

Evaluación del efecto de un producto comercial con base de clorofila, sobre cultivos de leucocitos humanos

Evaluation of a commercial chlorophyll-based product effect on human leukocytes cultures

Angelica Rubí Alarcón-Vera ^{a*}, Pablo Octavio-Aguilar ^a

^a Laboratorio de Genética, Área Académica de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Pachuca-Tulancingo, km 4.5. Ciudad del Conocimiento. Col. Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184.

Resumen

La clorofila y sus derivados poseen propiedades antioxidantes, anti mutagénicas y anticancerígenas. Además, inducen la diferenciación, la detención del ciclo celular, la apoptosis, la activación inmune y la inmuno regulación contra células malignas. Dado el creciente mercado de productos naturales con beneficios no comprobados, es crucial delimitar su uso seguro y destacar aquellos con efectos beneficiosos comprobados. Por ello, este estudio evaluó si un suplemento alimenticio comercial con base de clorofila puede inducir una respuesta inmune en cultivos de leucocitos humanos. Probamos el producto en diferentes concentraciones en cultivos para analizar su impacto en la proliferación celular. Los resultados mostraron que los linfocitos inhiben su división a dosis altas del producto (> 5 µL/500µL de medio, 1%) sin afectar a neutrófilos y monocitos. A dosis bajas (2 µL/500µL de medio, 0.4%) se incrementa la proliferación de linfocitos igualando el efecto basal de la Fito hemaglutinina. Por tanto, el estudio sugiere que los productos con base de clorofila podrían ser un complemento terapéutico al inhibir los procesos inflamatorios mediados por células T, aunque no se probó su efecto sobre otros grupos celulares.

Palabras Clave Clorofila, linfocitos, respuesta inmunológica, inmunomodulación, inflamación.

Abstract

Chlorophyll and its derivatives have antioxidant, antimutagenic, and anticancer properties. In addition, they induce differentiation, cell cycle arrest, apoptosis, immune activation, and immunoregulation against malignant cells. Given the growing market for natural products with unproven benefits, it is crucial to delimit their safe use and highlight those with proven beneficial effects. Therefore, this study evaluated whether a commercial chlorophyll-based food supplement can induce an immune response in human leukocytes cultures. We tested the product at different concentrations in cultures to analyse its impact on cell proliferation. The results showed that inhibit lymphoid division at high product doses (>5 µL/500 µL of medium, 1%) inhibit cell division without affecting neutrophils and monocytes. At low doses (2 µL/500 µL of medium, 0.4%), lymphocyte proliferation is increased, matching the basal effect of phytohemagglutinin.. Therefore, the study suggests that chlorophyll-based products could be a therapeutic complement by inhibiting T-cell-mediated inflammatory processes, although their effect on the other cell types was not probed.

Keywords: Chlorophyll, leukocytes, immune response, immunomodulation, inflammation.

*Autor para la correspondencia: pablo_aguilar9900@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: al403547@uaeh.edu.mx (Rubí Alarcón-Vera), pablo_aguilar9900@uaeh.edu.mx (Pablo Octavio-Aguilar)

Historial del manuscrito: recibido el 22/09/2024, última versión-revisada recibida el 05/10/2024, aceptado el 15/09/2025, en línea (postprint) desde el 19/09/2025, publicado el DD/MM/AAAA. DOI: <https://doi.org/10.29057/icbi.v13i26.13776>



INTRODUCCIÓN

Las propiedades terapéuticas de las plantas se conocen, de forma empírica; desde hace mucho tiempo. Al respecto, se sabe que los pigmentos fotosintéticos, como la clorofila, influyen sobre el funcionamiento del sistema inmunológico (Martins *et al.*, 2023). La clorofila, en su forma natural, presenta dos isotipos de pigmentos tetrapirrólicos, clorofila *a* y clorofila *b*; diferenciados en la naturaleza de su grupo funcional. La clorofila *a* es la forma más común, mientras que la clorofila *b* es propia de algunas especies terrestres. La clorofila *a* es una molécula macrocíclica insaturada de naturaleza hidrofóbica, lo que permite un uso eficiente en la elaboración de suplementos, extractos o pastillas (Yersultan *et al.*, 2023), más su utilidad como tratamiento requiere formas bioactivas. En 1960 el grupo de Woodward, dedicado a la elaboración de compuestos complejos, logró la síntesis total de pigmentos similares a la clorofila, lo que marcó el inicio de las recientes investigaciones basadas en compuestos bioactivos con mayor actividad que los suplementos basados en formas nativas (Scheer, 2022); pues en la naturaleza la clorofila es inestable y se descompone fácilmente. Para poder aprovechar sus beneficios, es necesario que se lleve a cabo un proceso químico de reverdecimiento, en el cual el ion magnesio central de la molécula es reemplazado por otro metal, como el zinc o el cobre, dando lugar a los derivados de clorofila. Estos compuestos no representan un riesgo toxicológico y son altamente solubles, por lo tanto, tienen una mayor absorción en los sistemas celulares humanos y pueden ejercer funciones específicas (Clark & Taylor-Robinson, 2021).

Tanto a los derivados, como a la molécula original, se les atribuye capacidad antioxidante, anti mutagénica y anticancerígena. No obstante, estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que los derivados de clorofila utilizados en la elaboración de productos comerciales, exhiben una bioactividad mejorada en comparación con las clorofilas naturales presentes en la dieta cotidiana (Martins *et al.*, 2023). Karg *et al.* (2022), indican que el hecho de que un compuesto ejerza efectos antioxidantes *in vivo* depende de su biodisponibilidad y el microambiente físico-químico. Por otro lado, indican que las propiedades bioactivas de la clorofila están relacionadas con su estructura química pues las cadenas laterales hidrofóbicas de este compuesto facilitan las interacciones con las membranas biológicas, influyendo en la captación celular y las vías de señalización.

Entre las células con mayor capacidad de respuesta, complejidad de interacciones y señalización se encuentran las del sistema inmune. Las células implicadas en la respuesta inmune se originan a partir de células madre hematopoyéticas que se diferencian en dos líneas: la mieloide que da origen a neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, mastocitos y células dendríticas; y la linfóide, que produce linfocitos B, T y células asesinas naturales (NK). En ausencia de infecciones o enfermedad, estas células permanecen en un estado funcional basal o quiescente, manteniendo un entrenamiento constante ante antígenos propios y externos. Entre ellas, los linfocitos T citotóxicos son responsables de eliminar células infectadas por patógenos intracelulares y células tumorales en fase subclínica, contribuyendo a la prevención en el desarrollo de cáncer. Sin embargo, su acción en etapas avanzadas es limitada (Xia *et al.*,

2021). Sin embargo, deben ser activados para llevar a cabo dicha respuesta (Cai *et al.*, 2018). En particular, los linfocitos T CD4+ y los T CD8+ tienen un papel fundamental al equilibrar el combate contra patógenos con riesgo de desarrollar autoinmunidad o procesos inflamatorios crónicos o agudos. Los linfocitos T CD4+ promueven la producción de anticuerpos específicos mediante la activación de células B, Th2-dependientes. Por otro lado, los linfocitos T CD8+ son citotóxicos y pueden eliminar a las células infectadas, ambos tipos representan el 80% de la fase linfóide en circulación (Bajénoff & Germain, 2007).

Estudios previos han documentado el uso de pigmentos fotosintéticos en la modulación de células del sistema inmune, incluyendo la activación de células T mediante interacciones con derivados de clorofila, lo que apoya la base experimental de este estudio (Supasri *et al.*, 2021), destacando las filobilinas como filoleucobilina, dioxibilina y filoxantobilina (Vollmar & Moser, 2023). Por lo tanto, considerando la estimulación de los pigmentos fotosintéticos sobre las células, y la importancia de los linfocitos en la respuesta inmunológica, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un producto comercial con base de clorofila, sobre cultivos de leucocitos humanos; considerando las dosis recomendadas por el fabricante, un control negativo y un control positivo; para establecer si existe un estímulo diferencial entre las células circulantes a fin de sugerir o disuadir de su uso. Se esperaba que la dosis de clorofila fuese importante para determinar la proliferación y activación de las células linfoides, con relación al control negativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de leucocitos

Se realizó un cultivo de linfocitos basado en el protocolo sin modificaciones de Salinas-Solís *et al.* (2023), que consistió en preparar un medio de cultivo bajo condiciones estériles en una campana de bioseguridad tipo IIA (Thermo Forma Modelo 1118). Por cada mL de medio McCoy (GIBCO), se adicionaron 20 µL de fitohemaglutinina (4 mg/mL GIBCO) y 10 µL de penicilina (10 mg/mL)-anfotericina (25 µg/mL) concentración 100 x [0.9% de 50 mL, SIGMA), la solución se esterilizó por filtrado al vacío con una cámara de filtración con papel filtro Whatman de 0.4 µm. Luego, la mezcla se colocó en una placa de 96 pozos con 500 µL cada uno.

Las muestras de sangre se obtuvieron con jeringas heparinizadas (10 mL), previa firma del consentimiento informado por tres donantes independientes sanos (NOM-004-SSA3-2012). La sangre se colocó en microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. El suero obtenido se separó en tubos estériles y se resuspendió el paquete celular. En cada pozo se sembraron aproximadamente 1×10^5 leucocitos por pozo y los cultivos se mantuvieron en una incubadora de aire circulante (BG Lab) a 36°C durante 3 días.

Tratamientos

A los cultivos de tres días se les agregó el producto comercial (Clorofila a 0.4g/100 mL, suplemento “Atlantis”, marca

RTOTAL SHUS,) en diluciones de 7 [1.4%], 5 [1%] y 2 [0.4%] $\mu\text{L}/500\mu\text{L}$ de medio de cultivo, que representan concentraciones menores a la sugerida por el fabricante (3%), para establecer un rango de uso seguro y mínimo efectivo del producto. Además, se utilizó como control negativo un tratamiento sin el producto, para evaluar efectos espontáneos y un control positivo con 10 μL de una solución de colchicina como agente inhibidor de la división celular (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se realizaron tres réplicas por tratamiento, (12 pozos en total por experimento) y se incubaron a 37°C durante otras 12 horas. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado utilizando sangre de diferentes pacientes para garantizar que el efecto observado sea inducido por los tratamientos y no una variación intrínseca del sujeto donante.

Los cultivos fueron retirados en microtubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 500 μL de fijador frío fresco (metanol: ácido acético 1:3 MERK) con agitación rápida. Luego, los tubos se dejaron reposando a temperatura ambiente durante 10 minutos para que el fijador ejerciera su efecto y se centrifugaron nuevamente. Este último paso se repitió hasta que el sobrenadante se tornara claro. Los tubos se pueden conservar refrigerados durante algún tiempo, no mayor a un mes.

Conteo

Los paquetes celulares se tiñeron mediante el método de Wright, una mezcla de eosina y azul de metileno. Se adicionaron 50 μL del reactivo de Wright a cada microtubo y se incubaron en la oscuridad durante 15 min. Luego se dejó caer la preparación sobre un portaobjetos y se realizó un frotis con el cubreobjetos. Se consideró este método de forma indirecta pues no se requiere el conteo cromosómico y ha sido validado para la identificación y conteo de células en división (Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019; Salinas-Solís *et al.*, 2023), aunque se recomienda utilizar la cámara de Neubauer en futuros trabajos.

El recuento de los leucocitos (previo entrenamiento de 40 horas con muestras sanguíneas y contraste con Naranjo, 2008) se realizó mediante un microscopio óptico (VELAB) con un aumento de 40X, comenzando desde la esquina superior, y contando en el sentido de las agujas del reloj a lo largo del todo el cubreobjetos. Esta exploración se realizó una vez para cada tratamiento con muestras independientes. Los indicadores de estimulación son el número de mitosis observadas respecto al total de células contabilizadas (Índice Mitótico) y la frecuencia de tipos leucoides (linfocitos, monocitos y neutrófilos) como variables independientes. Una vez identificadas las células se incrementó el aumento a 100X con aceite de inmersión para una mejor apreciación fotográfica.

Análisis estadístico

Para determinar la normalidad de los datos se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk, las cuales demostraron que la frecuencia de los tipos celulares no se distribuye de manera normal. Por lo tanto, se realizó una prueba de ANOVA multivariada no paramétrica (PERMANOVA con distancias

euclidianas y 9999 permutaciones)(Anderson, 2017) considerando las frecuencias del tipo celular como variables para el modelo de estudio. Posteriormente, se realizó una serie de pasos por exclusión para encontrar las variables con mayor peso en el modelo, de tal manera que al eliminar aquellos tipos celulares con mayor peso en el cálculo de las distancias, se perdiera el contraste significativo.

Finalmente, se comparó el índice mitótico de los linfocitos mediante una ANOVA de una vía, ya que este conjunto de datos si se distribuye de manera normal de acuerdo con los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk ($W > 0.8$, $p > 0.05$ en todos los casos). No se observaron divisiones del resto de los tipos celulares por lo que no se realizaron comparaciones con estos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron y cuantificaron las principales células del sistema inmune (linfocitos, monocitos y neutrófilos) tanto en los diferentes tratamientos como en los controles. No se observaron basófilos ni eosinófilos ya que estos tipos son infrecuentes en sangre circulante y se localizan en tejidos infiltrados o epitelios (Gleich, 1989), por lo que el tipo de muestra no contó con una representación significativa de tales células.

Además, fue posible observar células en división (Figura 1), aunque predominantemente se trató sólo de linfocitos. Esto se explica por las diferencias en el tiempo de vida de los tipos celulares en el cultivo. Las primeras células en responder ante cualquier estímulo son los neutrófilos, lo que genera un número reducido de estos en el cultivo a los tres días de incubación. La mayoría fueron eliminados antes de 90 minutos, e incluso es posible visualizar algunas estructuras similares a Trampas Extracelulares de Neutrófilos o NETs, por sus siglas en inglés (Neutrophil Extracellular Traps) en los cultivos de tres días y algunos neutrófilos en banda (Figura 2), pero son menos frecuentes (Westerlaken *et al.*, 2017).

Los neutrófilos polimorfonucleares liberan NET para atrapar y eliminar patógenos (bacterias y hongos principalmente), minimizar el daño tisular y regular las respuestas inflamatorias, que en nuestro caso serían inducidas en el cultivo por la presencia de células apoptóticas o necróticas, por contaminación o por la activación directa de la clorofila. Las NET liberadas por los neutrófilos mejoran la activación de las células T, aumentando su respuesta ante antígenos específicos y estímulos subóptimos. Este proceso requiere contacto físico entre las NET y las células T, tal como se sugieren las imágenes en nuestras preparaciones (Figura 3); mediante la señalización del receptor de células T (TCR) (Tillack *et al.*, 2012). La clorofila constituye *per se* un estímulo para los neutrófilos ya que estas células son capaces de reaccionar a la peridina de la clorofila, mediando su activación (Supasri *et al.*, 2021). Nuestros resultados sugieren que la clorofila activa la mitosis linfocítica por mediación de neutrófilos activados, pero solo en dosis bajas. Es importante señalar que la presencia de NETs requiere tinciones básicas especializadas para la detección de las fibras de ADN extracelular, como la tinción de Fulgen (específica para desoxirribosa) o SiR-Hoechst (Lukinavičius *et al.*, 2015). Por

lo que las estructuras observadas también podrían ser células activadas, aunque el medio no fue estimulado con citocinas como M-CSF o GM-CSF que pudiesen justificar la presencia de tal activación. De igual manera, la tinción de Wright si permite identificar NETs cuando se utilizan equipos de mayor sensibilidad como Cella Vision (Patterson & DiFrancesco, 2013). Por lo anterior, se sugieren futuros trabajos con métodos de tinción específicos para material genético y, de contar con los medios, un conteo de tipos celulares por citometría de flujo.



Figura 1. Linfocitos en proceso de división celular.



Figura 2. Izquierda, aparente trampa extracelular de neutrófilos (NET). Derecha, neutrófilo en banda.

El análisis de PERMANOVA reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 9.646$, $p= 0.0019$), explicadas únicamente por los cambios en la frecuencia de linfocitos (Tabla 1); mientras que los neutrófilos varían de forma aleatoria por lo que no contribuyen a explicar las diferencias. De igual forma, los monocitos no aportan a la variación del modelo. Este resultado se relaciona con la división predominante de linfocitos, pero solo en la dosis de $2 \mu\text{L}$.

Destacamos el resultado obtenido por el PERMANOVA serial. Este análisis permite unificar en una medida de distancia probabilística, obtenida por permutación, las diferencias de los diferentes indicadores por tratamiento, en este caso las frecuencias celulares que por sí solas constituyen variables independientes. La ventaja de la unificación es la apreciación del efecto sinérgico diferencial, ya sea positivo o negativo entre los tipos celulares. De igual manera, la distancia se incrementa entre tratamientos al incluir variables importantes para explicar la distribución de la variación, pero al eliminarlas del modelo, la distancia disminuye perdiendo capacidad discriminante, de tal forma que las variables importantes destacan al ser eliminadas, con una consecuente pérdida de valor probabilístico (menor F y mayor p) (e. g. Aquino-Camacho *et al.*, 2025). Otra ventaja del modelo es que no requiere la multinormalidad de los atributos evaluados, es decir, se puede considerar una prueba no paramétrica. La

misma aproximación se puede usar en cualquier modelo multivariante que no cumpla con los supuestos de esfericidad y multinormalidad, propios del Análisis de Componentes Principales o el Análisis de Factores (Souza, 2025). Fue gracias a este resultado que se depuró la base para utilizar los datos directos del conteo de linfocitos en la ANOVA de una vía.

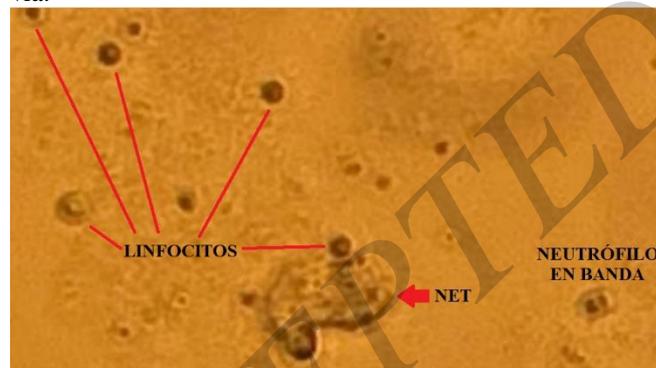


Figura 3. Interacción linfoide con NETs en cultivos de linfocitos estimulados con clorofila.

Tabla 1. Análisis multivariado permutado de la varianza de los tipos celulares ordenados de acuerdo a la importancia para el modelo de estudio. Solo al eliminar a los linfocitos se pierden las diferencias entre tratamientos.

Seriada	F	p
Linfocitos	0,9943	0,25
Total	9,646	0,0019
Monocitos	9,747	0,0024
Neutrófilos	10,92	0,0018

La ANOVA de una vía mostró que existe un índice mitótico de células linfoides significativamente menor en los tratamientos con 5 y $7 \mu\text{L}$ ($F_{(4, 10)} = 38.43$, $p = 0.0003$) con relación a las muestras control y a la dosis de $2 \mu\text{L}$ (Figura 4). En otras palabras, la clorofila inhibe la proliferación linfoide en dosis mayores a $5 \mu\text{L}$.

Clark & Taylor-Robinson (2021), en un informe sobre terapia COVID-19 señalan que un derivado de clorofila, la clorofilina (CHL) sódica y cúprica (SCC), podría inducir la producción de células madre, tanto que se sugiere su uso en linfopenia asociada con síntomas severos de esta infección viral. De igual manera dosis bajas de CHL ($10 \mu\text{M}$) inhiben la apoptosis celular (Sharma *et al.*, 2007). Otros estudios mencionan que la administración de clorofila y sus derivados, ya sea por ingesta o en solución inyectable; estimula parámetros hematológicos entre ellos la producción de linfocitos (Pyo *et al.*, 2013; Yersultan *et al.*, 2023). Esto explicaría los resultados en la dosis de $2 \mu\text{L}$; asumiendo que, tanto en el control positivo como en el negativo, la proliferación linfoide depende de la adición de fitohemaglutinina, que estimula la expresión de células T y mononucleares así como su activación (Sullivan *et al.*, 2001). En conjunto, la fitohemaglutinina en todos los tratamientos, y la clorofila en dosis bajas, estimulan la división linfoide.

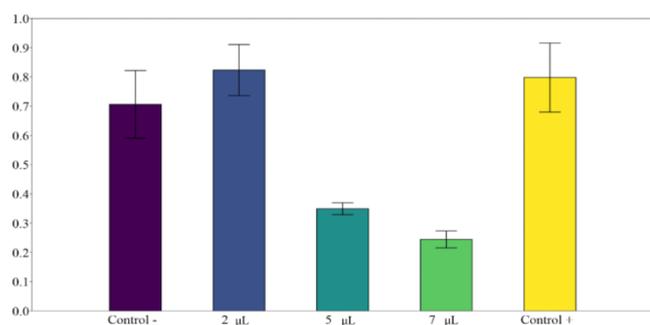


Figura 4. Índice mitótico por tratamiento. Las barras muestran la desviación estándar de las réplicas.

Sin embargo, mantener la homeostasis de la producción hematopoyética, principalmente de linfocitos, reduce la respuesta inmunológica exagerada implicada en procesos inflamatorios, por lo que las dosis de 5 y 7 µL actuarían como moduladores de tal respuesta, incluso por encima de la fitohemaglutinina. Al respecto, se ha comprobado el efecto inhibitorio de la expresión del gen TNF- α (una citocina proinflamatoria), así como una activación marginal de NF- κ B (citocina inductora de diferenciación linfoide) por acción de la clorofila y sus derivados (Hyden & Ghosh, 2011; Subramoniam *et al.*, 2012). Nuestros resultados sugieren que la clorofila es un agente antiinflamatorio prometedor para el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide, colitis ulcerosa, lupus, sarcoidosis y cáncer. Pero, este hallazgo también condiciona el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos con linfopenia en dosis mayores al 1%, como hepatitis, VIH, septicemia o etapas avanzadas de cáncer. Los resultados, aunque son alentadores, no consideran anomalías hemáticas asociables con enfermedades crónicas, por lo que no deben ser consideradas como sugerentes para el consumo en este tipo de pacientes. Recalcamos que, las muestras sanguíneas proceden de personas sanas, así que el trabajo debe considerarse como una aproximación inicial. En futuros trabajos, sería necesario el contraste con grupos donantes con padecimientos como cáncer, dislipidemias o variantes de anemias además de probar otros productos comerciales.

CONCLUSIONES

Se han documentado varias actividades terapéuticas de la clorofila. Nuestros resultados sugieren que su acción, ya sea inductora de hematopoyesis o inhibitoria de procesos inflamatorios depende principalmente de la dosis. A dosis bajas se induce la proliferación linfoide mientras que en dosis altas se inhibe.

REFERENCIAS

Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). 1-15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>

Aquino-Camacho, M. F., Octavio-Aguilar, P., & Falcón-Ordaz, J. (2025). Variaciones morfológicas y morfométricas de *Syphacia peromysci* parásito de *Peromyscus*. *Páidi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 12(24), 110-15. <https://doi.org/10.29057/icbi.v12i24.12641>

Bajénoff, M., & Germain, R. (2007). Seeing is believing: a focus on the contribution of microscopic imaging to our understanding of immune system function. *European Journal of Immunology*, 37(S1), S18-S33. <https://doi.org/10.1002/eji.200737663>

Cai, G., Sun, K., Wang, T., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Liu, Z., & Bian, J. (2018). Mechanism and effects of zearalenone on mouse T lymphocytes activation in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162 (2018) 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.055>

Clark, N., & Taylor-Robinson, A. (2021). COVID-19 Therapy: could a copper derivative of chlorophyll a be used to treat lymphopenia associated with severe symptoms of SARS-CoV-2 infection? *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.620175>

Gleich, G. J. (1989). Chapter 4 Eosinophils, basophils, and mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 84(6), 1024-1027. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(89\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0091-6749(89)90144-9)

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). NF- κ B in immunobiology. *Cell Research*, 21(2), 223-244. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>

Karg, C., Parráková, L., Fuchs, D., Schennach, H., Kräutler, B., Moser, S., & Gostner, J. (2022). A chlorophyll-derived phylloxanthobilin is a potent antioxidant that modulates immunometabolism in human PBMC. *Antioxidants*, 11(10), 2056. <https://doi.org/10.3390/antiox11102056>

Lukinavičius, G., Blaukopf, C., Pershagen, E., Schena, A., Reymond, L., Derivery, E., Hell, S. W., Wolfram Gerlich, D., & Johnsson, K. (2015). SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy. *Nature Communications*, 6(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/ncomms9497>

Martins, T., Barros, A., Rosa, E., & Antunes, L. (2023). Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich agro-food: a comprehensive review. *Molecules*, 28(14), 5344. <https://doi.org/10.3390/molecules28145344>

Naranjo, A. C. B. (2008). Atlas de hematología células sanguíneas. 2ª edición. Universidad Católica de Manizales, Colombia. ISBN 958-8022-30-4

NOM-004-SSA3-2012. (2012). Norma Oficial Mexicana, Diario de la Federación 15/10/2012. *Del expediente clínico*, https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5272787&fecha=15/10/2012#gsc.tab=0

Patterson, W., & DiFrancesco, T. (2013). Implementation of Cella Vision at a Consolidated Laboratory Medicine Program. *Canadian Journal of Pathology*, 5(2), 56.

Pyo, M-Y., Park, B-K., Choi, J., Yang, M., Yang, H. O., Cha, J. W., Kim, J-C., Kim, I. S., Lee, H. B., & Jin, M. (2013). Pheophytin a and chlorophyll a identified from

environmentally friendly cultivation of green pepper enhance interleukin-2 and interferon- γ in Peyer's patches ex vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1747-1753. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00302>

Salinas-Solis, L., Gaytán-Oyarzún, J. C., & Octavio-Aguilar, P. (2023). Detection of mutagenic and genotoxic effects of the Turkey tail medicinal mushroom (*Trametes versicolor*, Agaricomycetes) extracts from Mexico on human lymphocyte cultures. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 25(12), 33-41. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2023050464>

Sánchez-Zepeda, M. Y., López-Herrera, M., Gordillo-Martínez, A. J., Gaytán-Oyarzún, J. C., Prieto-García, F., & Octavio-Aguilar, P. (2019). Micronuclei, mitotic index and chromosomal aberrations as biomarkers of genotoxicity in haba (*Vicia faba* L.) by effect of cadmium. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 10(1), 27-40.

Scheer, H. (2022). Chlorophylls: a personal snapshot. *Molecules*, 27(3), 1093. <https://doi.org/10.3390/molecules27031093>

Sharma, D., Kumar, S. S., & Sainis, K. B. (2007). Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. *Molecular Immunology*, 44(4), 347-359. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.02.031>

Souza, T. (2025). PERMANOVA. In: *Advances Statistical Analysis for Soil Scientists*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-88161-9_1

Subramoniam, A., Asha, V. V., Nair, S. A., Sasidharan, S. P., Sureshkumar, P., Rajendran, K. N., Karunakaran, D., & Ramalingam, K. (2012). Chlorophyll revisited: anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF- α gene by the same. *Inflammation*, 35, 959-966. <https://doi.org/10.1007/s10753-011-9399-0>

Sullivan, Y. B., Landay, A. L., Zack, J. A., Kitchen, S. G., & Al-Harhi, L. (2001). Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells. *Immunology*, 103(3), 270-280. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01243.x>

Supasri, K. M., Kumar, M., Segečová, A., McCauley, J. I., Herdean, A., Padula, M. P., & Ralph, P. J. (2021). Characterisation and bioactivity analysis of peridinin-chlorophyll a-protein (PCP) isolated from *Symbiodinium tridacnidorum* CS-73. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(12), 1387. <https://doi.org/10.3390/jmse9121387>

Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., & Sospedra, M. (2012). T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *Journal of Immunology*, 188(7), 3150-3159. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103414>

Vollmar, A. M., & Moser, S. (2023). The advent of phyllobilins as bioactive phytochemicals – natural compounds derived from chlorophyll in medicinal plants and food with immunomodulatory activities. *Pteridines*, 34(1), 20220047. <https://doi.org/10.1515/pteridines-2022-0047>

Westerlaken, G. H., Van Montfrans, J., & Meyaard, L. (2017). Differential Signalling and Kinetics of Neutrophil Extracellular Trap Release Revealed by Quantitative Live Imaging. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06901-w>

Yersultan, T., Abdelghafar, A. E., Zhanna, A., Sultan, T., Nurdana, S., Gulnar, T., & Faten, A. A. (2023). Improvement of blood parameters of male rats exposed to different injection doses of liquid chlorophyll. *Cureus*, 15(3), 36044. <https://doi.org/10.7759/cureus.36044>