

Espirulina (*Arthrospira maxima*) protege de la teratogenicidad por ciclofosfamida en ratones

Angelina Carolina Vega-Navarro^{1,2}

 0000-0001-7019-673X

Sergio Esteban Moreno-Vázquez²

 0000-0001-7213-0048

Natalia Cecilia Hernández-Delgado²

 0000-0002-8583-0657

José Melesio Cristóbal-Luna²

 0000-0003-4765-5568

Yuliana García Martínez²

 0000-0002-9103-0154

Gabriela Gutiérrez-Salmeán³

 0000-0003-3651-0865

Germán Chamorro-Cevallos^{2,*}

 0000-0002-8935-9831

¹ Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores-Iztacala,
Odontología, Endoperiodontología,
Ciudad de México, México

² Instituto Politécnico Nacional,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
Departamento de Farmacia,
Ciudad de México, México

³ Universidad Anáhuac,
Facultad de Ciencias de la Salud,
Centro de Investigación en Ciencias
de la Salud (CICSA),
Ciudad de México, México

***Autor para correspondencia:**
Correo electrónico:
gchamcev@yahoo.com.mx

Recibido: 2022-05-11

Aceptado: 2022-06-30

Publicado: 2022-12-07

Información y declaraciones adicionales
en la página 20

© Derechos de autor 2022

Angelina Carolina Vega-Navarro et al.

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Resumen

Evalúamos si la *Arthrospira maxima*, conocida como espirulina (Sp) contrarresta los efectos teratogénicos inducidos por la ciclofosfamida (Cf) en ratones. Noventa ratones CD-1 gestantes, se distribuyeron en 6 grupos: Control, Cf 20 mg/kg, Sp 400 mg/kg y tres con Sp a 100, 200 y 400 mg/kg conjuntamente con Cf. La Sp se administró vía intragástrica del día de gestación (DG) 6 al 16 y la Cf, vía intraperitoneal al DG 10. Las hembras no difirieron en el peso, con excepción del DG 10. En los parámetros grávidos, la Cf y Sp solas o en asociación no presentaron efectos significativos, salvo en la longitud del cordón umbilical, diámetro de la placenta, peso y tamaño de los fetos. Al DG 17 se sacrificaron las hembras obteniendo parámetros de gravidez. En los fetos se evaluaron malformaciones macroscópicas como anasarca, excencefalia, hidrocefalia, ojo abierto, paladar hendido, ausencia y deformaciones de extremidades superiores e inferiores y de la cola, en las anomalías esqueléticas se observaron ausencias, deformaciones, huesos supernumerarios y un retardo en la mineralización, en los hígados se determinaron enzimas antioxidantes, así como marcadores de daño por estrés oxidativo. La Sp 400 en combinación con la Cf contrarrestaron las malformaciones significativamente. La Sp protege de la teratogenicidad de Cf en ratones disminuyendo las especies reactivas de oxígeno y aumentando las concentraciones de superóxido dismutasa y el glutatión peroxidasa, aunque no la catalasa.

Palabras clave: Ciclofosfamida; Espirulina; *Arthrospira maxima*; Antiteratogénesis; Ratón.

Cómo citar este artículo:

Vega-Navarro AC, Moreno-Vázquez SE, Hernández-Delgado NC, Cristóbal-Luna JM, García Martínez Y, Gutiérrez-Salmeán G, Chamorro-Cevallos G. Espirulina (*Arthrospira maxima*), protege de la teratogenicidad por ciclofosfamida en ratones. Veterinaria México OA. 2022;9. doi: 10.22201/fmvz.24486760e.2022.1077.

Contribución del estudio

Las malformaciones congénitas en humanos y animales se generan por el consumo de algunos fármacos, causas ambientales, factores genéticos y otras circunstancias de orden multifactorial, administrados o presentes durante los períodos críticos de la gestación. En los fármacos, se conoce a la ciclofosfamida que, empleada como antitumoral e inmunosupresor, produce por la generación de especies reactivas, entre otros mecanismos, serias malformaciones externas y esqueléticas en la descendencia de las madres que la consumen libremente o por prescripción médica. Los experimentos preclínicos en animales de experimentación como roedores, que emplean agentes antioxidantes tales como la Sp (cianobacteria administrada en el presente trabajo a ratonas gestantes durante la organogénesis) pueden, por su propiedad de extrapolación a humanos, alertar y evitar tales riesgos durante el período embrionario, contribuyendo de esta manera al desarrollo científico y a la comprensión de la antiteratogénesis mediante la utilización de productos naturales.

Introducción

La ciclofosfamida (Cf) es un profármaco alquilante empleado como antitumoral e inmunosupresor, que mediante las enzimas microsomales hepáticas, se biotransforma principalmente en mostaza fosforamida y acroleína,⁽¹⁾ causantes de algunos efectos tóxicos. La teratogenicidad, uno de tales efectos, es de gran preocupación mundial, por lo que, para mitigar su gravedad se han investigado agentes antioxidantes como el vanadio,⁽²⁾ la quercetina,⁽³⁾ el N-acetyl-L-cysteina⁽⁴⁾ y el extracto de té verde⁽⁵⁾, que han dado lugar a buenos efectos protectores. En una revisión de casos de mujeres expuestas a Cf, se ha señalado que una de las razones para la producción de efectos teratógenos es el desequilibrio prooxidante-antioxidante, que conduce a la restricción del crecimiento intrauterino y a las malformaciones craneofaciales que incluyen: anomalías oculares, paladar hendido, hidrocefalia, micrognatia, microtia, craneosinostosis y asimetría facial, además de defectos en las extremidades como hipoplasia radial, cubital y tibial; pie zambo, defectos digitales de mano y pie, así como fusión vertebral.⁽⁶⁾

Arthrospira maxima, mejor conocida por tradición y comercialmente como "espirulina" (Sp), pertenece al filo Cyanobacteria. Anteriormente a este filo se le conocía como microalgas verde-azul. Posee un alto valor nutricional, por lo que se ha recomendado para combatir el hambre y la desnutrición,⁽⁷⁾ además de atribuirle diversas actividades farmacológicas en humanos y animales de laboratorio, muchas de ellas basadas en su alta capacidad antioxidante. Tal es el caso de su efecto antitóxico,⁽⁸⁾ antiinflamatorio,⁽⁹⁾ anticancerígeno, quimiopreventivo y reparador del ADN⁽¹⁰⁾ antibacteriano,⁽¹¹⁾ antimicótico,⁽¹²⁾ inmunorregulador,⁽¹³⁾ antialérgico y antiviral,⁽¹⁴⁾ antianémico,⁽¹⁵⁾ antihipertensivo e hipolipemiente,⁽¹⁶⁾ hipoglucemiante,⁽¹⁷⁾ hepatoprotector,⁽¹⁸⁾ además de reductor del peso corporal,⁽¹⁹⁾ entre otros. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar si la Sp en su calidad de agente antioxidante protege también de las malformaciones congénitas inducidas por la Cf en ratones gestantes, administrada durante el período de organogénesis.

Materiales y métodos

Declaratoria de ética

Todo el manejo de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos aprobados por la CEI-ENCB con folio ENCB/CEI/076/2020 CONBIOÉTICA 09-CEI-002-20190327 y en conformidad con la NOM-062-ZOO-1999, "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio".

Animales

Para este estudio se utilizaron ratones hembra y macho CD-1 de 30-35 gramos de peso, 7 a 8 semanas de edad, adquiridos en el bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, los cuales se mantuvieron en jaulas individuales en bioterio bajo condiciones controladas de temperatura (23 ± 2 °C), humedad (60 ± 10 %) y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas cada uno. Los animales tuvieron libre acceso al alimento estándar (Rodent Lab Chow 5001, Purina, St. Louis, M O, USA) y agua purificada, por un período de aclimatación de dos semanas previo al experimento.

Acoplamiento

El acoplamiento se llevó a cabo durante las tres últimas horas de oscuridad (7 am a 10 am) exponiendo al azar tres hembras con un macho y al evidenciarse el tapón vaginal se consideró como el día de la gestación 0 (DG 0), colocando a las hembras acopladas en jaulas individuales, llevando una marcación inocua en el pelaje.

Tratamientos

Las hembras acopladas se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos de 15 animales cada uno, que se destinaron a los siguientes tratamientos: control, Cf 20 mg/kg, Sp 400 mg/kg y a los tres restantes se les administró concomitantemente Cf 20 mg/kg y dosis de 100, 200 y 400 mg/kg de Sp respectivamente. La Sp se adquirió en Alimentos Esenciales para la Humanidad (Ciudad de México) y fue administrada por vía intragástrica empleando como vehículo agua purificada a un volumen constante de 10 mL/kg. La Cf (Sigma-Aldrich CAS Número: 6055-19-2, producto C3250000) se inyectó por vía intraperitoneal a 20 mg/kg empleando el vehículo en un volumen constante de 5 mL/kg; las administraciones se efectuaron entre las 11:30 y 12:30 horas. Las hembras gestantes se pesaron los días DG 0, DG 6, DG 10 y DG 17.

Sacrificio

Las hembras se sacrificaron el DG 17 por dislocación cervical y mediante una incisión abdominal se obtuvo el útero que se pesó con su contenido. En el útero se contó el número de implantaciones, reabsorciones embrionarias tempranas y tardías, además de obtener el peso de las hembras posterior al retiro del útero.

Evaluación macroscópica de los fetos

Al extraer los fetos, se registró si estaban vivos o muertos, la longitud del cordón umbilical, así como la longitud y diámetro de la placenta. En cada uno de los fetos, se determinó el peso, tamaño y sexo, aunado a un examen visual, para detectar malformaciones macroscópicas con la ayuda de un microscopio estereoscópico (American Optical 30x) siguiendo los planos céfalo-caudal y próximo-distal.

Análisis esquelético de los fetos

Para el análisis esquelético de los fetos, previa muerte, se les retiró la piel y, a través de una incisión abdominal se removieron los órganos internos, colocando los hígados en PBS (Phosphate-Buffered Saline) a -70 °C. A continuación, se fijaron en etanol al 70 %, para proceder 48 horas después a la tinción bicromática modificada.⁽²⁰⁾ Las alteraciones esqueléticas se observaron en un estereomicroscopio, según lo descrito por Menegola et al.,⁽²¹⁾ evaluándose número, presencia/ausencia/supernumerarios, forma (fusión, división, aumento o disminución de tamaño, curvaturas, amorfismos, falta de desarrollo), así como grado de osificación.

Determinación del estrés oxidativo

Los hígados del feto que se habían colocado en PBS se descongelaron para homogeneizar el tejido (homogeneizador Omni Tissue Homogenizer) por camada. El homogenizado se centrifugó a 13 000 rpm por 15 min 4 °C, y se empleó el sobrenadante resultante con el fin de determinar actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y como marcadores de estrés oxidativo, malondialdehído (MDA) y grupos carbonilo. Para determinar la actividad de SOD y GPx se emplearon los kits de RANSOD y RANSEL (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Co. Antrim, UK) y se siguieron las instrucciones del fabricante, leyéndole las absorbancias a 480 y 340 nm, respectivamente. Para el análisis de CAT se empleó el método de Aebi,⁽²²⁾ leyéndole la absorbancia a 570 nm. La determinación de grupos carbonilo se realizó por el método de Parvez y Raisuddin,⁽²³⁾ leyendo la absorbancia a 360 nm, mientras que el análisis de MDA se efectuó de acuerdo con el método de Buege y Aust⁽²⁴⁾ para las absorbancias a 535 nm.

Análisis estadístico

Las inferencias estadísticas se realizaron con el programa SigmaPlot versión 14. El estudio de los datos cuantitativos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza de una vía, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Para la comparación del número y tipo de implantaciones, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos de los porcentajes se analizaron con la prueba de χ^2 seguida de la prueba exacta de Fisher. En cada análisis se consideró la existencia de diferencias estadísticamente significativas al obtener un valor de $P < 0.050$.

Resultados

Pesos maternos

En el DG 0, antes de iniciar los tratamientos, el peso de las hembras acopladas no tuvo variación entre los grupos; únicamente en el DG 10 se redujeron significativamente $P < 0.001$, en todos los tratados con Sp comparados con los grupos control y Cf, excepto el control y el grupo de Cf + Sp 200 con una $P = 0.001$. En los restantes días, los pesos presentaron crecimiento muy similar al de los grupos control y Cf. Una vez retirado el útero después del sacrificio, los pesos de las hembras no presentaron diferencias significativas.

Parámetros de gravidez

Los parámetros de gravidez no presentaron diferencias significativas entre los grupos, aunque se observó una tendencia a disminuir las reabsorciones tempranas y tardías en los grupos Cf + Sp comparados con el grupo Cf (**Cuadro 1**).

En el **Cuadro 1**, los diferentes grupos corresponden a: Control (vehículos: agua y suero, según sea Sp o Cf); Cf 20 mg/kg (administración única día 10 de la gestación); Sp 400 mg/kg; Cf + Sp 100 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 100 mg/kg; Cf + Sp 200 = Cf 20 mg/kg + Sp, 200 mg/kg, y Cf + Sp 400 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 400 mg/kg. La Sp se administró del día 6 al 16 de la gestación.

La longitud del cordón umbilical fue menor en el grupo de Cf y Cf + Sp 200, sin diferencia entre ellos, pero sí con el resto de los grupos, es decir, con el grupo Control ($P \leq 0.001$), con los grupos Sp, Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$) y con grupo Cf + Sp 100 ($P = 0.022$) (**Cuadro 1**). Los mismos efectos se observaron en el diámetro de la placenta, comparados con el grupo control, mostrando diferencia significativa ($P \leq 0.001$) con los grupos Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400, aunque el grupo Cf, sólo tuvo diferencia con el grupo Sp ($P \leq 0.001$), sin observarse cambios entre los grupos en relación al peso de la placenta (**Cuadro 1**).

Con respecto al peso y al tamaño fetal, el grupo de las madres tratadas con Sp superó de forma significativa a todos los grupos, aún con el grupo Control ($P = 0.001$), este grupo Control no mostró diferencia con el grupo Cf + Sp 400 (**Cuadro 1**). Los fetos presentaron un peso menor en los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 en relación al Control con diferencia significativa ($P \leq 0.001$). Los fetos con menor peso fueron los del grupo Cf con diferencia con todos los grupos, Sp, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$) (**Cuadro 1**).

Sobre el tamaño de los fetos el grupo Control no mostró diferencia Cf + Sp 400, pero sí con los grupos Cf ($P \leq 0.001$), Cf + Sp 100 ($P = 0.026$) y Cf + Sp 200 ($P = 0.027$), indiscutiblemente los fetos más pequeños se ubican en el grupo Cf con diferencia significativamente al resto, Sp, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200, Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$) (**Cuadro 1**).

Análisis macroscópico de los fetos

El **Cuadro 2** y la **Figura 1** muestran los resultados del análisis externo realizado a los fetos: no se encontraron malformaciones en el control negativo ni en los animales tratados con solo Sp. Al evaluar malformaciones macroscópicas se muestran diferencias significativas de $P \leq 0.001$ entre el grupo Control con Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400, así como el grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 100,

Cuadro 1. Parámetros de gravidez de ratones con diferentes tratamientos con ciclofosfamida (Cf) y diferentes dosis de espirulina (Sp)

	Control	Cf	Sp 400	Cf + Sp 100	Cf + Sp 200	Cf + Sp 400
Hembras apareadas	18	18	17	18	20	18
Hembras preñadas	15	15	15	15	15	15
(%) Índice de fertilidad ¹	83.33 %	83.33 %	88.23 %	83.33 %	75.00 %	83.33 %
Hembras con fetos vivos	15	15	15	15	15	15
(%) Índice de embarazos ²	83.33 %	83.33 %	88.23 %	83.33 %	75.00 %	83.33 %
Implantaciones	15.4 ± 0.59	14.6 ± 0.61	14 ± 0.76	16.3 ± 0.50	13.86 ± 0.52	15.6 ± 0.57
Reabsorciones tempranas	1.2 ± 0.22	1.66 ± 0.56	0.93 ± 0.23	1.60 ± 0.56	1.53 ± 0.43	1.13 ± 0.36
Reabsorciones tardías	0.6 ± 0.25	0.8 ± 0.26	0.53 ± 0.19	0.86 ± 0.40	0.66 ± 0.30	0.4 ± 0.23
Fetos Muertos	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.66	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.66	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
(%) Pérdidas post-implantación ³	12.55 %	17.59 %	10.48 %	15.57 %	15.86 %	9.70 %
Fetos vivos	87.44 ± 0.7	82.42 ± 0.8	89.52 ± 0.7	84.43 ± 0.8	84.13 ± 0.6	90.29 ± 0.8
Fetos hembras / machos (%)	50.99 / 49.01 %	50.00 / 49.00 %	50.53 / 49.47 %	50.48 / 49.51 %	50.86 / 49.14 %	50.46 / 49.53 %
Peso uterino (g)	1.23 ± 0.08	1.20 ± 0.07	1.14 ± 0.06	1.23 ± 0.05	1.08 ± 0.06	1.24 ± 0.04
Longitud del cordón umbilical (cm)	1.01 ± 0.41	0.72 ± 0.01 ^a	0.94 ± 0.00 ^b	0.80 ± 0.01 ^b	0.71 ± 0.02 ^a	0.87 ± 0.01 ^b
Peso de la placenta (g)	0.13 ± 0.07	0.10 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.00
Diámetro de la placenta (cm)	0.82 ± 0.12	0.72 ± 0.01 ^a	0.83 ± 0.01 ^b	0.75 ± 0.00 ^a	0.76 ± 0.01 ^a	0.79 ± 0.01 ^a
Peso fetal (g)	0.94 ± 0.01	0.67 ± 0.01 ^a	1.02 ± 0.01 ^{a, b}	0.75 ± 0.01 ^{a, b}	0.75 ± 0.02 ^{a, b}	0.93 ± 0.01 ^b
Tamaño fetal (cm)	1.99 ± 0.01	1.66 ± 0.01 ^a	2.06 ± 0.01 ^{a, b}	1.78 ± 0.01 ^{a, b}	1.79 ± 0.02 ^{a, b}	1.96 ± 0.01 ^b

Los resultados se expresan como la media ± ES.^a Diferencia significativa con el Control; ^b Diferencia significativa con Cf, P < 0.05.

¹ Índice de fertilidad (%) = (No. de hembras preñadas / # de hembras apareadas) × 100.

² Índice de embarazo = (No. de hembras con fetos vivos / No. de hembras apareadas) × 100.

³ Pérdidas posimplantación = (No. de sitios de implantación – No. de fetos vivos / No. de sitios de implantación) × 100.

Cuadro 2. Malformaciones macroscópicas en los fetos (n = 1163) por diferentes tratamientos con ciclofosfamida (Cf) y diferentes dosis de espirulina (Sp)

Grupos	Control	Cf	Sp 400	Cf + Sp 100	Cf + Sp 200	Cf + Sp 400
No. de fetos examinados (n)	202	178	188	206	175	214
(%) Malformaciones macroscópicas	0 (0.00 %)	168 ^a (94.38 %)	0 ^b (0.00 %)	138 ^{a, b} (66.99 %)	116 ^{a, b} (66.28 %)	48 ^{a, b} (25.53 %)
Anasarca	0 (0.00 %)	27 ^a (15.17 %)	0 ^b (0.00 %)	55 ^a (26.69 %)	33 ^a (18.85 %)	0 ^b (0.00 %)
Exencefalia	0 (0.00 %)	16 ^a (8.98 %)	0 ^b (0.00 %)	13 ^a (6.31 %)	4 (2.28 %)	0 ^b (0.00 %)
Hidrocefalia	0 (0.00 %)	4 (2.25 %)	0 (0.00 %)	19 (9.22 %)	24 ^{a, b} (13.71 %)	0 (0.00 %)
Ojo abierto	0 (0.00 %)	34 ^a (19.10 %)	0 ^b (0.00 %)	42 ^a (20.38 %)	45 ^a (25.71 %)	0 ^b (0.00 %)
Microtia	0 (0.00 %)	17 ^a (9.55 %)	0 ^b (0.00 %)	4 ^b (1.94 %)	0 ^b (0.00 %)	0 ^b (0.00 %)
Paladar hendido	0 (0.00 %)	114 ^a (64.04 %)	0 ^b (0.00 %)	67 ^{a, b} (32.52 %)	42 ^{a, b} (24.00 %)	9 ^b (4 %)
Iniencefalia	0 (0.00 %)	67 ^a (37.64 %)	0 ^b (0.00 %)	80 ^a (38.83 %)	53 (30.28 %)	0 ^b (0.00 %)
Espina bífida	0 (0.00 %)	45 ^a (25.28 %)	0 ^b (0.00 %)	27 ^{a, b} (13.10 %)	14 ^{a, b} (8.00 %)	0 ^b (0.00 %)
Cola corta	0 (0.00 %)	53 ^a (29.77 %)	0 ^b (0.00 %)	51 ^a (24.75 %)	51 ^a (29.14 %)	0 ^b (0.00 %)
Cola enrollada	0 (0.00 %)	16 ^a (8.98 %)	0 ^b (0.00 %)	12 ^a (5.82 %)	10 ^a (5.71 %)	0 ^b (0.00 %)
Extremidades anteriores	0 (0.00 %)	124 ^a (69.66 %)	0 ^b (0.00 %)	72 ^{a, b} (34.95 %)	82 ^{a, b} (46.86 %)	33 ^{a, b} (15.42 %)
Extremidades posteriores	0 (0.00 %)	126 ^a (70.79 %)	0 ^b (0.00 %)	81 ^{a, b} (39.32 %)	44 ^{a, b} (25.14 %)	8 ^b (3.74 %)

La Sp se administró a las hembras del 6o al 16o día de la gestación. Los resultados indican el número de fetos con la malformación; en paréntesis el porcentaje que corresponde por grupo. ^a Diferencia significativa con el Control; ^b Diferencia significativa con Cf; P < 0.05.



Figura 1. Malformaciones inducidas en fetos de ratonas gestantes tratadas con ciclofosfamida (Cf), administrada en una dosis el día 10 de gestación y diferentes dosis de espirulina (Sp), administrada del 6° al 16° día de la gestación.

Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400. Los animales más afectados fueron los del grupo tratado sólo con Cf, con 70 % para extremidades anteriores, 71 % para extremidades posteriores. El paladar hendido fue una malformación con un elevado porcentaje (64 %).

De 15 hembras, 1163 fetos fueron distribuidos en los siguientes grupos: 202, corresponde al 100 % del grupo control (vehículos: agua y suero, según sea Sp o Cf); 178 fetos (100 %) en el de Cf 20 mg/kg (administración única día 10 de gestación); 188 fetos (100 %) en el de Sp 400 mg/kg; 206 fetos (100 %) en el de Cf + Sp 100 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 100 mg/kg; 175 fetos (100 %) en el de Cf + Sp 200 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 200 mg/kg, y 214 fetos (100 %) en el de Cf + Sp 400 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 400 mg/kg.

En **Figura 1a**) se muestra un feto por cada grupo que corresponden a: control (vehículos: agua y suero, según sea Sp o Cf); b) Cf, 20 mg/kg (administración única día 10 de la gestación); c) Sp 400 mg/kg; d) Cf + Sp 100 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 100 mg/kg ; e) Cf + Sp 200 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 200 mg/kg, y f) Cf + Sp 400 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 400 mg/kg ; en donde a), c) y f) no se observan malformaciones, mientras, la flecha negra (†) señala alteraciones evidentes en fetos con los tratamientos b), d) y e). En B) se muestran las malformaciones inducidas por Cf en los fetos en diversas áreas del cuerpo.

Aunque al administrar Sp concomitante con la Cf disminuyen los porcentajes de malformaciones, no deja de haber diferencias significativas importantes en el número y severidad con esas anomalías en los fetos. En la mayoría de los casos, hay una relación dosis respuesta, aunque en los fetos con hidrocefalia y ojos abiertos, se pierde ligeramente esa relación. En el tratamiento con Cf + Sp 400, con excepción del porcentaje de daño en el paladar, y en las extremidades anteriores y posteriores, todas alcanzaron el valor porcentual de cero, igual que en el grupo control.

En específico, la anasarca presentó diferencias significativas entre el grupo Control con los grupos Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), la misma diferencia guarda el grupo Cf con Sp y Cf + Sp 400. En relación con las malformaciones presentes en el cráneo, la exencefalia mostró diferencia significativa entre los grupos Control, Sp y Cf + Sp 400 con el grupo Cf ($P = 0.006$), además el grupo Control también tuvo diferencia con el grupo Cf + Sp 100 ($P = 0.038$). A diferencia de la hidrocefalia que sólo tiene diferencia el grupo Cf + Sp 200 con el Control ($P \leq 0.001$) y con el grupo Cf ($P = 0.004$).

Con respecto a la presencia de ojo abierto, el grupo Control tiene diferencias con los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), mientras el grupo Cf presenta una $P \leq 0.001$ con los grupos Sp y Cf + Sp 400. La microtia fue una de las malformaciones menos frecuentes, con diferencia significativa del grupo Cf con todos los demás ($P = 0.004$), aún la diferencia es menor pero significativa con el grupo Cf + Sp 100 ($P = 0.037$). El paladar hendido, es una de las tres malformaciones más frecuentes, su presencia mostró diferencia significativa del grupo Cf al compararlo con todos los demás grupos ($P \leq 0.001$), al mismo tiempo en el grupo Control al igual que el grupo de Sp no se reportó esta malformación, mentiendo diferencia significativa con los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$).

Dentro de los defectos en la columna vertebral, se observó que en el grupo Control la iniencefalia, presentó diferencia con los grupos Cf y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$), misma diferencia se muestra entre el grupo Cf al ser comparados con

los grupos Sp y Cf + Sp 400. Además, la presencia de espina bífida mostró diferencia entre el grupo Control con el grupo Cf + Sp 200 ($P = 0.012$), así como con los grupos Cf y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$), mientras el grupo Cf presentó diferencia significativa con el grupo Sp, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$).

En particular, la cola presenta alteraciones, considerando corta o enrollada. La cola corta en el grupo Control presentó diferencias con los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), así como también el grupo Cf mostró diferencia con los grupos Sp y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$). Mientras el grupo Control al determinar la presencia de cola enrollada se diferenció de los grupos Cf ($P = 0.006$), Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P = 0.038$), así como el grupo Cf se distinguieron de los grupos Sp y Cf + Sp 400 ($P = 0.006$).

Las malformaciones más recurrentes se presentan en extremidades, presentándose más anteriores, las cuales varían en severidad y se relacionan con la Cf, observando una protección dosis dependiente con la Sp. Con relación a las extremidades anteriores el grupo Control presenta diferencias con los grupos Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200, Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$), al mismo tiempo el grupo Cf mostró diferencia con Sp ($P \leq 0.001$), Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400 ($P = 0.001$). Al comparar las malformaciones de las extremidades posteriores, el grupo Control presenta diferencias con los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), cuando el grupo Cf difiere con los grupos Sp, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$).

Alteraciones esqueléticas

En el Cuadro 3 y la Figura 2 se observa que las alteraciones esqueléticas inducidas por Cf son evidentes y cada una de ellas incluyeron disminución en la osificación, ausencia o deformación de los huesos, falta de desarrollo o diferenciación ósea, fusiones o divisiones (resultados no presentados). Ninguna de las anomalías esqueléticas encontradas en el grupo Cf fueron observadas en el grupo control ni en el grupo de Sp.

En el Cuadro 3, los resultados representan el número total de fetos con alteración por grupo y entre paréntesis el porcentaje de alteraciones por hueso. Los tratamientos corresponden a: control (vehículos: agua y suero, según sea Sp o Cf); Cf 20 mg/kg (administración única día 10 de la gestación); Sp 400 mg/kg; Cf + Sp 100 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 100 mg/kg; Cf + Sp 200 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 200 mg/kg, y Cf + Sp 400 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 400 mg/kg, la Sp se administró del 6^o al 16^{vo} día de la gestación.

Control (vehículos: agua y suero, según sea Sp o Cf); ciclofosfamida 20 mg/kg (administración única día 10 de la gestación); Sp 400 mg/kg; Cf + Sp 100 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 100 mg/kg; Cf + Sp 200 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 200 mg/kg, y Cf + Sp 400 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 400 mg/kg. En la Figura 2 a), c) y f) no hubo alteraciones evidentes.

Cuadro 3. Alteraciones esqueléticas fetales presentes en diferentes tratamientos con ciclofosfamida (Cf) y diferentes dosis de espirulina (Sp)

Área	Hueso	Control	Cf	Sp	Cf + Sp 100	Cf + Sp 200	Cf + Sp 400
Cráneo	Occipital	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	68 ^a (38.86 %)	0 ^b (0.00 %)
	Interparietal	0 (0.00 %)	162 ^a (91.01 %)	0 ^b (0.00 %)	193 ^a (93.69 %)	48 ^{a, b} (27.43 %)	17 ^{a, b} (7.94 %)
	Parietal	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	91 ^{a, b} (52.00 %)	17 ^{a, b} (7.94 %)
	Temporal	0 (0.00 %)	172 ^a (96.63 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	76 ^{a, b} (43.43 %)	17 ^{a, b} (7.94 %)
	Etmoidal	0 (0.00 %)	162 ^a (91.01 %)	0 ^b (0.00 %)	193 ^a (93.69 %)	32 ^{a, b} (18.28 %)	0 ^b (0.00 %)
	Vómer	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	0 ^b (0.00 %)
	Basiesfenoides	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	39 ^{a, b} (22.28 %)	0 ^b (0.00 %)
	Frontal	0 (0.00 %)	176 ^a (98.88 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	52 ^{a, b} (29.71 %)	0 ^b (0.00 %)
Faciales	Nasal	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	26 ^{a, b} (12.62 %)	0 ^b (0.00 %)	0 ^b (0.00 %)
	Incisivo	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	51 ^{a, b} (24.76 %)	20 ^{a, b} (11.43 %)	0 ^b (0.00 %)
	Palatino	0 (0.00 %)	114 ^a (64.04 %)	0 ^b (0.00 %)	67 ^{a, b} (32.52 %)	43 ^{a, b} (24.57 %)	9 ^b (4.20 %)
	Maxilar	0 (0.00 %)	114 ^a (64.04 %)	0 ^b (0.00 %)	67 ^{a, b} (32.52 %)	43 ^{a, b} (24.57 %)	9 ^b (4.20 %)
	Mandíbula	0 (0.00 %)	14 ^a (7.86 %)	0 ^b (0.00 %)	3 (1.46 %)	0 ^b (0.00 %)	0 ^b (0.00 %)
	Cigomático	0 (0.00 %)	94 ^a (52.80 %)	0 ^b (0.00 %)	94 ^a (45.63 %)	0 ^b (0.00 %)	0 ^b (0.00 %)
Columna vertebral	Cervicales	0 (0.00 %)	156 ^a (87.64 %)	0 ^b (0.00 %)	154 ^{a, b} (74.76 %)	25 ^{a, b} (14.28 %)	0 ^b (0.00 %)
	Torácicas	0 (0.00 %)	115 ^a (64.61 %)	0 ^b (0.00 %)	165 ^{a, b} (80.10 %)	43 ^{a, b} (24.57 %)	0 ^b (0.00 %)
	Lumbares	0 (0.00 %)	39 ^a (21.91 %)	0 ^b (0.00 %)	57 ^a (27.67 %)	16 ^{a, b} (9.14 %)	0 ^b (0.00 %)
	Sacras	0 (0.00 %)	63 ^a (35.39 %)	0 ^b (0.00 %)	72 ^a (34.95 %)	0 ^b (0.00 %)	0 ^b (0.00 %)
	Caudales	0 (0.00 %)	81 ^a (45.50 %)	0 ^b (0.00 %)	83 ^a (40.29 %)	61 ^a (34.86 %)	0 ^b (0.00 %)
Esternón	Esternebra I	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	204 ^a (99.03 %)	60 ^{a, b} (34.28 %)	0 ^b (0.00 %)
	Esternebra II	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	64 ^{a, b} (36.57 %)	0 ^b (0.00 %)
	Esternebra III	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	59 ^{a, b} (33.71 %)	0 ^b (0.00 %)
	Esternebra IV	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	41 ^{a, b} (23.43 %)	0 ^b (0.00 %)
	Esternebra V	0 (0.00 %)	156 ^a (87.64 %)	0 ^b (0.00 %)	153 ^a (74.27 %)	48 ^{a, b} (27.43 %)	0 ^b (0.00 %)
	Esternebra VI	0 (0.00 %)	156 ^a (87.64 %)	0 ^b (0.00 %)	127 ^a (61.65 %)	38 ^{a, b} (21.71 %)	0 ^b (0.00 %)

Área	Hueso	Control	Cf	Sp	Cf + Sp 100	Cf + Sp 200	Cf + Sp 400
Costillas	Verdaderas	0 (0.00 %)	153 ^a (85.95 %)	0 ^b (0.00 %)	92 ^{a, b} (44.66 %)	45 ^{a, b} (25.71 %)	0 ^b (0.00 %)
	Falsas	0 (0.00 %)	156 ^a (87.64 %)	0 ^b (0.00 %)	52 ^{a, b} (25.24 %)	51 ^{a, b} (29.14 %)	0 ^b (0.00 %)
	Flotantes	0 (0.00 %)	149 ^a (83.71 %)	0 ^b (0.00 %)	46 ^{a, b} (22.33 %)	20 ^{a, b} (11.43 %)	0 ^b (0.00 %)
Cadera	Ilion	0 (0.00 %)	62 ^a (34.83 %)	0 ^b (0.00 %)	16 ^{a, b} (7.77 %)	0 ^b (0.00 %)	0 ^b (0.00 %)
	Isquion	0 (0.00 %)	157 ^a (88.20 %)	0 ^b (0.00 %)	123 ^{a, b} (59.71 %)	91 ^{a, b} (52.00 %)	0 ^b (0.00 %)
	Pubis	0 (0.00 %)	163 ^a (91.57 %)	0 ^b (0.00 %)	189 ^a (91.75 %)	112 ^{a, b} (64.00 %)	0 ^b (0.00 %)
Cinturón escapular	Clavícula	0 (0.00 %)	133 ^a (74.72 %)	0 ^b (0.00 %)	52 ^{a, b} (25.24 %)	0 ^b (0.00 %)	0 ^b (0.00 %)
	Escapula	0 (0.00 %)	157 ^a (88.20 %)	0 ^b (0.00 %)	63 ^b (30.58 %)	3 ^b (1.71 %)	0 ^b (0.00 %)
Extremidad anterior	Humero	0 (0.00 %)	109 ^a (61.23 %)	0 ^b (0.00 %)	49 ^{a, b} (23.79 %)	44 ^{a, b} (25.14 %)	7 ^b (3.27 %)
	Radio	0 (0.00 %)	92 ^a (51.68 %)	0 ^b (0.00 %)	54 ^{a, b} (26.21 %)	56 ^{a, b} (32.00 %)	38 ^{a, b} (17.76 %)
	Ulna	0 (0.00 %)	92 ^a (51.68 %)	0 ^b (0.00 %)	54 ^{a, b} (26.21 %)	56 ^{a, b} (32.00 %)	38 ^{a, b} (17.76 %)
	Carpo	0 (0.00 %)	165 ^a (92.69 %)	0 ^b (0.00 %)	73 ^{a, b} (35.43 %)	29 ^{a, b} (16.57 %)	7 ^b (3.27 %)
	Metacarpo	0 (0.00 %)	165 ^a (92.69 %)	0 ^b (0.00 %)	36 ^{a, b} (17.47 %)	87 ^{a, b} (49.71 %)	0 ^b (0.00 %)
	Falanges	0 (0.00 %)	178 ^a (100 %)	0 ^b (0.00 %)	206 ^a (100 %)	175 ^a (100 %)	72 ^{a, b} (33.64 %)
Extremidad posterior	Fémur	0 (0.00 %)	133 ^a (74.72 %)	0 ^b (0.00 %)	124 ^{a, b} (60.19 %)	69 ^{a, b} (39.43 %)	8 ^b (3.74 %)
	Tibia	0 (0.00 %)	162 ^a (91.01 %)	0 ^b (0.00 %)	114 ^{a, b} (55.34 %)	32 ^{a, b} (18.29 %)	0 ^b (0.00 %)
	Fíbula	0 (0.00 %)	162 ^a (91.01 %)	0 ^b (0.00 %)	114 ^{a, b} (55.34 %)	32 ^{a, b} (18.29 %)	0 ^b (0.00 %)
	Metatarso	0 (0.00 %)	9 (5.06 %)	0 (0.00 %)	5 (2.43 %)	7 (4.00 %)	0 (0.00 %)
	Falanges	0 (0.00 %)	162 ^a (91.01 %)	0 ^b (0.00 %)	68 ^{a, b} (33.01 %)	39 ^{a, b} (22.28 %)	0 ^b (0.00 %)

Los resultados se expresan como la media ± ES. ^a Diferencia significativa con el Control; ^b Diferencia significativa con Cf, P < 0.05.

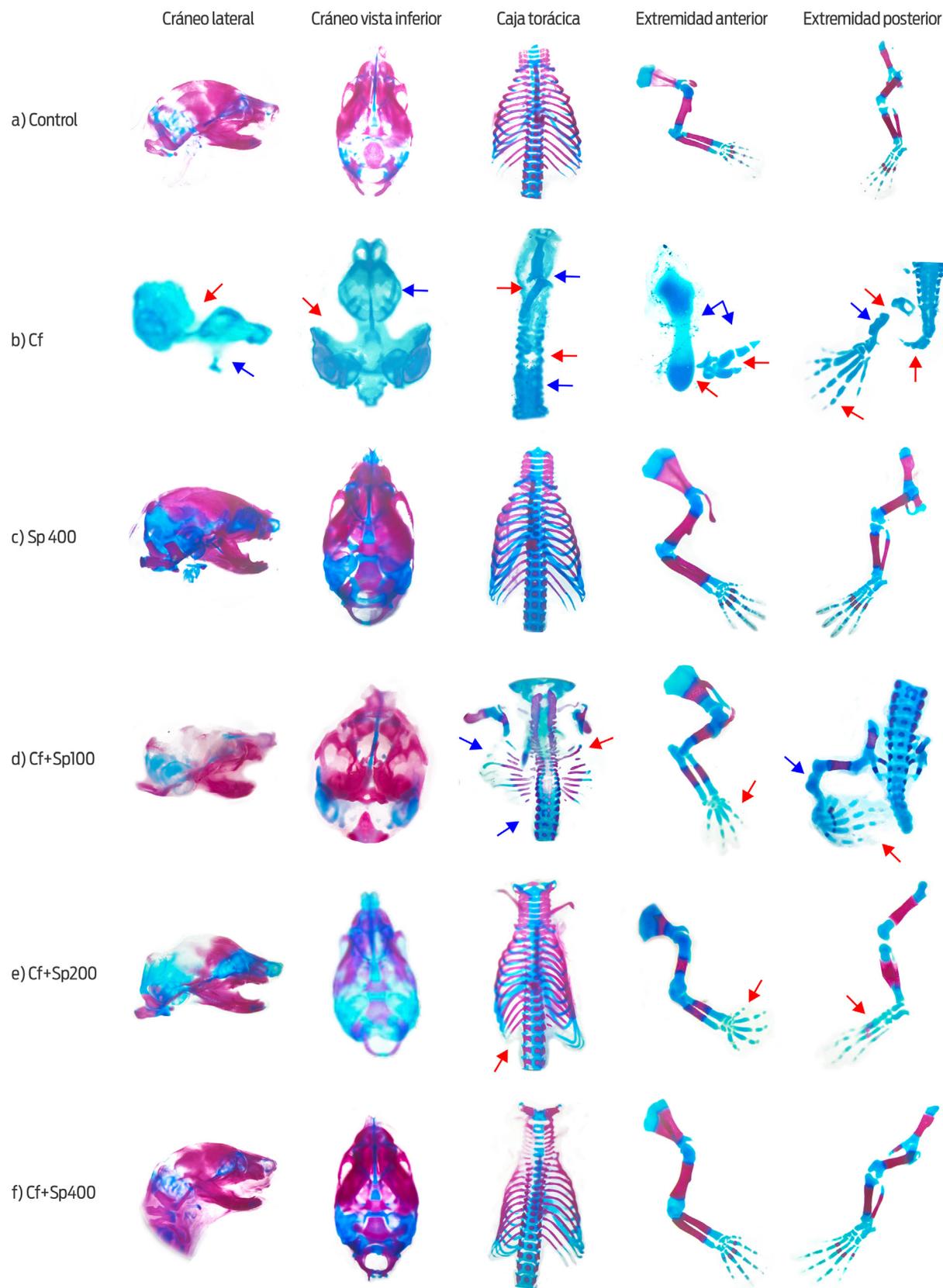


Figura 2. Alteraciones esqueléticas en fetos tratados con la técnica bicrómica, un espécimen representante de cada uno de los grupos.

En la **Figura 2 b**) Cf: hay ausencia de huesos (flecha roja ↑) en cráneo (frontal, parietal, intraparietal), en caja torácica (costillas, vértebras), extremidades anteriores (radio, ulna, carpo, falanges), y posteriores (tibia, fíbula, falanges), alteraciones en la forma (flecha azul ↑) faciales (maxilar, palatinos, mandíbula), caja torácica (esternones, vértebras) y extremidades, así como la falta de osificación generalizada del esqueleto, y las afecciones que disminuyen conforme a la dosis administrada de Sp; d) Cf + Sp 100, e) Cf + Sp 200 y f) Cf + Sp 400.

Al evaluar el cráneo se observaron alteraciones esqueléticas relacionadas con la Cf, rebasando el 90 %. El hueso occipital sin afección en los grupos Control, Sp y Cf + Sp 400 a diferencia con los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$). El hueso interparietal presentó diferencia entre el grupo Control con los grupos Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$) y Cf + Sp 400 ($P = 0.012$), mientras Cf mostró diferencia con los grupos Sp, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$). En los huesos parietales las alteraciones mostraron diferencias entre el grupo Control versus Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 ($P = 0.001$) y el grupo Cf + Sp 400 ($P = 0.012$), mientras el grupo de Cf se diferencian de los grupos Sp y Cf + Sp 400 ($P = 0.001$). El temporal, presentó diferencia entre el grupo Control con todos los grupos Cf, es decir, Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 ($P = 0.001$) y con Cf + Sp 400 ($P = 0.012$), en cuanto al grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200 ($P = 0.001$), mostrando el efecto protector dependiente de la dosis de la Sp. Un efecto similar se presenta al evaluar el hueso etmoidal, en el cual la diferencia con el grupo Control se da con Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$) y con el grupo Cf con Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$). Al evaluar el vomer el grupo Control presentó diferencia con los grupos Cf, Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$), diferencia que también guarda el grupo de Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200. Mientras, el basifenoideas y el frontal, la diferencia entre el grupo Control se da con los grupos Cf y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$), mientras la misma diferencia se da entre Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200.

Dentro de las alteraciones óseas de la cabeza, destaca que el hueso nasal presentó diferencia entre el grupo Control con los grupos Cf y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$), mientras la misma diferencia entre el grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200. Mientras el incisivo mostró diferencia entre el grupo Control con los grupos Cf, Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$), Cf + Sp 200 ($P = 0.002$), al comparar el grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$). Los palatinos y el maxilar guardan la misma relación del grupo Control con los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), al igual que el grupo Cf con Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$). De los huesos menos afectados por la Cf es la mandíbula (8 %), aún en este el grupo Control presentó diferencia con el grupo Cf ($P = 0.012$), Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), la entre diferencia el grupo Cf se mantiene el grupo Cf al compararlo con los grupos Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$). Por su parte, el hueso cigomático sin reporte alteraciones en el grupo Control presentó diferencias con los grupos Cf y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$) y el grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200.

Los daños producidos por la Cf afectan las vértebras. El grupo Control sin alteraciones en las vértebras cervicales con diferencia significativa de los grupos con alteraciones, estos son Cf, Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$) y Cf + Sp 200 ($P = 0.001$), en cambio al comparar el grupo Cf, el grupo con mayores alteraciones en dichas verte-

bras tuvieron diferencias con los grupos Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$) y de Cf + Sp 100 ($P = 0.004$). Las diferencias se presentaron en otras vertebrales, en las torácicas el grupo Control presentó diferencia con los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), mientras el grupo Cf, con la misma diferencia con Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$). Las vértebras menos afectadas fueron las lumbares y las sacras (22 y 35 %, respectivamente), aun así, en las lumbares el grupo Control presentó diferencia con Cf, Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$) y Cf + Sp 200 ($P = 0.006$), mientras el grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$) y Cf + Sp 200 ($P = 0.002$), por otro lado, al analizar las vértebras sacras, el grupo Control mostró diferencia con los grupos Cf y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$) y el grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$). En las vértebras caudales el grupo Control se diferenció de los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), por otro lado el grupo Cf tuvo la misma diferencia con Sp, Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$).

Las esterneras como el resto del esqueleto se vieron afectadas por la administración de la Cf, así como un efecto protector de la Sp, que se relaciona con su dosis. La esternera I, sin alteraciones en los grupos Control, Sp, Cf + Sp 400 se diferencian de los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$). Las esterneras II, III, IV y VI el grupo Control con diferencia con Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), mientras el grupo Cf con Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$). En el caso de la esternera V el grupo Control mantuvo diferencia con los grupos Cf, Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$) y Cf + Sp 200 ($P = 0.038$), mientras el grupo Cf la diferencia se presentó con los grupos Sp, Cf + Sp 400 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$).

En costillas, tanto en las verdaderas, las falsas como en las flotantes en el grupo Control, no hay alteraciones guardo diferencia con Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), por otro lado el grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$).

Los huesos de la cadera son afectados por la exposición a la Cf, efecto que se contrarresta conforme se incrementa la dosis de Sp. Específicamente, al evaluar el ilión del grupo Control tuvo diferencia con Cf ($P \leq 0.001$), Cf + Sp 100 ($P = 0.012$), mientras, el grupo Cf presentó una diferencia significativa con los grupos Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$). En el isquión y el pubis el grupo Control se diferenció de los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), en tanto, Cf presentó diferencia con Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$).

Las diferencias entre los grupos, también se manifiestan en la clavícula y la escápula, donde el grupo Control presentó diferencia con Cf y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$), por otro lado, el grupo de Cf la presentó con los grupos Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$).

Los huesos de las extremidades anteriores son de las más afectadas por la Cf, es por ello que el húmero, el carpo y el metacarpo mostraron diferencias entre el grupo Control con los grupos Cf, Cf + Sp 100 y Cf + Sp 200 ($P \leq 0.001$), el grupo con más alteraciones fue el de Cf que presentó diferencia con Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$). En el radio y la úlna el grupo Control tuvo diferencia con Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$), y el grupo Cf presenta diferencia con Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$).

Cuadro 4. Enzimas antioxidantes y daño oxidativo en los hígados fetales provenientes de hembras tratadas con ciclofosfamida y diferentes dosis de espirulina

Tratamiento	SOD (U/mL)	GPx (U/L)	CAT (U)	nmol MDA/g	nmol C = O/mg/g
Control	299.3 ± 59.34	105.5 ± 13	4578 ± 83	55.4 ± 6.74	0.73 ± 0.12
Cf	275.6 ± 84.51	143.8 ± 10 ^a	3964 ± 11	48.0 ± 5.11	0.56 ± 0.05 ^a
Sp 400	991.3 ± 96.65 ^{a, b}	181.2 ± 25 ^{a, b}	6090 ± 99	43.7 ± 3.32	0.71 ± 0.16 ^b
Cf + Sp 100	302.9 ± 64.6	139.1 ± 55 ^{a, b}	4862 ± 10	46.3 ± 4.70	0.75 ± 0.06 ^b
Cf + Sp 200	361.9 ± 66.13	224.8 ± 46 ^{a, b}	4600 ± 16	41.2 ± 5.22	0.70 ± 0.08 ^b
Cf + Sp 400	531.5 ± 91.20	276.8 ± 48 ^{a, b}	6635 ± 17	47.2 ± 4.44	1.28 ± 0.34 ^b

Los resultados se expresan como la media ± ES. Los tratamientos corresponden a: Control (vehículos: agua y suero, según sea Sp o Cf); Cf, 20 mg/kg (administración única día 10 de la gestación); Sp 400 mg/kg; Cf + Sp 100 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 100 mg/kg; Cf + Sp 200 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 200 mg/kg, y Cf + Sp 400 = Cf, 20 mg/kg + Sp, 400 mg/kg. La Sp se administró del día 6 al 16 de la gestación. Se muestra la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (Gpx) y catalasa (CAT), mientras el daño oxidativo se determinó por la concentración de malondialdehído (MDA) y grupos carbonilo (C = O).

La parte de las extremidades más afectadas por la Cf son las falanges, mostrando diferencia significativa entre el grupo Control con los grupos Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$), presentándose la misma diferencia entre el grupo Cf con los grupos Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100.

De la extremidad posterior, el fémur, la tibia, la fíbula y las falanges, presentaron diferencias entre el grupo Control que mantuvo una diferencia significativa con los grupos Cf, Cf + Sp 100, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 400 ($P \leq 0.001$), mientras que el grupo Cf la tuvo con los grupos Sp, Cf + Sp 400, Cf + Sp 200 y Cf + Sp 100 ($P \leq 0.001$), excepto en el fémur con Cf + Sp 100 ($P = 0.002$).

Determinaciones bioquímicas

En el Cuadro 4 se presentan los resultados del estudio bioquímico. De las enzimas antioxidantes, SOD fue la más elevada en el grupo de Sp 400 mg/kg con diferencia significativa en relación con el grupo control. Por otro lado, la actividad de GPx aumentó significativamente $P = 0.047$ comparada con las de los grupos Control y Cf. Sin embargo, la actividad de CAT no difirió significativamente, aunque se observó una tendencia a disminuir en el grupo Cf y a aumentar en el grupo Sp 400.

Respecto al daño oxidativo, medido por la concentración de MDA, ninguno de los grupos arrojó diferencias significativas $P < 0.050$ frente al grupo Control ni con el grupo Cf. Mientras que, en la oxidación de proteínas, todos los tratados con Sp se diferenciaron significativamente del grupo Cf (Cuadro 4).

Discusión

Se ha demostrado ampliamente que la Sp posee diferentes actividades farmacológicas y antitóxicas que han sido comprobadas en humanos y animales de experimentación.^(13, 25) En animales, se ha encontrado que algunas de ellas se atribuyen principalmente a su actividad antioxidante, por el abundante contenido de betacaroteno, catalasa, superóxido dismutasa y glutatión.^(7, 26)

Aunque se han hecho investigaciones sobre la efectividad de la Sp, asociadas principalmente a sus efectos antioxidantes para proteger del daño que algunos agentes causan en el desarrollo embrionario en animales,^(27, 28) no se han llevado a cabo estudios sobre la acción que pueda ejercer contra los efectos teratogénicos por Cf —un profármaco con características químicas y farmacológicas diferentes y particulares—.

Aunado a lo anterior, la Sp ha demostrado ser una cianobacteria segura que no produce toxicidad al ser administrada a roedores en estudios agudos, subcrónicos, crónicos y genotóxicos.⁽²⁵⁾ Al mismo tiempo, en investigaciones sobre toxicidad reproductiva a altas dosis, ha demostrado estar exenta de producir efectos nocivos.⁽²⁹⁾

Respecto al efecto de la Cf sobre el peso materno, entre otros, Miller et al.⁽⁴⁾ no reportan diferencias significativas entre los grupos, mientras que otros investigadores hallaron una reducción significativa, aún administrada en forma concomitante con oxidantes como vanadio⁽²⁾ o extracto de té verde.⁽⁶⁾

En el presente estudio, después de iniciar la administración de Sp, los ratones gestantes empezaron a disminuir su peso en comparación con los grupos Control y Cf. Sin embargo, al final de la gestación se recuperaron, sin manifestar diferencia entre los grupos. Lo anterior se asocia a efectos de la *Arthrospira maxima*, que como Heo y Choung⁽³⁰⁾ señalan, se atribuye a una reducción del tejido adiposo blanco en la cepa de ratón CD-1 por la disminución de la lipogénesis y la adipogénesis, aunada a la activación de la termogénesis que promueve el metabolismo del tejido adiposo marrón.⁽³¹⁾

Además, la Sp, contiene gran cantidad de proteína, que suple deficiencias nutricionales y modula la ingesta de alimento (reduce leptinas y la fenilalanina que promueve liberación de colecistoquinina).⁽³¹⁾ Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga de la Sp, son convertidos en ácido docosahexaenoico (DHA), esencial durante la gestación, debido a que el organismo no los produce de manera eficiente para cubrir los requeridos en el desarrollo placentario y fetal.⁽³²⁾

Los ácidos grasos suministrados por la Sp promueven cambios en el metabolismo de los lípidos que favorecen la termogénesis, como se ha señalado, acción que origina que las crías tengan mayor peso, aunque no influye en el de las madres, como lo reportan Carpio et al.⁽³¹⁾ en ratas gestantes-lactantes.

Rezaei et al.,⁽³²⁾ en ratas a las que les administraron Cf en el DG 13, reportaron disminución de peso y del diámetro de la placenta, debido a una reducción en el grosor del laberinto, situación que favorece el paso de este agente al feto.⁽³³⁾ En nuestro estudio, en los grupos Cf y Cf + Sp 200 la reducción del diámetro de la placenta y de la longitud del cordón umbilical fue significativa, aunque sin diferencia en el peso. Las arterias espirales poco desarrolladas causan hipoxia y por tanto reperfusión, que exacerba el estrés oxidativo, contribuyendo al daño del propio tejido placentario y provocando además retraso del crecimiento fetal.⁽³⁴⁾

Diversos autores han confirmado que la Cf administrada en el DG 10 produce malformaciones en ratones sin ser embrioletales ni causar toxicidad aparente en las hembras gestantes.^(2, 4, 6) Lo hallado en nuestro estudio concuerda con lo antes discutido, además no se observan alteraciones en los parámetros reproductivos, aunque sí una tendencia al aumento de reabsorciones y muertes fetales en el grupo tratado con Cf y dosis bajas de Sp.

La ciclofosfamida ha sido objeto de varios estudios de toxicidad, donde se han señalado daños en diferentes órganos y sistemas, tanto en humanos como en animales. (2-4, 6, 35) En contraparte, la Sp o algunos de sus componentes como los β -carotenos, promueven el crecimiento, la diferenciación de los tejidos epiteliales y el desarrollo embrionario.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) resultan esenciales para el desarrollo del sistema neural,⁽¹⁰⁾ contrarrestando los efectos tóxicos de la Cf. Lo anterior se corrobora con los resultados de este estudio que muestran que los fetos de las madres tratadas con Sp no presentaron malformaciones macroscópicas ni esqueléticas, y sí, un aumento significativo de peso, tamaño y grado de osificación en comparación con los fetos del grupo Control.

Un alto porcentaje (94.38 %) de fetos del grupo Cf exhibieron al menos una malformación, mientras es significativo el efecto protector de la Sp, aún en dosis bajas, Cf + Sp 100 (66.99 %) y Cf + Sp 200 (66.28 %), aunque los resultados más importantes se encontraron en el grupo Cf + Sp 400.

Para proteger de los efectos teratogénicos de la Cf, se han empleado antioxidantes, como Miller et al.⁽⁴⁾ lo ha hecho, administraron N-acetil-L-cisteína y disminuyeron los defectos en costillas, vértebras, esternón y, en general, en la osificación. En nuestro estudio, al emplear Sp disminuyeron de forma significativa los daños en el total del esqueleto, en especial cuando la dosis fue de 400 mg/kg, y también tuvieron una mejor osificación.

La incidencia del paladar hendido inducido por Cf en nuestro trabajo (64 %) es muy similar a los resultados de otros estudiosos.⁽³⁰⁾ Considérese que el cierre del paladar está influenciado embriológicamente por otras estructuras locales como la lengua y la mandíbula. Esta última, que puede manifestarse como micrognatia, se manifiesta como un efecto de la Cf.^(4, 6) Su menor tamaño corresponde al del maxilar —característica fisiológica de los mamíferos para el amamantamiento—, como lo señalan Leite et al.,⁽³⁶⁾ la disminución de la osificación por efecto de la Cf⁽³⁷⁾ afecta la movilidad intrauterina de la mandíbula, por tanto de la lengua, lo que a su vez favorece el paladar hendido.⁽³⁸⁾

Suárez et al.⁽³⁹⁾ han señalado que el incremento de la actividad de SOD es un reflejo de una elevada generación de anión superóxido durante tiempo prolongado, lo que llega a inactivar esta enzima antioxidante. En este caso, el aporte exógeno de SOD a través de Sp evita daños por estrés oxidativo, lo que conduce a que los fetos del grupo Sp 400 tengan mayor tamaño y peso, y mejor mineralización, además de nacer sin malformaciones. También, SOD en la Sp contrarresta el estrés oxidativo producido por Cf y sus metabolitos, logrando efectos protectores especialmente a 400 mg/kg, dosis con la que los fetos tienen un tamaño y peso similar a los de control, y disminuyen significativamente los daños teratogénicos inducidos por Cf.

CAT se considera una enzima antioxidante prescindible durante la gestación,⁽⁴⁰⁾ ya que ratones genéticamente modificados, en los cuales se inhibe la síntesis de esta enzima en el hígado, continúan convirtiendo el peróxido de hidrógeno en agua, lo que no compromete el desarrollo fetal.⁽⁴¹⁾ Por otro lado, se ha observado que en el caso de la Cf, el glutatión (GSH) es una enzima antioxidante que participa de forma importante, es por ello que al unirse al fármaco o a sus metabolitos, llega a saturarse en su actividad.⁽⁴⁾ En realidad, los embriones de ratón

tienen una muy baja capacidad de síntesis de GSH, cuya falta puede dar lugar a un desarrollo embrionario anormal.⁽⁴⁰⁾

La Sp contiene carotenoides como fuente de vitamina A, que quizá influyen en la síntesis o actividad de GPx. La actividad de GPx en los grupos a los que se les administró Sp sola o con Cf muestra diferencia significativa, tanto con el grupo Control como con el de Cf, lo que sugiere actividad protectora ante el estrés oxidativo. De Haan et al.⁽⁴²⁾ señalan que el hígado es el órgano que produce más SOD en citosol y GPx en la etapa embrionaria, y en neonatos de ratón, independientemente del consumo o la exposición a oxígeno; así, estas enzimas antioxidantes son las que más contrarrestan los daños producidos por especies reactivas de oxígeno (ROS).

Ufer y Wang⁽⁴⁰⁾ consideran una alternativa para determinar los efectos de ROS –daños como malformaciones, así como la oxidación de lípidos y proteínas–, aunque considérese la vida media de estas macromoléculas como mecanismos de reparación, que pueden indicar un daño a corto plazo o acumulativo por ROS.

En este estudio, no se encontraron diferencias entre grupos respecto al malondialdehído –biomarcador del producto final de la lipoperoxidación–. El daño se pudo haber reparado si se considera el tiempo entre la administración de la Cf (DG 10) y la obtención del hígado (DG 17), aunado al efecto de sus componentes como la ficocianina y los β -carotenos que inhiben la lipoperoxidación.⁽¹⁹⁾ Por otro lado, las proteínas del grupo Cf se oxidaron significativamente más que las de todos, por lo que se debe de considerar, como señalan Jové et al.⁽⁴³⁾ que las proteínas dañadas por ROS o por los propios compuestos de la lipoxidación se conservan más tiempo, es decir, son daños más estables.

Se ha analizado la relación entre bajas concentraciones de CAT y GSH, así como la elevación de MDA con el aumento de oxidantes en líquido amniótico y sangre periférica en mujeres cuyos fetos tienen anomalías congénitas del sistema nervioso.⁽⁴⁴⁾ Por esta razón, se ha propuesto el uso de diferentes antioxidantes en ratones de experimentación tratados con Cf, que al incrementar las ROS, conducen a defectos ectodérmicos y mesenquimales durante la organogénesis.^(2-4, 6)

SOD es imprescindible durante el desarrollo de los embriones de ratón; otras enzimas como GPx y CAT, a pesar de su poca capacidad de síntesis, pueden compensar sus funciones antioxidantes entre ellas o por otros mecanismos.⁽⁴⁰⁾ Además, SOD aún después del nacimiento, puede acarrear alteraciones o susceptibilidad a diversas enfermedades. La Sp favorece un adecuado efecto antioxidante, con amplios estudios en humanos como en animales, lo que constituye una nueva propuesta de su uso para evitar malformaciones asociadas al daño por ROS causado por Cf.

Conclusiones

La Sp, en su calidad de antioxidante, administrada a ratones CD1 durante la organogénesis, protege de las malformaciones causadas por Cf al disminuir las especies reactivas de oxígeno inducidas por este agente, y previniendo la oxidación, en especial de proteínas, donde 400 mg/kg es la dosis más efectiva, al aumentar la concentración de SOD y GPx.

Disponibilidad de datos

Todos los datos se encuentran en el manuscrito y material de apoyo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al licenciado en nutrición Edgar Salinas Rivas, de Alimentos Esenciales para la Humanidad, por la donación de la espirulina.

Declaración de financiamiento

El trabajo fue posible gracias al apoyo de la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (sip@ipn.mx) a través del proyecto 20200181, otorgado a G Chamorro y AC Vega. El financiador no estuvo involucrado en el diseño del estudio, colección o análisis, tampoco en la decisión para publicar o preparar el manuscrito.

Conflicto de interés

Los autores manifiestan que no tienen conflictos de interés, relaciones financieras personales o con organizaciones que podrían influir inapropiadamente o perjudicar el contenido de este artículo.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: G Chamorro, AC Vega

Curación de datos: JM Cristóbal, Y García

Análisis formal: JM Cristóbal

Adquisición de fondos: G Chamorro, AC Vega

Investigación: AC Vega, SE Moreno, NC Hernández

Metodología: AC Vega, SE Moreno, NC Hernández G

Administración del proyecto: G Chamorro

Recursos: G Chamorro, AC Vega

Software: G Gutiérrez

Supervisión: G Chamorro, JM Melesio

Validación: G Gutiérrez

Visualización: AC Vega

Redacción-borrador original: G Chamorro, AC Vega

Redacción-revisión y edición: G Chamorro, AC Vega, G Gutiérrez

Referencias

1. Martínez N, Almaguer G, Vázquez-Alvarado P, Figueroa A, Zúñiga C, Hernández-Ceruelos A. Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de ciclofosfamida, daunorrubicina y metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo cometa. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2014;13(5):437-57. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85632125002>
2. Torki ARA, Azadbakht M. The protective effect of vanadium on cyclophosphamide-induced teratogenesis in mouse fetus. Al-Kufa University Journal for Biology. 2018. <https://journal.uokufa.edu.iq/index.php/ajb/article/view/8027>

3. Khaksary MM, Gholami MR, Najafzadeh VH, Zendedel A, Doostizadeh M. Protective effect of quercetin on skeletal and neural tube teratogenicity induced by cyclophosphamide in rat fetuses. *Veterinary Research Forum*. 2016;7(2):133-38.
4. Miller BM, Wells KK, Wells CB, Lam XT, Carney ME, Kepko DS, et al. Exposure to the dietary supplement N-acetyl-L-cysteine during pregnancy reduces cyclophosphamide teratogenesis in ICR mice. *Journal of Clinical Nutrition and Food Science*. 2018;1(1):035-39.
5. Logsdon LA, Herring BJ, Lockard JE, Miller BM, Kim H, Hood RD, Bailey MM. Exposure to green tea extract alters the incidence of specific cyclophosphamide-induced malformations. *Birth Defects Research Part B Developmental and Reproductive Toxicology*. 2012;95(3):231-7. doi: 10.1002/bdrb.21011.
6. Padmanabhan R. congenital malformations attributed to prenatal exposure to cyclophosphamide. *Anticancer Agents in Medical Chemistry*. 2017;17(9):1211-27. doi: 10.2174/1871520616666161206150421.
7. Deng R, Chow TJ. Hipolipidemic, antioxidant and antiinflammatory activities of microalgae spirulina. *Cardiovascular Therapeutics*. 2020;28(4):e33-e45. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00200x.
8. Ferrera-Hermosillo A, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. Hepatoprotective effects of spirulina maxima in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Medical Case Reports*. 4:103. doi: 10.186/1752-1947-4-103.
9. Gutiérrez-Rebolledo GA, Galar-Martínez M, García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos GA, Hernández-Reyes AG, Martínez-Galero E. Antioxidant effect of spirulina (*Arthrospira maxima*) on chronic inflammation induced by Freund's Complete Adjuvant in rats. *Journal of Medicinal Food*. 2015;18(8):865-871. doi: 10.1089/mf.2014.0117.
10. Lafarga T, Fernández-Sevilla JM, González-López C, Acién-Fernandez FG. Spirulina for the food and functional food industries. *Food Research International*. 2020;137:109356. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109356.
11. Muthusamy G, Thangasamy S, Raja M, Chinnappan S, Kandasamy S. Biosynthesis of silver nanoparticles from spirulina microalgae and its antibacterial activity. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2017;24(23):19459-19464. doi: 10.1007/s11356-017-9772-0.
12. Ferrazzano GF, Papa C, Pollio A, Ingenito A, Sangianantoni G, Cantile T. Cyanobacteria and microalgae as sources of functional foods to improve human general and oral health. *Molecules*. 2020;25(21):5164. doi: 10.3390/molecules25215164.
13. Finamore A, Palmery M, Bensehaila S, Peluso I. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly spirulina. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;3247528. doi: 10.1155/2017/3247528.
14. Mohan A, Misra N, Srivastav D, Umapathy D, Kumar S. Spirulina-The nature's wonder: a review. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*. 2014;2(4C):1334-39.
15. Selmi C, Leung PS, Fischer L, German B, Yang CY, Kenny TP, et al. The effects of spirulina on anemia and immune function in senior citizens. *Cellular & Molecular Immunology*. 2011;8(3):248-54. doi: 10.1038/cmi.2010.76.
16. Szulinska M, Gibas-Dorna M, Miller-Kasprzak E, Suliburska J, Miczke A, Walczak-Galezewska M, et al. Spirulina maxima improves insulin sensitivity, lipid

- profile, and total antioxidant status in obese patients with well-treated hypertension: a randomized double-blind placebo-controlled study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2017;21:2473-81.
17. Hernández-Lepe MA, Wall-Medrano A, Juárez-Oropeza MA, Ramos-Jiménez A, Hernández-Torres RP. Spirulina and its hypolipidemic and antioxidant effects in humans: a systemic review. *Nutrición Hospitalaria*. 2015;32(2):494-500.
 18. Torres-Duran PV, Ferreira-Hermosillo A, Juarez-Oropeza MA. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of spirulina maxima in an open sample of mexican population: a preliminary report. *Lipids in Health and Disease*. 2007;26,6:33. doi: 10.1186/1476-511X-6-33.
 19. Moradi S, Ziaei R, Foshati S, Mohammadi H, Mostafa NS, Hossein RM. Effects of spirulina supplementation on obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Complementary Therapies in Medicine*. 2019;47:102211. doi: 10.1016/j.ctim.2019.102211.
 20. Peters PWJ. Double staining of fetal skeletons for cartilage and bone. In: Neubert D, Merker HJ, Kwasigroch TE, editors. *Methods in Prenatal Toxicology*. Georg Thieme, Stuttgart; 1977:153-54.
 21. Menegola E, Broccia ML, Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology*. 2001;64(3):125-33. doi: 10.1002/tera.1055.
 22. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
 23. Parvez S, Raisuddin S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2005;20(1):112-117.
 24. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1978;52:302-10. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.
 25. Gutiérrez-Salmeán G, Fabila-Castillo L, Chamorro-Cevallos G. Nutritional and toxicological aspects of spirulina (*Arthrospira*). *Nutrición Hospitalaria*. 2015;1,32(1):34-40. doi: 10.3305/nh.2015.32.1.9001.
 26. Martínez-Sámamo J, Torres Montes-Montes de Oca A, Luqueño-Bucardo OI, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. Spirulina maxima decreases endothelial damage and oxidative stress indicators in patients with systemic arterial hypertension: results from exploratory controlled clinical trial. *Marine Drugs*. 2018;16(12)496. doi: 10.3390/md16120496.
 27. Vázquez-Sánchez J, Ramón-Gallegos E, Mojica-Villegas A, Madrigal-Bujaidar E, Pérez-Pastén-Borja R, Chamorro-Cevallos G. Spirulina maxima and its protein extract protect against hydroxyurea-teratogenic insult in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(11):2785-9. doi: 10.1016/j.fct.2009.08.013.
 28. Escalona-Cardoso GN, Paniagua-Castro N, Pérez-Pastén R, Chamorro-Cevallos G. Spirulina (*Arthrospira*) protects against valproic acid-induced neural tube defects in mice. *Journal of Medicinal Food*. 2012;15(12):1103-8. doi: 10.1089/jmf.2012.0057.
 29. Salazar M, Chamorro GA, Salazar S, Steele CE. Effect of spirulina maxima consumption on reproduction and peri- and postnatal development in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 1996;34(4):353-9. doi: 10.1016/0278-6915(96)00000-2.
 30. Heo MG, Choung SY. Anti-obesity effects of spirulina maxima in high fat diet induced obese rats via the activation of AMPK pathway and SIRT1. *Food & Function*. 2018;19(9):4906-4915. doi: 10.1039/c8fo00986d.

31. Carpio G, Gil-Kodaka P, Villanueva ME. Perfil hepático de ácidos grasos de ratas gestantes-lactantes y vírgenes suplementadas con espirulina (*Arthrospira platensis*). Revista Chilena de Nutrición. 2021;48(2):147-56. doi: 10.4067/S0717-75182021000200147.
32. Rezaei Z, Mohammadi T, Khaksary MM, Najafzadeh VH, Mohamadian B. MESNA Protective effect against cyclophosphamide toxicity on histomorphometry of rat placenta. Iranian Veterinary Journal. 2017;13(1):52-60. doi: 10.22055/IJ.2017.36103.1604.
33. Tobola-Wróbel K, Pietryga M, Dydowicz P, Napierala M, Brazert J, Florek E. Association of Oxidative Stress on Pregnancy. Oxidative medicine and cellular longevity. 2020;(ID 6398520):1-12. doi: 10.1155/2020/6398520.
34. Sultana Z, Maiti K, Aitken J, Morris J, Dedman L, Smith R. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes. American Journal of Reproductive Immunology. 2017;77(5):e12653. doi: 10.1111/aji.12653.
35. Khaksary MM, Bakhtiari E. The teratogenicity of cyclophosphamide on skeletal system and neural tube of fetal mice. World Applied Sciences Journal. 2012;16(6):831-34.
36. Leite VS, Oliveira RJ, Kanno TYN, Mantovani MS, Moreira EG, Salles MJS. Chlorophyllin in the intra-uterine development of mice exposed or not to cyclophosphamide. Acta Scientiarum. Health Sciences. 2013;35(2):201-10. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307228854008>
37. Rot-Nikcevic I, Downing KJ, Hall BK, Kablar B. Development of the mouse mandibles and clavicles in the absence of skeletal myogenesis. Histology and Histochemistry. 2007;22(1):51-60. doi: 10.14670/HH-22.51.
38. Bacon W. Cyclophosphamide-induced temporomandibular synostosis. American Journal Orthodontics. 1983;83(6):507-12.
39. Suárez S, Cabrera S, Ramírez E, Janampa D. Marcadores de estrés oxidativo en placentas de gestantes añosas. Anales de la Facultad de Medicina, Lima. 2007;68(4):328-32.
40. Ufer C, Wang C. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2011;4:12. doi: 10.3389/fnmol.2011.00012.
41. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. Journal Biological Chemistry. 2004;279,(31):32804-12. doi: 10.1074/jbc.M404800200.
42. De Haan JB, Tymms MJ, Cristiano F, Kola I. Expression of copper/zinc superoxide dismutase and glutathione peroxidase in organs of developing mouse embryos, fetuses, and neonates. Pediatric Research. 1994;35:188-95. doi: 10.1203/00006450-199402000-00013.
43. Jové M, Mota-Martorell N, Pradas I, Martín-Gari M, Ayala V, Pamplona R. The advanced lipoxidation end-product malondialdehyde-lysine in aging and longevity. Antioxidants (Basel). 2020;15;9(11):1132. doi: 10.3390/antiox9111132.
44. Cim N, Tolunay HE, Karaman E, Boza B, Bilici M, Çetin O, et al. Amniotic fluid oxidant-antioxidant status in foetal congenital nervous system anomalies. Journal International Medical Research. 2018;46(3):1146-52. doi: 10.1177/0300060517734443.