

ESTUDIO TERATOGENICO DE *Spirulina* EN RATON

*Germán Chamorro*¹ y *María Salazar*²

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

RESUMEN

Se investigó el potencial embriotóxico y fetotóxico de *Spirulina* en ratón. El alga fue administrada a animales gestantes a concentraciones de 0, 10, 20 y 30 g/100 en la dieta, durante los días 7-13, 1-13 y 1-19 de la gestación. El día 19 se sacrificaron las madres y se examinaron los cuernos uterinos para contar los fetos vivos, muertos y reabsorbidos. Los fetos vivos se pesaron, analizándose las malformaciones externas, esqueléticas y viscerales. No se encontró diferencia significativa entre los lotes en cuanto al número de reabsorciones o de fetos afectados, ya fuese considerando la camada como unidad de análisis, o tomando en cuenta el número total de fetos afectados.

Estos resultados indican que la alimentación de ratones gestantes hasta con una concentración de 30 g/100 del alga, no provoca efectos embriotóxicos ni teratogénicos. La cantidad de alimento ingerida por los animales a esa concentración, es exageradamente superior al posible consumo humano.

INTRODUCCION

Los estudios sobre fuentes alternativas de proteínas para consumo humano y animal han aumentado considerablemente en los últimos años. Entre ellos se encuentran los relativos a la cianobacteria *Spirulina* sp., en la que diversos grupos de investigadores han cen-

Manuscrito modificado recibido: 27-10-89.

- 1 Profesor-Investigador, Cátedra de Toxicología de Alimentos y Toxicología Preclínica, Depto. de Farmacia, 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.

trado esfuerzos a fin de mejorar su producción, y seguir las normas exigidas o recomendadas por los diferentes gobiernos e instituciones (1).

En diversos experimentos toxicológicos realizados en animales domésticos (2-4) y de laboratorio (5-9), se ha demostrado que la *Spirulina* no induce efectos tóxicos, determinados por el aumento ponderal, constantes hematológicas, constantes bioquímicas, histología y otras variables.

En publicaciones previas sobre toxicología de la reproducción, se informó que esta alga no había alterado los índices de gestación, viabilidad y lactación durante un estudio multigeneracional efectuado en ratas (10). Tampoco dio lugar a malformaciones congénitas después de administrarla a esa especie animal durante diferentes períodos de la gestación (11). Debido a la necesidad de ampliar este estudio a otra especie de roedor, en el trabajo aquí comentado se estudió la eventual acción embriotóxica o teratógena de la *Spirulina* en ratón.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizó *Spirulina* seca y pulverizada, gentilmente proporcionada por la Compañía Sosa Texcoco S.A. de C.V. (México D.F., México), previo análisis químico y microbiológico, formando parte de un lote común de producción. Los resultados de estos análisis pueden ser consultados en las publicaciones de Santillán (1) y de Sosa Texcoco (12).

La dieta balanceada contenía 0, 10, 20 y 30 g del alga, la que se agregó principalmente a expensas de sustitución de la soya, según se comunicó previamente (13).

Se emplearon ratones de la cepa CD1 (9-10 semanas de edad, 27 + 1g de peso), donados por el Instituto de Higiene de la Secretaría de Salud de México D.F., México, los que se mantuvieron en un local cerrado con temperatura de 22 + 1°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, y humedad controlada.

Se aparearon machos y hembras durante la noche y en la mañana siguiente se verificó el acoplamiento por la presencia de tapón espermático en la vagina. En caso de encontrarlo, se designó ese día como el 1º de la gestación. Las dietas se administraron durante tres períodos: 7-13 d, 1-13 d, y 1-19 d de la gestación. Estos tres períodos se utilizaron para abarcar respectiva y secuencialmente las siguientes etapas de la gestación: a) organogénesis, b) preimplantación-organogénesis y c) preimplantación-organogénesis-perinatal (14). Se registró la evolución ponderal de las hembras, las que se sacrificaron el día 19, y se extrajeron los fetos, los cuales se contaron y pesaron. Luego se procedió al recuento de las reabsorciones embrionarias en los cuernos uterinos, mediante el método de Salewsky (15). Todos los fetos fueron sometidos a análisis para detectar malformaciones externas. Para el estudio de las malformaciones viscerales se procedió de acuerdo al método de Wilson (16) y para observar las

alteraciones esqueléticas, al procedimiento de Dawson (17).

El análisis estadístico se llevó a cabo valiéndose de las pruebas "t" de Student y de χ^2 , dependiendo de si eran datos numéricos o de frecuencia, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aumento Ponderal

La Tabla 1 muestra que el tratamiento A no alteró el aumento ponderal de los ratones con ninguna de las concentraciones. Esto no se observó el día 6 con los tratamientos B y C, ya que los animales presentaron disminución significativa en comparación con los testigos. Esta reducción se debe probablemente a disfgia, ocasionada por aversión inicial a la dieta que contenía *Spirulina*, antes que a un efecto deletéreo del alga. En un trabajo reciente se obtuvieron resultados similares. Sin embargo, a partir del día 13 de la gestación, se notó una franca recuperación ponderal y el día 19, los tres lotes de animales tratados con *Spirulina* pesaron más que los testigos, lo que en el caso del tratamiento C, alcanzó valor significativo.

Esto parece indicar que una vez transcurrido el período de preimplantación en las hembras, el consumo de alimento se normalizó y subsecuentemente se incrementó por efecto de compensación.

Los animales que se sometieron al tratamiento A, a partir del día 7º, no mostraron este fenómeno en lo que respecta al peso del día 13, lo que indica que una vez ocurrida la implantación, debido probablemente a algún factor metabólico u hormonal característico de ese período, no se presenta disfgia.

En estas condiciones, no se pueden atribuir a la *Spirulina* efectos tóxicos maternales durante la gestación, reflejados en el aumento

TABLA 1

PORCENTAJE DE AUMENTO PONDERAL DE RATONES ALIMENTADOS CON *Spirulina* EN DIFERENTES PERIODOS DE LA GESTACION

<i>Spirulina</i> (g/100)	Períodos de tratamiento y días de pesadas								
	A			B			C		
	6	13	19	6	13	19	6	13	19
Testigo	6.7	27.1	69.0	7.1	25.7	70.5	7.1	25.7	67.6
10	7.1	28.6	72.4	4.8*	23.4	72.9	4.3*	23.8	75.7*
20	7.1	28.1	69.5	6.2	25.2	73.3	4.8	23.8	73.3*
30	6.7	27.1	70.0	3.8*	22.0	71.9	6.2	24.3	76.2*

A = 7-13 d; B = 1-13 d; c = 1-19 días.

* Diferencia significativa (prueba "t" de Student) con los testigos, P < 0.05.

ponderal, datos que coinciden con los encontrados previamente en ratas (11).

Efecto sobre la Reproducción

Los resultados que se consignan en la Tabla 2 indican que el alga no dio lugar a alteraciones en los parámetros de reproducción considerados. En efecto, teniendo en cuenta las madres como unidad experimental, se encontró que no hubo diferencia en las que tuvieron camada afectada en el grupo de los ratones testigo o en los tratados. De la misma forma, los datos obtenidos con los fetos fueron similares en todos los lotes. La diferencia aislada que se constató en el caso de los fetos vivos/madre de 20 g/100, no representa efecto del alga. En esa Tabla se observa, asimismo, que la mayor parte de fetos afectados se debieron a las reabsorciones y no a fetos que hubiesen presentado anomalías. Este particular y otras alteraciones se encuentran frecuentemente en los roedores, y en el presente estudio fue la causa de haber encontrado una elevada proporción de madres con fetos afectados.

TABLA 2

**EFFECTO DE LA *Spirulina*, SOBRE LA REPRODUCCION,
ADMINISTRADA A RATONES EL DÍA 7-13 DE LA GESTACION**

Observaciones	<i>Spirulina</i> (g/100)			
	Testigo	10	20	30
<i>Parámetros maternos:</i>				
Acopladas	20	23	24	22
Fecundadas	19	22	21	20
Con camada normal	13	15	15	15
Con camada afectada	6	7	6	5
Por reabsorciones*	4	5	3	2
Por fetos anormales*	1	0	2	1
Por reabsorciones y fetos anormales*	1	2	1	2
<i>Parámetros fetales:</i>				
Total de implantaciones	189	229	223	206
Implantaciones/madre	9.9 + 1.04	10.4 + 0.97	10.6 + 1.0	10.3 + 0.9
Total fetos:	152	184	188	175
vivos/madre	8.9 + 0.77	9.2 + 1.1	9.9 + 0.94	9.7 + 0.96
normales	146	181	183	171
afectados	43	48	40	35
por anomalías	6	3	5	4
por reabsorciones	37	45	35	31
Peso promedio (g)	1.33 + 0.16	1.38 + 0.13	1.30 + 0.18	1.36 + 0.14

e = Exclusivamente; s = Simultáneamente.

* Diferencia significativa (prueba "t" de Student) con los testigos.

Las Tablas 3 y 4—referentes a otros períodos de tratamiento—no acusan tampoco efecto embriotóxico del alga. En estos dos tratamientos la alimentación con la *Spirulina* se inició antes del día de la implantación del huevo fecundado que, en el caso de ratones, corresponde al 6º de gestación. Sin embargo, no se constató alteración de este parámetro en ninguno de los lotes.

TABLA 3

EFFECTO DE LA *Spirulina*, SOBRE LA REPRODUCCION,
ADMINISTRADA A RATONES EL DIA 1-13 DE LA GESTACION

Observaciones	<i>Spirulina</i> (g/100)			
	Testigo	10	20	30
<i>Parámetros maternos:</i>				
Acopladas	20	22	20	21
Fecundadas	16	19	17	15
Con camada normal	10	13	13	11
Con camada afectada	6	6	4	4
Por reabsorciones ^e	2	1	2	1
Por fetos anormales ^s	1	1	0	2
Por reabsorciones y fetos anormales ^s	3	4	2	1
<i>Parámetros fetales:</i>				
Total de implantaciones	156	181	179	130
Implantaciones/madre	9.7 + 0.99	9.5 + 1.02	10.5 + 0.97	9.2 + 0.84
Total fetos:	119	158	147	124
vivos/madre	8.5 + 0.86	8.7 + 1.01	9.1 + 1.0	8.8 + 0.88
normales	115	152	145	120
afectados	41	29	34	18
por anomalidades	4	6	2	4
por reabsorciones	37	23	32	14
Peso promedio (g)	1.37 + 0.26	1.41 + 0.18	1.36 + 0.15	1.42 + 0.19

e = Exclusivamente; s = Simultáneamente.

TABLA 4

**EFFECTO DE LA *Spirulina*, SOBRE LA REPRODUCCION,
ADMINISTRADA A RATONES EL DIA 1-13 DE LA GESTACION**

Observaciones	<i>Spirulina</i> (g/100)			
	Testigo	10	20	30
<i>Parámetros maternos:</i>				
Acopladas	20	21	19	20
Fecundadas	16	17	16	18
Con camada normal	8	8	9	9
Con camada afectada	8	9	7	9
Por reabsorciones ^e	4	5	4	6
Por fetos anormales ^s	1	3	1	0
Por reabsorciones y fetos anormales ^s	3	1	2	3
<i>Parámetros fetales:</i>				
Total de implantaciones	159	165	159	164
Implantaciones/madre	9.9 + 1.11	9.7 + 0.98	9.9 + 1.05	9.1 + 1.03
Total fetos:	113	123	118	124
vivos/madre	8.1 + 0.89	8.2 + 0.96	8.4 + 1.02	8.2 + 0.99
normales	110	116	113	108
afectados	49	49	46	56
por anormalidades	4	7	5	6
por reabsorciones	45	42	41	50
Peso promedio (g)	1.34 + 0.16	1.36 + 0.19	1.40 + 0.15	1.38 + 0.12

e = Exclusivamente; s = Simultáneamente.

En todos los períodos de tratamiento, la proporción relativamente alta de madres y fetos afectados se debió a que esa proporción es la suma de las anormalidades y reabsorciones encontradas. Por otra parte, en las anormalidades también está el total de malformaciones, pero también el de las anomalías. Finalmente, las anormalidades que acusaron los fetos se describen en la Tabla 5. Según se nota, algunas de ellas se encuentran tanto en el lote testigo como en los tratados. Este es el caso de costillas deformes, de edemas, hematomas

TABLA 5

**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 <i>Spirulina</i> (g/100)											
	A				B				C			
	T	10	20	30	T	10	20	30	T	10	20	30
Costillas deformes	2			2								1
Costillas fusionadas		1*							1			
Ectopía renal								1				
Edema			2		2					1	3	
Exencefalia		1*								1		
Falta desarrollo						1	1					1
Hematomas	3				1			2				
Hemorragia intra- abdominal									1			
Hidrocefalia		1										2
Hidronefrosis								1				
Hipertrofia pulmonar					1					2		
Hipertrofia renal						2			1			
Hipoplasia pulmonar												
Maceración						3	1			2		2
Osificación retardada	1	1	1	2						1	1	
Vértebra presacral ausente			2									
Vértebra presacral extra									1			1

A = 7-13 d; B = 1-13 d; C = 1-19 d.

* = Mismo feto.

y osificación retardada. Otras anomalías que únicamente se presentaron en los grupos que recibieron *Spirulina*, como exencefalia, falta de desarrollo, hidrocefalia, maceración y ausencia de vértebra presacral, tuvieron baja incidencia, de manera que el tratamiento estadístico no reveló diferencia significativa.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran ausencia de embrio-toxicidad y fetotoxicidad del alga, administrada a ratón en diferentes períodos gestacionales y a diversas concentraciones en la dieta.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue parte del Proyecto: "Planta Piloto Productora de Proteína de Alga *Spirulina*" (10.387), que se desarrolló con el apoyo de UNIDO y de la Compañía Sosa Texcoco. Los autores agradecen sinceramente su autorización para publicar los resultados.

SUMMARY

TERATOGENIC STUDY OF *Spirulina* IN MICE

The embryotoxic and fetotoxic potential of *Spirulina* was investigated in mice. The algae was given to pregnant animals at the levels of 0, 10, 20 and 30 g/100 in the diet through days 7-13, 1-13 and 1-19 of gestation. On day 19, the rats were sacrificed, and the uterine horns were examined for live, dead and resorbed fetuses. The live fetuses were weighed and examined for external malformations and either skeletal or visceral abnormalities. With the litter as the unit of analysis and when the total number of fetuses affected was considered, no significant difference was found in the number of resorbed or malformed among groups.

These results indicate that the feeding of pregnant mice with algae, up to a dietary level of 30 g/100, did not evoke any signs of embryotoxic effects. The *Spirulina* levels tested in this study represent exaggeration over any anticipated human consumption.

BIBLIOGRAFIA

1. Santillán, C. Mass production of *Spirulina*. *Experientia*, 38: 40-43, 1982.
2. Fevrier, C. & B. Seve. Essais d'incorporation de *Spirulin* (*Spirulina maxima*) dans les aliments de porcins. *Ann. Nutr. Alim.*, 29: 625-650, 1976.
3. Blum, J.C. & C. Calet. Valeur alimentaire des algues *Spirulines* pour la croissance du poulet de chair. *Ann. Nutr. Alim.*, 29: 651-674, 1975.
4. Blum, J.C., S. Guillaumin, 7 C. Calet. Valeur alimentaire des algues *Spirulines* pour la poule pondeuse. *Ann. Nutr., Alim.*, 30: 675-682, 1976.
5. Yoshino, Y., Y. Hirai, H. Takakshi, N. Yamamoto & N. Yoshino. The chronic intoxication test on *Spirulina* product fed to Wistar strain rats. *Jpn. J. Nutr.*, 221-225, 1980.
6. 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.
7. Becker, E.W. & V.L. Venkataram. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass*, 4: 105-125, 1984.
8. Chamorro, G.A., G. Herrera, M. Salazar, S. Salazar & V. Ulloa. Subchronic toxicity study in rats fed *Spirulina*. *J. Pharm. Belg.*, 43: 29-36,
9. Chamorro, G.A., G. Herrera, M. Salazar, S. Salazar & V. Ulloa. Short-term toxicity study of alga *Spirulina* in F_{3b} generation of rats. *J. Toxicol. Clin. Exper.*, 1988 (En prensa).
10. Chamorro, G., M. Salazar, E. Izquierdo, S. Salazar & V. Ulloa. Multigeneration study on reproduction and lactation in rats fed *Spirulina*. *Arch. Hydro. Beih.*, 20: 165-171, 1985.
11. Chamorro, G., M. Salazar & S. Salazar. Estudio teratogénico de *Spirulina* en rata. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 39(4): 641-649, 1989.
12. Sosa Texcoco, S.A. El Alga *Spirulina*. México, 1981 (Boletín de Divulgación Científica).
13. Chamorro, G., S. Salazar, M. Salazar & N. Pagés. Etude teratologique de la *Spirulina* chez le hamster. *Belg. J. Fd. Chem. Biotechnol.*, 42: 189-192, 1988.
14. Tuchmann-Duplessis, H. *Drug Effects on the Fetus*. New York, N.Y., ADIS Press, 1975.

15. Salewsky, E. Färrmethoden zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 247: 367, 1964.
16. Wilson, J.G. Embryological considerations in teratology. In: **Teratology: Principles and Techniques**. J.G. Wilson and Warkany (Eds.). Chicago, Ill., The University of Chicago Press, 1965, p. 251-261.
17. Dawson, A.B. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red. *S. Stain Technol.*, 1: 223, 1966.