



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Determinación del potencial teratógeno del pirul
Schinus molle en *Drosophila melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

MARÍA DOLORES TORRES VELASCO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ ARMANDO MUÑOZ MOYA



2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Determinación del potencial teratógeno del pirul *Schinus molle* en *Drosophila melanogaster*

realizado por Torres Velasco María Dolores con número de cuenta 0-7126266-8 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Patricia Ramos Morales
Propietario M. en C. Alejandro Martínez Mena
Propietario Dr. José Armando Muñoz Moya
Tutor
Suplente Biól. Rita Virginia Arenas Rosas
Suplente M. en C. Adriana Muñoz Hernández

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 30 de septiembre de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLÓGIA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLÓGIA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

'nlm.

DEDICATORIAS

A mis hijos, Iridia y Aristóteles porque gracias a ellos siempre tengo un objetivo que alcanzar.

A mis padres, Galdino y Josefina por su cariño y los momentos felices que me dieron, siempre estarán en mi corazón.

A ti, Dios, que me has acompañado a lo largo de mi vida y que me has enseñado que no hay imposibles. Gracias porque hoy me regalas la alegría de ver realizado uno de mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

No es fácil llegar, se necesita ahínco, lucha, deseo pero sobre todo apoyo como el que he recibido de ustedes durante este tiempo, gracias a él he llegado hasta este momento que he de recordar como el más feliz de mi vida.

Con cariño, admiración y respeto

A la Dra. Patricia Ramos Morales por compartirme su espacio, su tiempo y sus conocimientos, pero sobre todo ser una excelente compañera y amiga.

A mis sinodales, Dra. Patricia Ramos Morales, M. en C. Alejandro Martínez Mena, Biól. Rita Virginia Arenas Rosas, M. en C. Adriana Muñoz Hernández por los valiosos comentarios brindados a este trabajo.

A las autoridades del Programa de apoyo a la Titulación, especialmente a la Dra. Luisa Alba Lois y al Lic. Martín López Barrera por el apoyo incondicional para terminar esta etapa tan importante en mi carrera profesional.

A mi asesor de tesis, Dr. José Armando Muñoz Moya por el tiempo, conocimientos e interés constante para finalizar este proyecto.

Esta tesis se realizó mediante el *Programa de apoyo a la Titulación*, establecido entre la Secretaría de Educación Pública, la Universidad Nacional Autónoma de México y el Colegio de Bachilleres.

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ ESTA INVESTIGACIÓN

Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias, UNAM.

El material biológico utilizado en este trabajo fue proporcionado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

ÍNDICE

i. RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Origen de la biodiversidad en México.....	2
1.2. Plantas Medicinales.....	2
1.2.1. Etnobotánica.....	2
1.2.2. Metabolitos secundarios.....	3
1.2.3. <i>Schinus molle</i>	5
1.2.3.1 Origen.....	5
1.2.3.2 Distribución geográfica.....	5
1.2.3.3 Variables climáticas.....	6
1.2.3.4. Variables edáficas.....	6
1.2.3.5. Variables topográficas.....	6
1.2.3.6. Descripción.....	6
1.2.3.7. Etnobotánica del pirul.....	7
1.3. Toxicología Genética.....	9
1.3.1. Teratogénesis.....	10
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba.....	12
1.4.1. Biología del desarrollo.....	13
1.4.2. Reconocimiento fenotípico del sexo.....	15
2. OBJETIVO.....	17
3. HIPÓTESIS.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. Obtención del pirul.....	17
4.2. Concentraciones.....	17
4.3. Tratamientos.....	18
4.4. Análisis de alteraciones.....	18
4.5. Análisis estadístico.....	19
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSIÓN.....	25
7. CONCLUSIONES.....	30
8. BIBLIOGRAFÍA.....	31

i. RESUMEN

En el ambiente existen gran variedad de agentes y factores a los que los seres vivos están expuestos, mismos que podrían ocasionar entre otros, tipos daño, alteraciones durante el desarrollo de los organismos en formación. A los agentes que son capaces de alterar el desarrollo normal de cualquier embrión, se les conoce como teratógenos. La especie *Schinus molle L.* de la familia de las Anacardiaceae, conocida vulgarmente como “pirul”, es una planta medicinal que se utiliza para combatir enfermedades como: tos, asma y reumatismo, debido a que contienen taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esteroidales, esteroides, terpenos, gomas, resinas, y aceites esenciales, compuestos que se han asociado con actividad medicinal. El aceite esencial, está presente en las hojas, corteza y frutos, que son una fuente rica de triterpenos, sesquiterpenos y monoterpenos. El aceite esencial de las hojas y frutos ha mostrado ser un repelente efectivo de insectos, particularmente contra la mosca casera.

Con el objeto de contribuir al conocimiento de las actividades biológicas del pirul, se probó el potencial teratogénico en larvas de moscas de tipo silvestre de *Drosophila melanogaster* (canton-S) de 72 ± 4 h de edad. En experimentos preliminares se determinaron las concentraciones del extracto de las hojas. Se utilizó agua destilada como disolvente y testigo negativo, se realizaron 2 repeticiones por cada concentración probada, las cuales se obtuvieron al triturar 5 gramos de hojas de pirul en un mortero y agregar 100 ml de agua destilada; esta solución se consideró como el 100 % y se hicieron diluciones sucesivas para obtener las concentraciones a probar: [0.012-100 %], las cuales fueron incorporadas en el alimento en el que crecieron las larvas, para recuperar el efecto mediante la observación de malformaciones en los adultos de *D. melanogaster*. La frecuencia de alteraciones en los lotes experimentales se comparó con la frecuencia de alteraciones en las moscas del lote testigo; el aumento en la frecuencia de alteraciones en las moscas expuestas al 0.78 % de la solución original resultó significativo ($p < 0.05$); en el resto de las concentraciones la frecuencia de alteraciones fue similar a la del testigo negativo ($p > 0.05$), el tratamiento alteró el índice de sobrevivencia de manera significativa; no alteró la proporción sexual de manera significativa, de esta manera se concluye que el pirul presenta efecto teratogénico en *D. melanogaster*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen de la biodiversidad en México

La diversidad de la flora de México es una de las más ricas a nivel mundial. Por lo menos existen unas 26000 especies que representan prácticamente a todos los tipos de vegetación, debido en gran medida a la ubicación de nuestro territorio en el planeta y a la historia del continente. Nuestro país, con una orografía variada, alberga en sierras, montañas y picos a la flora del norte, de carácter templado o frío; en sus planicies costeras y trópicas a las especies del sur, de carácter cálido. Por otro lado, nuestro país comprende en más del 50% de su territorio una zona conocida como desierto en la que también prosperó una flora típica, conocida como xerofítica (Krebs, 1985; Estrada, 1985; Rzendowski, 1988; Hengevel, 1989).

1.2. Plantas Medicinales

1.2.1. Etnobotánica

El conocimiento profundo que los numerosos grupos étnicos de México, distribuidos a lo largo y ancho del territorio nacional tienen de su flora local, constituye uno de los legados de nuestro pasado indígena. Parte relevante de dicha flora son las plantas medicinales, que han sido utilizadas tradicionalmente para aliviar los problemas de salud, principalmente en aquellas zonas en las que la medicina social no ha penetrado (Del Amo, 1979).

La herbolaria mexicana permanece como parte integral de nuestra herencia cultural ya que el conocimiento y utilización de las plantas medicinales se remonta a la antigüedad. Por ejemplo, en 1552 el indígena Martín de la Cruz, realiza el Códice Badiano, un compendio donde por primera vez se agrupan las especies mexicanas según sus aplicaciones en el cuerpo humano. El código Badiano es todo un compendio de medicina indígena y gracias a él se conoce de los sorprendentes adelantos de los aztecas en el uso de las plantas medicinales, para enfermedades como el glaucoma, las cefalalgias, parasitosis, disentería, gota, hepatitis y estreñimiento, por mencionar algunas (Torres, 1996). Después Fray Bernardino de Sahagún, entre 1558 y 1575, describe casi 300 plantas mexicanas con aplicaciones medicinales. Se ha establecido que las plantas mexicanas que curan se destacan como parte fundamental de la medicina tradicional popular, debido a su antiguo

empleo y a que son accesibles. La recopilación de la información relacionada con el uso de las plantas con acción medicinal cobra gran importancia, porque promueve la conservación y uso racional de ejemplares útiles y aún de otros que se encuentran en peligro de extinción (Del Amo, 1979).

1.2.2. Metabolitos secundarios

Como resultado de los diversos procesos evolutivos, las plantas poseen gran número de compuestos químicos secundarios. Los metabolitos secundarios se llaman así, porque no se encuentran de manera general en toda la materia viva; por esto contrastan con los compuestos primarios (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos) que siempre están presentes. Los compuestos secundarios derivan de un grupo reducido de compuestos precursores como ácido acético y algunos aminoácidos esenciales (fenilalanina, tirosina y triptofano) (Evans, 1991).

El valor medicinal de la planta curativa está asociado a la presencia de sustancias químicas llamadas principios activos, los cuales tienen acción terapéutica definida y pueden emplearse para modificar favorablemente los trastornos patológicos originados por la enfermedad (Cabrera, 1975). En medicina natural es importante conocer la distribución de los principios activos en la planta, para lograr la medicación adecuada (Cabrera, 1975; Hernández y Gally, 1981; Álvarez, 1986).

Muchos de los principios activos son sumamente complejos y de algunos aún se desconoce la naturaleza química; otros han sido aislados, purificados, e incluso, sintetizados. Por lo general, pertenecen a una de estas categorías: alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenos, esteroides glicosídicos, aceites esenciales, gomas, resinas, grasas y sustancias antibióticas (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Desde el punto de vista biosintético, los metabolitos secundarios se dividen en: fenil propanos, acetogeninas, terpenoides, esteroides, alcaloides y un grupo diverso de compuestos que no encajan dentro de estos cinco grupos (figura 1) (Evans, 1991)

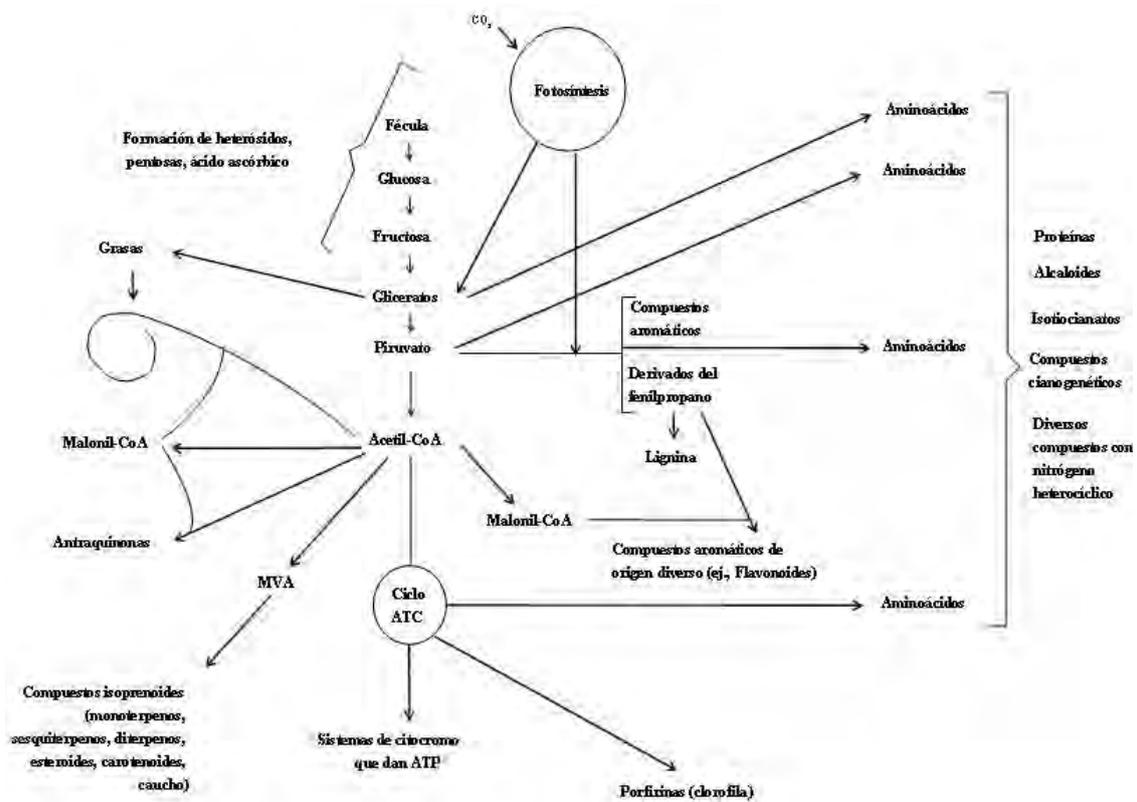


Fig 1. Origen de algunos metabolitos secundarios con relación a las rutas metabólicas básicas (Modificado de Evans, 1991).

Los flavonoides, que se encuentran tanto en estado libre como heterosídico, constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales. En la actualidad se conocen más de 2000 de los cuales unos 500 se encuentran en estado libre. Estos derivados son conocidos por sus propiedades antiinflamatorias, antialérgicos, antitrombóticas, vasoprotectoras, por la inhibición de la promoción de tumores y como protectores de la mucosa gástrica; efectos que se han atribuido a la influencia de los flavonoides sobre el metabolismo del ácido araquidónico (Evans, 1991). Muchas plantas que contienen flavonoides son diuréticas o antiespasmódicas. Algunos flavonoides poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Thompson, 1980; Evans, 1991).

Los aceites esenciales tienen, por lo general, varios componentes químicos, usualmente derivados terpénicos, o de compuestos aromáticos. A menudo contienen alcoholes, cetonas, aldehídos, fenoles, éteres y ésteres entre otros, siendo otros germicidas potentes, esta propiedad está asociada con su volatilidad y capacidad para penetrar al citoplasma, sin embargo, al ser insolubles en agua, su uso se restringe como antisépticos en medicina. Son

valiosos como carminativos, antitusígenos, antisépticos bucales (para hacer gargarismos), pulverizaciones y ungüentos (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Se han aislado más de 12000 metabolitos secundarios orgánicos, muchos de ellos han resultado útiles en medicina pero, si se utilizan sin control, su uso puede ser contraproducente ya que pueden llegar a producir efectos colaterales indeseables y aún, ser mutagénicos carcinogénicos o bien, teratogénicos. Un factor de importancia en esta práctica es que en la mayor parte de los casos ocurre sin dosificación específica, ni vigilancia médica. Los ácidos orgánicos, fenoles, cumarinas, glucosídeos, terpenos, quinonas, hormonas, saponinas, alcaloides, tioles, etc., metabolitos secundarios simples y complejos, aromáticos y de cadena abierta, se van multiplicando en los diversos taxa, tanto de plantas, animales como microorganismos, desempeñando a la vez diferentes funciones biológicas y ecológicas (Evans, 1991).

Por lo anterior se deben conocer también las propiedades de sus componentes individuales y de las interacciones entre éstos, que posean por ejemplo, propiedades mutagénicas, carcinogénicas, teratogénicas; o bien, anticancerosas, antimutagénicas, hipertensoras y antimicrobianas demostrables (Thomson, 1980).

1.2.3. *Schinus molle*

1.2.3.1. Origen

Árbol originario de los valles interandinos del centro del Perú. Es una especie de gran difusión ornamental en zonas áridas y semiáridas a nivel mundial. En Perú es una especie forestal típica de las estepas espinosas y de los bosques montañosos bajos (Cerrate, 1979).

1.2.3.2. Distribución geográfica

Antiguamente, el pirul se encontraba ocupando extensas zonas de Centro y Sudamérica llegando hasta el Norte de Argentina. Actualmente su distribución se ha extendido principalmente por cultivo. En Chile crece desde la Región de Tarapacá en el extremo norte, hasta la región metropolitana en la zona central, aunque su rango de distribución se ha extendido más al sur debido a su cultivo. No forma asociaciones puras, encontrándose ejemplares aislados a lo largo de toda su distribución natural. También es cultivado en

muchos países de América, África oriental, Medio oriente, Israel y también en la zona del Mediterráneo en el sur de Europa (Cerrate, 1979).

1.2.3.3. Variables climáticas

El pirul crece en zonas de alta insolación y es muy resistente a la sequía. Su mejor desarrollo lo alcanza con precipitaciones entre 250-600 mm, aunque en el norte de Chile puede crecer en ambientes extremadamente áridos. Las temperaturas de crecimiento óptimo son cercanas a los 12.8°C, siendo muy tolerante a las altas temperaturas, pudiendo resistir largos períodos arriba de los 34°C (Cerrate, 1979).

1.2.3.4. Variables edáficas

El pirul presenta escasas exigencias en cuanto a la calidad de suelo. Se considera una especie vaga respecto a las preferencias edáficas ya que crece tanto en suelos pesados arcillosos como en livianos arenosos profundos. Se desarrolla bien en suelos drenados, aunque resiste anegamientos estacionales. Habita en suelos neutros a alcalinos y es resistente a la salinidad, como lo demuestra su presencia en la Pampa del Tamarugal en el norte de Chile (Cerrate, 1979).

1.2.3.5. Variables topográficas

Se encuentra en altitudes que varían entre los 10 y 3500 msnm. En Perú es frecuente en los valles interandinos del sur, centro y norte, creciendo en hondonadas, quebradas y parte del monte ribereño, encontrándose prácticamente en todos los Andes del Perú. Puede crecer en la costa en terrenos desérticos, médanos y quebradas secas (Cerrate, 1979).

1.2.3.6. Descripción

El pirul (*Schinus molle* (L)) de la familia Anacardiaceae, es un árbol perennifolio, de 4 a 8 m de altura, se encuentra ampliamente distribuido en la altiplanicie mexicana, invade con facilidad cualquier tipo de terreno. La copa es redondeada y abierta proporcionando sombra moderada, las hojas son compuestas, alternas, de 15 a 30 cm de largo, colgantes con savia

lechosa, imparipinadas de 15 a 41 folíolos, generalmente apareados, de 0.85 a 5 cm de largo, estrechamente lanceolados, color verde amarillento (figura 2).

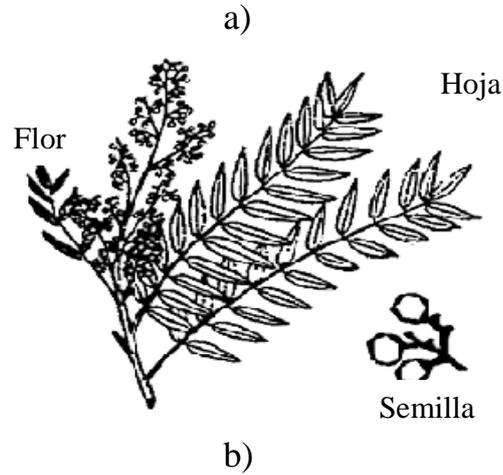


Fig. 2 a) Hojas, flores y semillas del pirul; b) ejemplar de pirul, *Schinus molle*.

1.2.3.7 Etnobotánica del pirul

El pirul está asociado generalmente con pocas especies de plantas, El análisis fitoquímico revela que la planta contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esteroidales, esteroides, terpenos, gomas, resinas, y aceites esenciales. El aceite esencial, está presente en las hojas, corteza y semilla, es una fuente rica de triterpenos, sesquiterpenos y

monoterpenos. Las actividades biológicas se atribuyen a los aceites esenciales que se encuentran en la planta. La semilla puede contener hasta el 5% de aceite esencial, y las hojas pueden contener hasta un 2% de aceite esencial. Los terpenos como el felandreno y carvacol, son acumulados y eliminados a través de hojas y frutos (Anaya y Gómez-Pompa, 1971).

Datos etnobotánicos del pirul en Sudamérica indican que se utiliza como antirreumático, antiséptico, antiinflamatorio, para trastornos de la piel, antifúngico, antibacterial, cicatrizante, diurético, trastornos digestivos, asma, bronquitis, gota, gonorrea y gripe (Ruffa *et al.*, 2004). En México el pirul se emplea para el asma, astringente, balsámico, blenorragia, bronquitis, cataratas, cólicos, colirio, conjuntivitis, tos, desórdenes digestivos, hongos del pie, gonorrea, gripe, goma, licor, úlceras bucales, oftálmico, profiláctico, purgante, reumatismo, dolor de estómago, dolor de muelas, tuberculosis, tumores, úlceras, enfermedades urogenitales y venéreas, verrugas y heridas

http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/3-anaca4m.pdf.

También el pirul es un estimulante del útero; En estudios con animales presenta acciones antiespasmódicas en el útero, por lo que no se recomienda su uso durante el embarazo. El empleo prolongado de esta planta no se recomienda, ya que puede matar a las bacterias pertenecientes a la flora intestinal, por tener propiedades antibacterianas (Ruffa *et al.*, 2004). En la tabla I, se presenta algunos usos del pirul.

La información acerca del uso de plantas como agentes antitumorales específicos es escasa, sin embargo, el efecto citotóxico de extractos metanólicos de plantas medicinales sobre las células de carcinoma hepatocelular humano ha sido estudiado como la actividad citotóxica de *Schinus molle* (L) en contra de la línea de células de carcinoma hepatocelular humano, Hep G2. (Ruffa *et al.*, 2002).

Tabla I.- Utilización del pirul en diferentes actividades humanas (Modificado de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/3-anaca4m.pdf)

USO	PARTE DE LA PLANTA	APLICACIONES
Aromatizante	Toda la planta	Olor perfumado por aceites esenciales y volátiles.
Base para chicle	Resina	En América del Sur se usa como goma de mascar. Fortalece encías y sana úlceras bucales.
Colorante	Hoja, tallo, corteza, raíz	Tañido amarillo pálido de tejidos de lana.
Combustible	Madera	Leña, carbón, pólvora.
Comestible	Fruto	Bebida refrescante, atole, fermentado con pulque.
Condimento	Fruto	Adultera la pimienta negra.
Cosmético	Hoja, semillas	Enjuagues bucales, dentífrico, fijador de perfumes, lociones, talcos y desodorantes.
Curtiente	Corteza	Tañir pieles.
Forrajero	Fruto	Alimento para pájaros
Implementos de trabajo	Madera	Mangos de herramientas, estacas y fustes de sillas de montar.
Industrial	Resina Ceniza	Fabricación de barnices. Blanqueador de ropa, purificador del azúcar.
Insecticida	Fruto, hoja	Repelente de insectos (mosca casera)
Medicinal	Hoja, flor, fruto, corteza, resina	Analgésico, antibacterial, anti depresivo, antimicrobial, antifúngico, antiviral, antiespasmódico, astringente, balsámico, citotóxico, diurético, expectorante, hipotensivo, purgativo, estomáquico, tónico, uterino, estimulante.
Melífera	Flor	Apicultura.

1.3 Toxicología Genética

La toxicología estudia el impacto que las diferentes sustancias producen en los seres vivos y la naturaleza de él o los mecanismos por los que estas alteraciones son producidas. La exposición de los seres vivos a sustancias contaminantes potencialmente reactivas presentes en el ambiente es frecuente. Se calcula que más de 100000 productos químicos han sido elaborados para uso comercial e industrial (aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos, pesticidas y muchos otros más). Muchos de éstos son capaces de provocar daño con efectos a corto, mediano y largo plazo. La interacción entre los organismos y los contaminantes ambientales es un proceso que se lleva a cabo en la mayoría de los casos por

periodos prolongados e incluye concentraciones mínimas de éstos, por lo que en muchas ocasiones se dificulta la detección del efecto prolongado (De Serres, 1979)

La toxicología también se relaciona con la evaluación cuantitativa de la sobrevivencia y frecuencia de los efectos provocados en relación con la forma de exposición de los organismos. Así, participa en la valoración de sustancias usadas en la medicina con fines diagnósticos, preventivos y terapéuticos; en la industria de los alimentos, como complemento o aditivos alimenticios directos e indirectos y en la industria química como materia prima, disolventes e intermediarios en la síntesis de otras sustancias y en la elaboración de materiales diversos (Brusick, 1987).

La toxicología genética es la disciplina científica que identifica y analiza la acción de un grupo de agentes tóxicos que son capaces de provocar daño (mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis). Su objetivo primordial es detectar y entender las propiedades de los agentes físicos y químicos que producen efectos hereditarios, deletéreos y hasta letales. Es una ciencia esencialmente multidisciplinaria que pretende establecer la correlación que existe entre la exposición a agentes xenobióticos (sustancias ajenas al organismo) y la inducción de alteraciones genéticas en células germinales, somáticas y en proceso de diferenciación para definir, a partir de ello, los efectos que las toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos (Brusick, 1987).

1.3.1. Teratogénesis

Los agentes genotóxicos que provocan alteraciones durante el desarrollo embrionario se conocen desde la tragedia ocasionada por la talidomida, que en los años sesenta provocó el nacimiento de 10,000 niños malformados en Alemania, Japón y en otros países. La droga sedativa ejerce sus efectos nocivos entre los 35 y 50 días del embarazo, pero no parece producir efectos en el embrión en desarrollo antes o después de este periodo (Castilla *et al.*, 1996).

Un teratógeno es una sustancia química, agente biológico o físico capaz de causar defectos en el desarrollo de un nuevo ser. Uno de los factores importantes al determinar el riesgo de que un teratógeno pueda causar daño es la dosis de la sustancia o agente físico (Klaassen,

1975). Cada teratógeno actúa en un aspecto particular del metabolismo celular. Por esta razón diferentes agentes teratógenos tienden a producir distintos efectos. Aunque actúen en distintos periodos del desarrollo embrionario y sobre el mismo sistema, cada agente puede producir un modelo o patrón específico de malformaciones. Algunos fármacos tienen un mayor potencial teratógeno debido también a factores como dosis, metabolismo materno y transporte placentario (Klaassen, 1975).

Sin embargo, el número de teratógenos químicos conocidos para los seres humanos es reducido; la mayoría pertenece al grupo utilizado en la quimioterapia del cáncer (Castilla *et al.*, 1996).

Algunas toxinas de origen animal son enzimas que producen diversos efectos en la bioquímica celular y en la fisiología de los organismos. Los alcaloides son quizá las toxinas vegetales naturales más potentes que se conocen desde el punto de vista genotóxico ya que en cantidades mínimas producen mutaciones puntuales y cromosómicas en los organismos empleados (Evans, 1991).

Para llegar a este conocimiento se utilizan los bioensayos, a través de los cuales la toxicología ha obtenido datos importantes en lo referente al daño ocasionado a la salud del hombre. Lo cual de otra manera solo hubiera sido posible con la exposición accidental a estas sustancias (Casarett 1975, Brusick, 1987).

Los bioensayos se basan en el uso de organismos cuya respuesta podría ser similar a la que se presentaría en el hombre bajo condiciones parecidas de exposición (Casarett, 1975; Sorsa, 1982; Brusick, 1987). Estos bioensayos deben ser evaluados con base en su capacidad de respuesta, de tal forma que aquellos que resulten sensibles y capaces de discriminar entre los diferentes tipos de daño, sean aceptados y puestos en práctica. Los modelos animales que se emplean van desde procariontes, hasta sistemas complejos como los artrópodos y mamíferos (Delgado, 1990).

En la toxicología del desarrollo los experimentos con animales pueden ser divididos en dos grandes clases:

- a) Para probar agentes con potencial desconocido.
- b) De segunda fase o ampliación sobre el efecto de agentes cuyo potencial para causar malformaciones ya se ha establecido (Shepard y Lemire, 2004).

Las pruebas teratológicas tradicionales con mamíferos consumen mucho tiempo y son costosas, además requieren de la participación de personal especialmente entrenado. Por este motivo surge la necesidad de desarrollar sistemas de prueba alternativos, sencillos y confiables que ayuden al establecimiento de prioridades para los estudios *in vivo* en el campo de la toxicología del desarrollo (Lynch *et al.*, 1991).

En este contexto, aparece *Drosophila melanogaster*, organismo que posee características que lo convierte en un modelo de prueba eficaz. Son capaces de absorber, distribuir, metabolizar y excretar compuestos químicos, mientras que producen descendencia numerosa en periodos de tiempo relativamente corto (Lynch *et al.*, 1991).

Los resultados de estudios con *Drosophila* han mostrado que al tratar el huevo y las fase larvarias de este organismo con compuestos químicos diversos se han obtenido alteraciones específicas en las moscas adultas previamente identificados como tóxicos para el desarrollo de mamíferos, se observa una elevada inducción de anomalías morfológicas en los adultos de las moscas (Lynch *et al.*, 1991).

Lynch, *et al.* (1991) han reportado una amplia base de datos sobre alteraciones inducidas por químicos en *Drosophila* y proponen formalizar los criterios que involucren el uso de este bioensayo para la detección del potencial teratogénico de compuestos químicos.

1.4. *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba

En 1909, el Dr. T. H. Morgan introdujo el empleo de la “mosca del vinagre”, *Drosophila melanogaster* en la investigación genética y desde entonces se emplea como modelo biológico en diversas disciplinas científicas. En este organismo se puede analizar un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, tanto en células somáticas como en células germinales (Tabla II) (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

Tabla II.- Características importantes para el empleo de *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba (Modificado de Ramos-Morales *et al.*, 1993).

Sensible a una gran variedad de sustancias	Detecta un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos y químicos en el ADN; presenta rutas de desintoxicación similares a las de mamíferos.
Detecta bajas concentraciones de mutágenos	Existen gran cantidad de marcadores fenotípicos que permiten analizar gran variedad de eventos.
Reproducibilidad	Es uno de los sistemas de bioensayo más rápido y eficiente, pudiéndose, realizar estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ; versatilidad para la elección de protocolos.
Ciclo de vida de corta duración	9 – 10 días a 25 °C y 60 % de humedad relativa.
Económico	Se le mantiene a bajo costo y en poco espacio; produce gran cantidad de descendencia, hasta 500 organismos por pareja.

1.4.1. Biología del desarrollo

El desarrollo de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* presenta un periodo de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvales que culminan con una metamorfosis completa (holometábola) de la que finalmente surge un imago o adulto. La secuencia y duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida son: huevo, un día; larva de primer estadio, un día; de segundo, un día, y de tercero, un día; pupa, 4.5 a 5 días.

La duración del ciclo de vida completo es de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, 25 °C y 60 %, respectivamente (figura 3) (Demerec, 1965; Roberts, 1986; Ramos *et al.*, 1993).

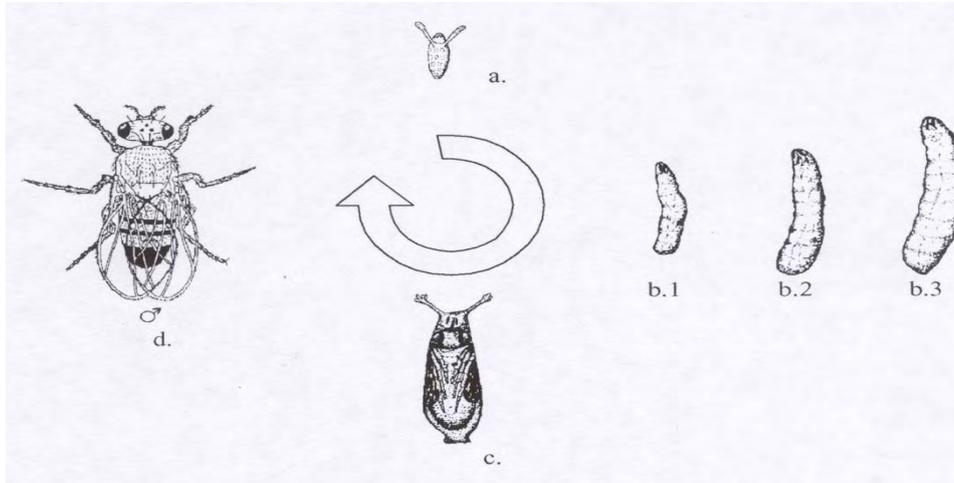


Fig. 3 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* es de 10 días a 25 °C a) huevo, b1) larva de primer estadio, b2) larva de segundo estadio, b3) larva de tercer estadio, c) pupa y d) adulto.

La larva presenta dos linajes celulares diferentes; las células larvarias y las imagales. Las células larvarias forman el cuerpo de la larva y se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y sólo aumentan su volumen. Las células imagales tienen tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retienen la capacidad de división celular, están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva entra en metamorfosis; estas células se localizan en estructuras características denominadas discos imagales, los cuales son primordios celulares que incrementan su tamaño al multiplicarse el número de células mediante divisiones mitóticas que ocurren en momentos particulares durante el desarrollo larvario.

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, los cuales involucran la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios (histólisis) y la organización de estructuras del adulto a partir de un complejo de discos imagales. Los órganos que son completamente histolizados durante la metamorfosis son las glándulas salivales, el intestino, los cuerpos grasos y los músculos. El estado pupal toma de 3 a 5 días y termina cuando emerge el imago o adulto (figura 4) (Demerec, 1965; Roberts, 1986; Ramos *et al.*, 1993).

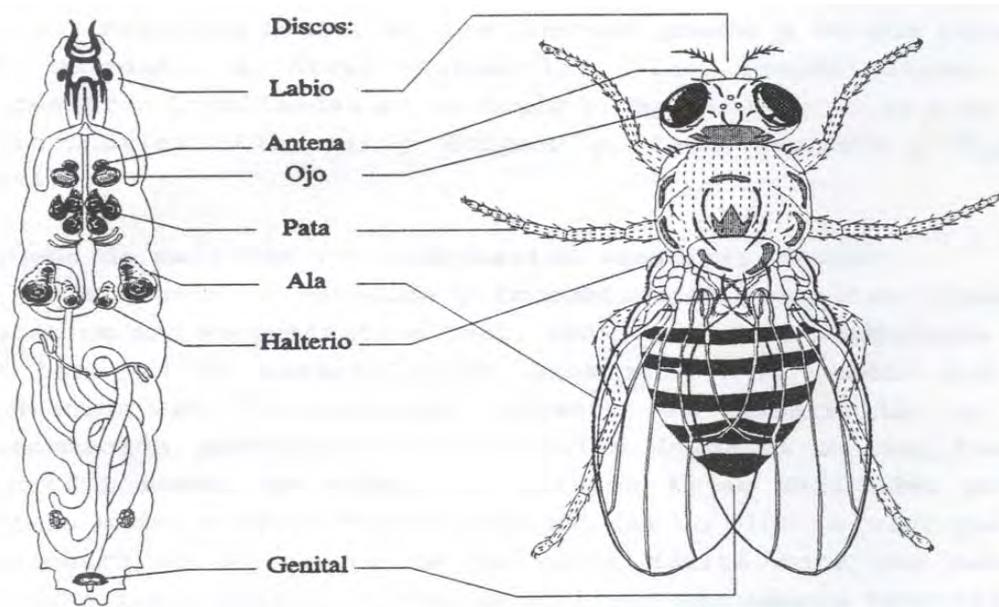


Fig. 4 Los discos imagales de *Drosophila melanogaster* originan diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas. (Tomado de Muñoz-Moya, 1994).

1.4.2. Reconocimiento fenotípico del sexo

El dimorfismo sexual en *Drosophila melanogaster* es positivo hacia la hembra, es decir, el tamaño de las hembras por lo general es mayor que el de los machos.

El abdomen del macho tiene en su extremo terminal tres segmentos fusionados, visiblemente melanizados; por su parte, el abdomen de la hembra, no tiene fusionados estos segmentos y la coloración de éstos es uniforme; en la hembra, la terminación del abdomen es ligeramente puntiaguda en contraste con la del macho, que es más redondeada. La placa genital de la hembra se caracteriza por tener un ovopositor, mientras que la del macho está formada por múltiples piezas, generalmente de coloración oscura. Otras estructuras auxiliares en la distinción de los sexos es la presencia de peines sexuales que constan de una hilera de aproximadamente 10 cerdas cortas y gruesas, de color negro y con apariencia de peine; son únicas en los machos y se localizan en la región basal del tarso del primer par de patas (figura 5) (Demerec, 1965; Roberts, 1986; Ramos *et al.*, 1993).

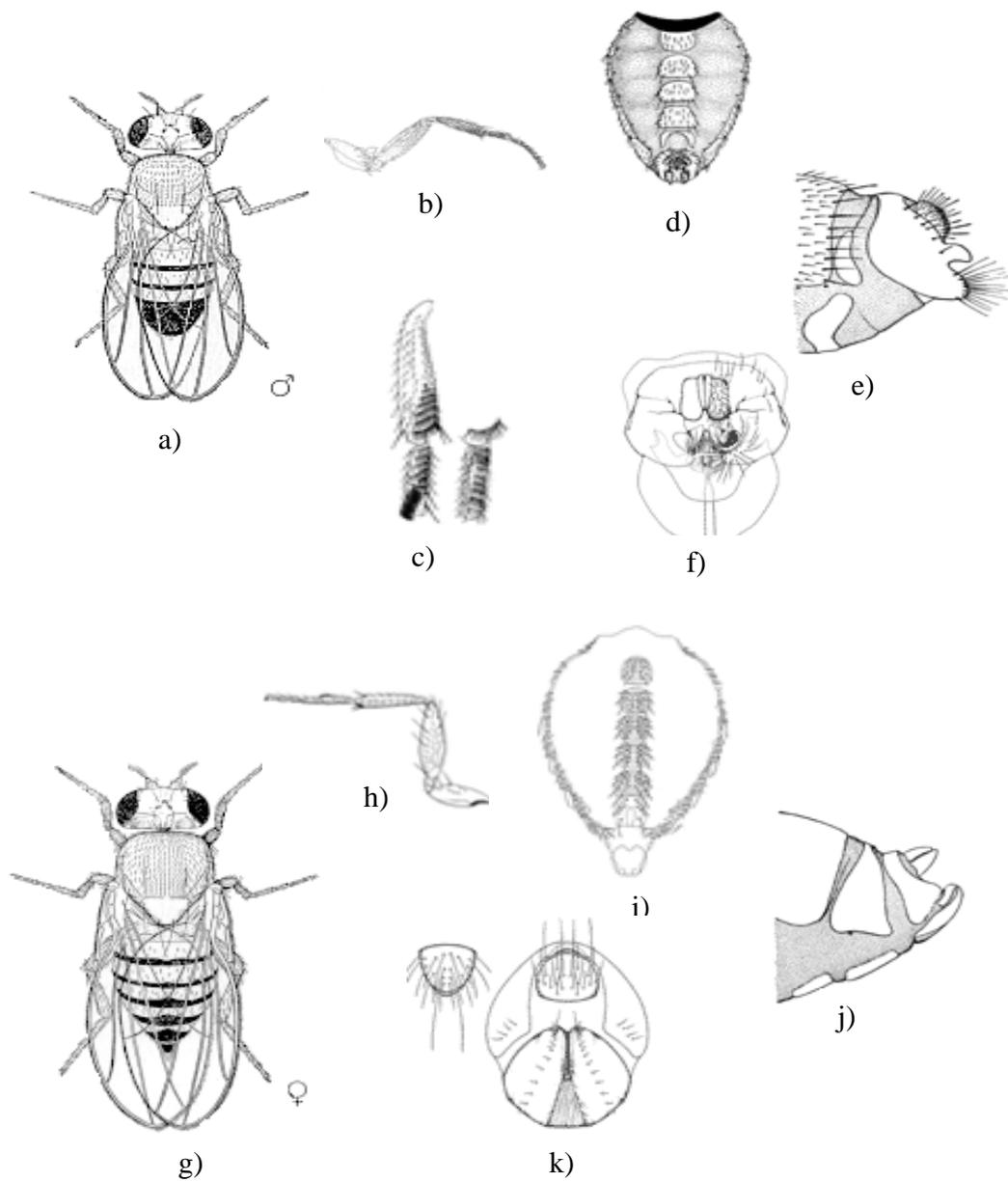


Fig. 5 Dimorfismo sexual en *Drosophila melanogaster*: a)macho, b)1^{er} par de patas del macho, c) peine sexual, d)aspecto ventral, e) aspecto lateral de la parte terminal del abdomen, f) placa genital; g) hembra h) 1^{er} par de patas, i)aspecto ventral, j) aspecto lateral de la parte terminal, k) genitales de la hembra (Tomado de Ashburner y Carson, 1986)

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad teratogénica de las hojas del pirul, *Schinus molle* (L) en el sistema *in vivo* de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*.

3. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios contenidos en el extracto acuoso de las hojas del pirul, presentan un efecto nocivo sobre el desarrollo de las larvas expuestas y presentarán alteraciones morfológicas en el estado adulto.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención del pirul

Las hojas de pirul, *Schinus molle*, se colectaron en el mes de junio del 2001 en la facultad de Ciencias UNAM.

4.2. Concentraciones

En experimentos preliminares se determinaron las concentraciones del extracto de hojas a utilizar. Se molieron 5 g de hojas de pirul en un mortero y se agregaron 100 ml de agua destilada, posteriormente se filtró el macerado con una malla de tela. A la solución obtenida, se consideró como el 100 % y a partir de ésta se hicieron diluciones sucesivas para obtener las concentraciones a probar: 0.012, 0.024, 0.049, 0.097, 0.19, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 %. Como disolvente y testigo negativo se utilizó agua destilada. Se realizaron 3 repeticiones del experimento.

4.3. Tratamientos

Las moscas utilizadas fueron del tipo silvestre, (c-s). Los cultivos de moscas progenitoras se mantuvieron en frascos lecheros con medio de cultivo elaborado de acuerdo con Ramos *et al.*, (1993).

Los progenitores se transfirieron a medio de cultivo fresco para la recolecta de huevos durante un periodo de 8 h. Tres días después, se obtuvieron larvas de tercer estadio (72 ± 4 h) que fueron sometidas al tratamiento.

Para evaluar la actividad teratogénica del pirul, las larvas se recuperaron del medio de cultivo por el método de Nöthinger (1970), que consiste en separar las larvas del medio, mediante una solución concentrada de sacarosa al 20%, posteriormente la solución se vertió en un embudo de separación, del que se recuperaron las larvas por flotación, utilizando una malla de nylon y se enjuagaron en agua corriente.

Para los tratamientos, las larvas se transfirieron a tubos homeopáticos que contenían 0.7 g de medio instantáneo Carolina (Biological Supply Co. Burlington, N.C., USA) y 3.5 ml de la solución a probar recién preparada, asegurando de esta manera que la concentración del compuesto en todo el medio de cultivo estuviera repartida de manera uniforme. Las larvas se alimentaron por un periodo de 48 h hasta que emergieron las moscas adultas para una exposición de 72 X 48 h.

4.4. Análisis de las alteraciones

Después de 10 días de iniciado el tratamiento los organismos adultos se sacrificaron por exceso de anestesia (éter) y se fijaron en etanol al 70 % para su posterior observación. De cada mosca fue analizada la superficie dorsal, ventral y lateral; (inspeccionados las cerdas, patas, segmentación, alas, halterios, antenas, ojos y las partes bucales) con un microscopio de disección a 25 X.

Durante la observación de cada individuo se determinó el tipo de malformaciones más frecuente y evidente, que comprendió la placa genital de los machos y en las placas genital y anal de las hembras, por lo anterior el conteo de organismos con alteraciones se centró en aquellos machos que presentaban una visible elongación del último segmento abdominal (placa genital), y una curvatura del mismo segmento en dirección del eje antero-posterior de la mosca, ya que en condición normal no se observa alargado y con la orientación de la placa genital hacia la región ventral. Para el caso de las hembras se contaron como alteradas aquellas que presentaron un pronunciado alargamiento del último segmento abdominal o placa genital, combinado con una apertura mayor de la placa anal, incluso con engrosamiento evidente de las cerdas que rodean a esta estructura. Lo observado en contraposición al patrón anatómico normal apreciable como último segmento no alargado, guardando proporción con el resto del cuerpo, una placa anal cerrada, descansando sobre región dorsal del segmento final abdominal con cerdas circundantes largas y delgadas (figura 6).

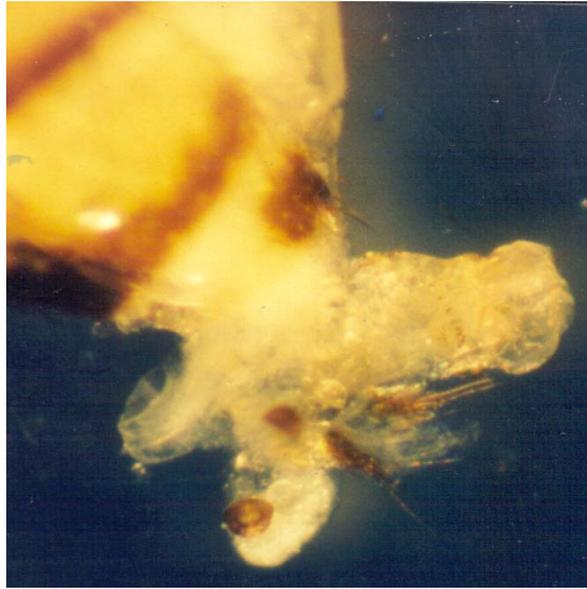


Fig. 6 Alteración más común (placa genital y anal) en hembras de *Drosophila melanogaster*.

4.5. Análisis estadístico

Los índices de sobrevivencia (IS) y la proporción sexual (Psex) fueron comparados con un análisis de varianza y una posterior comparación múltiple de medias por el método de Turkey. Por su parte los índices de organismos alterados en los controles y en los lotes sometidos a tratamientos, fueron comparados usando la prueba de z para proporciones. En todos los casos se fijó a $\alpha=0.05$.

IS= Numero de individuos del lote experimental/Numero de individuos del lote testigo.

Psex= Numero de machos/Total (machos y hembras).

En la figura 7, se muestra la metodología utilizada para evaluar la participación del extracto acuoso del pirul en la posible respuesta teratogénica en *Drosophila melanogaster*.

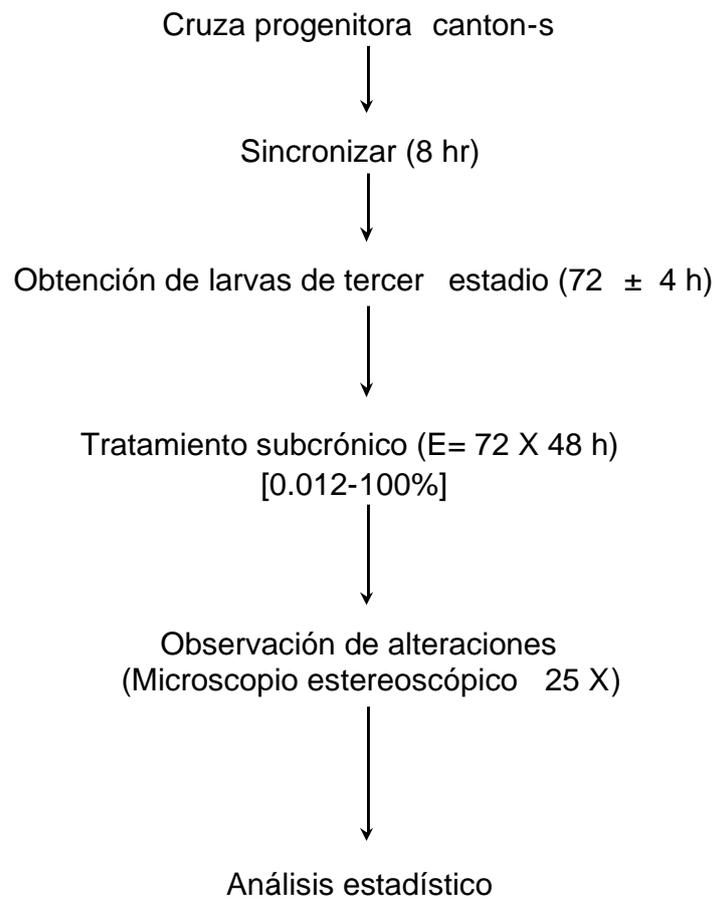


Fig. 7 Resumen de la metodología.

5. RESULTADOS

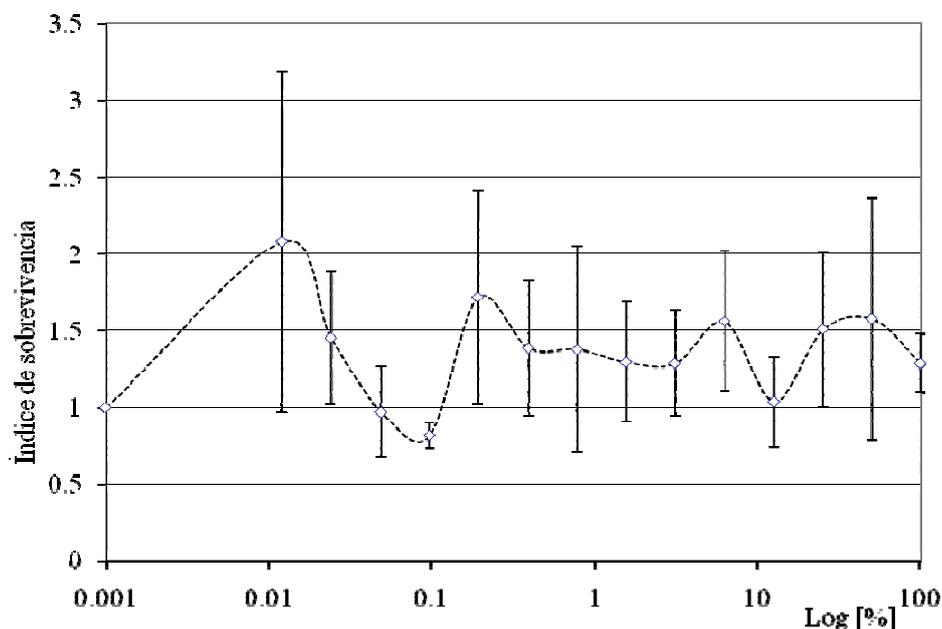
Los resultados obtenidos en cada repetición, fueron comparados, y al no encontrar diferencias entre ellos, se procedió a sumarlos con el fin de aumentar el tamaño de muestra.

El índice de sobrevivencia, está representado como la relación entre el número de moscas adultas recuperadas en cada tratamiento entre el número de moscas de los testigos concurrentes, siendo de 1 para el lote testigo. En la tabla III y figura 8, se muestran los índices de sobrevivencia obtenidos en los tratamientos con el pirul. El índice de sobrevivencia se ve afectado en todas las concentraciones empleadas, inclusive en la concentración de 0.012 %, se obtiene IS de 2.08, lo cual nos indica que el pirul no es tóxico en las concentraciones probadas. Solo en las concentraciones de 0.049 % (0.97) y 0.097 % (0.82) disminuye, pero no es estadísticamente significativa.

Tabla III.- índice de sobrevivencia de moscas del tipo silvestre, tratadas con el pirul \pm error estándar (ee). Exposición=72 X 48 h.

Concentración [%]	Numero de organismos	Índice de Sobrevivencia (\pm ee)
0	415	1.00 \pm 0.00
0.012	649	2.08 \pm 1.11
0.024	507	1.45 \pm 0.43
0.049	398	0.97 \pm 0.29
0.097	373	0.82 \pm 0.08
0.19	550	1.72 \pm 0.70
0.39	489	1.39 \pm 0.44
0.78	414	1.38 \pm 0.67
1.56	391	1.30 \pm 0.39
3.12	453	1.29 \pm 0.34
6.25	540	1.56 \pm 0.46
12.5	392	1.04 \pm 0.29
25	499	1.51 \pm 0.50
50	434	1.58 \pm 0.79
100	494	1.29 \pm 0.19

Fig. 8 Índice de sobrevivencia obtenido de moscas tipo silvestre, tratadas con el pirul.

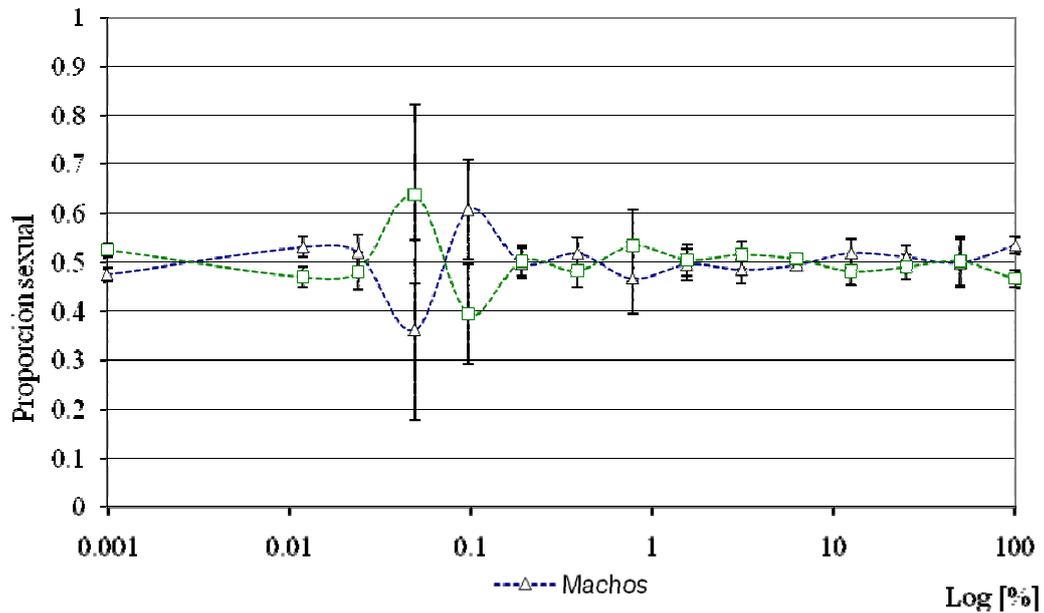


En la tabla IV y figura 9, se observa que en la concentración 0.097% se obtiene más machos que hembras, pero en general extracto del pirul no modifica significativamente el Psex de machos ni de hembras.

Tabla IV.- Proporción sexual de moscas del tipo silvestre, tratadas con el pirul \pm ee). Exposición=72 X 48 h.

Concentración [%]	Numero de organismos	Hembras (\pm ee)	Machos (\pm ee)
0	415	0.52 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01
0.012	649	0.47 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02
0.024	507	0.48 \pm 0.04	0.52 \pm 0.04
0.049	398	0.64 \pm 0.18	0.36 \pm 0.18
0.097	373	0.39 \pm 0.10	0.61 \pm 0.10
0.19	550	0.50 \pm 0.03	0.50 \pm 0.03
0.39	489	0.48 \pm 0.03	0.52 \pm 0.03
0.78	414	0.53 \pm 0.07	0.47 \pm 0.07
1.56	391	0.50 \pm 0.03	0.50 \pm 0.03
3.12	453	0.51 \pm 0.03	0.49 \pm 0.03
6.25	540	0.51 \pm 0.01	0.49 \pm 0.01
12.5	392	0.48 \pm 0.03	0.52 \pm 0.03
25	499	0.49 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02
50	434	0.50 \pm 0.05	0.50 \pm 0.05
100	494	0.47 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02

Fig. 9 Proporción sexual, obtenido de moscas tipo silvestre tratadas con el pirul. E=72 X 48 h.

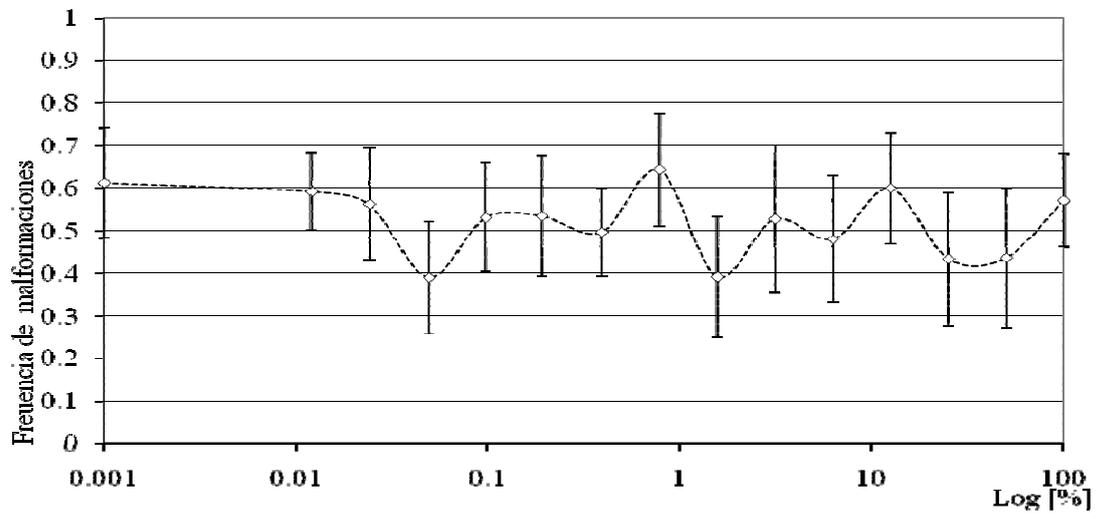


En la tabla V y figura 10, muestra la FA obtenidas en las moscas de tipo silvestre, tratadas con el pirul, se observa que en la mayoría de los tratamientos se obtienen frecuencias menores al lote testigo (siendo significativo en las concentraciones de 0.049, 1.56, 6.25, 25 y 50; $p < 0.05$). Cabe mencionar que en la concentración de 0.078 % es donde se incrementa la FA de 0.61 a 0.64, siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla V.- Frecuencia de alteraciones de moscas del tipo silvestre, obtenido con el pirul \pm EE. Exposición= 72 X 48 h.

Concentración [%]	Numero de organismos	Alteraciones	Frecuencia de alteraciones
0	415	254	0.61
0.012	649	384	0.59
0.024	507	285	0.56
0.049	398	155	0.39
0.097	373	198	0.53
0.19	550	294	0.53
0.39	489	243	0.50
0.78	414	266	0.64
1.56	391	153	0.39
3.12	453	239	0.53
6.25	540	259	0.48
12.5	392	235	0.60
25	499	216	0.43
50	434	189	0.44
100	494	282	0.57

Fig. 10 Frecuencia de alteraciones, obtenido de moscas del tipo silvestres tratadas con el pirul. E=72 X 48 h.



En la figura 11, se muestran los resultados del índice de sobrevivencia y la frecuencia de alteraciones. No se encontró relación entre los dos marcadores.

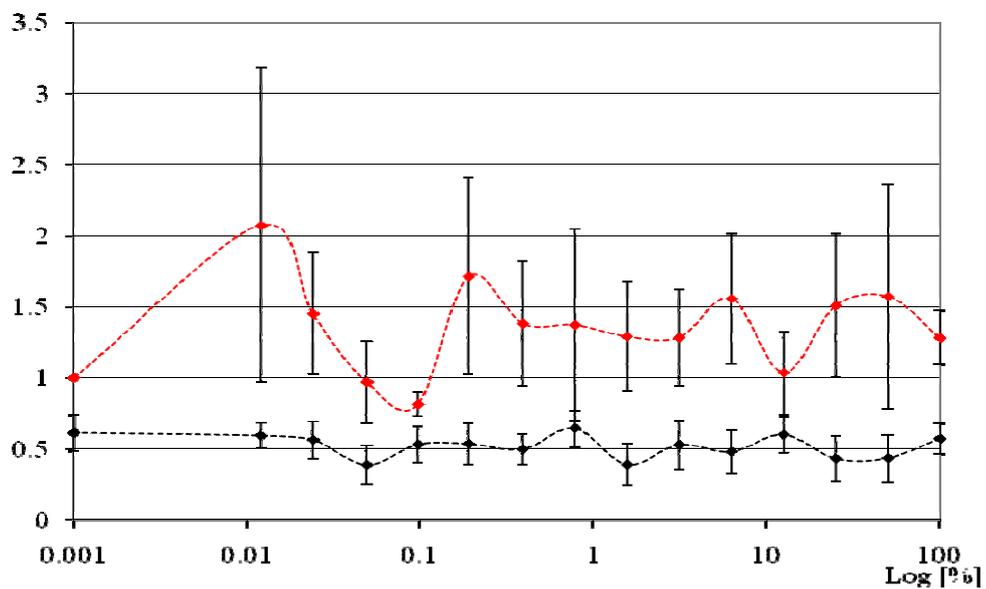


Fig. 11 Índice de sobrevivencia y frecuencia de malformaciones, obtenido de moscas del tipo silvestre tratadas con el pirul. E=72 X 48 h.

6. DISCUSIÓN

El pirul es una especie a la que se le han atribuido propiedades y acciones terapéuticas, en varios países de América Latina incluyendo a México, se le adjudican propiedades medicinales (Ruffa *et al.*, 2004).

Como se puede apreciar, su uso es muy amplio (como el de casi todas las plantas medicinales), principalmente en personas que no tienen recursos económicos ni asistencia social. Como ocurre con gran parte de las plantas con actividad medicinal supuesta o probada (Ruffa *et al.*, 2004), pocas veces se realizan estudios enfocados a determinar otro tipo de actividad que pudiera presentarse de manera colateral y provocar efectos indeseables o inclusive, existe la posibilidad de que algunos compuestos o sus derivados pudieran ser mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar si los metabolitos del extracto acuoso de las hojas del pirul presenta actividad teratogénica en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* y de esta manera contribuir a la investigación en este campo, ya que no hay literatura que indique que el pirul es teratogénico.

Las ventajas que nos ofrece el trabajar con *D. melanogaster* como modelo para evaluar posibles teratógenos son amplias. La mosca del vinagre, es un organismo con el cual se han desarrollado poderosas técnicas genéticas y moleculares para la identificación y caracterización de muchos genes. Se ha establecido que comparte muchos genes con vertebrados, como los involucrados en varios procesos celulares y del desarrollo. Estas similitudes básicas en la estructura y función celular entre la mosca y los vertebrados es porque comparten vías para: la señalización intercelular (Pawson y Berstein, 1990), patrones de desarrollo (Krumlauf, 1992), aprendizaje y comportamiento (Kandel y Abel, 1995), formación de tumores y metástasis (Potter *et al.*, 2000), degeneración neuronal (Fortini y Bonini, 2000), efecto de drogas y neurotransmisores en el comportamiento (Bainton *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000) y en el sueño (Shaw *et al.*, 2000; Hendricks *et al.*, 2000).

Uno de los factores prioritarios a controlar en cualquier protocolo que involucre el uso de *Drosophila* es el evitar someterlas a estrés innecesario, porque esto podría, tener efectos adversos en el desarrollo del organismo (Powell, 1997).

El número aproximado de larvas en cada vial fue de 100 y no un número exacto, ya que al contarlas implicaría el manipularlas directamente y esto generaría estrés que podría afectar

los resultados. Aun con estas precauciones, el manipular las larvas por el método de Nöthinger, (1970), implica un cambio brusco en la temperatura, el método es eficaz pero podría resultar en un evento estresante para las larvas.

Al analizar los parámetros como el índice de sobrevivencia, no se encontraron diferencias significativas, esto sugiere que los metabolitos secundarios que están contenidos en el extracto acuoso de las hojas del pirul no son tóxicos para *Drosophila*. Si los metabolitos presentaran un efecto tóxico, la población de moscas disminuiría en los lotes experimentales, como se puede apreciar. En la concentración de 0.97 %, se obtuvo un IS del 0.82, pero estadísticamente no es significativo. Estos resultados nos indican que el pirul no es tóxico, porque el IS está dentro de los estándares, ya que si se obtiene un índice de sobrevivencia menor al 0.70, se considera que el compuesto (s) empieza (n) a ser tóxico (s). Se menciona en la literatura que el pirul puede ser utilizado como insecticida, contra varios insectos (*Triatoma infestans*, vector del mal de Chagas) y principalmente contra la mosca doméstica (Ferrero *et al.*, 2006);

En este estudio no resultó tener esta propiedad ya que como se indicó anteriormente no influyó en el IS de la población, además de que los metabolitos que tienen esta capacidad son los terpenos, que por tener un origen lípidico, probablemente no fueron recuperados en el extracto acuoso por ser insolubles en el agua.

Los metabolitos contenidos en el pirul, influyen en la sobrevivencia, como se pudo estimar, por regla general en todas las concentraciones empleadas se recobró un IS mayor al lote testigo que no sería normal, pero el efecto si es debido al pirul. Las moscas que deberían de haber muerto de manera natural, sobrevivieron y se recobraron los adultos, esto puede deberse a que los metabolitos extraídos de las hojas del pirul, de alguna manera encendieron alguna (s) ruta (s) en el metabolismo que les permitió sobrevivir ya que muchos metabolitos como flavonoides (que también están presentes en el pirul) participan protegiendo del daño oxidativo; por otro lado, también pudo deberse que estas larvas recibieron una señal que disparó una respuesta anti-estrés; hasta el momento no se pudo determinar cuál fue él o los metabolitos que desencadenaron estos efectos pero se sugiere que probablemente son los flavonoides, que se sabe que tiene la propiedad de proteger a las células del estrés oxidativo (Bisht *et al.*, 2009).

Al analizar la Psex, que se esperaría que sea del 0.50 para hembras y 0.50 de machos (proporción 1:1, por la determinación del sexo que es XX para hembras y para machos XY), no se ve alterado en la mayoría de las concentraciones empleadas y no es estadísticamente significativo. Cabe mencionar que el Psex se modificó en las concentraciones de 0.097 % (machos de 0.61 y de hembras el 0.39) y 0.049 % (0.36 para hembras y de 0.64 para machos), pero de igual manera no resultó estadísticamente significativo, no hay una relación de que se estuviera recobrando más moscas de un solo sexo, ya que en estas dos concentraciones se revierte la proporción de cada sexo, además de que el sexo predeterminado es el de macho.

A pesar de que hay información disponible en experimentos con animales sobre teratogenicidad de más de 2500 químicos, solamente existe un número limitado de teratógenos a los que también se les reconoce como teratógenos humanos (Shepard y Lemire, 2004).

Muchos de los compuestos sintetizados por las plantas son teratogénicos en animales de laboratorio, pero solo unos pocos presentan esta propiedad cuando se administran en el alimento (Keeler, 1984). La gama de componentes de plantas, conocidas como poseedoras de efectos teratogénicos comprende 14 grupos diferentes como los alcaloides, cumarinas, lignanos, macrólidos, nitrilos, terpenos, aceites esenciales, aminoácidos tóxicos y compuestos no identificados de muchas plantas, la mayoría de los teratógenos contienen nitrógeno. (Evans, 1991). La información sobre el potencial teratogénico de plantas que se ha venido acumulando a lo largo de los años, puede ser organizada en tres grandes grupos: 1) Plantas conocidas como teratogénicas con teratógenos conocidos, 2) Plantas conocidas como teratogénicas con teratógenos no identificados y 3) plantas que se sospecha que tienen actividad teratogénica. Se incluye en el primer grupo a los teratógenos de los géneros *Lupinus*, *Veratrum*, *Conium* y *Leucaena*; en el segundo grupo se incluye los géneros *Astragalus*, *Nicotiana* y *Trachymene*; y en el tercer grupo están incluidos los géneros *Datura*, *Prunus*, *Sorghum* y *Senecio* (Keeler, 1984).

Muchos de los metabolitos secundarios contenidos en las hojas del pirul están agrupados en alguno de estos 14 grupos como se mostró anteriormente; Se sabe que el pirul puede inducir contracciones en el útero por lo cual no se recomienda durante el embarazo ya que produciría que el desarrollo del embrión no llegara a término o inclusive que fuera

teratógeno (Ruffa *et al.*, 2004); pero en la literatura no hay información acerca de las propiedades teratogénicas del pirul.

La prueba de teratogénesis en *Drosophila melanogaster* (**Drosophila Teratogénesis Test**, DTT), se ha empleado para caracterizar la toxicidad de compuestos químicos en el desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos en esta prueba, indican que al tratar a los huevos y a los tres estadios larvarios con químicos particulares se producen alteraciones específicas en las moscas adultas. En un estudio realizado por Schuler *et al* (1982, en el cual probó 17 químicos; 15 tienen efectos tóxicos en desarrollo de mamíferos, 1 negativo y en otro débil positivo. Los 17 químicos probados presentan la misma actividad, 15 de 15 fueron tóxicos activos en el desarrollo, también generaron una o más anomalías morfológicas en los adultos que emergieron. En otro estudio se probaron más de 32 agentes químicos, de los cuales 18 cumplieron con los requerimientos de evaluación; 13 fueron positivos y 5 fueron negativos; por otro lado, de 13 agentes químicos con actividad teratogénica en mamíferos, solo 10 fueron correctamente identificados en esta prueba; cuatro de cinco químicos sin efecto aparente sobre el desarrollo fueron correctamente identificados como falsos positivos en una tasa del 20 %. La sensibilidad de este bioensayo fue del 77 %; y una especificidad del 80 %; en general la exactitud fue del 78 % (Lynch, *et al.*, 1991). Esto resultados indican que *Drosophila melanogaster* puede ser empleada para la caracterización de contaminantes ambientales con potencial teratogénico.

Cabe mencionar que en estos estudios no se han probado extractos de plantas con actividad medicinal. Los criterios que utilizaron para evaluar el efecto teratogénico en los estudios antes mencionados sólo se concretan en estructuras como las alas (tipo Notch, donde las alas presentan muescas) y las cerdas humerales (tipo Bent, las cerdas tiene un ángulo de 90 °).

En este estudio los resultados obtenidos indican que el pirul presenta actividad teratogénica, resultando estadísticamente significativo en la concentración de 0.78 %. Aunque se analizaron todas las estructuras de las moscas (patas, ojos, antenas, cerdas etc.) solo se recobraron malformaciones en la placa genital de los machos y placa genital y anal de las hembras. El efecto observado en las otras concentraciones probablemente se deba a que en el lote testigo también se encontró estos tipos de alteraciones con una frecuencia del 0.61. En los demás lotes experimentales se obtienen valores inclusive menores que el lote

testigo, el resultado obtenido nos indica que se tienen que estandarizar los criterios de evaluación para poder llegar a un resultado más concreto.

Por otro lado, los resultados pudieran no ser los esperados (para las otras concentraciones empleadas), por contener metabolitos que se sospecha que presentan actividad teratogénica como la quercetina y caemferol, probablemente los metabolitos secundarios contenidos en el extracto acuoso, solo en cierta concentración alcanzaron adecuadamente los órganos blancos. La formación de la región terminal en las hembras comienza aproximadamente 6 horas después de formación del pupario y que involucra una serie de eventos celulares complejos y que finalmente completan el desarrollo a las 52 horas de la formación del pupario. En el caso de los machos, la morfogénesis de la región terminal comienza en las primeras horas después de haberse formado el pupario y se completa 31 horas después, (Jürgens y Hartenstein, 1993). En ambos casos la morfogénesis de la región final abdominal se completa en las últimas horas de la fase de pupa, cuando la metamorfosis se está terminando. Por el tiempo de formación de estas estructuras es muy probable que él o los compuestos interfieran con el desarrollo. Por otro lado, se podría pensar que en las concentraciones donde la frecuencias de alteraciones es menor que la del testigo, las moscas que pudieran tener alteraciones morirían por el tratamiento resultando tóxico, pero como se puede apreciar en la figura 11, no hay relación, ya que en la mayoría de dichos tratamiento se recobran más organismo que en el lote testigo.

Por consiguiente se requieren hacer más estudios que involucren exposiciones totalmente crónicas con este extracto; además de probar otro tipo de extractos (etanol y cloroformo) que puedan contener otros metabolitos que no fueron recuperados en el extracto acuoso. Además, caracterizar si se están sintetizando proteína antiestrés (por ejemplo la proteínas de choque térmico, HSP y algunas antioxidantes como: catalasa (CA), súper oxido desmutasa (SOD), tioredoxinas (TRX), factor de crecimiento (IGF)) que pudieran estar involucrada en la respuesta obtenida en *D. melanogaster*.

7. CONCLUSIONES

1.- El extracto acuoso del pirul no resultó tóxico (IS), ni alteró la proporción sexual en *Drosophila melanogaster*.

2.- El pirul es teratogénico, en la concentración de 0.78 %.

3.- No se encontró correlación entre los biomarcadores, IS, Psex y la frecuencia de malformaciones en la respuesta obtenida.

4.- Se requieren probar otros extractos con diferentes disolventes (metano, cloroformo hexano, etc.).

5.- *Drosophila melanogaster* puede ser utilizada para evaluar el potencial teratogénico de extractos de plantas (mezclas complejas).

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, A. H. (1986) **Diccionario de herbolaria. Posada.** México. 314 pp.
- Anaya, A. L. y A. Gómez-Pompa, (1971) Inhibición del crecimiento producida por el “pirul” (*Schinus molle*). **Rev. Soc. Méx. Hit. Nat.** XXXII:99-109.
- Ashburner, M. y H.L. Carson (1986) **Genetics and biology of Drosophila. Part E.** Academic Press, USA. 548 pp.
- Bainton, R.J; L.T. Tsai; C.M. Singh; M.S. Moove; WS Neckameyer y U. Heberlein (2000) Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. **Curr. Biol.** 10:187-94.
- Bisht, K., K.H. Wagner y A.C. Bulmer (2009) Curcumin, resveratrol and flavanoids as anti-inflammatory, cyto-and DNA protective dietary compounds. **Toxicol.** Nov 7.
- Brusick, E. W. (1987) **Principles of genetic toxicology.** 2ª ed. Plenum Press Nueva York 204 pp.
- Cabrera, G. L. (1975) **Herbario mexicano.** Gómez Gómez Hnos. Eds., México. 239 pp.
- Casarett, L. J. (1975) Origin and scope of Toxicology. **En: Toxicology, the basic science of poison.** (L. J: Casarett y Doull Eds.). Nueva York. MacMillan Pub. pp 3-17.
- Cerrate, de F. E. (1979) El molle. **Boletín de Lima** 2: 28-32.
- De Serres, F. J. (1979) Problems associated with the application of short-term test for mutagenicity in mass-screening programs. **Environ. Mutagen.** 1:203-208.

- Del Almo, R.S. (1979) **Plantas medicinales del estado de Veracruz**. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos de Veracruz. México. 279 pp.
- Delgado, R. A. (1990) **Daño inducido por mutágenos positivos en células del ala de *Drosophila melanogaster***. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 75 pp.
- Demerec, M. (1965) **Biology of *Drosophila***. Heffner Publishing Co. Nueva York. 633 pp.
- Estrada, E. (1985) **Jardín botánico de plantas medicinales Máximo Martínez**. Universidad Autónoma de Chapingo. 41 pp.
- Evans, Ch. W. (1991) **Farmacognosia**. Interamericana McGraw-Hill. México. 901 pp.
- Ferrero, A. A; J.O.W. González y C.C. Sánchez (2006) Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia** **77**: 381-383.
- Fortini, M. E. y N. M. Bonini (2000) Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a player. **Trends Genet.** **16**:161-167.
- Hendricks, J. C; S.M Finn; K.A. Panckeri; J. Chaukin; J. A Williams; A. Sehgal y A.I Pack (2000) Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. **Neuron** **25**:129-138.
- Hengevel, L. (1989) **Dynamics of biological invasions**. Champman and Hall Eds. Gran Bretaña 160 pp.
- Hernández, M. R y M. J. Gally (1981) **Plantas medicinales**. Árbol. México. 254 pp.
- Jürgens, G. y V. Hartenstein (1993) The terminal Regions of the Body Pattern. **En: The Development of *Drosophila melanogaster*** vol. II. (Bate M. y A. Martinez Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A. pp 687-746.

- Kandel, E. y T. Abel (1995) Neuropeptides, adenylyl ciclase, and memory storage. **Science** **268**:825-826.
- Keeler, R. F. (1984) Teratogens in Plants. **J. Anim. Sci.** **40 (5)**:423-432.
- Klaassen, C. D. (1975) Absorption, distribution and excretion of toxicants **En: Toxicology, the basic science of poisons.** (L. J. Casarett y J. Doull eds.) MacMillan Pub. Nueva York. Co. pp 26-44.
- Krebs, J. K. (1988) **Estudio y distribución de la abundancia.** Ed. Harla. México. 753 pp.
- Krumlauf, R. (1992). Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes. **Bioessays.** **14**:245-252.
- Li. T; C. T. Yang; D. Jin y D. W. Stafford (2000) Identification of a *Drosophila* vitamin K-dependent gamma-glutamine/carboxilase. **J. Biol. Chem.** **275**:18291-18296.
- Lynch, D. W; R. L. Schuler; R.D. Hood y D.G. Davis (1991) Evaluation of *Drosophila* for screening developmental toxicants: test results with eighteen chemicals and presentation of new *Drosophila* Bioassay. **Terat. Car. Mutat.** **11**:147-173.
- Muñoz, M. J. A. (1994) **Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomea orizabensis* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. 65 pp.
- Nöthinger, R. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large number of *Drosophila* larvae. **Dros. Inf. Serv.** **45**: 177.
- Pawson, T. y Berstein A. (1990) Receptor Tyrosine kinase: genetic evidence for their role in *Drosophila* and mouse development. **Trends Genet.** **6**: 350-356.
- Potter C. J; G. S. Turenchalk y T. Xu (2000) *Drosophila* in cancer research. An expanding role. **Trends Genet.** **16**:33-9.

- Powell, J.R (1997) Progress and prospects evolutionary biology: the *Drosophila* model. Oxford University Press. New York. USA. 500 pp.
- Ramos-Morales, P; M. H. M. Abundis; O. J. C. Gaitán; T. M. G. Ordaz; S. P. G. Orozco; L. J. Maldonado; A. J. Hernández; C. E. González; M. P. Reyes; M. E. M. Galicia y M. A. Muñoz (1993) **Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster***. McGraw-Hill. México. 131 pp.
- Roberts, D. B. (1986) ***Drosophila* a practical approach**. IRL. Press. Oxford. England. 295 pp.
- Rodríguez-Arnaiz R. y P. Ramos-Morales (1992) ***Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos**. Serie de Genética: Los pequeños manuales. Prensa de Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 50 pp.
- Rufa, M. J. G; M.L. Ferraro; Wagner; M.L. Calcaño; R.H. Campos y L. Caballero. (2002) Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts hepatocellular carcinoma cell line. **J. Etnopharmacology** 7:335-339.
- Ruffa, M.J.G; M. L. Wagner; M. Suriano; C. Vicente; J. Nadinic; S. Pampuro; H. Salomón; R.H. Campos y L. Cavallaro (2004) Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses. **Ant. Chem. Chemo.** 15:153-159.
- Rzendowski, J. (1988) **Vegetación de México**. Ed. Limusa. México. 432 pp.
- Shaw P. J; C. Cirelli; R.J. Greenspan, y G. Tonini (2000) Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. **Science** 287 (5459):1834-7.
- Shepard, T.H y R.J. Lemire (2004) Catalog of teratogenic agents. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA. 473 pp.
- Sorsa, M. K. y H. Vainio (1982) Biologic monitoring of exposure to chemical mutagens in the occupational environment. **Teratog. Carcinog. Mutag.** 2: 137-150.

- Thompson W. A. R. (1980) **Las plantas medicinales**. Blume. México. 220 pp.
- Torres, M. (1996) **Plantas medicinales de México**. Harla. México 380 pp.

http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/3-anaca4m.pdf