



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE
Equisetum myriochaetum MEDIANTE EL EMPLEO
DE CÉLULAS SOMÁTICAS DEL ALA DE
Drosophila melanogaster.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
HORACIO VALDEMAR BÁRCENAS RODRÍGUEZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSARÍA RODRÍGUEZ ARNAIZ



2004 FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA DE QUÍMICA
LIBRERÍA DE QUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Bárceñas Rodríguez
Horacio Valdemar
FECHA: 21/06/04
FIRMA:

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Determinación del efecto Genotóxico de Equisetum myriochaetum mediante el empleo de células somáticas del ala de Drosophila melanogaster."

realizado por Bárceñas Rodríguez Horacio Valdemar

con número de cuenta 09332354-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Propietario

Dra. María Cristina Revilla Monsalve

Propietario

M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

Suplente

Dr. Adolfo Andrade Cetto

Suplente

Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



A mis Padres

Ma. Esther Rodríguez Solís
Sergio Bárcenas Alanís

Mis hermanos

Selene, Sergio, Octavio y Paola

A mis cuñados

Aidee y Alejandro

A mis sobrinos consentidos

Ilse y Gamy

Por su apoyo incondicional en cada una de mis metas, gracias.....lo logramos una vez más.

Y especialmente

A mi lachita (Edith) por tu paciencia, cariño y amor
en todo momento.

Agradecimientos

A la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por la dirección, apoyo y valiosos consejos durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán y a la M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez por contribuir al enriquecimiento de este manuscrito y su apoyo técnico.

A los miembros del Jurado

Dra. María Cristina Revilla Monsalve
Dr. Adolfo Andrade Cetto

A los compañeros del Laboratorio de Genética: Ma. Luisa, Memo, Nancy, Judith, Víctor, Blanca, Hugo, Armando, Varenka y Ruth.

A mis amigos: Memo, Rive, Amino, Carlos, Fallo, Mónica, Kike, David, Artemio, Axel, Cristian, Nico, Richy, etc.

Índice

Resumen	3
Abstract	3
Introducción	5
Etnofarmacología y fitomedicamento	7
<i>Equisetum myriochaetum</i>	7
Taxonomía	8
Usos	9
Compuestos reportados de <i>Equisetum myriochaetum</i>	9
Diabetes mellitus	11
Toxicología	12
Toxicológica genética	12
Teratogénesis	13
Sistemas biológicos de prueba	14
<i>Drosophila melanogaster</i>	15
Biología del desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	17
Prueba de mutación y recombinación (SMART)	20
Ventajas de SMART	22
Planteamiento del problema	23
Hipótesis	24
Objetivos	25
Materiales y métodos	26
Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Sistema de cruas	26
Compuesto químico	28
Prueba de toxicidad	28
Medio de cultivo	28
Ensayo SMART	28
Análisis estadístico	30
Prueba de teratogénesis	31
Resultados	32
Discusión	34

Conclusiones	38
Bibliografía	39
Tablas y gráficas	53

Resumen

Equisetum myriochaetum es una planta Mexicana usada en la medicina tradicional para tratar varias enfermedades relacionadas con el riñón y la diabetes mellitus tipo 2. La planta medicinal se conoce popularmente como “cola de caballo”, sus principales compuestos son flavonoides. El presente estudio trata de la evaluación genotóxica del extracto fitoterapéutico de *Equisetum myriochaetum* en el ensayo de Mutación somática y Recombinación mitótica (SMART) en las alas en *Drosophila melanogaster*. El extracto fue administrado de forma aguda (6 horas) a larvas de 3 días de edad (72 ± 3 hrs) con 8 concentraciones diferentes determinadas mediante un ensayo de LD₅₀. Dos cruza diferentes que involucran los marcadores *flr* (flare) y *mwh* (multiple wing hairs) fueron usadas: la estándar (ST) con bioactivación normal y la crusa de alta bioactivación (HB) en la cual las moscas tienen una alta capacidad de biotransformación dependiente de los citocromos P450 los cuales se sobreexpresan de forma constitutiva. En ambas cruza sólo se analizó la progenie transheterocigota. Los resultados mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manchas entre el control (agua) y las series tratadas (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 500 ppm) del extracto de *E. myriochaetum*. Para evaluar los posibles efectos teratogénicos inducidos por el extracto de *E. myriochaetum* se utilizaron moscas de la cepa silvestre a las cuales se les administró el extracto fitoterapéutico en 8 concentraciones diferentes desde el primer estadio larvario hasta adultos. Los resultados sugieren que el extracto fitoterapéutico de *E. myriochaetum* no es genotóxico ni teratogénico en las células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Abstract

Equisetum myriochaetum is a Mexican plant used in traditional medicine for the treatment of several diseases such as kidney disease and diabetes mellitus type 2. This medicinal plant is popularly known in México as “horsetail”, their principal compounds are flavonoids. The present study deals with the evaluation of the genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *E. myriochaetum* in the wing somatic mutation and recombination test (SMART) of *Drosophila melanogaster*. The extract was administered by acute feeding (6 hours) to 3 old day larvae with 8 different concentrations. Two different crosses involving the markers flare (*flr*) and multiple

wing hairs (*mwh*) were used: the standar (ST) cross with normal bioactivation and the high bioactivation (HB) cross, which has a high constitutive cytochrome P450-dependent bioactivacion capacity. In both crosses, were analyzed only the transheterozygous progeny. The results showed that there is no statistically significant difference in spot frecuencies between control and treated series. Results that suggest that the phytotherapeutic extract from *E. myriochaetum* is not genotoxic in somatic cells of *D. melanogaster*.

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas como medicina se remonta al hombre primitivo, se han encontrado evidencias de que la asociación hombre-planta data de 60 000 años, pues en la cueva de un hombre de Neandertal fueron encontrados, junto con su cuerpo, restos de numerosas plantas, el análisis del polen reveló que todas ellas tenían un valor medicinal (Jin-Ming *et al.* 2003).

El documento de medicina más antiguo que se conoce es la tablilla de arcilla de los Sumerios que tiene una antigüedad de 4,000 años, en ella se describe la utilización de plantas para varias enfermedades. En el tiempo de la antigua civilización de Egipto, se manejaba mucha información sobre las plantas medicinales. De entre los remedios prescritos para aliviar el dolor había tratamientos para el corazón y para la circulación. Esta información, junto con cientos de otros remedios, están preservados en los papiros Ebers desde hace 3,500 de años. La antigua China es también una fuente de información acerca de los usos de las plantas en la medicina. El Pun tsao, es una farmacopea que fue publicada alrededor del año 1,600 (a.C.) y que contiene miles de tratamientos para enfermedades a base de plantas y son atribuidas al trabajo de Shen-nung, emperador de China quien vivió hace 4,500 años. En la India, la medicina tradicional se conoce desde hace varios miles de años y se encuentra en la colección Hindú conocida como los versos sagrados de Rig-Veda (Jin-Ming, *et al.* 2003).

Actualmente se considera que del 75% al 90% de la población rural en el mundo aún utiliza la medicina tradicional como único remedio para la salud. Esta larga tradición continúa siendo utilizada en países de Asia como China, India y varios países del continente africano y sudamericano. En el análisis de las medicinas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos realizado por Cragg y colaboradores se encontró que 157 de los 520 medicamentos (30%) aprobados en un periodo de 10 años (1983-1992) eran productos naturales o sus derivados (Cragg *et al.* 1997; Jin-Ming *et al.* 2003).

En el este de Europa el mercado de la fitoquímica generó \$2.2 mil millones de dólares (70 % solamente en Alemania) en 1989 y sigue aumentando. El comercio de plantas utilizadas dentro de Europa para medicina no convencional se incrementó de 15% a 20% por año con un importante valor de 3.6 mil millones de dólares en 1995 (Anon, 1996; Jin-Ming *et al.*, 2003). Hoy, entre los 25 medicamentos más vendidos en el mundo, el 30% corresponden a productos naturales (Jin-Ming *et al.*, 2003).

México posee una flora medicinal muy extensa y las características socioeconómicas del país han contribuido a la continuidad en el uso de plantas medicinales. Se estima que aproximadamente el 60 % de los mexicanos utilizan plantas medicinales para tratar diversos padecimientos (Meckes, 1993).

Nuestro país tiene una gran tradición en el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades. Los primeros registros del uso de las plantas medicinales se produjeron después de la conquista y quedaron plasmados en códices, entre los cuales destacan el de *De Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* de Martín de la Cruz y el de *Historia Plantarum Novæ Hispanæ* que aparece en castellano, bajo el título de *Historia Natural de la Nueva España* de Francisco Hernández (1959). En este último es donde se describe la planta conocida como Acatzanaícxitl (Figura 1) que con tlahahoéhoetl y tezcalpachtli xalatlahcense cura las diarreas. En 1886 Francisco del Paso y Troncoso reporta que el “acatzanaícxitl” o “pie de tordo”, que ha sido considerado como un *Equisetum*, es una planta que tiene tallos verticiliados, constituidos por entre-nudos articulados, que los indios compararían, muy propiamente con las falanges articuladas de la pata de aquella ave (Valdés y Flores, 1985).

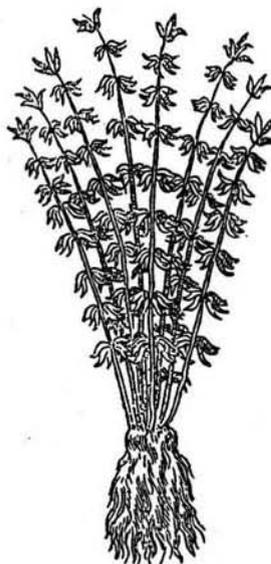


Figura 1.- ACATZANAÍCXITL (Hernández, 1959).

Etnofarmacología y Fitomedicamento

La Etnofarmacología es la observación, identificación, descripción e investigación experimental de los ingredientes que hay en las plantas y efectos de medicina tradicional; estas investigaciones se basan en disciplinas como la botánica, la farmacología, la toxicología y la química, entre otras (Holmstedt, 1991; Heinrich y Gibbons, 2001).

El concepto de fitomedicamento que se encuentra en la Farmacopea Europea del año 2000, se refiere a la planta completa ó parte de la planta, de un alga, hongo ó liquen en un estado sin procesar y que usualmente se emplea en forma seca aunque a veces fresca. Un fitomedicamento se produce por la utilización de la planta entera para que todos sus compuestos trabajen de forma sinérgica y puedan ejercer una actividad biológica (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

***Equisetum myriochaetum* Schldl. Cham. & Linnaea 1830.**

Nombre común. Tujt (tzeltal), tut mol (tzotzil), yok'es (tzeltal), carricillo, cola de caballo, limpiaplata, limpiaplatos.

Planta terrestre (Figura 2); tallos aéreos de 2-5 (hasta 8) m de alto, con verticilos regulares de ramas, 2-23 mm de diámetro, acanalado con 16 a 48 canales; vainas del tallo con un radio de largo y ancho de 11.5, margen oscuro en el lado superior, el resto del mismo color que el tallo, ocasionalmente en los especímenes grandes la base de la vaina es oscura, estomas en una línea, en cada lado del surco; ramas con 6 a 8 canales, con tubérculos que recuerdan a los dientes de una sierra, apuntando hacia el ápice; estróbilo terminal en las ramas y en el tallo principal, romo o puntiagudo; estróbilos del tallo de hasta 12 mm de diámetro; estróbilos de las ramas de 10 mm de largo y 4 mm de diámetro (Palacios-Rios, 1998). El género *Equisetum* se distribuye en América, Europa, Asia, África, Filipinas, Nueva Guinea, Nueva Caledonia e Islas Fidji; cuenta con cerca de 15 especies, 13 de las cuales se encuentran en América, 5 de éstas en los trópicos. En particular, la especie *myriochaetum*, se distribuye ampliamente en nuestro país en los estados de: Nayarit, Michoacán, Guerrero, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, Estado de México, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Palacios-Rios, 1992).

Se encuentra en cañadas, orillas de arroyos, en terrenos arenosos y húmedos y sobre laderas calizas con vegetación de bosque mesófilo de montaña, matorral submontaño, bosque de *Pinus*, bosque de *Pinus-Quercus*, bosque tropical caducifolio, bosque tropical superennifolio y bosque de galería, a una altitud de 300 a 2,100 m (Palacios-Rios, 1998).

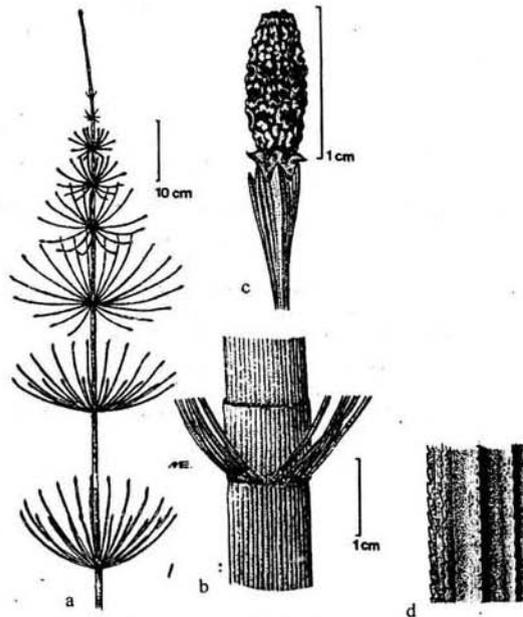


Figura 2.- *E. myriochaetum*; a, hábito; b, detalle de la vaina; c, detalle del estróbil; d, detalle de los últimos ejes (Palacios-Rios, 1992).

Taxonomía (Trease y Evans, 1991).

Phyla: Pteridophyta

Clase: Articulatae

Orden: Equisetales

Familia: Equisetaceae

Género: *Equisetum*

Especie: *myriochaetum*

Usos:

El *Equisetum myriochaetum* se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades del riñón, se recomienda para problemas de hígado y en combinación con otras plantas se emplea contra la tuberculosis, contra el dolor de estómago; el agua que resulta de la infusión de la planta se usa para baños, como diurético, antiséptico urinario, dolores corporales, también es utilizado para la diabetes (Pérez *et al.*, 1985; Palacios-Rios, 1992; 2002; Argueta, 1994; www.semarnat.gob.mx). En 1999 Andrade-Cetto y colaboradores determinaron el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso y butanólico de partes aéreas del *E. myriochaetum* utilizando ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Obteniendo con una sola administración oral una significativa reducción de glucosa en sangre, similar a la conseguida con la glibenclamida (3mg/Kg.). Otro reporte acerca del efecto hipoglucemiante de la planta fue realizado en el Centro médico siglo XXI, en éste, solo se probó el efecto del extracto acuoso de partes aéreas del *E. myriochaetum* (0.33g/kg) en 11 pacientes a los cuales recientemente se les había diagnosticado diabetes mellitus tipo 2. Solo una dosis del extracto fue administrada y la cantidad de glucosa e insulina fue determinada a diferentes tiempos 0, 30, 60, 90,120 y 180 minutos después de la administración. Los resultados demostraron que el extracto *E. myriochaetum* tiene efecto hipoglucemiante en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 después de 90 min. de haber sido administrado (Revilla *et al.*, 2002).

Compuestos reportados de *Equisetum myriochaetum*

Los compuestos presentes en el extracto activo farmacológicamente de las partes aéreas de *Equisetum myriochaetum* son glucoflavonoides: campferol-3-O-sofosido, campferol-3,7-di-O- β -glucosido, campferol- 3-O-soforosido-4'-O- β -glucosido y el precursor caffeoyl-metil-ato-4'-O- β -glucopiranosido (Wiedenfeld *et al.*, 2000).

Otros compuestos reportados para esta especie son: β -D-glucosa; 2 flavonoides: la pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavonona) y la crisina (5,7-dihidroxi-flavona); dos esteroides: β -sitosterol y el β -D-glucositolsterol; un carbohidrato: la β -D-glucopiranososa, y

ocho ácidos grasos identificados como láurico, mirístico, pentadecanoico, palmítico, margárico, esteárico, behénico y lignocérico (Chavez, 1991; Camacho *et al.*, 1992).

Los flavonoides son pigmentos casi universales en los vegetales. Casi siempre hidrosolubles, son responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas. Los flavonoides son amarillos, azules, violetas, antocianósidos rojos y si no son directamente visibles ayudan a la coloración como copigmentos. Existen más de 4,000 todos tienen un mismo elemento estructural básico, se agrupan con relación al grado de oxidación del grupo piránico central en flavanos, flavonoles, flavonas y antocianidinas (Figura 3) (Devore, 1978). Las funciones biológicas de los flavonoides son en general: protectores de las células contra el daño oxidativo (antioxidantes), protectores contra UV-B, eliminadores de radicales libres, fitoalecinas (hormonas vegetales), fungicidas, insecticidas, antivirales, antihemorrágicos (factor vitamina P), espasmolíticos, antihepatóxicos, diuréticos, antialérgicos, bactericidas; tienen una gran capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre; tienen actividad sedativa, y como antimaláricos; como moduladores de enzimas de biotransformación, agentes antitumorales; para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Estudios epidemiológicos han demostrado que los flavonoides tienen propiedades anticarcinogénicas y antioxidantes (Havsteen, 1983; Shamberger, 1984; Hodnick *et al.*, 1986; Middleton y Teramura 1993; Hertog *et al* 1995; Formica y Regelson, 1995; Eaton, 1996; Rhodes y Price, 1996; Duarte-Silva *et al.*, 1997^a y 1997^b; Noroozi *et al.*, 1998; Zhai, 1998; Graefe y Veit 1999; Lean *et al.*, 1999; Wagner 1999; Bülent *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2000; Wang y Sporns, 2000; Masuda *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2001; Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

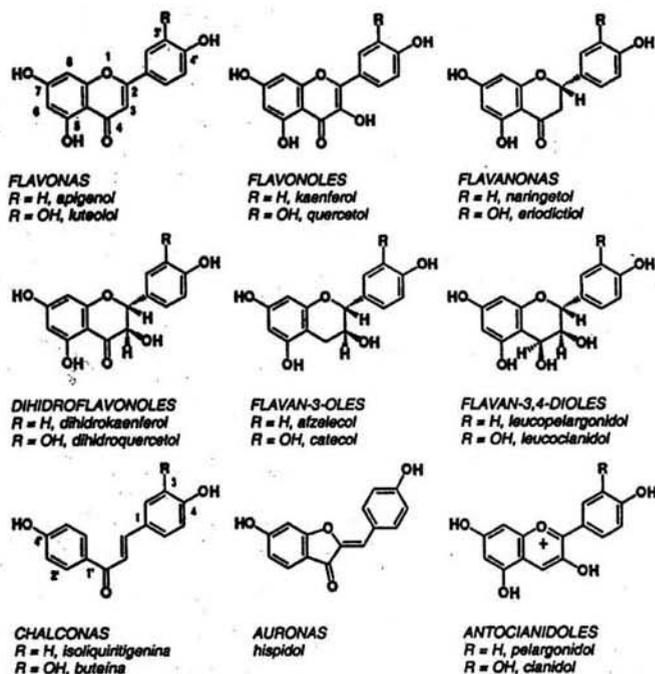


Figura 3.- Flavonoides. Estructuras básicas y tipos (Devore, 1978).

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un grupo heterogéneo de alteraciones caracterizadas por la hiperglucemia crónica asociada a una acción inadecuada de la insulina que es acompañada por una variedad de alteraciones bioquímicas y manifestaciones clínicas. Esta enfermedad está determinada genéticamente y el sujeto que la padece tiene alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, junto con una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a ésta. Cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de los pacientes con larga evolución de la enfermedad por complicaciones microangiopáticas, en especial renales y oculares, así como microangiopáticas con afección a las arterias coronarias, enfermedades vasculares periféricas y neuropatía (Islas y Revilla, 1999).

A partir del 2001 la diabetes mellitus tipo 2 se convirtió en la primera causa de mortalidad en México (www.ssa.gob.mx).

Toxicología

Los seres vivos estamos expuestos a la acción de numerosos agentes potencialmente tóxicos, sean éstos físicos, químicos o biológicos, que provocan efectos fisiológicos, bioquímicos, patológicos y, en algunos casos, genéticos. La toxicología es la ciencia que estudia la interacción entre los compuestos químicos ambientales y los sistemas biológicos. La mayoría de las sustancias químicas presentes en el ambiente son de origen artificial, es decir, son sintetizadas por el hombre. Sin embargo, existen cientos de venenos naturales generados por microorganismos, hongos, plantas y animales, que son muy tóxicos para otros seres vivos. La toxicología es una ciencia aplicada que se basa en metodologías de una gran variedad de ciencias como la fisiología, la farmacología, el estudio del metabolismo, etiología, genética, embriología, química y estadística (Brusick, 1987; Rodríguez-Arnaiz, 2003⁴).

Toxicológica genética

Es la disciplina científica que identifica y analiza la acción de un grupo de agentes tóxicos que son capaces de interactuar con el material genético de los organismos. Estos compuestos se denominan genotóxicos. El objetivo primordial es, el de detectar y entender las propiedades de los agentes físicos y químicos que son genotóxicos y que producen efectos hereditarios desde deletéreos hasta letales. Es, por lo tanto, una ciencia esencialmente multidisciplinaria que pretende establecer la correlación que existe entre la exposición a agentes xenobióticos y la inducción de alteraciones genéticas tanto en las células germinales como en las células somáticas de los organismos, y definir, a partir de ello, los efectos que las toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos. Durante la evolución de esta disciplina científica, más de 200 sistemas *in vivo* e *in vitro* han sido desarrollados, de los cuales solo algunos han sido totalmente validados. La exposición a los agentes tóxicos puede presentarse en forma aguda, es decir, en un solo episodio generalmente

accidental, en el cual ingresan al organismo cantidades elevadas de alguna toxina. También puede darse en forma crónica, si existe exposición continua a dosis bajas, que suele ir acompañada de su acumulación en el organismo, produciéndose la respuesta tóxica después de mucho tiempo. La ruta o forma de entrada al organismo es también variada: puede ser por inhalación, por vía digestiva o por contacto a través de la piel. Las poblaciones de organismos pueden estar expuestas a las toxinas de manera 1) involuntaria, como ocurre en el ambiente abierto, 2) voluntaria, cuando el individuo emplea drogas o agentes terapéuticos, y 3) ocupacional, en el ambiente de trabajo. (Brusick, 1987; Casciano, 1991; Rodríguez-Arnaiz, 2003^a).

Cuando un agente xenobiótico ingresa al organismo, puede ser reactivo por sí mismo y es por tanto de acción directa, o bien, puede ser activado por las enzimas metabólicas, en cuyo caso es de acción indirecta y se llama promutágeno. Cuando se da la interacción del compuesto o su metabolito con el DNA, la lesión podrá ser reparada de forma eficiente o ineficientemente, de manera tal que el daño genético inicial podrá o no fijarse, expresándose en las diferentes estirpes celulares, tal como se muestra en la Figura 4 (Rodríguez-Arnaiz, 2003^a).

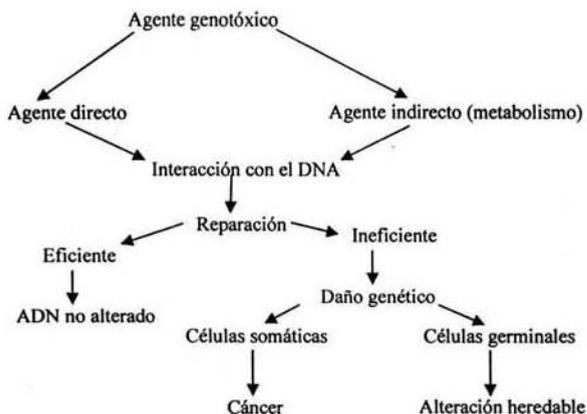


Figura 4. Los agentes genotóxicos y el daño genético inducido (Rodríguez-Arnaiz, 2003^a).

Teratogénesis

Los agentes genotóxicos que provocan alteraciones durante el desarrollo embrionario se conocen como teratógenos y estos se conocen desde el efecto

ocasionado por la talidomida, que en 1962 provocó el nacimiento de 10 000 niños malformados en Alemania, Japón y otros países. La droga sedativa ejerce sus efectos nocivos entre los días 35 y 50 del embarazo, pero no produce ningún efecto en el embrión en desarrollo antes o después de este periodo. Actualmente se conocen muchos factores que alteran el desarrollo y producen niños malformados. Entre ellos destaca el factor genético, debido a: la herencia de genes o combinaciones cromosómicas, la exposición a radiaciones, las enfermedades virales (como la rubéola) y a diversos agentes químicos que han mostrado ser teratógenos en animales de laboratorio en ciertas etapas del desarrollo, específicamente durante la formación de los órganos del cuerpo, u organogénesis (Figura 5). Sin embargo, el número de teratógenos químicos conocidos para los seres humanos es muy reducido y la mayoría pertenece al grupo utilizado en la quimioterapia del cáncer (Rodríguez-Arnaiz, 2003^a).



Figura 5. Orígenes de las malformaciones embrionarias (Rodríguez-Arnaiz, 2003^a).

Sistemas Biológicos de Prueba

Para que un agente químico sea lanzado al mercado debe conocerse antes su toxicidad, su destino ambiental y el uso al que va destinado. Sin embargo, si un agente químico ya está en el comercio deben definirse y cuantificarse los datos en cuanto al riesgo genético que conlleva su uso. Existen dos formas o aproximaciones para probar a los agentes químicos: *a*) Aproximación en hilera, que es muy utilizada para probar gran número de sustancias, *b*) El empleo de una batería de pruebas. Para el primer caso se emplea una sola prueba que debe ser rápida, confiable y barata. Los agentes son eliminados con base en la respuesta, así que pocas sustancias, las positivas, se dejan

para ser evaluadas con pruebas más costosas y definitivas. Con la segunda aproximación se eliminan los agentes no genotóxicos, ya que muestran ser inactivos en todas las pruebas empleadas. La batería de pruebas seleccionada debe ser capaz de identificar a los agentes que tienen una afinidad específica por el DNA; debe tener una capacidad metabólica apropiada y ser reproducible entre laboratorios. Los sistemas de prueba se idearon con el propósito de evaluar, en organismos de bioensayo, los efectos producidos por agentes químicos ambientales, a los que el hombre está expuesto. Las características que debe tener todo sistema de prueba son básicamente la sensibilidad y la reproducibilidad. La sensibilidad de un sistema de prueba se define como la capacidad del sistema para detectar con facilidad y precisión estadística un pequeño efecto mutagénico inducido. La reproducibilidad implica la similitud de respuesta de un sistema en y entre laboratorios. Otras características que destacan para que un sistema de prueba sea empleado a nivel internacional son: bajo costo, corta duración, que detecte un amplio rango de eventos genéticos y que favorezca el uso de tamaños de muestra satisfactorios, entre otras. Esto se logra solamente con el establecimiento de protocolos similares entre los diferentes sistemas, lo cual permitiría llegar a interpretaciones estandarizadas y entrenando al personal para que adquiera niveles técnicos competentes. Esta reproducibilidad es también deseable en la forma de respuestas confiables de los datos positivos y negativos. Sin embargo, las diferencias en cuanto a organización y metabolismo entre procariontes y eucariontes hacen muy difícil la uniformidad en la respuesta. Aunque en la actualidad existen más de 150 sistemas de prueba, solamente se utilizan unos pocos para evaluar los probables efectos genotóxicos inducidos por agentes químicos ambientales. Entre los empleados más comúnmente están los que detectan mutaciones en células germinales y los que detectan mutaciones, rompimientos cromosómicos (clastogenia) y recombinación mitótica en células somáticas. Estas últimas permiten predecir la capacidad carcinogénica de los compuestos sujetos a prueba (De Serres, 1975; Kilbey *et al.*, 1981; Valencia *et al.*, 1984; Rodríguez-Arnaiz, 2003^b).

Drosophila melanogaster

El estudio de los efectos genéticos inducidos por fármacos debe realizarse en organismos modelo de laboratorio, antes de su aplicación en la práctica clínica humana. El descubrimiento de la acción mutagénica del gas mostaza, en células somáticas

(Auerbach, 1945) marca el inicio de las investigaciones para detectar el potencial mutágeno de una gran variedad de compuestos químicos. La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es uno de los organismos modelo que se ha utilizado en la toxicología genética para detectar el riesgo genético que representa la exposición a diversos agentes químicos, en ocasiones extraordinariamente reactivos, con las diversas macromoléculas celulares, en particular con el DNA (Rodríguez-Arnaiz, 2003^b).

El ciclo de vida de *Drosophila* presenta un período de embriogénesis que ocurre en la etapa de huevo y una sucesión de larvas que culminan con una metamorfosis completa (holometábola) de la cual surge un “imago” ó adulto. La duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida a una temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, es: huevo, 0-24 horas; larva de primer estadio, 24-48 horas; larva de segundo estadio, 48-72 horas; larva de tercer estadio, 72-120 horas; pupa, 120-240 horas y adulto 30 días (Figura 6) (Demerec y Kaufmann, 1962).

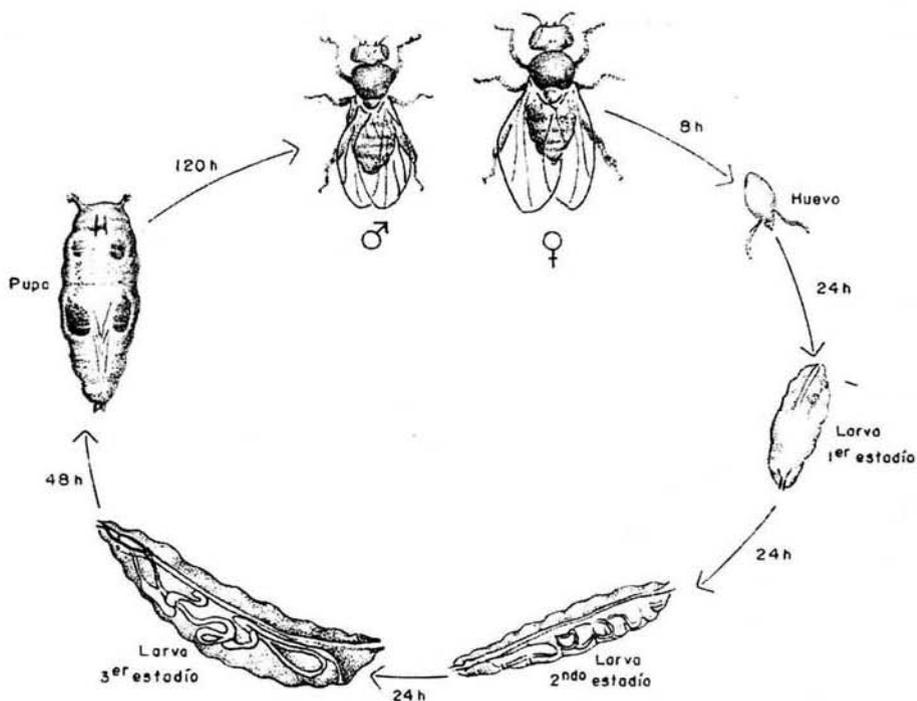


Figura 6.- Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (esquema realizado por Aldi de Oyarzabal, 2003).

Biología del desarrollo de *Drosophila melanogaster*

Los espermatozoides quedan almacenados, después de la cópula, en la espermateca de la hembra. La penetración del espermatozoide tiene lugar a través de una abertura llamada micrópilo que se encuentra en el extremo anterior (polo animal) del óvulo. Posteriormente el núcleo del espermatozoide y el del óvulo se unen para integrar el núcleo del cigoto, lo que representa el estado inicial del desarrollo del embrión. La hembra deposita los huevos poco tiempo después de que el espermatozoide penetró en ellos, o bien los retiene en el útero durante los estadios más tempranos del desarrollo embrionario. El huevo es de color blanco lechoso, tiene una longitud promedio de 430 micras, la superficie dorsal es aplanada y la ventral algo convexa, tiene un par de filamentos delicados que son extensiones del corion situados en la región anterodorsal, los cuales impiden que se hunda el huevo en la superficie blanda del medio de cultivo (Demerec y Kaufmann, 1962; Demerec, 1965).

Transcurridas las primeras 24 horas del huevo eclosiona la larva de *Drosophila melanogaster* que presenta dos linajes celulares diferentes; las células larvarias que forman el tejido de la larva y las células imaginales, que formarán las estructuras y tejidos del adulto. Una vez establecidas las células precursoras de los discos imaginales, éstas siguen un desarrollo asincrónico al de las células larvarias (Demerec, 1965). Las células larvarias llevan a cabo las funciones vitales de esta edad, en el caso de las glándulas salivales se ha perdido la capacidad de división y solamente aumentan de tamaño, éstas presentan cromosomas politénicos que se forman mediante el fenómeno de endomitosis, y están determinadas y diferenciadas genéticamente (Demerec, 1965; Wilkins, 1986; Pomerai, 1990). A diferencia de las células larvarias, las células precursoras de los discos imaginales no participan en la formación del cuerpo de la larva y se originan del ectodermo (Demerec, 1965). Las células imaginales se distinguen de las células larvarias por su tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retención de la capacidad de división celular y porque están determinadas genéticamente alcanzando su diferenciación hasta que entran a la etapa de pupa que corresponde a la metamorfosis (Pearson, 1974). Estas células se localizan en estructuras

características denominadas discos imaginales 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 (Madhavan y Schneiderman, 1977; Cohen, 1993).

En el último estadio larvario, la cutícula se va endureciendo de manera paulatina y se torna oscura, posteriormente se forma el pupario. 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 los discos imaginales (Figura 7). Los órganos que son completamente histolizados durante la metamorfosis son: glándulas salivales, intestino, cuerpos grasos y músculos larvarios. La mayor parte de los órganos, así como algunas estructuras integumentales de la cabeza, tórax, genitales externos del adulto se forman a partir de los discos imaginales ya presentes en las larvas o por células larvarias que se diferencian al ocurrir la reorganización del estado pupal, por ejemplo: el disco del ala forma el ala y además la región dorsal y parte lateral del tórax. Cada disco tiene una forma y tamaño característico, así como una localización precisa dentro del cuerpo de la larva. El estado pupal toma de 3 a 5 días y termina cuando emerge el "imago" o adulto (Demerec, 1965; Fristrom y Fristrom, 1993).

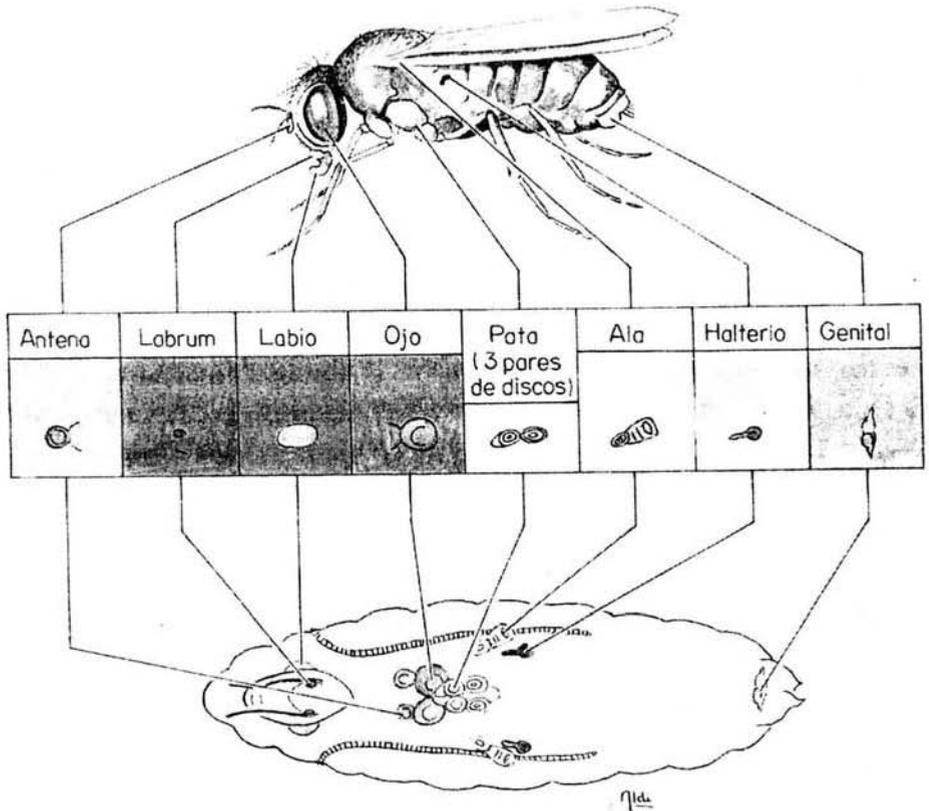


Figura 7.- Discos imaginales de *Drosophila melanogaster* (esquema realizado por Aldi de Oyarzabal, 2003).

Cuando la metamorfosis acaba, emerge el adulto rompiendo el extremo anterior de la envoltura puparia, el cuerpo de la mosca es alargado, sin pigmentación, tiene las alas totalmente plegadas y al poco tiempo éstas se extienden. A medida que pasan las horas el adulto adquiere su color característico. A las 8 ó 9 horas el "imago" alcanza la madurez sexual (Demerec, 1965; Wilkins, 1986).

Las ventajas que presenta la mosca de la fruta por las cuales se considera un organismo modelo son: ser un organismo de tamaño pequeño, con dimorfismo sexual,

con un ciclo de vida corto, de aproximadamente 10 días a 25 °C con una humedad relativa del 60 %, pueden realizarse estudios tanto en células germinales como en células somáticas, sensibilidad para detectar agentes químicos, existen un gran número de cepas diferentes (>12 000) con marcadores específicos que permiten la evaluación de gran variedad de efectos genéticos, sus 4 cromosomas están completamente mapeados por metodologías diversas tales como la genética, la citológica y recientemente la molecular. Su secuencia genómica ha revelado que la mitad de las proteínas secuenciadas tiene similitud con las proteínas de mamíferos, además la mosca presenta una ortología de 61% de genes para enfermedades humanas y un 68% de genes que controlan cánceres, así como gran similitud en rutas metabólicas, sistema propio de activación metabólica para biotransformar ciertos procarcinógenos. Aspectos cruciales como las interacciones con el ambiente o los contactos célula-célula, no pueden entenderse cuando se trabaja con células o tejidos que derivan de organismos multicelulares cultivados *in vitro* (Baars, 1980; Würzler y Vogel, 1986; Vogel, 1987; Zijlstra y Vogel, 1988; Lindsley y Zimm, 1992; Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992; Vogel, 1992; Guzmán-Rincón y Graf, 1995; St John y Xu, 1997; Vogel, *et al.*, 1999; Adams, *et al.*, 2000; Rubin, *et al.*, 2000; Yesilada, 2001; Rodríguez-Arnaiz, 2003^b). Graf y colaboradores (1994) mostraron que el ensayo *in vivo* de mutación somática y recombinación mitótica de *Drosophila* puede detectar la genotoxicidad de mezclas complejas y de bebidas como brandy y vino tinto español. En particular, es posible administrar el material sujeto a prueba de manera similar como se consume normalmente por lo seres humanos.

Prueba de mutación y recombinación somática (SMART)

Este ensayo se basa en la generación de moscas con un genotipo tal, que un evento mutacional en la célula somática genera un cambio genético que se manifiesta fenotípicamente en todas las células hijas, a través de un clon. Se emplean marcadores genéticos que afectan el genotipo de los discos imaginales, de modo que el daño se induce en las células de las larvas, y se manifiesta en el cuerpo diferenciado del adulto. Los clones generan manchas en la superficie del adulto por lo que permiten una detección sencilla del cambio genético producido. Las alteraciones genéticas pueden ser debidas a recombinación mitótica, mutación somática, rompimientos cromosómicos y

no disyunción (Graf *et al.*, 1984) (Figura 8). Por otra parte la pérdida de heterocigosis en células somáticas, debida a la recombinación mitótica inducida (recombinogénesis), se ha asociado, al menos en parte, con los fenómenos de iniciación de algunos tipos de cáncer (Rodríguez-Arnaiz, 2003^b).

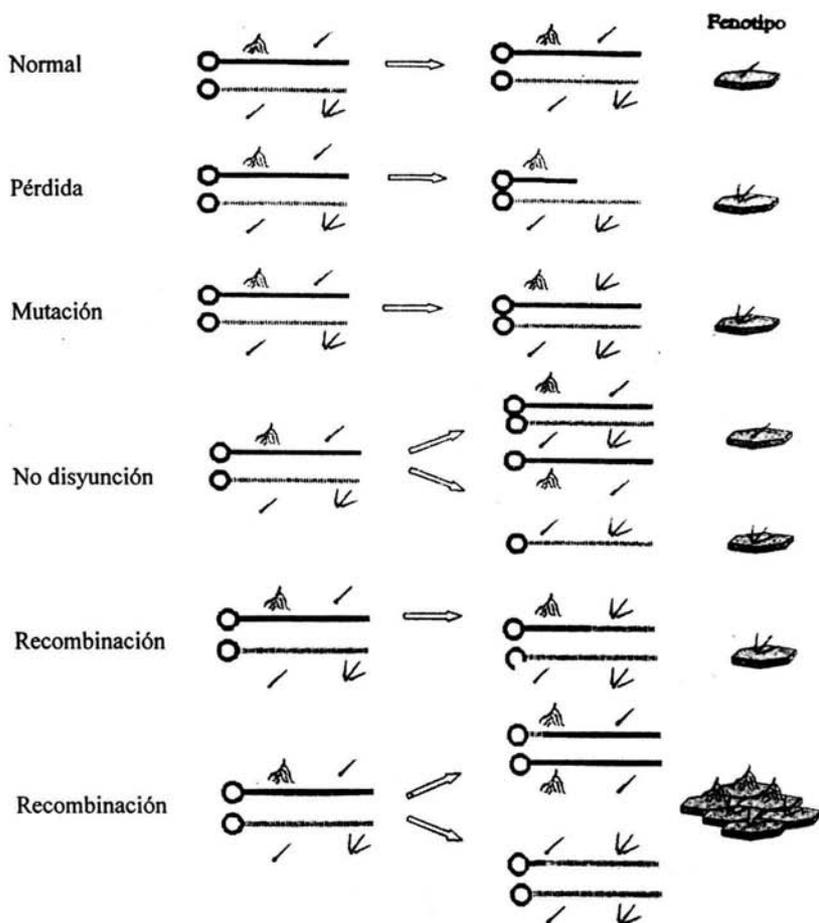


Figura 8.- Eventos que detecta la prueba de mutación y recombinación somática (Adaptado de Graf *et al.*, 1984).

Los ensayos de mutación somática y recombinación mitótica más utilizados son los que emplean marcadores genéticos en las alas y en los ojos. En el ensayo SMART alas, se trata a larvas transheterocigotas para los marcadores *mwh* y *flr* (Figura 9), los cuales originan diferentes tipos de mancha que son: manchas simples chicas y manchas

simples grandes así como manchas gemelas. En las manchas simples, sólo uno de los dos marcadores antes mencionados se expresan, mientras que los eventos de recombinación entre el marcador proximal (*flr*) y el centrómero, dan origen a manchas gemelas, las cuales expresarán los dos marcadores de manera independiente. Por su origen las manchas gemelas son indicadoras de recombinación mitótica (Graf *et al.* 1984).

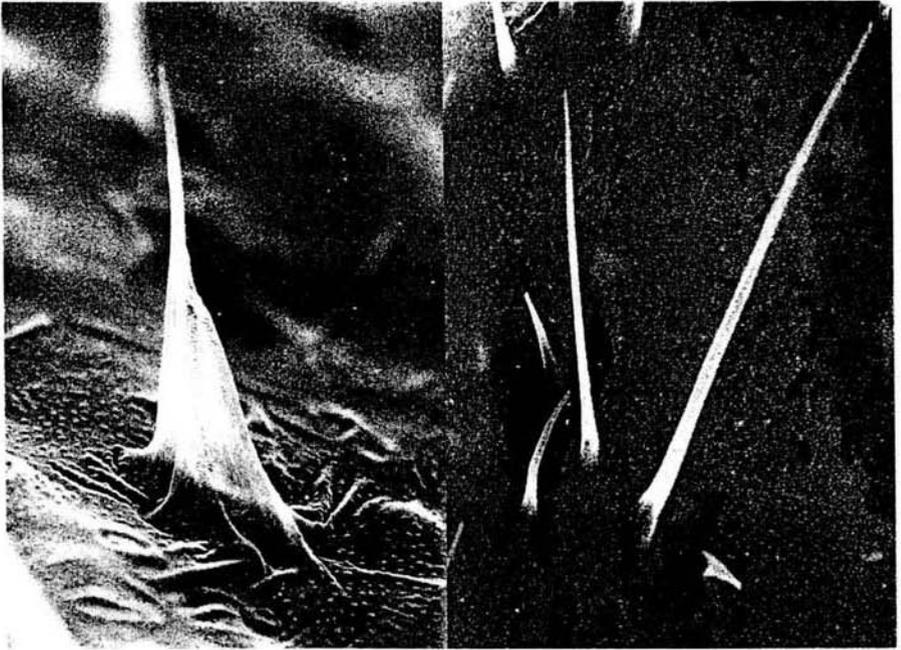


Figura 9.- Microscopia de Barrido de los marcadores *mwh* y *flr* (Fotos donadas por el Dr. Graf a la Dra. Rodríguez-Arnaiz).

Ventajas de SMART

Una de las ventajas de este sistema es que el tiempo del ensayo es de una generación (10 días), permite analizar un gran número de células blanco ($\approx 1,000,000$) con un tamaño de muestra de 40 alas (García-Bellido y Dapena 1974; Graf *et al.*, 1984; Vogel *et al.*, 1985; Würgler *et al.*, 1985)

Planteamiento del Problema

El uso de las plantas medicinales está sumamente difundido en nuestro país, sin embargo, en la mayoría de los casos, la administración de éstas no tiene una base científica y solo se utiliza de manera empírica (cultura oral).

Es importante realizar estudios científicos a través de los cuales se compruebe su efecto y se descarten los aspectos tóxicos, genotóxicos y teratógenicos.

Hipótesis:

Ho:

El extracto de *Equisetum myriochaetum* no produce un efecto genotóxico, por lo que la frecuencia de manchas en las series tratadas y en el testigo concurrente será similar.

Ha:

El extracto de *Equisetum myriochaetum* producirá un efecto genotóxico, lo que será reflejado en una frecuencia mayor de manchas en las series tratadas que en el testigo concurrente.

Objetivo General:

Determinar el efecto genotóxico inducido de *Equisetum myriochaetum* mediante el empleo de células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos Particulares:

Establecer la curva dosis-respuesta.

Determinar si el extracto actúa de forma directa o si requiere de activación metabólica (indirecta).

Comparar la respuesta en la actividad mutagénica y recombinogénica con respecto al metabolismo en las dos cruces: la estándar y la mejorada.

Determinar si el extracto es capaz de inducir malformaciones genéticas que se expresen en los adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Drosophila*

Las siguientes cepas de *Drosophila melanogaster* fueron utilizadas. (1) *mwh e* (múltiple wing hairs): línea que porta dos marcadores recesivos en el cromosoma 3. El primero, *mwh* se encuentra localizado a 3-0.3 cM (entre *fap* y *ru*). Este marcador afecta los tricomas, causando tricomas supernumerarios, (más de 2 tricomas por célula) en lugar de 1 por célula como se presenta en el fenotipo silvestre. El marcador *ebony* (*e*) localizado a 3-70.7 cM, expresa un fenotipo en el que el color del cuerpo es oscuro (Lindsley y Zimm, 1992). (2) *flr*³/TM3 (*flare*³), esta línea porta el marcador *flr* que también afecta los tricomas de las alas ya que éstos se observan como una flama; está localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 38.8 cM (con respecto a *h* y *th*), en condición homocigótica es letal. Debido a lo anterior la línea porta el cromosoma balanceador TM3, *ri*^p e *bx*^{34e} e *Bd*^S, que fue construida incluyendo múltiples inversiones pericéntricas que involucran a gran parte del cromosoma 3, estabilizando de esta manera el alelo *flr*³, además el cromosoma puede distinguirse a nivel de fenotipo porque contiene al marcador *Bd*^S (Beaded of Serrate) localizado a 3-91.9 cM, el cual al ser dominante permite reconocer a los organismos portadores, los cuales muestran las alas con bordes discontinuos. También es un gen letal en condición homocigota, por lo que en cada generación solo se recobran organismos heterocigotos *flr*³/TM3 *Bd*^S. (3) ORR *flr*³/TM3: cepa que presenta resistencia a DDT, la cual se caracteriza por la sobreexpresión constitutiva de los genes P450 que se traducen en niveles altos de citocromos P450, enzimas que son codificadas por los genes que se encuentran en los cromosomas 1, 2 y 3. (4) silvestre (Dapkus y Merrell, 1977; Frölich y Würgler, 1990; Graf y van SchaiK, 1992; Lindsley y Zimm, 1992; Tijet *et al.*, 2001).

Sistema de cruzas

Se cruzaron hembras vírgenes de la cepa *flr*³/TM3 e *Bd*^S (2) con machos *mwh e* / *mwh e* de la cepa (1), conocida como cruce estándar con bioactivación normal (ST). Para la cruce de alta bioactivación (HB) se utilizaron hembras vírgenes de la línea ORR-

flr³/TM3 de la cepa (3) con machos *mwh e / mwh e* de la cepa (1). La línea ORR se caracteriza por la sobre expresión constitutiva de CYP 6A2 (Graf *et al.*, 1984; Graf y van SchaiK, 1992; Saner *et al.*, 1996)). La Figura 10 muestra el sistema de cruzas empleado.

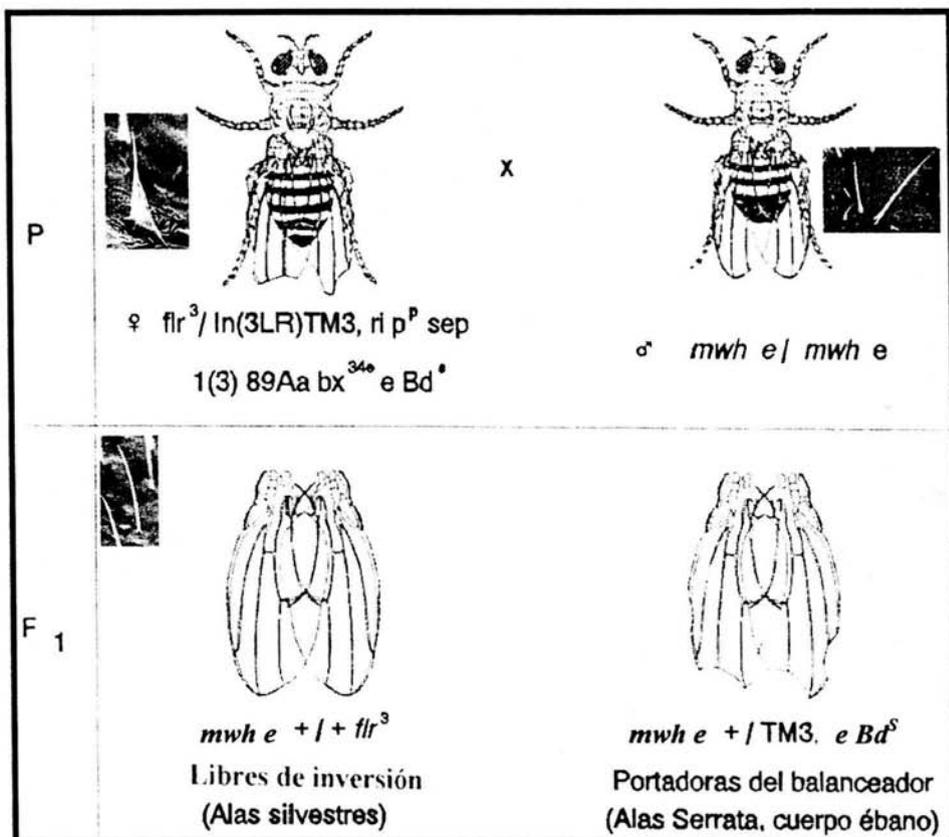


Figura 10. Sistema de Cruzas empleado. La diferencia entre la cruzada ST y HB es que las ♀♀ progenitoras son ORR, línea que no muestra un fenotipo visible (imagen propiedad del laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, UNAM).

Compuesto químico

Cápsulas con extracto homogenizado y liofilizado de *Equisetum myriochaetum* proporcionadas por el Dr. Andrade Cetto del Grupo de Etnofarmacología, Facultad de Ciencias UNAM.

Prueba de Toxicidad

Para los experimentos de toxicidad se utilizaron 200 machos adultos de la cepa (2) *flr³/TM3* e *Bd^S* de 6 horas de edad, los cuales se colocaron en viales (10 individuos/vial). Estas moscas fueron alimentadas durante 48 horas con extractos de *E. myriochaetum* en las siguientes concentraciones: 14.45, 28.90, 57.81, 115.6, 231, 462.5, 925, 1850 y 3700 ppm. El control fue tratado con el solvente (agua).

Medio de cultivo

El medio de cultivo fue elaborado con: agua (82.56%), carragenina (0.99%), azúcar (4.62%), harina de maíz (6.94%), levadura de cerveza (4.36 %), ácido propiónico (0.26%) y nipagin (0.26%) (Ramos *et al.*, 1993).

Ensayo SMART

La prueba de mutación somática y recombinación mitótica (SMART) fue esencialmente realizada de acuerdo a Graf *et al.* (1984). Tres días después de realizada la cruce los progenitores se transfirieron a frascos con medio de cultivo fresco en los que se colectaron huevos por un período de 6 horas (sincronización) con el fin de homogenizar la edad de la progenie, posteriormente se retiraron los progenitores dejando los huevos en el medio hasta que se desarrollaron las larvas del tercer estadio. El tratamiento agudo, se realizó mediante la colecta de larvas de 72 ± 3 h de edad con una solución concentrada de sacarosa (20%) después se colocaron en viales que tenían

en un extremo una malla de nylon y un tapón de poliuretano en el otro para impedir que las larvas escaparan. Los viales con alrededor de 200 larvas fueron colocados durante 6 horas en vasos de precipitado de 10 ml de capacidad los cuales contenían 50 mg de celulosa en polvo y las diferentes concentraciones de *E. myriochaetum*: 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 500ppm, los testigos concurrentes fueron tratados con el solvente (agua). Transcurrido este tiempo las larvas se enjuagaron con agua corriente y se transfirieron a medio de cultivo fresco hasta que emergieron los adultos. Este tratamiento se realizó para ambas cruzas (ST y HB).

Posteriormente se separó la progenie de acuerdo con su fenotipo: a) transheterocigotas (*mwh e +/ + flr³*) con alas y cuerpo silvestre b) portadoras del cromosoma balanceador (*mwh e +/ TM3, e Bd⁵*) con alas *Serrate* y cuerpo *ebony*. Las moscas se sacrificaron por exceso de anestesia con éter y se fijaron en etanol al 70%. Las alas se disectaron del cuerpo de las moscas con la ayuda de unas pinzas de relojero y se colocaron por pares en portaobjetos con solución de Fauré (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de de hidrato de cloral y 50 ml de agua). En cada laminilla se alinean 20 alas de hembras y 20 alas de machos, de acuerdo con Graf *et al.*, (1984).

Para el registro de las manchas se tomó únicamente la región distal del ala, la cual se subdivide en 7 secciones separadas por la venación natural como: A, B, C, C', D, D', y E (Figura 11)(García-Bellido y Merriam, 1971 y Graf *et al.*, 1984).

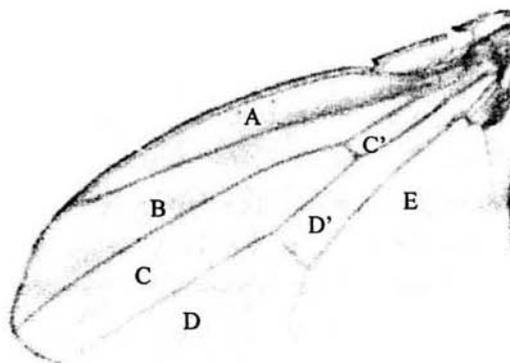


Figura 11.- Secciones del ala de *Drosophila melanogaster* (imagen propiedad del Lab. Genética, Facultad de Ciencias UNAM).

Las alas fueron analizadas en un microscopio óptico (Nikon YS 100) con un aumento de 400X, se registró cada mancha de acuerdo a la sección del ala en la que se encontró, el número de células que la formaba y el tipo de mancha: *mwh*, *flr*³ o gemela (Figura 12). Las manchas se clasificaron según el tamaño en: simple chica (1 a 2 células), simple grandes (>2 células) o gemelas (si se presentan los dos marcadores mutantes *mwh* y *flr*³ formando parte de la mancha). Se consideró que dos manchas se originaron por dos procesos independientes si se encontraban separadas por 3 o más hileras de tricomas de tipo silvestre.

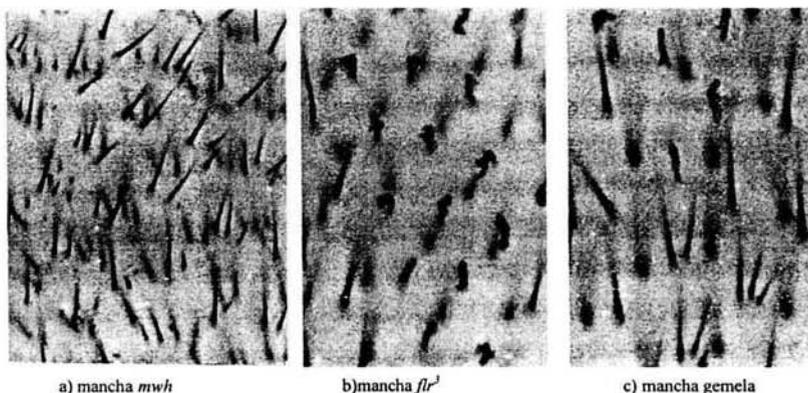


Figura 12.- Tipos de manchas (fotos propiedad del Lab. Genética, Facultad de Ciencias, UNAM).

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó empleando el programa de cómputo SMART, basado en la prueba no paramétrica de χ^2 y con un nivel de significancia del 5%. Mediante este programa se determinó si la frecuencia de manchas sencillas y gemelas obtenidas después de los tratamientos, se incrementaba cuando se comparaba con los testigos correspondientes (Frei y Würigler, 1988). Para evaluar la mutagénesis de un compuesto se comparan las series tratadas con las series correspondientes al testigo concurrente. En este procedimiento se contrastan dos hipótesis y el diagnóstico obtenido califica la actividad genotóxica del compuesto químico o mezcla tratamiento, este puede ser: positivo, negativo, inconcluyente o débil positivo (Selby y Olson, 1981). La hipótesis nula (H_0) supone que no hay diferencias entre la frecuencia de manchas entre las series tratadas y el testigo, si la frecuencia de

mutación se incrementa de manera significativa, la H_0 se rechaza. Por otro lado la hipótesis alternativa (H_a), postula que en las series tratadas hay un incremento estadístico igual a "m" veces la frecuencia basal. Dado que la frecuencia de manchas chicas y totales, es mucho mayor que la frecuencia de manchas simples grandes y la de manchas gemelas se utiliza $m = 2$ para las primeras y $m = 5$ para las segundas. Si se acepta la H_0 y se rechaza la H_a el resultado es negativo (-), por el contrario si se rechaza la H_0 y se acepta la H_a , el resultado es positivo (+); por otro lado, si las dos hipótesis se rechazan, el resultado se considera débil positivo (d+), y si ambas se aceptan, el resultado es indeterminado (i). Frei y Wrügler (1995) complementaron la prueba estadística proponiendo un tamaño de muestra de 120 alas, las cuales corresponden a 30 hembras y 30 machos por concentración, además de proponer que las lecturas de la frecuencia de manchas se realizaran considerando manchas recobradas por individuo en vez de manchas recobradas por ala como se hacia anteriormente, esto debido a que las manchas encontradas tanto en el ala izquierda como en la derecha de la mosca no necesariamente representan eventos independientes. Para ciertos tipos de análisis como dispersión o análisis de varianza esto es importante, particularmente si hay una variabilidad excesiva en la incidencia de manchas por algunas razones como el sexo, tendencia individual a la formación de manchas, polimorfismo genético, etc.

Prueba de teratogénesis

Para el protocolo de teratogénesis se utilizaron moscas de la cepa silvestre. Tres días después de haber realizado la cruce de los progenitores, se transfirieron a frascos con medio de cultivo fresco junto con las diferentes concentraciones de *Equisetum myriochaetum*: 0.78, 1.56p, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 500 ppm, más un control con el solvente (agua). Se colectaron huevos por un período de 6 horas (sincronización) con el fin de homogeneizar la edad de la progenie, posteriormente se retiraron los progenitores dejando los huevos en el medio hasta que emergieron los adultos; las moscas se observaron en un microscopio estereoscópico.

RESULTADOS

El extracto de *Equisetum myriochaetum* no resultó ser tóxico en ninguna de las concentraciones probadas (Tabla 1) por lo que no fue posible obtener la LD50. Para evaluar el potencial genotóxico del extracto de la planta se utilizó la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) versión ala, para lo cual la evaluación se realizó mediante dos cruza conocidas como: la estándar (ST) y la de alta bioactivación (HB). Las larvas de ambas cruza fueron tratadas bajo las mismas condiciones. Debido a que el extracto de *E. myriochaetum* no resulto ser tóxico, las concentraciones para evaluar la genotoxicidad de la planta fueron: 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 500 ppm y el testigo concurrente o control negativo, que fue el solvente (agua). Estas concentraciones se eligieron con base en bibliografía reportada (Andrade *et al.*, 2000). La concentración de 1.56 ppm corresponde a la dosis que se emplea en los seres humanos (2 g para una persona de aprox.70 kg) para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Revilla *et al.*, 2002).

Después de haber sido tratadas con el extracto de *E. myriochaetum* la sobrevivencia de los adultos en la cruza ST muestra un comportamiento similar para los genotipos silvestre y Serratia en todas las concentraciones, mientras que en la cruza HB hay diferencias aunque no significativas en las concentraciones 0.78, 25 y 500 ppm (Figura 13).

La frecuencia de manchas chicas, grandes, gemelas y totales por mosca así como el tamaño promedio del clon de la cruza ST se muestran en la Tabla 2. Las diferentes concentraciones del extracto de *E. myriochaetum* no indujeron de forma significativa ningún efecto genotóxico. La frecuencia inducida de manchas totales muestra un patrón asintótico (Figura 14), el cual también se presenta en la distribución de manchas por tamaño (Figura 15). Las manchas chicas (de uno a dos tricomas afectados) fueron las más frecuentes, obteniéndose una relación de chicas a grandes que osciló de alrededor de 4 a 14. En el testigo concurrente esta relación fue también de 4 (Figura 16).

En la cruza de alta bioactivación la respuesta obtenida al tratar de forma aguda a larvas de 72±3 horas con diferentes concentraciones del extracto de *E. myriochaetum* fue también negativa (Tabla 3). El patrón de respuesta con respecto al número y frecuencia de manchas es también asintótico (Figura 17).

La distribución de manchas por tamaño se muestra en la Figura 18. Las manchas chicas se presentaron en una frecuencia mucho mayor que las grandes (de 3 a 17) (Figura 19),

mientras que solamente se indujeron manchas gemelas en las concentraciones más altas (50 y 500 ppm) en ninguna de las cuales el resultado mostró ser estadísticamente significativo.

La Figura 20 muestra la comparación en la respuesta de las cepas empleadas. Puede notarse que el patrón es asintótico y la respuesta muy similar en ambas cepas. La r^2 de la curva fue de 0.1004.

En la tabla 4 se muestran los resultados de teratógenosis en los cuales puede observarse que los individuos tratados con el extracto *E. myriochaetum*, no muestran anomalías en su fenotipo.

DISCUSIÓN.

Para que un medicamento salga al mercado se requiere que sea sometido a diferentes pruebas entre las que se pueden mencionar la toxicidad, la genotoxicidad y la teratogénesis, entre otras. Se han realizado pocos estudios del efecto tóxico de plantas de este género (*Equisetum*). En el caso de *Equisetum hyemale* se probó que presenta baja toxicidad en ratas (Xu *et al.*, 1993). En contraste en el protocolo de toxicidad del *E. myriochaetum* realizado en este estudio para determinar la LD₅₀, no pudo encontrarse toxicidad aún en concentraciones tan altas como la de 3700 ppm. Estos resultados de toxicidad son similares a los obtenidos en otras investigaciones en plantas que contienen flavonoides (Hosseinzadeh, *et al.*, 2002; Havsteen, 2002; Osadebe y Okoye, 2003). Este es el primer estudio de plantas de este género en cuanto a la genotoxicidad y la teratogénesis.

Los compuestos secundarios de plantas como terpenos, esteroides, alcaloides y fenoles, entre otros, están implicados en el mecanismo de defensa de las plantas contra los herbívoros incluidos los insectos. Para hacer frente a esta situación se ha postulado que los insectos que están en contacto permanente con estas plantas han desarrollado el sistema enzimático de citocromos P450 (Cohen *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1992). Los P450 están involucrados en el metabolismo oxidativo, peroxidativo y reductivo de numerosos pesticidas, herbicidas, contaminantes ambientales y productos secundarios de plantas (Feyereisen, *et al.*, 1989; Sundseth, 1990).

En *Drosophila melanogaster*, los P-450 están relacionados con la resistencia a insecticidas, en otras palabras las líneas resistentes tienen una mayor actividad de P-450 que las líneas susceptibles que las expresan de forma basal (Hällström y Blanck, 1984; Prevec *et al.*, 1992; Idomar *et al.*, 2002).

Muchos compuestos químicos no son mutagénicos por sí mismos y estos se activan sólo como una consecuencia de la transformación metabólica. La activación de promutágenos y procarcinógenos es principalmente mediada por el sistema enzimático de los citocromos P-450 que consiste en varias isoenzimas y que tiene la capacidad de metabolizar una gran variedad de sustratos, como nitrosaminas, aflotoxinas, alcaloides pirrólicos, safoles, entre otros.

Drosophila melanogaster muestra ser muy útil en estudios de genotoxicidad *in vivo*, entre los diferentes ensayos de genotoxicidad usando a *Drosophila* como un

organismo de prueba, el ensayo de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en ala (SMART) ha resultado ser una buena herramienta para detectar un amplio rango de alteraciones genéticas de una manera rápida y barata (Graf *et al.*, 1984; Würgler y Vogel, 1986; Vogel, 1987; Frölich y Würgler, 1989). Otra característica favorable del ensayo es la de ser es un sistema sensible y flexible que permite la detección de genotoxicidad de compuestos químicos de manera individual ó en mezclas complejas. De hecho en el sistema de SMART ala se han evaluado rigurosamente más de 250 compuestos (Vogel, 1992). El ensayo presenta la ventaja adicional de contar con activación metabólica similar a la de los mamíferos (Zijlstra *et al.*, 1987). La incorporación de la crua mejorada o de alta bioactivación permite estudiar los efectos genotóxicos inducidos por una gran variedad de promutágenos y procarcinógenos.

Para determinar si los compuestos presentes en la mezcla del extracto de la planta requerían ser metabolizados o no, se utilizó la crua de alta bioactivación, además de la crua estándar. La principal diferencia entre las dos cruas usadas en el presente estudio es el alto nivel de CYP6A2 que se expresa de forma constitutiva en la crua de alta bioactivación ORR (Saner, 1995; Saner *et al.*, 1996; Campesato *et al.*, 1997), la cual es similar al a subfamilia CYP3A de los seres humanos (Aoyama *et al.*, 1989; Cunha *et al.*, 2001) y a la CYP3A16 del ratón (Itoh *et al.*, 1994). En este estudio aparentemente el incremento en los niveles de citocromos P450 presentes en las larvas de la crua de alta bioactivación no es requerido para la activación de los compuestos del extracto *Equisetum myriochaetum*.

Entre los compuestos reportados para *Equisetum myriochaetum* se encuentran principalmente los flavonoides que como ya se mencionó son compuestos fenólicos, presentes en plantas, y en diversos vegetales que forman parte de la dieta de los seres humanos como el vino tinto y una gran variedad de plantas comestibles como espinacas, brócoli, lechuga, col, etc.(da Silva *et al.*, 2002). De hecho se estima que el consumo diario de flavonoides por día es de 1 gramo (Di Carlo *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2003). La función biológica más conocida de los flavonoides es la de proteger a las células contra el daño oxidativo, (Shamberger, 1984; Hartman y Shankel, 1990; Odin, 1997; Kaya *et al.*, 2002) contra los rayos UV-B, fitoalecinas (hormonas vegetales), funguicidas, insecticidas, antivirales, antihemorrágicos (factor vitamina P), espasmolíticos, antihepatóxicos, diuréticos, antialérgicos, bactericidas, fijación de

metales (He y Cu), actividad sedativa, antimaláricos, agentes antitumorales, prevención de enfermedades cardiovasculares y también por sus propiedades anticarcinogénicas (Shamberger, 1984; Hodnick *et al.*, 1986; Middleton y Teramura 1993; Hertog *et al.* 1995; Formica y Regelson, 1995; Eaton, 1996; Rhodes y Price, 1996; Duarte-Silva *et al.*, 1997^a y 1997^b; Noroozi *et al.*, 1998; Zhai, 1998; Graefe y Veit 1999; Lean *et al.*, 1999; Wagner 1999; Bülent *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2000; Wang y Sporns, 2000; Masuda *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2001; Havsteen, 2002; Martínez-Florez *et al.*, 2002). Recientemente se han acumulado una gran cantidad de datos en la literatura que indican que la función biológica de algunos flavonoides es la de inhibir a las enzimas involucradas en la biotransformación de procarcinógenos por lo que ahora son vistos como agentes quimopreventivos potenciales (Elangovan *et al.*, 1994; Moon, *et al.*, 1998; Ciolino y Yeh, 1999).

Estudios de genotoxicidad con células procariontes y eucariontes muestran que los flavonoides, quercitina y rutina, presentes en bebidas como el vino tinto, el brandy y el té, entre otras, presentaron diferentes grados de genotoxicidad (Graf *et al.* 1994). Otro estudio demostró que flavonoides como el campferol (3,5,7-Trihydroxy-2-[4-hydroxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-one; 3,4',5, 7-tetrahydroxyflavona), la quercitina (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavona) y la miricetina (3,3',4',5,5',7- hexahydroxyflavona), de los cuales se estima que su consumo diario es de 16.3, 8.2 y 0.9 mg/día respectivamente, presentan actividad genotóxica en *Salmonella typhimurium* (TA98) con presencia de un sistema metabolizador externo (S9) y en células de hámster chino de la cepa V79 (Silva *et al.*, 2000). Otro flavonoide, en específico, el glicoflavonoide myricetina 3-O-neohesperidoside, presentó citotoxicidad *in vitro* contra las cepas de células de leucemia (P-388) y células de adenocarcinoma de pulmón (A-549) (Ismael y Alam 2001). Estas investigaciones demostraron que no todos los flavonoides tienen actividad biológica benéfica.

Por lo anterior se puede establecer que la función biológica de los flavonoides es de acción dual en el organismo. Los flavonoides presentes en el extracto de *E. myriochaetum* no mostraron ser genotóxicos o bien que éstos inhibieron la función de las enzimas involucradas en la biotransformación del extracto de *E. myriochaetum* por lo cual puede concluirse que no es genotóxico en ninguna de las concentraciones probadas en el ensayo *mwh + / + flr* de *Drosophila*.

Este estudio muestra que el extracto fitoterapéutico de *E. myriochaetum* no induce un incremento significativo en la frecuencia de mutaciones de las series experimentales, con respecto a la del testigo concurrente. Esto indica que los compuestos contenidos en el extracto de la planta no fueron capaces de inducir alteraciones genéticas en los discos imaginales que darán origen a las alas de las moscas. El tratamiento agudo (6 h) con el extracto de *Equisetum myriochaetum* para ambas cruces (ST y HB) en las condiciones probadas no son genotóxicas en *Drosophila melanogaster*. Además el ensayo para evaluar el efecto teratogénico del extracto de *E. myriochaetum*, mostró ser negativo ya que no se observó ningún tipo de alteración morfológica en las moscas adultas tratadas. Este estudio coincide con otro donde se utilizaron hamsters que al igual que este estudio se encuentran implicados flavonoides (Jones y Wiley, 1982).

Por último comparando los resultados obtenidos en los estudios sobre la genotoxicidad de flavonoides con los obtenidos en este trabajo, se puede llegar a las siguientes conclusiones: (1) que los compuestos reportados para el extracto de *Equisetum myriochaetum* no son genotóxicos; (2) que los flavonoides presentes en este extracto tienen actividad inhibitoria en las enzimas involucradas en la biotransformación de agentes xenobióticos; (3) que la ausencia de genotoxicidad puede deberse a la baja concentración de un posible compuesto genotóxico en la mezcla; (4) que el extracto actúa de manera sinérgica, de tal forma que si alguno de los compuestos presentes es genotóxico se inhiba su acción de manera antagónica con otro compuesto.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones probadas el extracto de *Equisetum myriochaetum* mostró:

- No ser genotóxico en las células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster*.
- Al no ser genotóxico no se pudo determinar su forma de acción
- La respuesta del extracto fue similar en ambas cruces (ST y HB)
- El extracto de *E. myriochaetum* no mostró ser teratogénico.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.M., Celniker, E.S., Holt, A.R., Evans, A.C., Gocayne, D.J., Amanatides, G.P., Scherer, E.S., Li, W.P., Hoskins, A.R., Galle, F.R., George, A.D., Lewis, E.S., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, N.S., Sutton, G.G., Wortman, R.J., Yeandell, D.M., Zhang, Q., Chen, X.L., Brandon, C.R., Rogers, C.Y., Blazej, G.R., Champe, M., Pfeiffer, D.B., Wan, H.K., Doyle, C., Baxter, G.E., Helt, G., Nelson, R.C. Miklos, G.L.G., Abril, F.J., Agbayani, A., An, H., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, M.R., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, M.E., Beeson, Y.K., Benos, V.P., Berman, P.B., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, R.M., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, C.K., Busam, A.D., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, M.J., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, B.L., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Deslattes, M.A., Dew, I., Dietz, M.S., Dodson, K., Doup, E.L., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, C.B., Dunn, P., Durbin, J.K., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, E.A., Garg, S.n., Gelbart, M.W., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, H.J., Gu, Z., Guan, P., Harris, L.N., Harvey, D., Heiman, J.T., Hernandez, R.J., Houck, J., Hostin, D., Houston, A.K., Howland, J.T., Ming-Hui, W., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, H.G., Ke, Z., Kennison, A.J., Ketchum, A.K., Kimmel, E.B., Kodira, D.C., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitski, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, C. T., McLeod, P.M., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, V.N., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, M.S., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, M.D., Nelson, L.D., Nelson, R.D., Nelson, A.K., Nixon, K., Nusskern, R.D., Pacleb, M.J., Palazzolo, M., Pittman, S.G., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, G.M., Reinert, K., Remington, K., Saunders, C.D.R., Scheeler, F., Shen, H., Shue, C.B., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, P.M., Smith, t., Turner, R., Venter, E., Wang, H.A., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, A.D., Weinstock, M.G., Weissenbach, J., Williams, M.S., Woodage, T., Worley, C.K., Wu, D., Yang, S., Yao, A.Q., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, S.J., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, H.X., Zhong, N.F., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, O.H., Gibbs, A.R., Myers, W.E., Rubin, M.G., Craig, V.J. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. 287, 2185-2195.

Andrade-Cetto, A. (1999) Estudio Etnofarmacológico de *Equisetum myriochaetum* Schlechtendal y Cham y *Cecropia obtusifolia* Bertol. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. 97 pp.

Andrade, C.A., Wiedenfeld, H., Revilla, M.C., Islas, A.S. (2000) Hipoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacology* 72, 129-133.

Anon, Datamonitor (Trade source), UK, 1996.

Aoyama, T., Yamano, S., Waxman, D.J., Lapenson, D.P., Meyer, V.A., Fisher, V., Tyndale, R. Inaba, T., Kalow, W., Gelbion, H.V. y Gonzalez, F. J. (1989) Cytochrome P450 hPCN3, a novel cytochrome P450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. *J. Biol. Chem.* 264, 10388-10395.

Argueta, V.A. (1994) Atlas de plantas de la medicina tradicional Mexicana Vol. I. Instituto Nacional Indigenista. México. 583 pp.

Auerbach, C. (1945) The problem of chromosome rearrangements in somatic cells of *Drosophila*. *Proc. Roy. Soc. (Edinburgh)* B62, 120-127.

Baars, A.J., Blijeven, W.G.H., Mohn, G.R., Natarajan, A.T., Briemer, D.D. (1980) Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparation to activate mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 72, 257-264.

Brusick, D. (1987) Principles of Genetic Toxicology. Plenum Press. New York. 284 pp.

Bülent, K., Creus, A., Velázquez, A., Yanikoglu, A y Marcos, A. (2000) Genotoxicity is modulated by ascorbic acid. Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Res.* 520, 93-101.

Campeato, R.V., Graf, U., Reguly, M.L. y Rodrigues, A.H.H. (1997) Recombinogenic Activity of Integerrimine, a Pyrrolizidine Alkaloid from *Senecio brasiliensis*, in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 29, 91-97.

Casciano, A.D. (1991) Introduction to Genetic Toxicology. Li, A.P y Heflich, A.H. (eds.). CRC Press. Boston. p 1-5.

Chávez, V. D. (1991) Estudio Químico de *Equisetum myriochaetum* schlect & cham. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F. p 34-79.

Camacho, M.R., Chavez, D., Mata, R., Palacio-Rios, M., (1992) Estudio Químico de *Equisetum myriochaetum*. Fitoterapia. 63, 471.

Cohen, M.B., Berenbaum, M.R. y Schuler, M.A. (1989) Induction of cytochrome P-450 mediated metabolism of xanthoxin in the black swallowtail. J. Chem. Ecol. 15, 2347-2355.

Cohen, S.M. (1993) Imaginal disc development. En: The development of *Drosophila melanogaster*. Bate M. y Martinez, A.A.(Eds). Vol II. Cold spring harbor laboratory press. U.S.A. p 747-842

Ciolino, H.P. y Yeh, G.C. (1999) The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist:antagonist of the aryl hydrocarbon receptor Br. J. Cancer. 79, 1340-1346.

Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M. (1997) Natural Products in drug discovery and development. J. Nat Prod. 60, 52-60.

Cunha, S.K., Reguly, M.L., Graf, U. y Rodrigues, A.H.H. (2001) Taxanes: the genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutagenesis. 16 (1), 79-84.

da Silva J. Hermann, S.M., Heuser, V., Peres W., Possa M. N., Gonzalez-Gallego, J. y Erdtmann, B. (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. Food Chem. Toxicol. 40 (7), 941-7.

Dapkus, J., and Merrell, D.J. (1977) Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 87, 685-697.

De Serres, F.J. (1975) The correlation between carcinogenic and mutagenic activity in short-term test for mutation induction and DNA repair. *Mutation Res.* 31, 203.

Demerec, M. y Kaufmann B.P. (1962) Introducción a la Genética y Citología de *Drosophila melanogaster*. Trad. Biol. Rodolfo Félix Estrada, Comisión Nacional de Energía Nuclear, Programa de Genética. 56p.

Demerec, M. (1965) *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Company. New York and London. 633 p.

Devore, G. (1978) *Química Orgánica*. Publicación Cultural. 8va. reimpresión. México. 734 p.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A. y Capasso, F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65, 335-337.

Duarte-Silva I., Rodrigues, A.S., Gaspar, J., Maia, R., Laires, A. y Rueff, J. (1997^a) Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: Relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis*. 12, 383-390.

Duarte-Silva, I., Rodrigues, A.S., Gaspar, J., Laires, A. y Rueff, J. (1997^b) Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: Relevance to the genotoxicity of galangin. *Mutation Res.* 343, 247-257.

Eaton, E.A. (1996) Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase: Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab. Dispos.* 24, 232-237.

Elangovan, V., Sekar, N. y Govindasamy, S. (1994) Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Lett.* 87, 107-113.

Feyereisen, R., Koener, J.F., Farnsworth, D.E. y Nebert, D.W. (1989) Isolation of insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca Domestica*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1465-1469.

Formica, J.V., Regelson, W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol. 33, 1061-1080.

Frei, H. Y Würgler, F.E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutation Res. 203, 97-308.

Frei, H. Y Würgler, F.E. (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. Mutation Res. 334, 247-258.

Fristrom, D y Fristrom, W.J. (1993) The Metamorphic Development of the adult epidermis. En: The development of *Drosophila melanogaster*. Bate M. y Martinez, A.A.(Eds). Vol II. Cold spring harbor laboratory press. U.S.A. p 843-898.

Frölich, A. Y Würgler, F.E. (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. Mutation Res. 216, 179-187.

Frölich, A. Y Würgler, F.E. (1990) *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation Res. 234: 71-80.

Gaedcke, W.F. y Steinhoff, K.B. (2003) Herbal Medicinal Products. CRC press. Stuttgart. 177 p.

García-Bellido A. y J. R. Merriam. (1971) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. Develop. Biol. 24, 61-87.

García-Bellido, A. Dapena. (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. Mol. Gen. Genet. 128, 117-130.

Graefe, E.U. y Veit, M. (1999) Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine*. 6(4), 239-46.

Graf, U. y van Schaik, N. (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 271, 59-67.

Graf, U., Wurgler, F. Katz, A., Frei, H., Juon, H., Hall, C. y Kale, P. (1984) Somatic mutation and recombination test *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188.

Graf, U., Moraga, A.A., Castro, R. y Diaz Carrillo E. (1994) Genotoxicity testing of different types of beverages in *Drosophila* wing Somatic Mutation and Recombination Test. *Food Chem. Toxicol.* 32(5), 423-30.

Guzmán-Rincón, J. y Graf, U. (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test. En: *Biomonitoring and Biomarkers of Environmental Change*. Plenum Press, New York, p 169-181.

Hällström, I. y Blanck, A. (1984) Genetic regulation in the cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Bioch. Pharmacol.* 33, 13-20.

Hartman, P.E. y Shankel, D.M. (1990) Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.* 15, 145-182.

Havsteen, B. (2002) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1141-1148.

Heinrich, M. y Gibbons S. (2001) Ethnopharmacology in drugs discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J. Pharmacy Pharmacol.* 53, 425-432.

Hernández, F. (1959) Historia Natural de la Nueva España. Vol. I Tomo II. UNAM. Mexico, D.F. 476 p.

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H. y Katan, M.B. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, Arch. Intern. Med. 155, 381-386.

Hodnick, W.F., Kung, F.S., Roettger, W.J., Bohmont, C.W. y Pardini, R.S. (1986) Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. Biochem. Pharmacol. 35, 2345-2357.

Holmstedt, B. (1991) Historical perspective and future of ethnopharmacology. J. Ethnopharmacol. 32, 7-24.

Hosseinzadeh, H. Ramezani, M. Y Danaei, A.R. (2002) Antihyperglycaemic effect and acute toxicity of *Securigera securidaca* L. Seed extracts in mice. Pytother Res. 16 (8), 745-7.

Idomar, M., El Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A. Baudoux, D., Muñoz-Serrano, Liemans, V. y Alonso-Moraga, A. (2002) Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 513, 61-68.

Islas, A.S. y Revilla, M.C. (1999) Diabetes mellitus: concepto y una nueva clasificación En: Diabetes mellitus. Islas, A.S. y Lifshitz, G.A. (Eds.) 2 ed. Mac Graw-Hill Interamericana. México. p. 3-14.

Ismael, N. Alam, M. (2001) A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. Fitoterapia. 72 (6), 679-9.

Itoh, S., Satoh, M., Abe, Y., Hashimoto, H., Yanagimoto, T., Kamataki, T. (1994) A novel form of mouse cytochrome-P450 3^a(cyp 3^a-16). Its cDNA cloning and expression in fetal liver. *Eur. J. Biochem.* 226, 877-882.

Jin-Ming, K., Ngho-Khang, G., Lian-Sai, C. y Tet-Fatt, C. (2003) Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol. Sin.* 24(1), 7-21.

Joneja, M.G. y Wiley, M.J. (1982) Inhibition of beta-aminopropionitrile (beta ANP)-induced skeletal teratogenesis by the flavonoid beta-hydroxyethylrutosides (HR) in hamster fetuses. *Teratology.* 26 (1), 59-63.

Kang, T.H., Jeong, S.J., Kim, N.Y., Higuchi, R. y Kim, Y.C. (2000) Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. *J. Ethnopharmacol.* 71 (1-2), 321-3.

Kaya, B., Creus, A., Velásquez, A., Yanikoglu, A. Y Marcos, R. (2002) Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Res.* 520, 93-101.

Kilbey, B.J., Mac Donald, D.J., Auerbach, C., Sobels, F.H. y Vogel, E.W. (1981) The use of *Drosophila melanogaster* in test for environmental mutagens. *Mutation Res.* 85, 141-146.

Lean, M. E.J., Noroozi, M., Kelly, I., Burns, J., Talwar, D., Sattar, N., Crozier, A. (1999) Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabet.* 48, 176-181.

Lindsley, L.D. y Zimm, G.G. (1992) *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, INC. USA. 1133 p.

Lu, C.M., Yang, J.J., Wang, P.Y. y Lin, C.C. (2000) A new acylated flavonolglycoside and antioxidant effects of *Hedyotis diffusa*. *Planta Med.* 66, 347-7.

Madhavan, M.M. y Schneiderman, H. A. (1977) Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. Roux's Arch. Dev. Biol. 183, 269-305.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, Culebras, J.M. y Tuñón, J. Ma. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria. XVII (6) 271-278.

Martin, H.-J., Kornmann, F. y Fuhrmann, G.F. (2003) The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut 1 glucose transporter in human erythrocytes. Chemico-Biological Interactions. 146, 225-235.

Masuda, T., Irritan, K., Yonemori, S., Oyama Y. y Takeda, Y. (2001) Isolation and antioxidant activity of galloyl flavonol glycosides from the seashore plant, *Pemphis acidula*. Biosci. Biotechnol Biochem. 65 (6), 1302-9.

Meckes, M. (1993) Introducción En: Investigación Científica de la herbolaria Medicinal Mexicana Secretaria de Salud México. IMSS. Edición Conmemorativa. México D.F. p 71-73.

Middleton, E. M. y Teramura, A.H. (1993) The role of Flavonol Glycoside and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. Plant Physiol. 103 (3), 741-752.

Moon, J.Y., Lee, D.W. y Park, K.H. (1998) Inhibition of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity in rat liver microsomes by naturally occurring flavonoids: structure-activity relationships. Xenobiotica 28, 117-126.

Murakami, N., Mostaqul, H.M., Tamura, S., Itagaki, S., Horii, T. y Kobayashi, M. (2001) New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis folium*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17:11(18), 2445-7.

Noroozi, M. Angerson, W. J. y Lean, M. E. (1998) Effect of flavonoides and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. Am. J. Clin. Nutr. 67, 1210-1218.

- Odin, A.P. (1997) Vitamins as Antimutagens: advantages and some possible mechanisms of anti-mutagenic action. *Mutation. Res.* 386, 39-67.
- Osadebe, P.O. y Okoye F.B.C. (2003) Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 89, 19-24.
- Palacios-Rios, M.(1992) Equisetaceae. En: V. Sosa (ed) *Flora de Veracruz* 69,13-22
- Palacios-Rios, M. (1998) Equisetaceae. En: J. Rzedowski & G. Calderón de Rzedowski (eds.), *Flora del Bajío y de regiones adyacentes* (en prensa): 1-6.
- Pearson, M. J. (1974) The abdominal epidermis of *Calliphora erythrocephala* (Diptera) y Polyteny and growth in the larval cell. *J. Cell. Sci.* 16, 113-131.
- Perez, G.R.M., Laguna, G.Y. y Walkowski, A. (1985) Diuretic activity of Mexican Equisetum. *Ethnopharmacol.* 14(2-3), 269-72.
- Pomerai, D.D. (1990) From gene to animal: An introduction to the molecular development. Cambridge University Press, 2 ed. New York, 417 p.
- Prevec, J.S., Okoampah, N.D. y Morton, R.A. (1992). Organophosphorus insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *J. Genet.* 71, 121-134.
- Ramos, P., H. Abundis, J. C. Gaytán, G. Ordaz, P.G. Orozco, J, Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E.M. Galicia y J. A. Muñoz. (1993) *Manual de Laboratorio de Genética para Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill, México. 131p.
- Revilla, M.C., Andrade-Cetto, A., Islas, S., Wiedenfeld, H. (2002) Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. *J. Etnopharmacol.* 81, 117-120.
- Rhodes, M.J.C. y Price, K.R. (1996) Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. *Food Chem.* 57, 113-117.

Rodríguez-Arnaiz, R. y Ramos, M. P. (1992) *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. Prensa de Ciencias. México. 50 p.

Rodríguez-Arnaiz, R. (2003^a) Las Toxinas Ambientales y sus efectos genéticos. Fondo de Cultura Económica. 4ta ed. México D.F. 95 p.

Rodríguez-Arnaiz, R. (2003^b) *Drosophila* como organismo modelo en la Biología Experimental En: La célula. L. F. Jiménez y H. Merchant (Eds.) Editorial Pearson Education (Addison-Wesley-Prentice Hall). p 761-791.

Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor-Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K. (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215.

Saner, C. (1995) "Characterization of *Drosophila melanogaster* Cytochrome P450 6A2: Gene Structure, Expression Pattern and Metabolic Capacity Towards Procarcinogens." Thesis 11205, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.

Saner, C., Weibel, B., Würigler, F.E. y Sengstag, C. (1996) Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* 27, 46-58.

Selby, P.B. y W.H. Olson (1981) Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result, *Mutation Res.* 83, 403-418.

Shamberger, R.J. (1984) Genetic toxicology of ascorbic acid. *Mutation. Res.* 133, 135-159.

Silva, D., Gaspar, J., Gomes da Costa, G., Rodrigues, A.S., Laires, A. y Rueff, J. (2000) Chemical feature of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chemico-Biological Interaction.* 124, 29-51.

St John, M. A. y Xu, T. (1997) Insights from model systems. Understanding human cancer in a fly. *Am. J. Genet.* 61, 1006-1010.

Sundseth, S.S., Nix, C.E. y Waters, L.C. (1990) Isolation of insecticide resistance-related forms of cytochrome P-450 from *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem.* 265, 213-217.

Tijet, N., Helvig, C. y Feyereisen, R. (2001) The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene.* 262, 189-198.

Trease., Evans, W.C. (1991) *Farmacognosia*. 13va ed. Interamericana Mc Graw Hill. México. 901p.

Valencia, R., Abrahamson, S., Lee, W.R., Von Halle, E.S., Woodruff, R.C., Würgler, F.E. y Zimmering, S. (1984) Chromosome mutation test for mutagénesis in *Drosophila melanogaster* A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 134, 61-88.

Valdés, J. y Flores, H. (1985) Comentarios a la obra de Francisco Hernández, Historia de las Plantas de la Nueva España. Tomo VII. UNAM. México. 373p.

Vogel, E.W. (1987) Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis.* 3, 161-171.

Vogel, E.W. (1992) Test for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.* 284, 159-175.

Vogel, E. Frei, H. Fujikawa, K. Graf, U. Kondo, S. Ryo H. Wurgler Y.F.E. (1985) Summary report on the performance of *Drosophila* assay. En: Ashby, J. de Serres, F.J. Draper, M. Ishidate, Y.M. (Eds). Collaborative study of short-term test for carcinogens. *Progress in Mutation, Res* 5. Elsevier/North. Holland, Amsterdam. p 325-340

Vogel, E. W., Graf, V., Frei, H.J. and Nivard, M.M. (1999) The result of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. IARC Sci. Publi. 146, 427-470.

Wagner, H. (1999) Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe Auflage Pharmazeutische Biologie Bandz. edi to Wissenschaftliche Verlagsesellschaft mbH. Stuttgart, Germany. 648 p.

Wang, J. y Sporns, P. (2000). MALDI-TOS MS Análisis of Food Flavonol Glycosides. J. Agric. Food Chem. 48, 1657-1662.

Waters, L.C., Zelhof, A.Z., Shaw, B.J. y Chang, L.-Y. (1992) Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulaiting expression of a n insecticide resistance-associated P-450 gene in *Drosophila*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 4855-4859.

Wiedenfeld, H., Andrade, C.A., Perez, A.C. (2000) Flavonol Glycosides from *Equisetum myriochaetum*. Biochem. Systemat. Ecol. 28, 395-397.

Wilkins, A.S. (1986) Genetic Analysis of Animal Development. John Wiley and Sons (Eds). New York, 1500 p.

Würgler, F.E. Graf, U. Frei. (1985) Somatic mutation and recombination in wing of *Drosophila melanogaster*, . En: Ashby, J. de Serres, F.J. Draper, M. Ishidate, Y.M. (Eds). Collaborative study of short-term test for carcinogens. Progress in Mutation, Res 5. Elsevier/North. Holland, Amsterdam. p 325-340.

Würgler, F.E., Vogel E.W. (1986) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En: de Serres F.J. (ed). Chemical mutagens: principles and methods for their detection, Vol. 10. New York: Plenum Press. p 1-72.

Xu, C.F., Bian, X.Y., Qu, S.M., You, L.H., Qi, Z.M., Cheng, W., Liu, X.J., Liu, W.Z. y Ren, S.J. (1993) Effet of *Equisetun hyemale* on experimental hyperlipemia in rats and its toxic test. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 18 (1), 52-3.

Yesilada, E. (2001) Genotoxicity Testing of some Metals in the *Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Test. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 66, 464-469.

Zhai, S., Dai, R., Friedman, F.K y Vestal, R.E. (1998) Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. Drug Metab. Dispos. 26, 989-992.

Zijlstra, J.A. y Vogel, E. W. (1988) Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 198: 73-83.

Zijlstra, J.A., Vogel, E.W. y Breimer, D.D. (1987) Pharmacological and toxicological aspects of mutagenicity research in *Drosophila melanogaster*. En: Hodgson, E., Bend, J. y Philpot R.M., Editors. Reviews in biochemical toxicology, Vol. 8. Amsterdam: Elsevier/North Holland. p 121-154.

Tabla 1. Prueba de Toxicidad, ♂♂ adultos de la cepa *flr*³ tratados con extracto de *E. myriochaetum*. Protocolo de 48h.

[ppm]	tiempo			
	0 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Control	10/10	10/10	10/10	10/10
14.45	10/10	10/10	10/10	10/10
28.9	10/10	10/10	9/10*	9/10*
57.81	10/10	10/10	10/10	10/10
115.6	10/10	10/10	10/10	10/10
231	10/10	9/10*	9/10*	9/10*
462.5	10/10	10/10	10/10	10/10
925	10/10	10/10	10/10	10/10
1850	10/10	10/10	10/10	10/10
3700	10/10	10/10	10/10	10/10

(*) moscas que se escaparon durante el transvase

Figura 13. Supervivencia de adultos de *Drosophila melanogaster* después de ser tratados con extractos de *E. myriochaetum*.

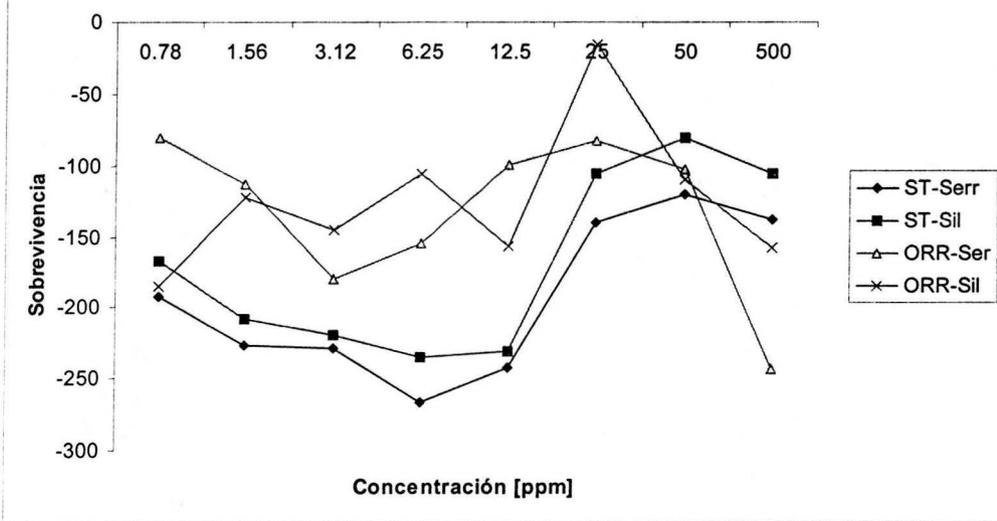


Tabla 2. Frecuencia de manchas por número de moscas obtenidas al tratar de forma aguda larvas de 72 ± 3 h de edad de *Drosophila melanogaster* con extracto de *Equisetum myriochaetum*. Cruza ST.

[ppm]	# moscas	Frecuencia de manchas por mosca (# de manchas) ^a					Mancha / ala	
		chicas (1-2 células) m = 2.0	grandes (> 2 células) m = 5.0	gemelas m = 5	totales m = 2	tamaño promedio Del clon	s/c	c/c
		control	60	0.3 (18)	0.06 (4)	0	0.36 (22)	2.09
0.78	60	0.23 (14) -	0.06 (4) -	0.01 (1) i	0.31 (19) -	2	0.6	-0.1
1.56	60	0.26 (14) -	0.06 (4) -	0.01 (1) i	0.35 (21) -	2.37	0.6	-0.1
3.12	60	0.41 (25) i	0.08 (5) -	0	0.5 (30) i	1.8	1	0.3
6.25	60	0.28 (17) -	0.06 (4) -	0	0.35 (21) -	2.14	0.7	0
12.5	60	0.46 (28) i	0.03 (2) -	0.03 (2) i	0.53 (32) i	1.79	1	0.2
25	60	0.25 (15) -	0.01 (1) -	0.03 (2) i	0.3 (18) -	2.39	0.6	-0.1
50	60	0.28 (17) -	0.03 (2) -	0.03 (2) i	0.35 (21) -	1.95	0.7	0
500	60	0.48 (29) i	0.1 (6) i	0.01 (1) i	0.59 (36) i	1.89	1.2	0.5

(^a) Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988 y 1995): + (positivo); - (negativo); i (inconcluyente); w+ (débil positivo); m = factor de multiplicación. Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.5$ y el ensayo estadístico de una cola.

Figura 14. Frecuencia inducida de manchas totales por extractos de *Equisetum myrchaetum* en el ensayo *mwh/flr* de *Drosophila melanogaster* en la cruz ST.

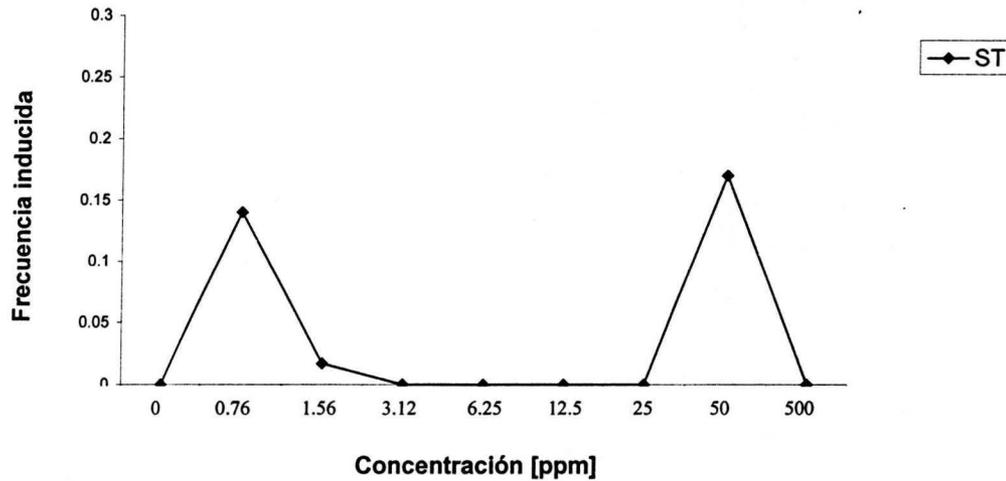


Figura 15. Distribución de manchas por tamaño, obtenidas al tratar de forma aguda a larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* con el extracto de *Equisetum myriochaetum* en la cruz ST.

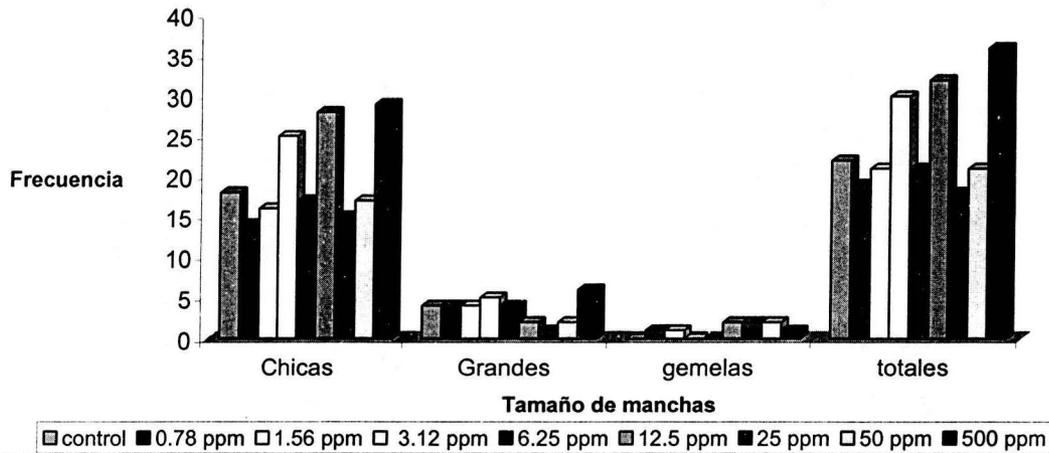


Figura 16. Número y tamaño de manchas simples obtenidas al tratar de forma aguda a larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* con extracto de *Equisetum myriochaetum* en *Drosophila melanogaster*. Cruza ST.

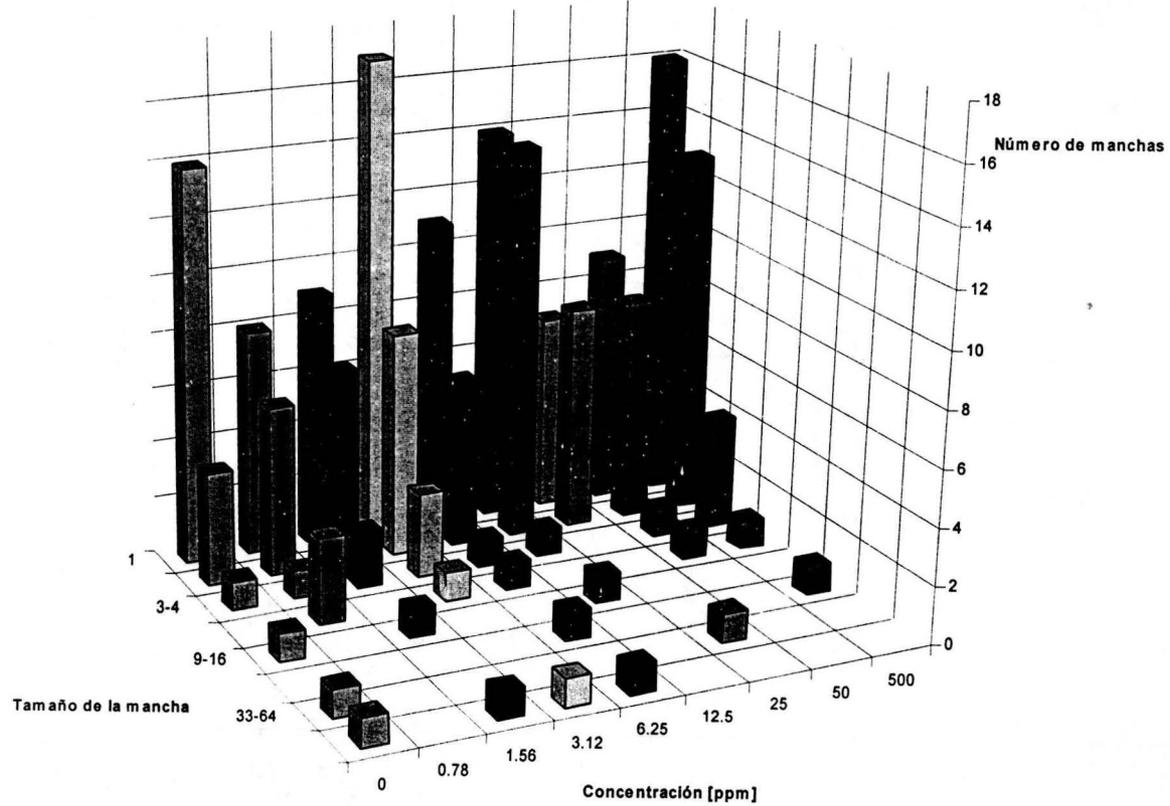


Tabla 3. Frecuencia de manchas / número de moscas obtenidas al tratar de forma aguda larvas de 72± 3h de edad de *Drosophila melanogaster* con extracto de *Equisetum myriochaetum*. Cruza HB.

[ppm]	# moscas	Frecuencia de manchas por mosca (# de manchas) ^a					Mancha / ala	
		chicas (1-2 células) m = 2.0	grandes (> 2 células) m = 5.0	gemelas m = 5	totales m = 2	tamaño promedio del clon	s/c	c/c
		control	60	0.25 (15)	0.05 (3)	0.01 (1)	0.31 (19)	2.11
0.78	60	0.36 (22) i	0.08 (5) i	0	0.45 (27) i	1.73	0.9	0.2
1.56	60	0.33 (20) i	0.05 (3) i	0	0.38 (23) i	2	0.8	0.1
3.12	60	0.23 (14) -	0.06 (4) i	0	0.3 (18) -	2.06	0.6	0
6.25	60	0.18 (11) -	0.03 (2) -	0	0.21 (13) -	2.08	0.4	-0.2
12.5	60	0.2 (12) -	0.01 (1) -	0	0.21 (13) -	1.62	0.4	-0.2
25	60	0.28 (17) i	0.01 (1) -	0	0.3 (18) -	1.56	0.6	0
50	60	0.4 (24) i	0.06 (4) i	0.01 (1) i	0.48 (29) i	1.79	1	0.3
500	60	0.25 (15) -	0.03 (2) -	0.03 (2) i	0.31 (19) -	1.89	0.6	0

(^a) Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1988 y 1995): + (positivo); - (negativo); i (inconcluyente); w+ (dóbil positivo); m = factor de multiplicación. Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.5$ y el ensayo estadístico de una cola.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Figura 17. Frecuencia inducida de manchas totales por extracto de *Equisetum myriochaetum* en el ensayo *mwh/flr* de *Drosophila melanogaster* en la cruz HB.

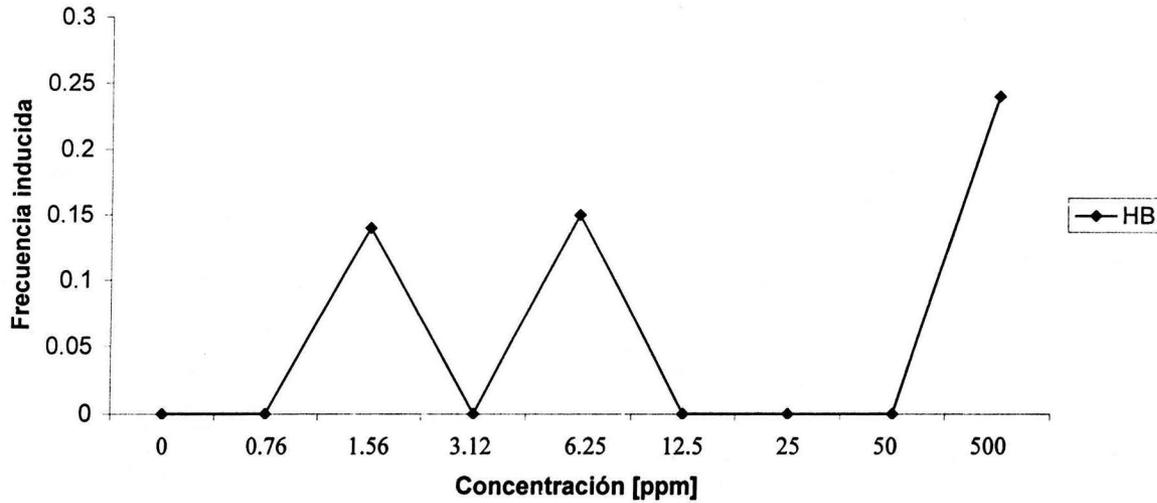


Figura 18. Distribución de manchas por tamaño, obtenidas al tratar de forma aguda a larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* con el extracto de *Equisetum myriochaetum*. Cruza ORR.

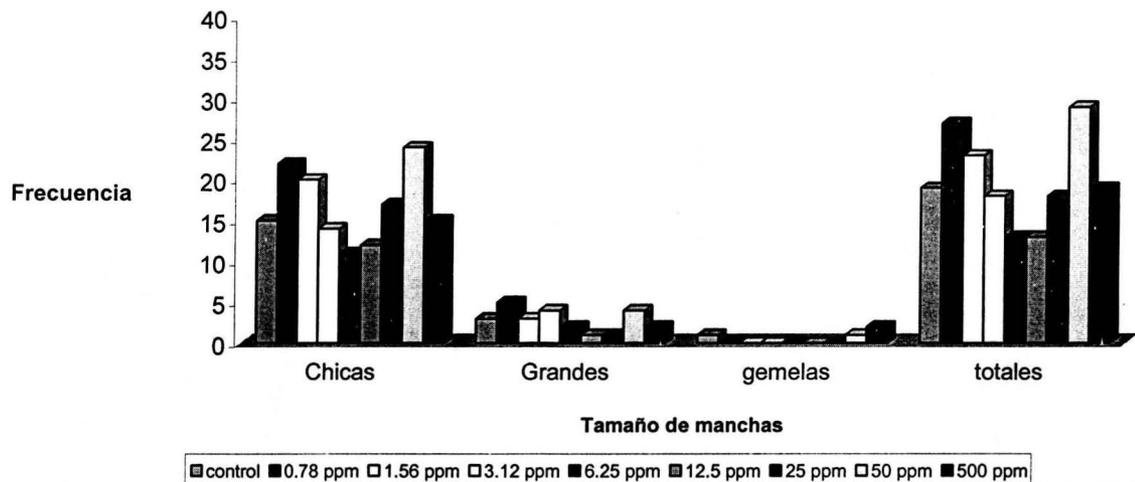


Figura 19. Número y tamaño de manchas simples obtenidas al tratar de forma aguda a larvas de tercer estadio con el extracto de *Equisetum myriochaetum* en *Drosophila melanogaster*. Cruza ORR.

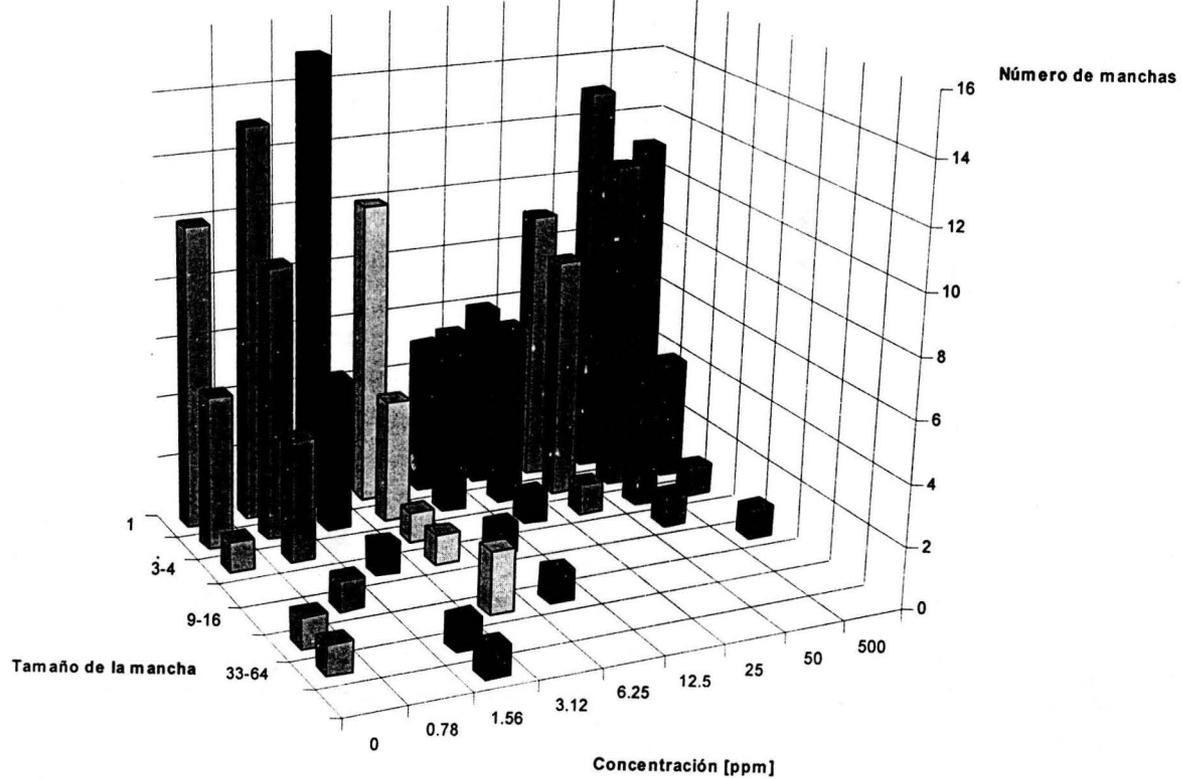


Figura 20. Frecuencia inducida de manchas totales por extracto de *Equisetum myriochaetum* en el ensayo *mwh/flr* de *Drosophila melanogaster* en las dos cruzas (ST y HB).

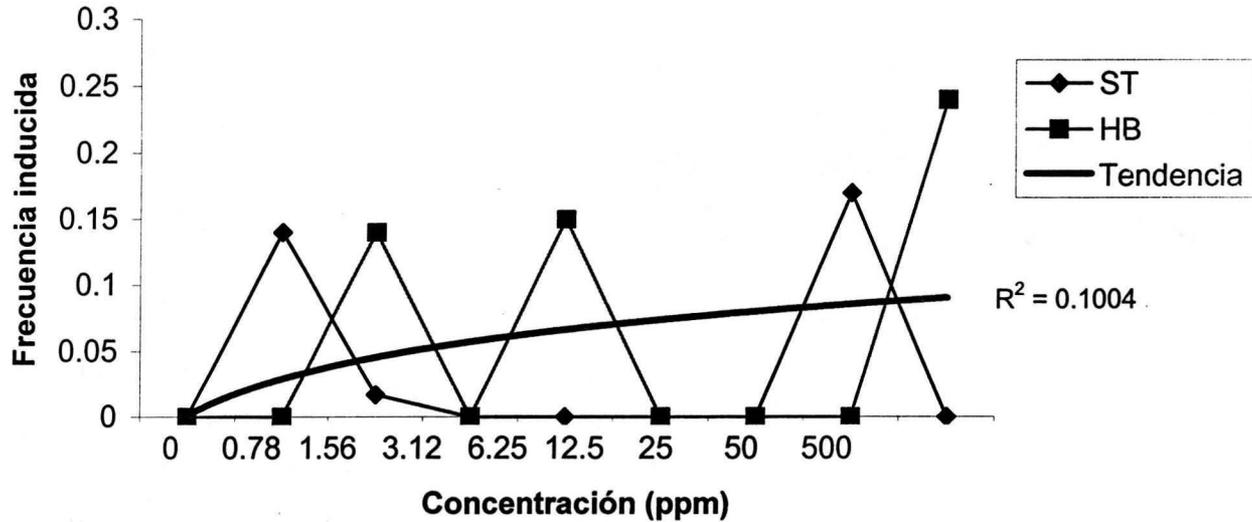


Tabla 4. Ensayo para evaluar el daño inducido por el extracto de *Equisetum myriochaetum* durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

[ppm]	# hembras	# machos	# moscas afectadas	Totales
control	294	307	--	601
0.78	323	424	--	747
1.56	291	403	1♂ y 1♀ segmento fusionado	694
3.12	170	163	--	333
6.25	236	272	1♀ segmento fusionado	508
12.5	413	385	--	798
25	404	433	--	837
50	177	197	--	374
500	207	219	--	426
Moscas totales				5318

Figura 21. Supervivencia de adultos de *Drosophila melanogaster* después de ser tratados con extractos de *E. myriochaetum* durante el desarrollo embrionario (Teratogénesis).

