ESTUDIO TERATOGENICO DE *Spirulina* EN RATA

Germán Chamorro[1], *María Salazar*[2] *y Silvia Salazar*[2]

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional (IPN)
México D. F., México

RESUMEN

El alga *Spirulina* es considerada como un complemento proteínico para uso humano y animal.

Todas las proteínas unicelulares destinadas a este propósito deben someterse previamente a investigaciones toxicológicas detalladas, en animales de laboratorio u otros modelos experimentales. Como parte de esas investigaciones, el objetivo del presente estudio fue el de evaluar su potencial teratogénico en ratas.

El alga fue administrada en la dieta a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/100 g durante los días 7-14, 1-14, y 1-21 de la gestación. Las hembras fueron sacrificadas antes de término, y los fetos examinados con el fin de detectar anormalidades externas, viscerales y esqueléticas. Según se determinó, los pesos maternal y fetal no se vieron afectados, y tampoco se produjo feto-toxicidad o teratogenicidad. Se considera importante llevar a cabo estos mismos estudios en otras especies animales.

INTRODUCCION

Las proteínas unicelulares obtenidas de bacterias, levaduras y algas se consideran, en algunos casos, como posibles suplementos proteínicos para consumo humano y animal.

El uso del alga *Spirulina* se conoce desde hace algunas centurias, ya que formaba parte de la alimentación de los Aztecas, quienes la consumían en forma de un queso llamado "Tecuitatl", palabra que en lengua

Manuscrito modificado recibido: 7–7–88.

1 Profesor Investigador, Cátedras de Toxicología de Alimentos y Toxicología Preclínica, Sección de Graduados de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Apartado Postal 105-314, Código Postal 11581, México D. F., México.

2 Profesor Investigador del Laboratorio de Toxicología Preclínica, Depto. de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

nahuatl significa "excremento de piedra" (1). Hoy se incluye en la dieta de los nativos que habitan en las orillas del lago Chad en Africa Central (2, 3). Desde el punto de vista nutricional, esta alga representa una fuente de alto contenido en proteínas (60-71 g/100 g), con una composición satisfactoria de aminoácidos (4).

Ante la eventualidad de los efectos indeseables en el hombre y en el animal que el consumo de proteínas no convencionales pueda tener, algunos organismos internacionales han recomendado una serie de estudios preclínicos de toxicología, independientemente de que tengan seguridad aparente (5, 6).

Como parte de ellos, los experimentos de toxicología analítica y toxicología biológica efectuados con *Spirulina* en animales de laboratorio, han demostrado ausencia de toxicidad (7-9). Recientemente, se informó, también que el tratamiento de tres generaciones sucesivas de ratas con esta alga, no produjo alteraciones en los índices de gestación, viabilidad y lactancia (10).

Con el fin de continuar los trabajos sobre toxicología de la reproducción, el propósito del presente estudio fue el de investigar el eventual efecto de la *Spirulina* sobre la descendencia, administrada a la madre en diferentes períodos de la gestación.

MATERIAL Y METODOS

La muestra de *Spirulina* utilizada en este estudio fue proporcionada por la Compañía Sosa Texcoco (México D. F., México) y consistió de alga seca en polvo, perteneciente a un mismo lote de producción.

Se utilizaron ratas Wistar primíparas cuyo peso era de 210 ± 20 g. Antes de iniciar el experimento y durante éste, los animales permanecieron en locales con ambiente controlado (temperatura de 22± 1ºC, ciclos de luz/obscuridad de 12 horas cada uno, y 60º/o de humedad relativa, proporcionándoles agua y alimento *ad libitum).* Luego de dos semanas de aclimatación, las hembras fueron apareadas de las 18:00 a las 9:00 horas del día siguiente, con machos de fertilidad comprobada. El acoplamiento fue verificado por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal, denominándose como día 1º de la gestación en caso positivo. Las hembras acopladas se repartieron aleatoriamente en cuatro lotes, los que recibieron dietas que contenían 0, 10, 20 y 30 g/100 g de *Spirulina,* principalmente por sustitución de la harina de soya, según se indica en la Tabla 1.

Las dietas fueron suministradas del 7-14, 1-14 y 1-21 días de la gestación (períodos A, B y C, respectivamente). Las hembras se pesaron los días 1, 7 y 14 y el día del sacrificio, que fue el 21. Después del sacrificio se practicó una cesárea para extraer los fetos, que se contaron, pesaron y anotaron si estaban vivos o muertos. Se sometieron a un examen minucioso con el fin de detectar malformaciones externas. Para observar las malformaciones internas se procedió según la técnica de cortes seriados de Wilson (11), que comprendió cabeza, tórax y abdomen. A este procedimiento se destinó aproximadamente dos tercios del número total de los fetos. Para el análisis del esqueleto se recurrió al método de coloración con alizarina, según Dawson, modificado por Staples (12), destinándose a

TABLA 1

COMPOSICION PORCENTUAL DE LA DIETA

Ingredientes	Dieta testigo	Dieta con *Spirulina*		
Alga *Spirulina*	—	10.0	20.0	30.0
Harina de pescado	8.0	8.0	8.0	8.0
Harina de soya	44.4	29.6	14.0	—
Trigo molido	33.5	35.8	37.8	39.1
Maíz amarillo molido	11.2	11.9	12.7	13.2
Harina de alfalfa	—	2.0	5.0	6.6
Aceite de maíz	1.6	1.6	1.6	1.6
Vitaminas y minerales	0.7	0.7	0.7	0.7
Lisina	0.6	0.4	0.2	—
Metionina	—	—	—	0.1
Fosfato monosódico	—	—	—	0.7

este examen el tercio restante. El recuento de implantaciones en el útero se hizo de acuerdo al procedimiento de Salewsky (13).

La significancia de las diferencias entre los animales tratados y testigos, se determino mediante prubas de X^2 o la prueba "t" de Student, dependiendo de la naturaleza de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aumento Ponderal

Los resultados del incremento ponderal de las madres que ingirieron *Spirulina* en los diferentes períodos de la gestación se muestran en la Tabla 2. Según se observa, la ingestión del alga durante el período de organogénesis, es decir, del 7–14 día, no alteró el peso, y su evolución continuó hasta el día del sacrifício en forma similar a los testigos. Cuando el alga se suministró a 20 g/100 g del 1–14, los animales pesaron significativamente más que los testigos los días 7 y 14, pero terminado el tratamiento desapareció la diferencia. Esto se volvió a observar con la administración durante todo el período de gestación. En este caso, la concentración de 30 g/100 g fue la que ocasionó la diferencia significativa hasta el día 7, efecto que no se presentó posteriormente. En experimentos llevados a cabo por Contreras (4) con concentraciones de 40 g/100 g, las ratas aumentaron de peso en forma ligeramente superior a los testigos cuya fuente de proteínas era la caseína. Aun cuando el estudio que nos ocupa trata de animales gestantes, es evidente el buen aprovechamiento de la proteína y la ausencia anticipada de toxicidad embrionaria.

TABLA 2

PORCENTAJE DE AUMENTO PONDERAL DE RATAS ALIMENTADAS CON *SPIRULINA* EN DIFERENTES PERIODOS DE LA GESTACION

Spirulina (g/100 g)	Períodos de tratamiento y dias de pesadas											
	A				B				C			
	Nº	7	14	21	Nº	7	14	21	Nº	7	14	21
Testigo	18	4.0	14.8	36.7	17	3.8	15.2	35.7	19	4.3	16.2	31.9
10	18	3.8	13.8	33.8	17	4.3	16.7	38.0	20	3.8	12.4	30.5
20	21	4.3	15.2	37.1	21	8.6[a]	18.6[b]	37.1	19	3.8	12.9	34.8
30	19	5.2	12.8	37.1	21	4.3	14.8	37.1	18	8.0	15.7	34.7

A = 7-14 días, B = 1-14 días, y C = 1-21 días.
Nº = Número de animales.
Diferencia significativa (prueba "t" de Student) en relación a los testigos: a = $P < 0.05$; b = $P < 0.01$.

Efecto sobre la Reproducción

La administración de la *Spirulina* del 7º al 14º día de la gestación no provocó alteración en los parámetros señalados en la Tabla 3. En efecto, no se encontró diferencia con los testigos en lo que respecta al número de camadas afectadas, ya sea porque hubiesen reabsorciones embrionarias, fetos anormales o simultaneamente reabsorciones y anormales. De la misma forma, interpretados los resultados en base al número de fetos afectados, ya fuese porque fueron reabsorbidos o porque eran anormales, tampoco se encontró diferencia con los testigos. En la Tabla 4 –que se refiere a la administración del alga durante los dos primeros tercios de la gestación– se nota que el promedio del peso fetal de madres tratadas con la dieta que contenía *Spirulina* (30 g/100 g) fue superior al peso de los testigos. Este dato, sin embargo, no coincidió con el aumento ponderal de las madres respectivas ni con un tamaño reducido de la camada, significando, por lo tanto, un efecto de la cianobacteria sobre el crecimiento fetal. Este incremento también se observó en los fetos de madres tratadas durante toda la gestación (Tabla 5), en donde las concentraciones de 10 y 30 g/100 g aumentaron el peso, efecto que no se logra con la concentración intermedia.

Cabe indicar que en todos los períodos de administración sujetos a experimentación, el número de madres afectadas fue elevado, al igual que el número de fetos. Esto se debe a que para la interpretación de los resultados se tuvieron en cuenta conjuntamente las reabsorciones y las anomalías de todo tipo, incluídos hematomas, falta de osificación, y desplazamiento de órganos, lo que –aun cuando no constituye precisamente una malformación– es conveniente considerarlas.

TABLA 3

EFECTO DE LA *SPIRULINA* SOBRE LA REPRODUCCION EN RATAS, ADMINISTRADAS DEL 7º AL 14º DIA DE LA GESTACION

Observaciones	*Spirulina* (g/100 g)			
	Testigo	10	20	30
Fecundadas:	19	20	22	21
— Con camada normal	15	15	16	16
— Con camada afectada	4	5	6	5
— Por reabsorciones[e]	1	2	1	2
— Por fetos anormales[e]	2	2	2	1
— Por reabsorciones y anormales[s]	1	1	1	2
Total de implantaciones	195	210	218	233
Implantaciones/madre	10.3 ± 2.2	10.5 ± 2.6	9.9 ± 2.4	10.6 ± 2.0
Total fetos	175	187	195	195
Fetos/madre	9.2 ± 2.5	9.3 ± 2.6	8.9 ± 2.5	9.3 ± 2.3
Fetos normales	169	180	190	190
Fetos afectados:	26	30	28	33
— Por anormalidades	6	7	5	5
— Por reabsorciones	20	23	23	28
Peso promedio fetal (g)	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.4	3.3 ± 0.3

e = Exclusivamente.
s = Simultáneamente.

El tipo de malformaciones encontradas en los fetos se describe en la Tabla 6. Según se observa, muchas de ellas se encuentran indistintamente repartidas en lotes testigos y en los tratados con *Spirulina*. Este es el caso de los fetos con costillas deformes, edema y hematomas. Como malformaciones particulares no encontradas en el lote testigo, se tuvieron casos de celosomia, costillas extras, costillas reducidas, edema e hidronefrosis. No obstante, la incidencia de estas anormalidades fue muy baja y corresponde a los estándares espontáneos encontrados en rata, no pudiendo, por lo tanto, ser atribuibles a un efecto del alga.

TABLA 4

EFECTO DE LA *SPIRULINA* SOBRE LA REPRODUCCION EN RATAS, ADMINISTRADA DEL 1º AL 4º DIA DE LA GESTACION

Observaciones	*Spirulina* (g/100 g)			
	Testigo	10	20	30
Fecundadas:	25	20	24	22
— Con camada normal	16	15	17	16
— Con camada afectada:	9	5	7	6
— Por reabsorciones[e]	8	3	3	1
— Por fetos anormales[e]	1	1	4	5
— Por reabsorciones y fetos anormales[s]	0	1	0	0
Total de implantaciones	284	201	241	219
Implantaciones/madre	11.4± 2.6	10.0± 2.3	10.0± 1.9	9.9 ±2.0
Total de fetos	240	178	224	209
Fetos/madre	9.6± 1.9	8.9± 2.1	9.3± 1.8	9.5 ±2.2
Fetos normales	239	176	219	203
Fetos afectados	45	25	22	16
— Por anormalidades	1	2	5	6
— Por reabsorciones	44	23	17	10
Peso promedio fetal (g)	3.1 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.1 ± 0.3	3.3 ±0.3[a]

e = Exclusivamente.
s = Simultáneamente.
a = Diferencia significativa (prueba "t" de Student) con los testigos: $P < 0.05$.

Así, la *Spirulina*, ingerida por ratas en los tres períodos de gestación, no provocó efectos deletéreos en los fetos. Estos resultados y los notificados previamente, muestran una buena posibilidad en cuanto a la inocuidad del alga para consumo humano y animal durante la gestación. Es necesario, sin embargo, extender estos mismos estudios a otras especies animales.

TABLA 5

EFECTO DE LA *SPIRULINA* SOBRE LA REPRODUCCION DE RATAS, ADMINISTRADAS DEL 1º AL 21º DIA DE LA GESTACION

Observaciones	*Spirulina* (g/100 g)			
	Testigo	10	20	30
Fecundadas:	22	23	25	23
— Con camada normal	15	16	16	15
— Con camada afectada:	7	7	9	8
— Por reabsorciones[e]	3	3	6	5
— Por fetos anormales[e]	3	3	2	2
— Por reabsorciones y fetos anormales[s]	1	1	1	1
Total de implantaciones	230	211	240	217
Implantaciones/madre	10.4 ±2.0	9.1± 1.8	9.6 ±1.9	9.4 ±1.9
Total de fetos	193	180	182	177
Fetos/madre	8.7 ±1.8	7.8± 1.7	7.2 ±1.7	7.6 ±1.7
Fetos normales	189	176	179	175
Fetos afectados:	41	35	65	42
— Por anormalidades	4	4	3	2
— Por reabsorciones	37	31	62	40
Peso promedio fetal (g)	3.0 ±0.4	3.2 ± 0.3	2.9 ±0.3	3.2 ± 0.3[a]

e = Exclusivamente.

s = Simultáneamente.

a = Diferencia significativa (prueba "t" de Student) con los testigos: $P < 0.05$.

TABLA 6

DESCRIPCION E INCIDENCIA DE ANORMALIDADES EN FETOS PROVENIENTES DE RATAS TRATADAS CON *SPIRULINA* EN DIFERENTES PERIODOS DE LA GESTACION

Anormalidad	Período de tratamiento y concentración de *Spirulina* (g/100 g)											
	A				B				C			
	T	10	20	30	T	10	20	30	T	10	20	30
Celosomía						1				1	2	
Costillas deformes	2		1				1	2	1	1		
Costillas extras				2			2				1	
Costillas fusionadas					1			1				
Costillas reducidas			2						2			
Ectopia testicular	1											
Edema		1	1	1[m]				1[m]			1	1
Extremidades deformes										1		
Hematomas	2	2		1[m]		1	1					
Hidrocefalia		1[m]							1	1		
Hidronefrosis		1	1				1	2				1
Micrognatia								1[m]				
Osificación retardada	1	3		2								

T = Testigo. A = 7º - 14º días, B = 1º - 14º días, C = 1º - 21º días.
m = Mismo feto.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del proyecto "Planta Piloto Productora de Proteína de Alga *Spirulina* (10.387) y contó con el apoyo financiero de UNIDO y Compañía Sosa Texcoco. Asimismo, los autores agradecen al Dr. G. Fournier las facilidades brindadas para su ejecución.

SUMMARY

TERATOGENIC STUDY OF *SPIRULINA* IN RATS

The algae *Spirulina* has been considered for use as a supplementary protein to feed and food. Any form of single cell protein destined to this purpose should be previously subjected to detailed toxicological investigations in animals or another experimental models. The present study was therefore designed to determine the teratogenic potential of *Spirulina* in rats. The algae was administered in the diet at the levels of 0, 10, 20 and 30 g/100 g on days 7-14, 1-14 and 1-21 of gestation. The dams were sacrified prior to term, adn the fetuses examined for external, visceral and skeletal abnormalities.

Maternal and fetal weights were not affected. Neither fetotoxicity nor terato-

genicity was associated with the dietary ingestion of *Spirulina*. It is also considered important to extend these studies to other animal species.

BIBLIOGRAFIA

1. Bourges, H., A. Sotomayor, E. Mendoza & E. Chávez. Utilization of the algae *Spirulina* as a protein source. **Nutr. Reps. Internat., 4**: 31-34, 1971.
2. Santillán, C. Mass production of *Spirulina*. **Experientia, 38**: 40-43, 1982.
3. Becker, E. W., B. Jakober, D. Luft & R. M. Schmulling. Clinical and biochemical evaluations of the algae *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity. A double-blind cross-over study. **Nutr. Reps. Internat., 33**: 665-574, 1986.
4. Contreras, A., D. C. Herbert, B. G. Grubbs & I. L. Cameron. Blue-green algae *Spirulina*, as the sole dietary source of protein in sexually-maturing rats. **Nutr. Reps. Internat., 16**: 749-763, 1979.
5. Protein-Calorie Advisory Group (PAG). PAG-Guideline No. 6 on preclinical testing of novel sources of protein. **PAG Bulletin No. 6**, 1974.
6. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Proposed guidelines for testing of single cell protein destined as a major protein source for animal feed. (Information Bulletin). **Technical Report No. 12.** Oxford, IUPAC Secretariat, 1974.
7. Krishnakumari, M. K., H. P. Ramesh & L. V. Venkataram. Food safety evaluation of acute oral and dermal effects of the algae *Scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* on albino rats. **J. Food Prot., 44**: 934-935, 1982.
8. Brune, H. Single cell algae *Spirulina maxima* and *Scenedesmus acutus* as alone protein source for broilers. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 48, 3**: 143-154, 1982.
9. Becker, E. W. & L. V. Venkataram. Production and utilization of the blue-green algae *Spirulina* in India. **Biomass, 4**: 105-125, 1984.
10. Chamorro, G., M. Salazar, E. Izquierdo, S. Salazar & V. Ulloa. Multigeneration study on reproduction and lactation in rats fed with *Spirulina*. **Arch. Hydro. Beih., 20**: 165-171, 1985.
11. Wilson, J. G. Embryological considerations in teratology. In: **Teratology: Principles and Techniques.** J. G. Wilson and J. Warkany (Eds.). Chicago, Ill., The University of Chicago Press, 1965, p. 251-261.
12. Staples, R. E. & V. L. Schnell. Refinements in rapid clearing technic in the KOH – alizarin red S method for fetal bone. **Stain. Technol., 39**: 61-63, 1964.
13. Salewsky, E. Farmethoden zum makroskopischen Nachweisvon implantationsstellen am Uterus der Ratte. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 247**: 367, 1964.