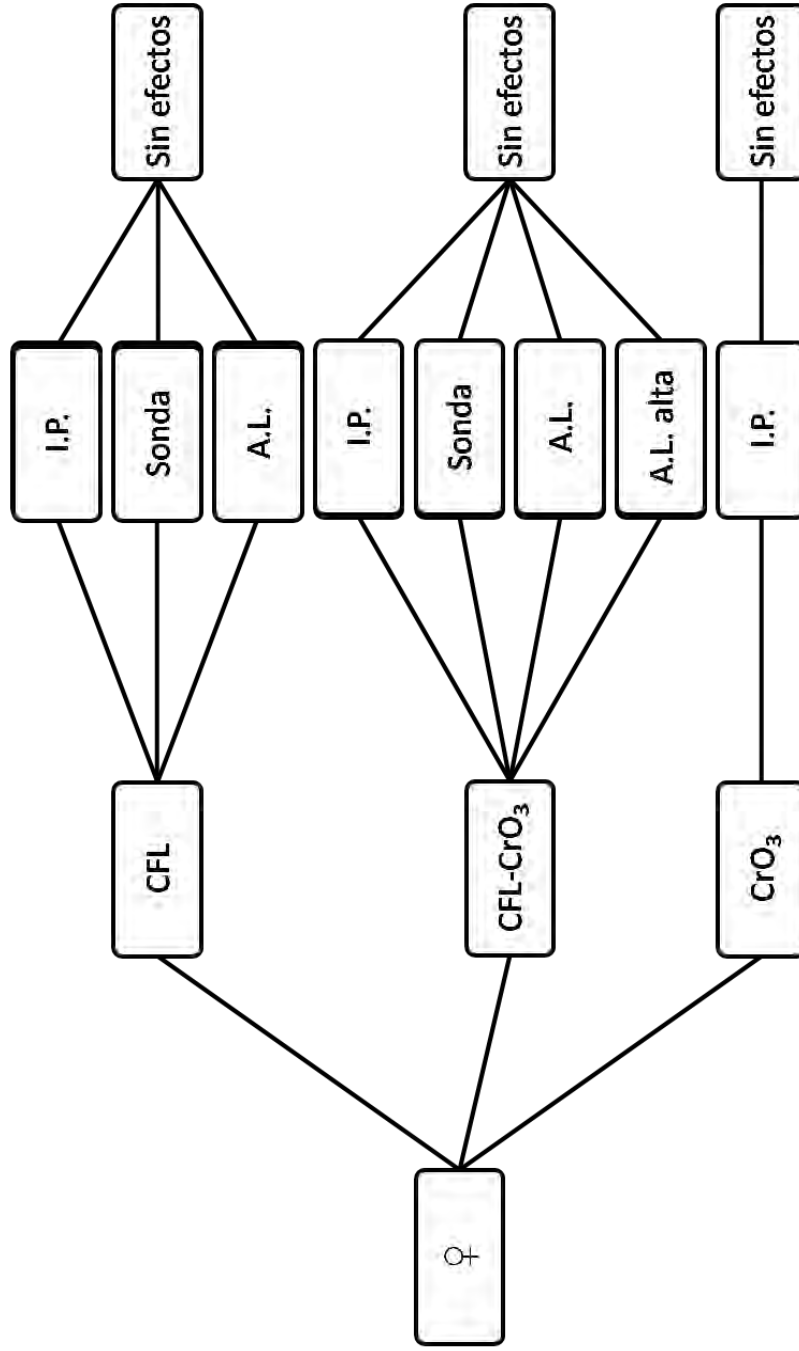


Figura 4. Resumen de resultados de los efectos de la CFL administrada por diferentes vías sobre el efecto citotóxico del CrO_3 en fetos obtenidos de hembras tratadas

Cuando se administró solo CFL a las hembras preñadas no se observaron signos aparentes de toxicidad materna en comparación con el grupo donde solo se administró CrO₃, ya que en este último las madres presentaron disminución de peso, pérdida de camadas totales y abortos, incremento en el número de reabsorciones y en el número de fetos muertos. Estas observaciones coinciden con lo reportado por Elbeteiha y Al-Hamood, (1997) quienes administraron vía oral compuestos de Cr (VI) a hembras preñadas y observaron disminución en la frecuencia de fetos vivos e incremento de reabsorciones. Se ha propuesto que los compuestos de Cr (VI) son capaces de atravesar la membrana transplacentaria y depositarse en los fetos e inducir muerte embrionaria o fetal (Danielsson *et al.*, 1982; Elsaieed y Nada, 2002). Uno de los resultados más frecuentes observados después de la exposición a agentes tóxicos durante la gestación es la presencia de signos de toxicidad materna (reducción en el peso corporal, aborto y muerte) e inducción de malformaciones en fetos (Khera, 1984; 1987), sin embargo en muchos estudios se reporta muerte y por lo tanto no se pueden evaluar efectos en el recién nacido. Aunque también se ha planteado que las muertes embrionarias y fetales pueden estar relacionadas con daño genotóxico (Giavini *et al.*, 1984; Kola *et al.*, 1986; Ornaghi *et al.*, 1989).

Cuando se combinaron los tratamientos de CFL y CrO₃ administrados a las hembras preñadas, persistieron algunos signos de toxicidad materna como la pérdida de camada en el grupo tratado con CFL por vía oral (sonda), incremento en el número de reabsorciones en el grupo tratado con CFL por vía i.p. e incremento en el número de fetos muertos y decremento en el peso materno en el grupo tratado con CFL por vía oral (dosis alta por acceso libre). Los signos de toxicidad observados probablemente son debidos a que la homeostasis y niveles hormonales de las hembras preñadas cambia alterándose la fisiología y dado que el organismo materno provee el desarrollo embrionario y fetal con el ambiente físico, los nutrientes y mecanismos para la eliminación de los desechos metabólicos, la alteración del estado fisiológico de la madre afecta su habilidad para proveer estos requerimientos para el desarrollo embrionario y fetal (Khera, 1984; Desesso, 1987; Khera, 1991; Saxena *et al.*, 1990; Kanojia *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2002).

Cuando se analizaron los fetos obtenidos en el día 18 de gestación de hembras preñadas tratadas con CFL administrada por diferentes vías no se modificaron las frecuencias de alteraciones externas y esqueléticas de manera estadísticamente significativa, mientras que la administración de CrO_3 por vía i.p. a las hembras preñadas incremento la frecuencia de alteraciones tales como falta de osificación, parpados abiertos y cola enroscada, las cuales coinciden con las previamente reportadas en estudios donde en los que se administraron compuestos de Cr (VI) a hembras preñadas vía oral (Kanojia *et al.*, 1998) y vía i.p. (López-Santiago, 2001). El mecanismo por el cual el CrO_3 induce este tipo de alteraciones en el desarrollo fetal, puede estar relacionado con el estrés oxidante ya que el CrO_3 al atravesar la membrana celular es reducido hasta Cr (III) y como resultado se generan ERO's, las cuales inducen restricción sobre el crecimiento intrauterino y retardan el desarrollo esquelético presentando disminución en la frecuencia en los puntos de osificación (Xu *et al.*, 2006), por lo que el tipo y la frecuencia de las alteraciones observadas hacen suponer que se deben a un efecto fetotóxico y no teratógeno, ya que se encontraron alteraciones como retraso en el desarrollo, presencia de hematomas y muerte fetal. Cuando se administraron previamente los tratamientos de CFL, se redujeron las alteraciones inducidas por el CrO_3 de manera parcial y diferenciada, ya que esta dependió de la vía de administración, la dosis y el tipo de alteración. Por ejemplo la micromelia y ectrodactilia persisten cuando se combina el CrO_3 con la CFL administrada vía i.p., mientras que cuando la CFL se administró por vía oral (sonda y acceso libre) la frecuencia de este tipo de alteraciones disminuyen, lo cual de igual manera como se menciono anteriormente esto puede estar relacionado con la vía de administración i.p. donde la CFL tiene afinidad con las glándulas metriales. Por otra parte, se ha observado que la falta de osificación pueden ser atribuidas a un retardo de la velocidad de la formación de los huesos (Santiago-López, 2001) ya que se ha descrito la osificación en el ratón se presenta primordialmente que entre el día 13 y 14 de gestación y concluye entre el día 17 y 18 (Palmer, 1979). Con lo antes mencionado se sugiere que la asimetría en las estenebras y la falta de osificación observada en los fetos analizados, no se debe a un daño teratógeno, sino a la falta

de desarrollo en los fetos, relacionado con la toxicidad materna reportada por Khera (1991). A la frecuencia de costillas cortas y rudimentarias algunos autores las no las han considerado como un indicador de daño teratogénico, ya que no representan una malformación específica, ya que existe una fase transitoria de poca maduración esquelética durante el desarrollo fetal, por lo que estas alteraciones pueden desaparecer en el desarrollo intra o extrauterino, con el crecimiento del ratón (Wright *et al.*, 1958; Foulon *et al.*, 1999).

Hasta el momento son pocos los estudios realizados sobre agentes antimutágenos y teratogénicos administrados durante la preñez, debido a la complejidad de los mismos, sin embargo se ha descrito que sustancias como el ginseng pueden reducir los efectos mutágenos y teratogénicos inducidos por compuestos de Cr (VI) (Elsaieed y Nada, 2002), así como la CFL administrada por vía i.p. protege de la acción genotóxica y teratogénica del Cr (VI) (García-Rodríguez, 2006). También se ha observado que la CFL, clorofilas purificadas y espinaca liofilizada pueden presentar efectos quimiopreventivo en la carcinogénesis transplacentaria mediante la disminución de la multiplicidad de tumores de pulmón en el recién nacido (Castro *et al.*, 2009). Con estos trabajos se abre un nuevo campo de estudio de gran interés. En la figura 15 se muestra a manera de conclusión un resumen de los resultados de los efectos de la CFL administrada por diferentes vías sobre los efectos en las camadas y las alteraciones en el desarrollo fetal inducidas por el CrO₃.

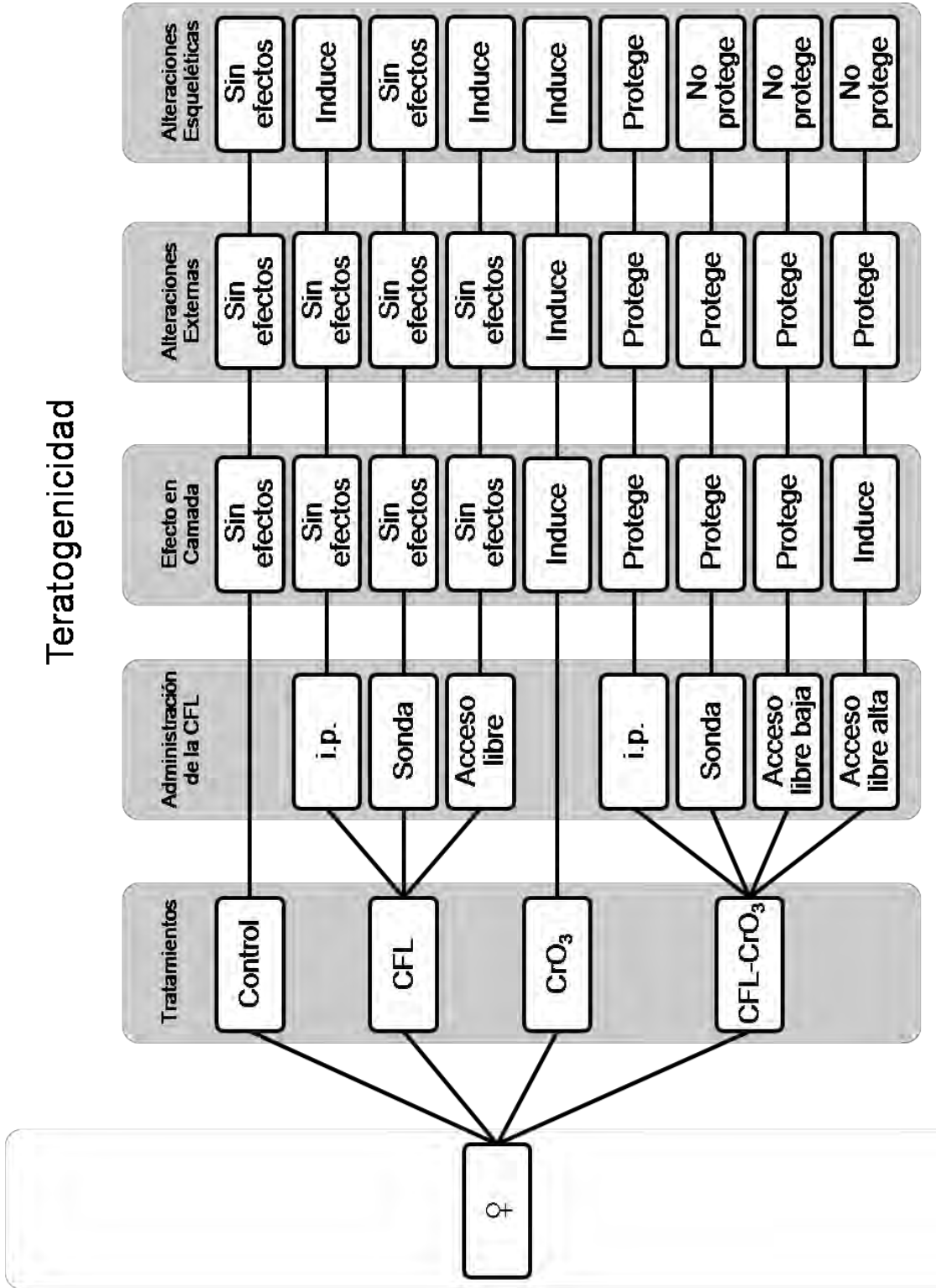


Figura 5. Resumen de resultados de los efectos de la CFL administrada por diferentes vías sobre las alteraciones en el desarrollo fetal inducidas por el CrO₃

8. Conclusiones

- La administración por diferentes vías de CFL tanto en hembras preñadas como en fetos no incrementa la frecuencia de MN, por lo que la CFL no presenta efectos genotóxicos.
- La administración de 20mg/kg de CrO_3 induce daño genotóxico tanto en madres como en fetos ya que incrementa la frecuencia de MN en sangre periférica.
- La administración previa de CFL administrada por vía i.p. y oral (sonda y acceso libre) disminuye el daño al ADN inducido por el CrO_3 de manera parcial y diferenciada en hembras preñadas y fetos, por lo tanto la CFL protege de los efectos genotóxicos del CrO_3 .
- No se observaron modificación de las frecuencias EPC con respecto al ENC cuando se administraron a las hembras CFL por vía i.p. y oral (sonda y acceso libre), CrO_3 por vía i.p. y la combinación de ambos tratamientos, por lo que la administración de estos agentes no presentan efectos citotóxicos evaluados mediante este parámetro.
- La administración de 20mg/kg de CrO_3 a hembras preñadas en el día 15 de gestación induce alteraciones relacionadas con daño teratógeno como ectrodactilia, micromelia, extremidades rotadas, parpados abiertos, cola enroscada, estenebras bifurcadas, costillas supernumerarias, columna desviada y vertebras desplazadas.

La administración previa de CFL protege de algunas las alteraciones en el desarrollo inducidas por el CrO_3 de manera parcial y diferenciada, ya que esta dependió de la vía de administración, la dosis y el tipo de alteració

9. Referencias

- Aliverti, V., Bonanomi, L., Giavini, E., Leone, V. and Mariani, L. (1979). The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology* 20, 237-242.
- Ames, B. (1989). Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. *Environ. Mol. Mutag.* 14, 66-77.
- Anderson, R.A. (1981). Nutricional role of chromium. *Sci. Total Environ.* 17, 13-29.
- ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades). (2000). Reseña Toxicológica del Cromo. Atlanta. http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs7.pdf (12 de abril 2008).
- Arimoto, S., Negishi, T. and Hayatsu, H. (1980). Inhibitory effect of hemin the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.* 11, 29-33.
- Baker, H.J., Lindsey, R.J. and Weisbroth, H.S. (1980). *The Laboratory Rat: Research applications. Volumen I y II*, Academic Press Inc., USA, pp. 276.
- Bender, M. (1980). Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production. Plenum, New York, 245-265.
- Blum, A.C., Xu, M., Orner, A.G., Fong, T.A., Bailey, S.G. and Stoner, D.G. (2001). β -catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-animo-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis.* 22, 315-320.
- Breinholt, V., Arbogast, D. Loveland, P., Pereira, C., Dashwood, R., Heendricks, J. and Bailey, G. (1999). 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.
- Carson, B.L., Ellis III y McCann, J.L. (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Lewis Publishers, INC. 68-74.
- Castro, D., V.Löhr, C., Fischer, K., Walters, K., Weeb-Robertson, B., Dashwood, R., Bailey, G. and Williams, D. (2009) Identifying efficacious approaches to chemoprevention with chlorophyllin, purified chlorophylls and freeze dried spinach in a mouse model of transplacental carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2-315-320.

- Cheng, R., Alvord, W., Powell, D., Kasprzak, K. and Anderson, L. (2002) Increased serum corticosterone and glucose in the offspring of chromium (III)-treated male mice. *Environ. Health Perspect.* 110, 801-804.
- Cole, R.L., Taylor, N., Cole, J. and Arlett, C.F. (1981). Short-term tests for transplacentally active carcinogens. Micronucleus in fetal and maternal mouse erythroblast. *Mutat. Res.* 80, 141-157.
- Cole, J. and Skopek, T. (1994). International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat. Res.* 304, 33-106.
- Danielson, R., Hassoun, E. and Denker, L. (1982) Embryotoxicity of Chromium: Distribution in pregnant mice and effects on embryonic cell in vitro. *Arch. Toxicol.* 51, 233-245.
- Dawson, A. B. (1926). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Citado en Caffeine and reduction of ossification in the rat: fact or artifact? Mother, T.F. (1988) Teratology* 37, 239-247.
- De Flora, S., Bagnaso, M., Serra, D. and Zancacchi, P. (1990) Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat. Res.* 238, 99-172.
- De Flora, S., Iltcheva, M. and Balansky, R. (2006) Oral chromium (VI) does not affect the frequency of micronuclei in hematopoietic cells of adult mice and of transplacentally exposed fetuses. *Mutat. Res.* 610, 38-47.
- Desesso, J.M. (1987). Maternal factors in developmental toxicity. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 7, 225-240.
- Desesso, J.M., Scialli, R.A. and Goeringer, G.C. (1994). D.mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits. *Teratology.* 49, 248-259.
- ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) (1983) Identification and assessment of the effects of chemicals on reproduction and development (reproductive toxicology). Monograph No. 5. Belgium, pp. 32.
- Eriksson, U. J. and Borg, L. A. H. (1991). Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetology.* 34, 325-331.
- Elbeteiha, A. and Al-Hamood, M. (1997) Long-term exposure of male and female mice to trivalent and hexavalent chromium compounds: effect on fertility. *Toxicology* 116, 39-47.

- Elsaieed, E. and Nada, S. (2002) Teratogenicity of hexavalent chromium in rats and the beneficial role of ginseng. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 361-368.
- FDA (Food and Drug Administration) (1966) Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use.
- FDA (Food and Drug Administration) (2000) IV.C.1 Short-Term test for Genetic Toxicity. Redbook 2000
- FDA (Food and Drug Administration) (2000) IVC.1.d. Mammalian erythrocyte Micronucleous Test. Redbook 2000
- Ferguson, L.R., Philpott, M. and Karunasinghe, N. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology.* 198, 147-159.
- Foulon, O., Girard, H., Pallen, C., Urtizbera, M., Repetto-Larsay, M. and Blacker, A. (1999). Induction of Supernumerary Ribs with Sodium Salicylate. *Reproductive Toxicology* 13, 369-374.
- García-Rodríguez, M.C. (2006). Estudio de los Efectos de la Clorofilina sobre la Acción Genotóxica y Teratógena del Cromo (VI). Tesis Doctorado en Ciencias Biología, División de Estudios de Posgrado Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- García-Rodríguez, M.C. y Altamirano-Lozano, M. (2001). Sales de Sodio y Cobre de la Clorofila: Usos, Aplicaciones Terapéuticas, Actividad Antimutágena y Anticancerígena. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 4, 77-86.
- García-Rodríguez, M.C. y Altamirano-Lozano, M. (2007). La Clorofilina como Modulador y Protector de Daño al ADN: Experiencia en el Ratón in vivo. *Bioquímica* 32, 15-24.
- García-Rodríguez, M.C., López-Santiago, V. and Altamirano-Lozano, M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research.* 496, 145-151.
- García-Rodríguez, M.C., Morales-Ramírez, P. and Altamirano-Lozano, M. (2002). Effects of chlorophyllin on mouse embryonic and fetal development in vivo. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 22, 461-471.
- Gentile, J.M. and Gentile, G.J. (1991). The metabolic activation of 4-nitro-O-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutat. Res.* 250, 79-86.

- Ghosh, a., Sen, S., Sharma, A. and Talukder G. (1991). Modification of clastogenic effects of mercuric chloride in mice *in vivo* by Chlorophyllin. *Toxicol. Lett.* 57, 11-18.
- Giavini, E., Bonanomi, L., and Ornaghi, F. (1984) Developmental toxicity during the preimplantation period: embryotoxicity and clastogenic effects of chlorambucil in the rat. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 4, 341-348.
- Giavini, E., Lemonica, I., Luo, Y. and Prati, M. (1990) Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rat treated before implantation with anticancer drugs: cyclophosphamide, cis-platinum, adriamycin. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 10, 417-426.
- Gómez-Arrollo, S. and Villalobos-Pietrini, R. (1983). Chromosomal Alteracions by some Chromium Salts, *Cytology.* 48, 185-193.
- Harkness, J.E. and Wagner, J.E. (1989). *The biology and medicine of rabbits and rodents.* Ed. Lean y Febiger, London.
- Hartwig, A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals.* 8, 3-11.
- Hayashi, M., Tice, R., MacGregor, Gatehouse, D., Adler, I., Blakey, D., Dertinger, S., Krishna, G., Morita, T., Russo, A. and Sutuo, S. (2000) *In vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay: II. *Env. Mol. Mutagen.* 35, 234-252.
- Hayashi, T., Schimerlik, M. and Bailey, G. (1999). 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.
- Heddle, A., Hite, M., Kirkhart, M. and Salamone, F. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. Elsevier science publisher. 83, 165-1110.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1990) Monograph on the evaluation of carcinogenesis risk to humans, chromium, nickel and welding, Lyon, France.
- Itoh, S. and Shimada, H. (1996) Micronucleous induction by chromium and selenium, and suppression by metalo thionein inducer. *Mutation Res.* 367, 233-236.
- Kada, T., Kato, M., Aikawa, K. and Kiriyaama, S. (1984). Adsorption of pyrrolisate mutagens by vegetable fibers. *Mutat. Res.* 141, 149-152.
- Kada, T., Morita, K. and Inoue T. (1978). Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutat. Res.* 53, 351-353.

- Kanojia, R., Junaid, M. and Murthy, R. (1998) Embryo and fetotoxicity of hexavalent chromium: a long-term study. *Toxicology Letters*. 95, 165-172.
- Kephart, J.C. (1955). Chlorophyll derivatives their chemistry commercial preparation and uses. *Econ. Bot.* 9, 3-38.
- Khera, K. (1991) Chemically induced alteration in maternal homeostasis and histology of conceptus: their etiologic significance in rat fetal abnormalities. *Teratology*. 44, 259-297.
- Khrisna, G. and Hayashi, M. (2002) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455, 155-166.
- King, M. and Wild, D. (1979). Transplacental Mutagenesis: The micronucleus test on fetal mouse blood. *Genet.* 51, 183-194.
- Klauning, J. and L. Klamendulis. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annuary Review of Toxicology and Pharmacology*. 44, 239-267.
- Kram, D., Bynum, C., Senula G., Bickings, C. and Schneider, E. (1982). In utero analysis of sister chromatid exchange: alterations in susceptibility to mutagenic damage as a function of fetal cell type and gestational age. *Cell Biology*. 8: 4784-4787.
- Krasnikova, N.A. (1973). Proliferation of the epithelium surrounding a skin wound in hairless mice exposed to sodium chlorophyllin. *Byul. Eksp. Biol. Med.* 76, 99-102.
- Kojima, R. (1978). Inhibitory mechanism of copper chlorophyllin on the hemolytic activity of cabrotoxin. *Igaku to Seibutsugaku*. 96, 461-463.
- Kola, I., Peter, I. and Parker, I. (1986) Maternal administration of cyclophosphamide induces chromosomal aberrations and inhibits cell number, histone synthesis in preimplantation mouse embryos. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 6, 115-127.
- Lai, C.N. (1979). Chlorophyll: the active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens in vivo. *Nutr Cancer*. 1, 19-21.
- Lai, C.N., Butler, M.A. and Matney, T.S. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyllin content. *Mutat. Res.* 77, 245-250.
- López-Santiago, V. (2001). Estudio del efecto genotóxico y teratógeno del trióxido de cromo (CrO₃) durante el desarrollo fetal del ratón in vivo. Tesis Licenciatura Biología. Facultad de estudios superiores Zaragoza, UNAM.

- Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 239, 29-80.
- Mendez-Pinto, M.M., Silva-Ferreira, A.C. Caris-Veyrat, C. and Guedes de Pinho, P. (2005). Carotenoid, chlorophyll, and chlorophyll-derived compounds in grapes and port wines. *J Agric Food Chem.* 53, 10034-10041.
- Mertz, W. (1969). Chromium occurrence and function in biological systems, *Physiological Reviews.* Vol. 49, N° 2.
- Morales-Ramírez, P. and García-Rodríguez, M.C. (1994) *In Vivo* Effect of Chlorophyllin on γ -ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutat. Res.* 320, 329-334.
- Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. and Rodríguez-Reyes, R. (1996). Effect of Chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. *Mutat. Res.* 391, 127-134.
- Morita, K., Hara, M. and Kada, T. (1978). Studies on natural desmutagens screening for vegetables and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from aminoacids. *Agric Biol Chem.* 42, 1235-1238.
- Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T. and Tweats, D. (1999). ICH-harmonized guidance on genotoxicity testing on pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res.* 436, 195-225.
- Nagai, H., Nishiyori, T., Diakoku, M. and Koda, A. (1983). Immunopharmacological studies of sodium-copper-chlorophyllin. *Pharmacol.* 33, 819-828.
- Nakeeb, M. and Yousef, R. (1974). Antimicrobial activity of sodium copper chlorophyllin. *Pharmazie.* 29, 48-50.
- Nau, H and Bass, R. (1981). Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the mouse embryo and fetus. *Toxicology.* 20, 299.
- Newmark, H. (1987). Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 461-466.
- Novotná, B. y Jelínek, R. (1990). Mutagenic and teratogenic effects of cyclophosphamide on the chick embryo: chromosomal aberrations and cell proliferation in affected and unaffected. *Wiley-Liss, Inc.* 341-350.

- Oda, T., Yokono, O., Yoshida, A., Miyake, K. and Lino, A. (1971). On the successful treatment of pancreatitis with chlorophyll-a and inhibitory effect of its derivatives on trypsin and other protease activities *in vitro*. *Gastroenterol. Japonica*. 6, 49-54.
- Ong, T.M., Whong, W.Z., Stewart, J. and Brockman, H.E. (1989). Comparative antimutagenicity of five compounds against five mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutat. Res.* 222, 19-25.
- Ornaghi, F. and Giavini, E. (1989) Induction of micronuclei preimplantation rat embryos *in vivo*. *Mutat. Res.* 225, 71-74.
- Oster, G., Broyde, S. and Bellin, J. (1964). Spectral properties of chlorophyllin. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1309-1313.
- Palit, S., Sen, S., Sharma, A. and Talukder, G. (1991). Protection by chlorophyllin against induction of chromosomal aberrations by cobalt in bone marrow cells of mice *in vivo*. *Fitoterapia* 42, 425-428.
- Palmer, A. (1979). Sporadic malformations in laboratory animals and their influence on drug testing. *Adv. Exp. Med Biol.* 27, 45-60.
- Phillips, R. (1975). Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among seventh-day adventists. *Cancer Research*. 32, 3513-3522.
- P.H.S. (Public Health Service) (2000). US Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological Profile for Chromium.
- Platzek, T., Bochert, G. and Rahm, U. (1983) Embryotoxicity induced by alkylating agents. *Arch. Toxicol.* 52, 45.
- Sarkar, D., Sharma, A. and Talukder, G. (1994). Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutat. Res.* 318, 239-247.
- Sarkar, D., Sharma, A. and Talukder, G. (1993). Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*. *Mutat. Res.* 301, 33-38.
- Saxena, D., Murthy, R., Jain, V. and Chandra, S. (1990) Fetoplacental-maternal uptake of hexavalent chromium administered orally in rats and mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 430-435.
- Scialli, R.A. (1992). A clinical guide to reproductive and developmental toxicology. CRC. U.S.A. 284pp.

- Sen, S., Sharma, A. and Talukder, G. (1991). Inhibition of clastogenic effects of nicotine by chlorophyllin in mice bone marrow cells *in vivo*. *Phytother. Res.* 5, 130-133.
- Shi, X. and Dalal, N.S. (1992). The role of superoxide radical in chromium (VI) generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss cycle. *Biochem. Biophys.* 292, 323-327.
- Staples, R.E. and Schenell, V.L. (1964). Refinements in rapid clearing technique in the KOCH-Alizarin Red-S method for fetal bones. *Stain Technol.* 39, 61-64.
- Surh, Y. and L. Ferguson. (2003). Dietary and medicinal antimutagenesis and carcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutat. Res.*, 523, 1-8.
- Taylor, P. (1986). *Practical Teratology*, Academic Press Inc, Orlando Florida.
- Te, C. Gentile, J.M., Baguley, B.C. and Pearson, A. E. (1997). *In vivo* effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide. *Int. J. Cancer.* 70, 84-89.
- Terwel, L. and Van der Hoeven, C.M. (1985). Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the Salmonella microsome assay. *Mutat Res.* 152, 1-4.
- Topham, J, Albanese, R., Bootman, J., Scott, D. and Tweats, D. (1983). *In vivo* cytogenetic assays, in: UKEMS Sub-committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part I, Basic test Battery, Ed. B.J. Dean, United Kingdom Environmental Mutagen Society, Swansea, 119-141pp.
- Trivedi, B., Saxena, D., Murthy, R. and Chandra, S. (1989) Embryotoxicity and fetotoxicity of orally administered hexavalent chromium in mice. *Reprod. Toxicol.* 3, 275-278.
- Vallarino-Kelly, T. and Morales-Ramirez, P. (2001) Kinetics of Micronucleous induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast *in vivo*. *Mutat. Res.* 495, 51-59.
- Whong, W., Stewart, J., Brockman, H.E. and Ong, T. (1988). Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B₁-induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Teratogen Carcinogen Mutagen.* 8, 215-224.
- World Cancer Research Fund. (2008). <http://www.dietandcancerreport.org> (3 de abril, 2008)

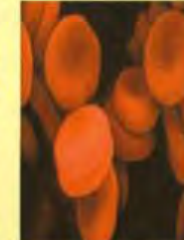
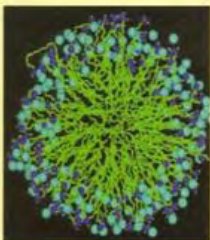
- Wright, H., Asling, W., Dougherty, H., Nelson, M. and Evans, H. (1958). Prenatal Development of the Skeleton in Long-Evans Rats. *Anat Rec* 130, 654-677.
- Xu, DX., Cheng, YH., Zhao, L., Wang, H. and Wei, W. (2006) Reactive oxygen species are involved in lipopolysaccharide-induced intrauterine growth restriction and skeletal development retardation in mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 195, 1707-1714.
- Zemlickis, D., Lishner, M., Erlich, R. and Koren, G. (1993) Teratogenicity and carcinogenicity in a twin exposed in utero to cyclophosphamide. *Teratogen Carcinogen Mutagen*.13, 139-143.

10. Anexos

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



XIII



Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Sala Cuicacalli

1 al 3 de octubre de 2008



EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA CLOROFILINA SOBRE EL DAÑO AL ADN EN HEMBRAS PREÑADAS Y FETOS DE RATÓN CD-1

López Salinas Gabriela Vianey, Altamirano Lozano Mario y García Rodríguez María del Carmen.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F. maricar_67@yahoo.com



La clorofila es el principal pigmento y componente que le da el color verde a los vegetales, debido a que es poco estable, de baja pureza y poco soluble en el agua, se ha trabajado en su lugar con la clorofilina (CFL) que son sus sales de sodio y cobre. La CFL ha mostrado en diferentes sistemas de prueba una gran actividad antimutágena y anticancerígena, incluso mayor que antioxidantes como la vitamina C y la E. En estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, se observó que la administración previa de CFL a ratones hembras adultas tratadas con CrO_3 disminuía la frecuencia de micronúcleos (MN), por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto de la CFL sobre la inducción de MN utilizando hembras preñadas tratadas con CrO_3 , con el objetivo de estudiar si los mecanismos protectores de la CFL persisten durante la gestación, tanto en las madres como en sus crías. Se emplearon 4 grupos de hembras preñadas de ratón de la cepa CD-1, los cuales fueron divididos de la siguiente manera: Grupo testigo; solo se le administró el vehículo, Grupo CFL; se le administró una dosis de 20mg/kg de CFL por vía intraperitoneal (i.p.), Grupo CrO_3 , se le aplicó por vía i.p. una dosis de 20mg/kg de CrO_3 y Grupo CFL- CrO_3 , se le administró una dosis 20mg/kg de CFL y 4 horas después una dosis de 20 mg/kg de CrO_3 . Todos los tratamientos fueron administrados en el día 15 de gestación, los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas. Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal en las hembras adultas a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos, los fetos fueron obtenidos en el día 18 de gestación por cesárea y decapitados para la obtención de las muestras de sangre. Las muestras fueron analizadas en laminillas previamente tratadas con naranja de acridina, siguiendo la técnica de Hayashi *et al.*, 1991, para la evaluación del daño al ADN mediante la frecuencia de MN. Los datos fueron revisados mediante un análisis de varianza de un sentido seguido de una Tukey para determinar la significancia en el aumento del número de MN. En los resultados obtenidos se observó que en los grupos de hembras preñadas testigo y CFL no se incrementó la frecuencia de MN, mientras que el grupo de hembras preñadas tratadas con el CrO_3 , presentaron un incremento entre 4 y 6 MN. En el grupo en el que se combinaron los tratamientos de CFL y CrO_3 persistió el incremento de los MN, por lo que se puede decir que a diferencia de las hembras sin preñar, la CFL no protege del daño al ADN inducido por el CrO_3 en la gestación. En cuanto al daño al ADN transplacentario, se observó que en los fetos obtenidos de las madres de los grupos testigo y CFL no se incrementa el número de MN, mientras que en los fetos obtenidos de las hembras tratadas solo con CrO_3 hay un incremento de alrededor de 2 MN, el cual a pesar de ser marginal resultó estadísticamente significativo. En los fetos obtenidos de las hembras tratadas con CFL y CrO_3 , persiste el incremento en los MN, por lo que se puede decir que al igual que en las hembras preñadas la CFL no protege del daño inducido por el CrO_3 en los fetos.

FSFB, 3rd International Congress, 14-17 October, 2008, Querétaro



PROGRAM



FOOD SCIENCE AND FOOD BIOTECHNOLOGY IN DEVELOPING COUNTRIES

3rd International Congress

**Organized by
Asociación Mexicana de Ciencia de los
Alimentos (AMECA),
Universidad Autónoma de Querétaro,
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro
de la República (PROPAC)**

**Querétaro, México
October 14-17, 2008**

Effects of Sodium Copper Salts of Chlorophyll on DNA Damage Induced by Chromium (VI) During Pregnancy in Mice

García-Rodríguez, M. C.*, López-Salinas, G. V. and Altamirano-Lozano, M.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F.*maricar_67@yahoo.com

Certain naturally occurring food constituents in the human diet exhibit protective effects against a wide range of carcinogens. Most of these inhibitors are found in vegetables for example chlorophyll, a major constituent of green plants that has been reported to be responsible for its antimutagenic activity by scavenging free radicals. The sodium copper salts of chlorophyll (CHL) are obtained in a saponification process of crude extracts of green plants. Chromium (VI) induces DNA damage by reactive oxygen species (ROS) during its reduction to Cr (III). The aim of this study was to determine the effects of CHL on DNA damage induced by chromium (VI) [CrO₃]. Pregnant female mice (CD-1) were treated with CHL (20 mg/kg), Cr (VI) (20 mg/kg) or with CHL and Cr (VI) at 20 mg/kg body weight. The CHL and Cr (VI) were administered by intraperitoneal via, DNA damage was evaluated with analysis of micronucleus (MN). Blood samples of adult organisms and fetuses were obtained from the tail vein and from the trunk after decapitation, respectively. The administration of CrO₃ to 15-day pregnant mice increases MN in the mothers and pups. CHL administered previously to the injection of CrO₃ reduced MN present in the pregnant and fetuses mice in a non-significant way. These observations suggest that CHL is redistributed between the mother and her breeding. The frequency of PCE was lower in CrO₃ pregnant treated mice than control ones, suggesting that the cytotoxic effects could depend on the endocrine condition of the animals.

(keywords: chlorophyll, DNA damage, fetuses, gestation, chromium)

**IV Congreso de Investigación
en la FES Zaragoza**



Del 21 al 24 de octubre de 2008

ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPONENTES DE LA DIETA SOBRE EL DAÑO AL ADN INDUCIDO POR EL TRIÓXIDO DE CROMO EN EL RATÓN *in vivo*.

García-Rodríguez, M.C.,

Vilches Larrea, R.E.,

López Salinas, G.V.,

Guerrero Palomo G.

Altamirano Lozano M.

Unidad de Investigación en Genética. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. D.F.
maricar_67@yahoo.com

Las poblaciones humanas se encuentran expuestas a diversos agentes que pueden alterar la integridad del ADN y repercutir en la salud. En los últimos años se ha incrementado el estudio de sustancias con propiedades antioxidantes, con fines de buscar protección de daño al ADN. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los efectos del té verde, el vino tinto y la clorofilina sobre el daños al ADN inducido por el trióxido de cromo (CrO_3). Se empleó la técnica de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratón *in vivo*. Grupos de cinco ratones de la cepa CD-1 fueron tratados con agua, té verde y vino tinto (por vía intragástrica), CrO_3 y clorofilina (por vía intraperitoneal) y grupos combinados del té verde, vino tinto y la clorofilina con el CrO_3 . Las muestras de sangre se tomaron de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. Se observó que; en los grupos testigo, té verde y clorofilina no se modifica la frecuencia de MN, mientras que, en los grupos tratados con el CrO_3 y vino tinto se incrementa el número de MN, siendo más significativo para el grupo CrO_3 , ya que el grupo de vino tinto solo se incremento alrededor de dos MN, mientras que en el de CrO_3 hasta 8 MN. En los grupos que se combinaron los tratamientos se observo que, la clorofilina disminuye el efecto del CrO_3 , sin embargo, el té verde no modificó el efecto inducido por el CrO_3 .



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

División de Ciencias Químico Biológicas

CARRERA DE BIOLOGÍA

IV FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

**(V FORO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA, XXXIII FORO DE INVESTIGACIÓN
ESCOLAR, XXVII FORO DE SALIDAS TERMINALES)**

M E M O R I A S

**Realizado en el Auditorio de Campus II y Sala de Audiovisuales de la Biblioteca Campo II
del 12 al 16 de enero del 2009**

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS PIGMENTOS VEGETALES
(CLOROFILINA Y FLAVONOIDES) SOBRE EL DAÑO AL ADN INDUCIDO POR
EL TRIÓXIDO DE CROMO EN EL RATÓN *in vivo***

Vilches Larrea, R.E., López Salinas, G.V., Guerrero Palomo G.

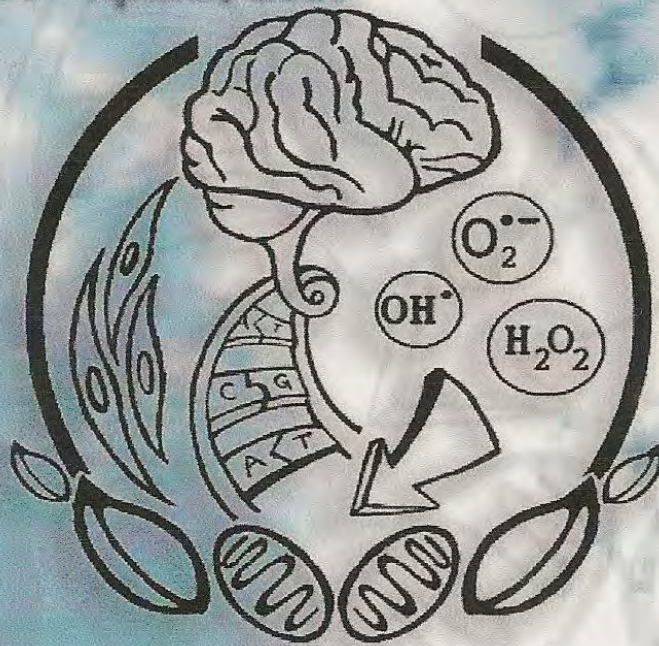
Asesores: Dra. Carmen García Rodríguez, Dr. Mario Altamirano Lozano

Las poblaciones humanas se encuentran expuestas a diversos agentes que pueden alterar la integridad del ADN y repercutir en la salud. En los últimos años se ha incrementado el estudio de sustancias con propiedades antioxidantes, con fines de buscar protección de daño al ADN. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los efectos del té verde, el vino tinto y la clorofilina sobre el daños al ADN inducido por el trióxido de cromo (CrO_3). Se empleó la técnica de micronúcleos (MN) en sangre periférica de ratón *in vivo*. Grupos de cinco ratones de la cepa CD-1 fueron tratados con agua, té verde y vino tino (por vía intragástrica), CrO_3 y clorofilina (por vía intraperitoneal) y grupos combinados del té verde, vino tinto y la clorofilina con el CrO_3 . Las muestras de sangre se tomaron de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de los tratamientos. Se observó que; en los grupos testigo, té verde y clorofilina no se modifica la frecuencia de MN, mientras que, en los grupos tratados con el CrO_3 y vino tinto se incrementa el número de MN, siendo más significativo para el grupo CrO_3 , ya que el grupo de vino tinto solo se incremento alrededor de dos MN, mientras que en el de CrO_3 hasta 8 MN. En los grupos que se combinaron los tratamientos se observo que, la clorofilina disminuye el efecto del CrO_3 , sin embargo, el té verde no modificó el efecto inducido por el CrO_3 .

4th International workshop
On comparative aspects
Of **oxidative stress**
In biological systems,

II Meeting of the Free Radicals and
Oxidative Stress branch of the
Mexican Biochemical Society.

March 31 - April 3, 2009



EFFECT OF CHLOROPHYLLIN ON GENOTOXICITY OF HEXAVALENT CHROMIUM (CrO₃) IN PREGNANCY FEMALE MICE

López-Salinas, G. V., Altamirano-Lozano, M. and García-Rodríguez, M. C.*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F.* grmc@puma2.zaragoza.unam.mx

Certain naturally occurring food constituents in the human diet exhibit protective effects against a wide range of carcinogens. Most of these inhibitors are found in vegetables for example chlorophyll, a major constituent of green plants that has been reported to be responsible for its antimutagenic activity by scavenging free radicals. The sodium copper salts of chlorophyll (CHL) are obtained by a saponification process of crude extracts of green plants. On the other hand is known that chromium (VI) induces DNA damage by reactive oxygen species (ROS) during its reduction to Cr (III). The aim of this study was to determine the effects of CHL on DNA damage induced by chromium (VI) [CrO₃]. Pregnant female mice (CD-1) were treated with CHL (20 mg/kg), Cr (VI) (20 mg/kg) or with CHL and Cr (VI) at 20 mg/kg body weight. The CHL and Cr (VI) were administrated by intraperitoneal via, and the DNA damage was evaluated by the analysis of micronucleus (MN). Blood samples of adult organisms and fetuses were obtained from the tail vein and from the trunk after decapitation, respectively. Results obtained shown that administration of CrO₃ to 15-day pregnant mice increases the MN frequency both, mothers and pups. CHL administrated previously to the CrO₃ treatment, reduced MN present in the pregnant and fetuses mice, but a non-significant way. These observations suggest that CHL is redistributed between the mother and her offspring. The frequency of Polychromatic Erythrocytes (PCE) was lower in CrO₃ pregnant treated mice than control ones, suggesting that the cytotoxic effects could depend on the endocrine condition of the animals.

(Key words: Chlorophyll, DNA damage, fetuses, gestation, Chromium)