



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE
CIENCIAS

Valoración de la inducción de micronúcleos
(MN) en linfocitos humanos *in vitro* por el
extracto fitoterapéutico de *Equisetum*
myriochaetum.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGO

P R E S E N T A:

GUILLERMO QUEVEDO OLIVARES



DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Ma. Guadalupe Ordaz Téllez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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:

"Valoración de la inducción de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos in vitro por el extracto fitoterapéutico de Equisetum myriochaetum."
realizado por Quevedo Olivares Guillermo

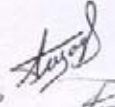
con número de cuenta 09621452-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

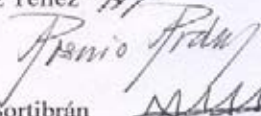
Atentamente

Director de Tesis

Propietario

M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez 


Propietario

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz 

Propietario

Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán 

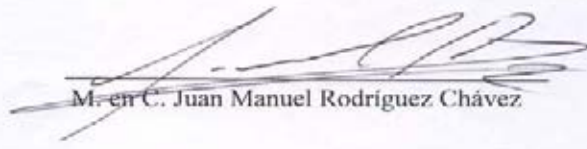
Suplente

Dr. Adolfo Andrade Cetto 

Suplente

M. en C. Angélica Graciela Martínez Hernández 

Consejo Departamental de Biología


M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Agradecimientos

Quiero extender el más sincero agradecimiento a mi directora de tesis M. en C. Ma. Guadalupe Ordaz Téllez por su excepcional asesoría y paciencia en la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán, Dr. Adolfo Andrade Cetto, M. en C. Angélica Graciela Martínez Hernández por sus valiosas observaciones a este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el privilegio de realizar mis estudios de bachillerato y licenciatura.

Dedicatoria

A mis padres por apoyarme incondicionalmente a lo largo de mi vida, por levantarme con mucho cariño y dedicación de un gran tropiezo y sobre todo por demostrarme muy a su manera mucho amor, mil gracias especialmente a ti mamá por ser el mayor ejemplo de mi vida y por ser la mamá más extraordinaria del universo...con todo mi corazón.....los amo...

A mamita por criarme con empeño y mucho cariño y por ser el pilar más grande que sostiene a nuestra familia.

A mis hermanos por consentirme y tolerarme tanto, en especial a Vicky por ayudarme en los momentos difíciles y por ser una de mis mejores amigas.....te quiero mucho

A mi princesa Vane por irradiar alegría, ternura y amor a nuestra familia, eres sin lugar a duda nuestro mas grande tesoro.....

A Eugin y a Tecui por haber compartido con ustedes grandes momentos de angustia y alegría, por ayudarme con todo lo que estuviera a su alcance y sobre todo por ser tan especiales en todos los sentidos....

A Carlotes y Balam por cultivar a lo largo de todo este tiempo nuestra amistad.....

A Edwin, Nash, Carlitos, Gaby, Luz, Dulce, Diana, Carmen, Hamlet, Irma, Nelia, Olga, Neto, Sara, David, Charcho, Yurik, Polínca, Susana, Liz, Mirsa, Fa y Esteban por ser de una u otra manera, importantes en mi vida ya que invariablemente tienen y tendrán un lugar muy especial en mi ser. A Nancy que como amiga siempre fue una excelente persona...

A mis primates Memo y Josetesokitl por ser amigos leales y por ser parte de los mejores recuerdos que hasta ahora tengo.

A mis compañeros de laboratorio Horacio, Víctor, Maju, Judith, Vare y Ruth por haber colocado su granito de arena en este trabajo y por ser tan buenos amigos.....

A Oscar, Ángela, Aphrania y Mariana por ser buenos amigos a pesar de no conocerlos tanto como quisiera.....

A Mireya por ser tan comprensiva, dulce y bella persona conmigo....

A Vane, mi muy querida mulita que a pesar de tus problemas en la cabeza....te aprecio mucho mucho y definitivamente tienes un gran lugar en mi corazón.....

A Mitzy por haberme enseñado muchas lecciones, aun ahora que ya no estas, por haber conocido gracias a ti lo que es amar y sobre todo por ser tan increíble persona, gracias por cada segundo que fuimos un solo ser.....

A Ale por escucharme y apapacharme en momentos de crisis y felicidad, por cada instante de su encantadora compañía, por esos bellos ojos que me embargan de alegría y sobre todo por dejarme entrar en tu vida.....

Finalmente gracias a todos ustedes y aquellas personas que de mi memoria escapan por ser cómplices de esta gran etapa

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen | 7 |
| Introducción | 8 |
| Antecedentes..... | 8 |
| Herbolaria, Etnofarmacología y Fitomedicamento..... | 9 |
| <i>Equisetum myriochaetum</i> Schldl. Cham. & Linnaea 1830..... | 12 |
| Taxonomía..... | 14 |
| Distribución Geográfica..... | 14 |
| Usos..... | 15 |
| Compuestos reportados de <i>Equisetum myriochaetum</i> | 16 |
| Flavonoides..... | 17 |
| Diabetes mellitus..... | 19 |
| Aberraciones cromosómicas..... | 23 |
| Células sanguíneas..... | 25 |
| Técnica de Micronúcleos..... | 27 |
| Justificación..... | 33 |
| Objetivo | 34 |
| Hipótesis | 35 |
| Materiales y Métodos | 36 |
| Criterios para el registro de células binucleadas..... | 36 |
| Población de estudio..... | 37 |
| Criterios de inclusión..... | 37 |
| Fitomedicamento..... | 37 |
| Obtención de la muestra..... | 39 |
| Siembra de linfocitos..... | 39 |
| Cosecha de linfocitos..... | 39 |

| | |
|--------------------------------|----|
| Preparación de laminillas..... | 40 |
| Resultados | 44 |
| Discusión | 50 |
| Conclusiones | 57 |
| Referencias | 55 |

Resumen

En nuestro país se tienen registradas alrededor de 306 especies de plantas que se emplean en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Entre las plantas medicinales que tienen importancia en el campo de la medicina tradicional se encuentra *Equisetum myriochaetum*. El ensayo de micronúcleos (MN) es hoy día uno de los ensayos citogenéticos *in vivo e in vitro* más reconocido en el campo de la toxicología genética, debido a que ha mostrado ser un biomarcador de exposición a xenobióticos muy sensible al daño inducido a nivel cromosómico. El propósito de este trabajo fue el de valorar la inducción de micronúcleos en linfocitos humanos *in vitro* por el extracto fitoterapéutico de *Equisetum myriochaetum*. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de cuatro donadores sanos. Se analizaron 1000 células binucleadas y se cuantificó el número de micronúcleos (0,1, 2, 3, 4, 5 >6) por célula; se contó el número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tretranucleadas, y con más de 5 núcleos, presentes en las preparaciones. Los resultados muestran que el incremento en la frecuencia de micronúcleos en los grupos tratados no fue estadísticamente significativo al compararlos con los testigos concurrentes por lo que el extracto de *Equisetum myriochaetum* no mostró producir un efecto genotóxico.

Introducción

Antecedentes

El hombre desde sus orígenes ha hecho uso de las plantas medicinales, las cuales se definen como; todas aquellas que contienen en algunas de sus partes principios activos que en determinadas dosis producen efectos curativos (Jin-Ming *et al.* 2003).

Diferentes civilizaciones a través del tiempo han reportado el uso de estas plantas para el tratamiento de diferentes padecimientos (Tabla I), pero la evidencia más antigua de asociación hombre-planta se encontró en la cueva de un hombre de Neandertal, que existió hace 60,000 años, en la que sus restos fueron descubiertos junto con numerosas plantas que han demostrado tener valor medicinal mediante estudios palinológicos (Jin-Ming *et al.* 2003).

Tabla I. Civilizaciones antiguas que han reportado la utilización de plantas medicinales. Tomado de Jin-Ming *et al.* 2003.

| Manuscrito | Antigüedad | Plantas |
|--|------------|--|
| La Tablilla de arcilla de los sumerios | 4,000 años | La casia, el mirto, la asafétida y el tomillo |
| El papiro de Ebers de los Egipcios | 3,500 años | La mirra, el cáñamo, el opio, el aloe y la cicuta. |
| El Punt tsao, de China | 3,600 años | Diferentes orquídeas como <i>Bletilla striata</i> |

El pueblo de México tiene una gran tradición en el uso de plantas medicinales, este hecho data desde los antiguos pobladores del Valle de México (Hernández, 1976; Lozoya, 1999). Uno de muchos ejemplos lo encontramos en las cuevas de Tehuacan, Puebla donde se ha encontrado evidencia arqueológica directa por la presencia de botones florales de *Plumeria rubra* variedad acatifolia (flor de mayo) y las semillas de *Thevetia peruviana* (venenillo) las cuales además de utilizarse en un contexto ceremonial fueron empleadas para sanar diversos padecimientos (Bye y Linares, 1999).

El escrito más antiguo e importante de la sabiduría prehispánica en materia de medicina y botánica es el llamado "Amate-Cehuatl-Xihuitl-Pitli" y fue escrito en 1552. En la actualidad también se conoce como Códice de la Cruz-Badiano, Códice Barberini, Códex Barberianus, Códice Herbario o Manuscrito Martín de la Cruz. El

libro es un recetario destinado a la curación de determinados padecimientos, para los cuales se recomiendan principalmente plantas de fácil localización en la geografía mexicana. Es más que un simple herbario, puesto que cuenta con



numerosos señalamientos de indudable trascendencia médica, como la fórmula de aplicación de las plantas según el tipo de enfermedad. Se agrupan las enfermedades conforme a un orden anatómico: de la cabeza a los pies y en cada capítulo se proporciona la receta indígena (los ingredientes y en algunos casos las cantidades de éstos) para preparar el remedio y la forma de usarlo (Fig.1) (Lozoya, 1999).

Figura 1. Portada del Códice de la Cruz-Badiano. Tomado de Lozoya, 1999.

Herbolaria, Etnofarmacología y Fitomedicamento

a) La herbolaria como se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, continúa vigente y tiene gran arraigo en nuestro país. Estas plantas medicinales constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de poblaciones, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas públicos para la salud (Betancourt, 2001).

El conocimiento empírico de las plantas medicinales y sus potenciales tóxicos, fue transmitido por tradición oral y eventualmente anotado en textos o manuscritos médicos, por lo que muchas drogas usadas hoy en día llegaron a través del estudio de la medicina tradicional (Mann, 1987).

b) La etnofarmacología es definida como la exploración interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos que son empleados en la medicina tradicional (Holmstedt, 1991; Lozoya, 1992), su objetivo es documentar y validar la herencia

cultural de esta práctica, así como también buscar nuevas alternativas medicinales a través de un camino experimental que en el mejor de los casos concluye con el aislamiento de un compuesto activo para la posterior elaboración de un nuevo medicamento (Lozoya, 1992).

En 1997 Cragg realizó un análisis de medicinas aprobadas en un periodo de 10 años (1983- 1992) por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos y se encontró que 157 de los 520 medicamentos (30%) autorizados para salir al mercado eran productos naturales o sus derivados (Cragg *et al.* 1997; Jin-Ming *et al.* 2003).

En Europa del Este, el mercado de la fitoterapia generó dos mil millones de dólares en 1989. El comercio de plantas utilizadas dentro de Europa para la medicina no convencional se incrementó del 15% al 20% por año con un importante valor de 4 mil millones de dólares en 1995. Hoy en día el 30% de los medicamentos más vendidos en el mundo corresponden a productos naturales (Jin-Ming *et al.* 2003).

Entre los fármacos reportados por la medicina tradicional que se utilizan en la actualidad encontramos: la efedrina usada en problemas respiratorios; el aceite de ricino que posee propiedades purgantes; la salicína, ácido acetil salicílico, principal componente de la aspirina, usada como analgésico, antipitético, etc. También es importante mencionar los compuestos aislados de plantas (no reportados por la medicina tradicional) a los que se les ha encontrado acción farmacológica importante, como los alcaloides vinblastina y vincristina obtenidos de *Catharantus roseus*, utilizados ampliamente en la quimioterapia del cáncer; la diosgenina, a partir de la cual se desarrollaron los anticonceptivos orales (Mann, 1987). La colchicina obtenida del colchico (*Colchicum autumnale*) utilizada entre otras cosas, como inhibidor mitótico ya que disminuye la formación o el crecimiento de tumores. El podofilo (*Podophylum hexandrum*), utilizado desde hace más de 2000 años por los chinos como fármaco antitumoral. En ensayos clínicos, dos derivados semisintéticos de esta planta se usan frecuentemente en el tratamiento del cáncer de pulmón y del testicular (Trease y Evans, 1987).

Los extractos crudos de la corteza del Tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) se han utilizado por su acción inhibitoria contra una gran variedad de tumores en ratones; por lo que se aisló el principio activo de la corteza de esta planta un pseudoalcaloide diterpénico llamado Taxol. El uso clínico del Taxol fue aprobado en 1995 por la FDA (Taxol, 2002).

Actualmente, se han registrado en nuestro país alrededor de 5,000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total), este número coincide con lo informado en varias regiones del mundo por especialistas en la materia, quienes consideran que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, la validación química farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en aproximadamente 5% de estas especies (Betancourt, 2001).

Dentro de la literatura referente a la medicina tradicional mexicana se citan 306 especies de 235 géneros y 93 familias, cuyo uso se ha reportado como hipoglucemiante, aunque se estima que alrededor de 500 especies son usadas en México como fitomedicamento contra el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, pese a que muy pocas de éstas han sido estudiadas bajo condiciones experimentales (Andrade-Cetto, 2005). El concepto de fitomedicamento que se encuentra en la Farmacopea Europea del año 2000 se refiere a la planta completa o parte de la planta sin procesar para que todos sus compuestos trabajen de forma sinérgica y puedan ejercer una actividad biológica (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

A partir de los años 1990, se hicieron los primeros estudios farmacológicos para determinar el efecto hipoglucemiante de algunas plantas en ratones hiperglucémicos los que permitieron probar su actividad farmacológica. En el caso de *Psacalium sp.* se logró realizar un reporte farmacológico y fitoquímico de algunos compuestos (Alarcón-Aguilar *et al.* 1997, 1998, 2000a, 2000b, 2002a, 2002b; Román-Ramos *et al.* 1991, 2001). Más adelante, el grupo de Andrade – Cetto estudio el extracto acuoso en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina donde se observó con una sola administración oral una

significativa reducción de glucosa en sangre, es decir mostró un efecto hipoglucemiante (Andrade-Cetto *et al.* 2000).

Hoy en día, en Alemania encontramos dos productos para el tratamiento de la diabetes basados en plantas medicinales mexicanas, por un lado Hando-Nopal extraído de *Opuntia sp.* y manufacturado por Hando Austria y el Sucontral elaborado a partir del Coplachi (*Hintonia sp.*) y manufacturado por HARRAS Pharma, Munich (Andrade-Cetto, 2005).

Debido a que las plantas son la principal fuente de nuevos productos para el tratamiento de algunas enfermedades y a que más del 64% de la población mexicana sigue haciendo uso de la medicina tradicional; es de gran importancia los estudios en los que se analice la propiedad farmacológica y genotóxica del fitomedicamento o se aísle su principio activo, ya que esto beneficia tanto a las comunidades rurales como a la sociedad en general (Lozoya, 1992).

Entre las plantas medicinales que tienen importancia en el campo de la medicina encontramos a la especie *Equisetum myriochaetum* de la cual se han reportado propiedades medicinales para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 ver tabla de plantas hipoglucemiantes en Andrade-Cetto, 2005.

***Equisetum myriochaetum* Schidl. Cham. & Linnaea, 1830 tomado de Palacios-Rios, 1998**

En 1886 Francisco del Paso y Troncoso describe a un *Equisetum* llamado comúnmente "acatzanaícxitl" o "pie de tordo", como una planta que tiene tallos verticilados, constituidos por entre nudos articulados, que los indígenas lo asemejaban con las falanges articuladas de la pata de dicha ave (Valdés y Flores, 1985). Actualmente se le conoce popularmente con el nombre de cola de caballo. Es una planta terrestre de tallos aéreos romo o puntiagudo de 2–5 m (hasta 8 m) de alto, con verticilos regulares de ramas de 2-23 mm de diámetro, acanalado con 16 a 48 canales; vainas del tallo con un radio de 11.5 mm, 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, los 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; estróbilos del tallo de hasta 12 mm de diámetro; estróbilos de las ramas de 10 mm de largo y 4 mm de diámetro (Fig.2) (Palacios-Rios, 1998).

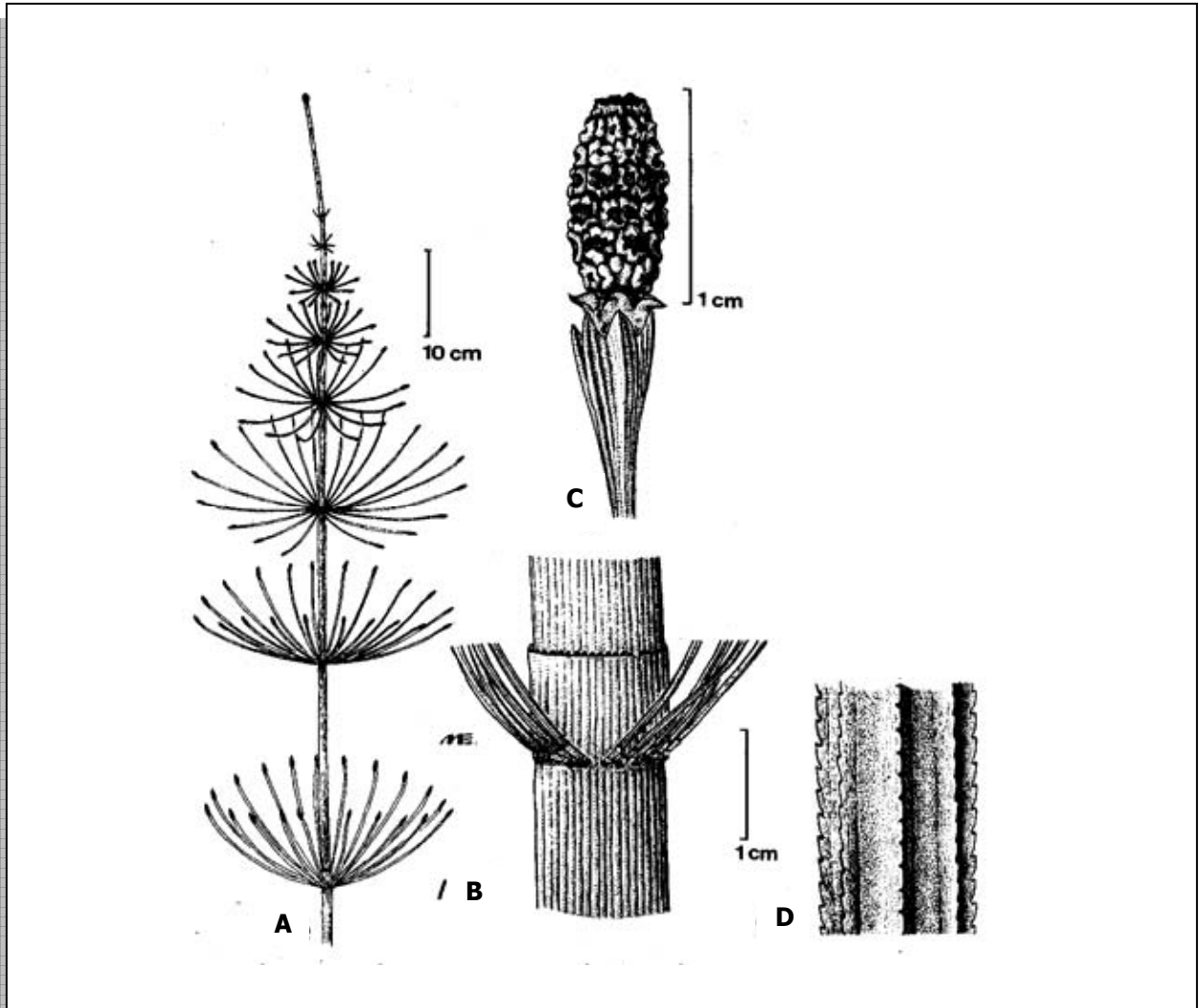


Figura 2.- *Equisetum myriochaetum*; **A)** hábito **B)** detalle de la vaina **C)** detalle del estróbilo **D)** detalle de los últimos ejes. Tomado de Palacios-Rios, 1992.

Taxonomía



Phyla: Pteridophyta

Clase: Articulatae

Orden: Equisetales

Familia: Equisetaceae

Género: *Equisetum*

Especie: *Equisetum myriochaetum*

Tomado de Trease y Evans, 1991.

Distribución Geográfica

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 *Equisetum 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 (Fig. 3) (Palacios- Rios, 1992).

Se encuentra en cañadas, orillas de arroyos, en terrenos arenosos y húmedos o 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 sobre el nivel del mar (Palacios–Rios, 1998).



Figura 3. Distribución de *Equisetum myriochaetum* en la República Mexicana ■

Usos

Equisetum myriochaetum es empleado tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades del riñón (Argueta, 1994), como diurético y antiséptico urinario (Palacios – Rios, 1992). Andrade Cetto y colaboradores en 1999 utilizaron el extracto acuoso y butanólico de las partes aéreas de *E. myriochaetum* para administrarlo a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y reportaron una significativa reducción de glucosa en sangre con una sola administración oral. En otro estudio se utilizó el extracto acuoso de las partes aéreas de *E. myriochaetum* (0.33g/Kg) y se administró a 11 pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2. Se determinaron niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en diferentes tiempos 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la administración del extracto. Los resultados mostraron que *E. myriochaetum* tiene efecto hipoglucemiante en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 después de 90 minutos de su administración (Revilla *et al.* 2002).

Compuestos reportados de *Equisetum myriochaetum*

El valor de las plantas medicinales está dado por sus constituyentes químicos, generalmente sus metabolitos secundarios son responsables de los efectos fisiológicos que producen. Los alcaloides, terpenoides, glicosidos, flavonoides y lignanos son algunas de las familias de compuestos con actividad biológica demostrada (Fitoterapia, 2001).

Desde el punto de vista fitoquímico, varias especies del género han sido investigadas y la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha describen el aislamiento y caracterización de flavonoides y alcaloides como los principales metabolitos secundarios. Sin embargo, dentro de estas variedades de equisetos encontramos a *Equisetum heleocharis*, que es más grande que *Equisetum myriochaetum* y contiene equisetina, un alcaloide reportado como venenoso (Palacios-Rios, 1998).

Los compuestos reportados para *Equisetum myriochaetum* son: dos flavonoides: la pinocembrina (5,7- dihidroxiflavonona) y la crisina (5,7 – dihidroxiflavona); dos esteroides: β - sitosterol y el β - D- glucositol; un carbohidrato: la β - D- glucopiranososa, una β -D-glucosa y ocho ácidos grasos identificados como laúrico, mirístico, pentadecanóico, palmítico, margárico, esteárico, behénico y lignocérico (Chávez, 1991; Camacho *et al.* 1992). En un estudio realizado por Wiedenfeld se encontraron glucoflavonoides en el extracto activo de las partes aéreas de *Equisetum myriochaetum* como: el campferol-3-O-sofósido, campferol-3,7-di-O- β -glucósido, campferol- 3-O-soforósido-4'-O- β -glucósido y el precursor caffeoyl-metil-ato-4'-O- β -glucopiranosido (Fig.4) (Wiedenfeld *et al.* 2000).

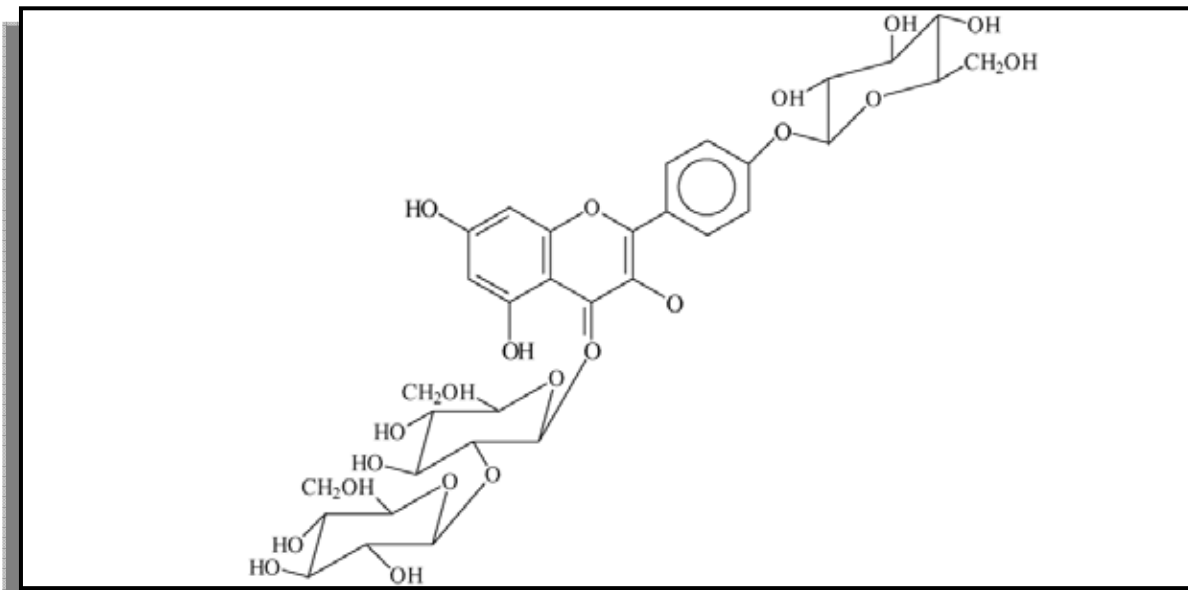


Figura 4. Compuesto reportado para *Equisetum myriochaetum*. Tomado de Wiedenfeld *et al.* 2000.

Flavonoides

Los flavonoides fueron descubiertos en 1930 por Szent - Gyorgy, quien aisló un compuesto de la cáscara del limón llamado citrina, el cual regula la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C₂ debido a que se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C. Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Martinez-Flórez *et al.* 2002).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías (Martinez-Flórez *et al.* 2002).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como

enzimas, transportadores de hormonas y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombóticas y antiinflamatorias (Martinez-Flórez *et al.* 2002).

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. En diversos flavonoides se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas (Hirano *et al.* 2001; Terao *et al.* 2001). De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (Geleijnse *et al.* 2002; Hertog *et al.* 1996).

Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de desintoxicación tales como las monoxigenasas dependientes de citocromo P- 450, entre otras (Stahl *et al.* 2002).

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. Existen más de 4,000 flavonoides, 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 (Fig. 5) (Martinez-Flórez *et al.* 2002).

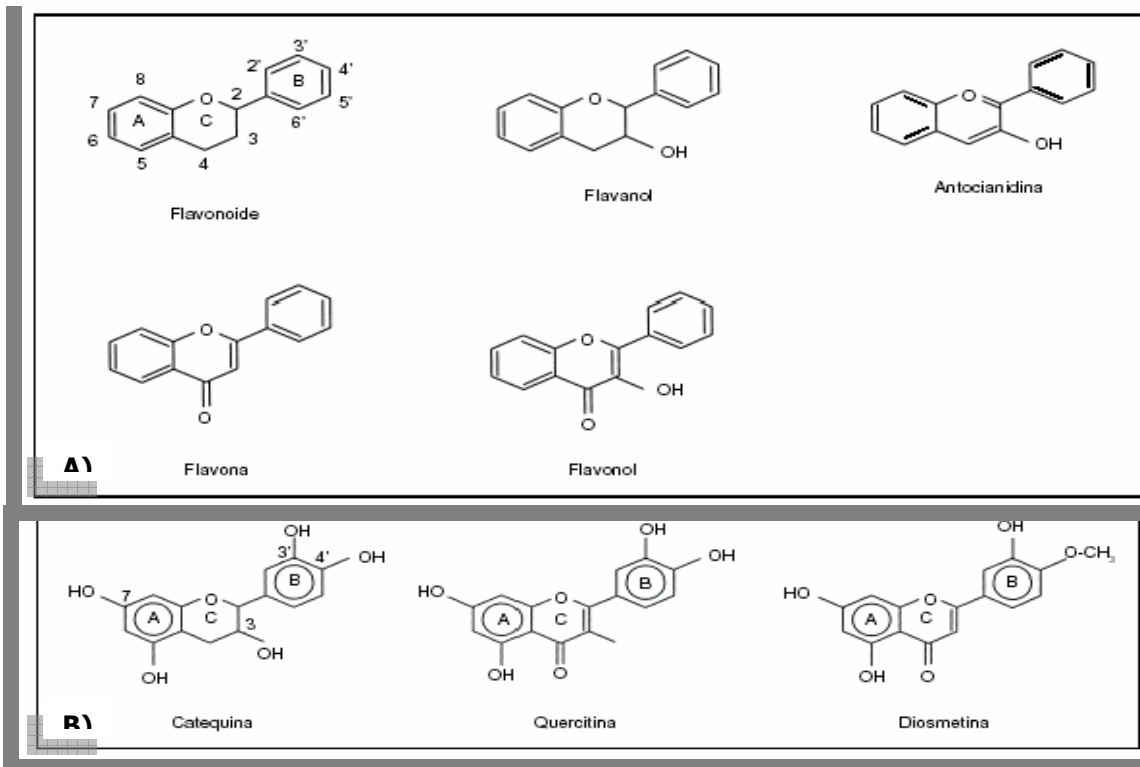


Figura 5.- **A)** Estructuras básicas y tipos de flavonoides. **B)** Características estructurales de los principales tipos de flavonoides. Tomado de Martínez-Flórez *et al.* 2002.

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es el desorden endocrino más común en la medicina, afecta a más de 176 millones de personas en el mundo de acuerdo con la OMS (WHO, 2005).

Esta enfermedad es un grupo heterogéneo de alteraciones caracterizadas por el aumento de glucosa en sangre (>15mmol/l) o hiperglucemia crónica asociada a una acción inadecuada de la insulina que es acompañada por una variedad de alteraciones bioquímicas y manifestaciones clínicas. 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. En condiciones normales la digestión de los alimentos

eleva la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo, lo cual estimula a las células β localizadas en el páncreas a segregar insulina que es la hormona responsable de controlar la concentración de glucosa en la sangre al facilitar la entrada de glucosa a todas las células del organismo (células blanco) (ADA, 2006).

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, es caracterizada por complicaciones microangiopáticas, en especial renales y oculares, así como macroangiopáticas con afección a las arterias coronarias, enfermedades vasculares periféricas y neuropatías (Fig.6) (Islas y Revilla, 1999).

De acuerdo con la Asociación Americana de la diabetes (ADA por sus siglas en inglés), la diabetes se divide actualmente en dos tipos: (ADA, 2006)

Diabetes tipo 1. Es también conocida como juvenil, en este tipo de diabetes el sistema inmune destruye las células que secretan la insulina (células β), por lo que es necesario inyectar esta importante hormona para el metabolismo.

Diabetes tipo 2. Es también conocida como Diabetes mellitus no insulina dependiente (DMNI) y es el tipo más común de diabetes. Resulta de la incapacidad de las células blanco en los diferentes tejidos del cuerpo de responder a la acción de la insulina ocasionando que el nivel de glucosa en sangre se mantenga alto, lo que induce a su vez a que las células β pancreáticas secreten insulina constantemente hasta que estas células dejan de producirla. Este tipo de diabetes representa aproximadamente del 90 al 95% de los casos de diabetes en el mundo y se encuentra más frecuentemente en adultos.

Clínicamente, la diabetes tipo 2 se caracteriza por:

- Alta frecuencia familiar (factores genéticos).
- Aparición relativamente tardía en el paciente.
- Asociada con obesidad e hipertensión arterial.
- Desarrollo lento de secuelas en comparación con la diabetes dependiente de insulina.
- Gran cantidad de cuerpos cetónicos en sangre y orina.
- Hiperglucemia severa ($> 15\text{mmol/l}$).

- Deshidratación y trastornos neurológicos.

Se ha encontrado que la predisposición para desarrollar diabetes mellitus tipo 2, varía entre grupos étnicos o poblaciones, estilos de vida y carga genética mientras que la edad promedio de aparición de la enfermedad esta entre los 45 y 75 años. En la actualidad se sabe que la diabetes mellitus tipo 2 resulta del efecto combinado de:

- a) Resistencia a la insulina.
- b) Disminución en la secreción de la insulina por el páncreas.
- c) Efecto de anticuerpos anti-insulina (WHO, 2005).

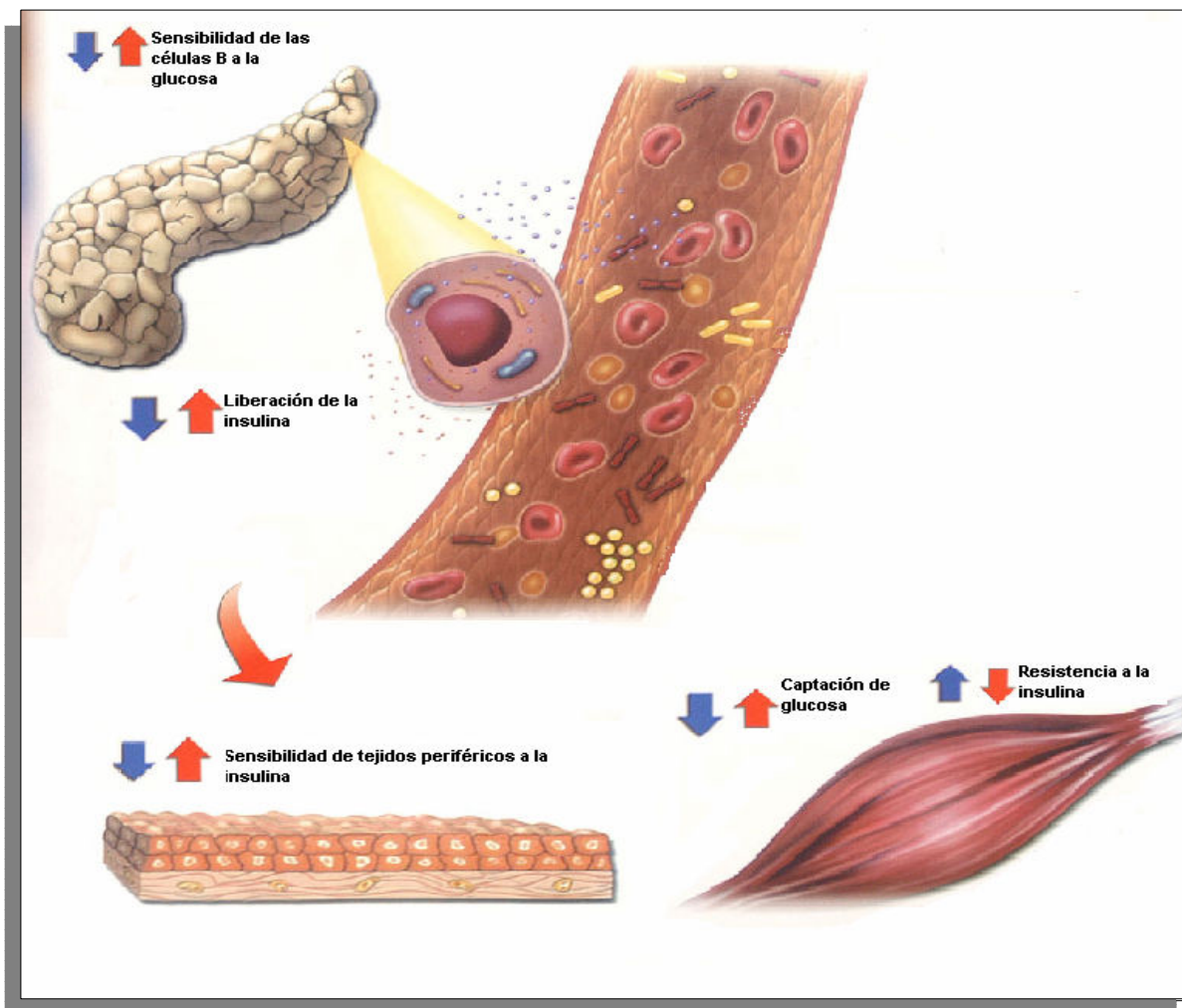


Figura 6. Esquema general de la diabetes.  Sin Diabetes mellitus  Con Diabetes mellitus. Modificado de WHO (1998).

Respecto a la resistencia a la insulina, se puede definir como la disminución en la capacidad de la insulina para llevar a cabo sus efectos fisiológicos debido a que los tejidos no responden a los estímulos de la hormona. Para que la insulina inicie sus acciones se requiere obligatoriamente que se una a un receptor. La unión de la insulina con el receptor activa diversos procesos químicos que llevan a las acciones de la misma tales como la incorporación de glucosa al interior de las células, su almacenamiento (formación de glucógeno), utilización de la glucosa en la producción de energía y la formación de grasas (triglicéridos y proteínas) por mencionar solo algunos efectos. Hasta el momento la evidencia científica indica que la resistencia a la insulina es una condición heredada y constituye el defecto primario en esta diabetes mellitus tipo 2 (Pérez-Pastent, 1997). La participación de factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad parece indudable, se ha tratado de asociar al cromosoma 11, donde está el gen que codifica para la insulina, éste se encuentra en el brazo corto del cromosoma y está formado por 1,355 pares de bases (Islas y Miranda, 1993).

Por otro lado la disminución en la secreción de la insulina por el páncreas es ocasionada por una respuesta insuficiente de las células β ante los niveles específicos de glucosa, lo que sugiere que este evento puede propiciarse de manera secundaria por la misma hiperglucemia causada inicialmente por resistencia a la insulina, debido a un efecto tóxico de la glucosa sobre las células insulares (WHO, 2005).

Se han identificado anticuerpos contra la insulina y anticuerpos contra una proteína presente en las células β llamada glutamato descarboxilasa. Debido a la resistencia periférica a la acción de la insulina, la hiperglucemia se mantiene, lo que estimula a una mayor secreción de insulina y por lo tanto más insulina libre, que a su vez tiene como consecuencia la formación de los anticuerpos anti-insulina que ocasionan la destrucción de las células β (WHO, 2005).

Las principales complicaciones tardías de la diabetes mellitus tipo 2 son:

- I. Retinopatía diabética (Complicaciones de los ojos).
- II. Nefropatía diabética (Complicaciones en los riñones).
- III. Neuropatía diabética (Daño en nervios periféricos).

IV. Pie diabético (Infecciones, úlcera plantar y gangrena diabética).

V. La macroangiopatía (Lesión en los vasos sanguíneos grandes) (Pérez, 1997).

La diabetes mellitus tipo 2 ocupa el tercer sitio como problema de salud a escala mundial y cuarto lugar en el ámbito nacional. La organización mundial de la salud estimó que en 1995 había 135 millones de adultos diabéticos en el mundo (WHO, 1998) y para el año 2005 se calculó un número de 300 millones de adultos diabéticos en el planeta, esto implica un incremento del 20% en el número de casos, de este porcentaje el 30% se encuentra en los países desarrollados y un 70% en los países en vías de desarrollo (S.S.A., 2004).

La OMS estima que en México, el número de pacientes diabéticos se incrementará de más de 2 millones en el 2002 a más de 6 millones en el 2030, lo que significa que en pocas décadas, México podría tener el más alto índice de diabetes en el mundo (WHO, 2005). Para el 2001 la Secretaría de Salud informó que la diabetes mellitus tipo 2 es la primera causa de mortandad en el país. El IMSS estima que por cada paciente con diagnóstico existe uno sin él, por lo que el número de diabéticos en México podría ser cercano a los 8 millones de personas (S.S.A., 2004).

Aberraciones cromosómicas

Las aberraciones cromosómicas pueden producirse de manera espontánea, o bien, ser inducidas por agentes físicos o químicos. La inducción experimental de aberraciones cromosómicas ha sido una herramienta importante para el estudio de los cambios que se generan de manera espontánea. Cada organismo tiene su propia tasa de cambios cromosómicos espontáneos, la cual está determinada por factores intrínsecos y extrínsecos, como son la estabilidad genómica, la edad, la nutrición, los factores ambientales como la temperatura y la humedad, entre otros. Los agentes físicos y químicos (agentes clastógenos) inducen rupturas en los cromosomas, que pueden resultar en la ganancia, la pérdida o bien en rearreglos de segmentos cromosómicos (Miller y Therman, 2001).

Los agentes clastógenos físicos son las radiaciones, las cuales se dividen en:

Radiaciones ionizantes: son todas aquellas capaces de tomar electrones de los átomos que forman los materiales por los que atraviesan. Los efectos citogenéticos producidos por las radiaciones ionizantes es la disminución de la actividad mitótica, alteraciones en la estructura de los cromosomas y condensación de los cromosomas en metafase y anafase (Miller y Therman, 2001).

Radiaciones no ionizantes: son aquellas cuya energía no es suficiente para tomar electrones de los átomos que se encuentran en su trayectoria. Sin embargo, al transferir su energía llevan a los átomos y moléculas a un estado de excitación mayor en el que se favorece la disociación y/o formación de enlaces químicos, por ejemplo la radiación ultravioleta (UV) (Miller y Therman, 2001). En la Tabla II se muestran los principales agentes clastogénicos químicos.

Tabla II. Principales agentes químicos clastogénicos. Tomado de Miller y Therman (2001).

| | |
|--|---|
| Agentes alquilantes (ej. Mostazas nitrogenadas y de azufre, metil y etil metanosulfonato, nitrosoguanidina). | Disolventes orgánicos industriales (ej. Benceno, tolueno, tíner). |
| Agentes intercalantes (ej. Proflavina, naranja de acridina, mostaza de quinacrina, rojo neutro) | Compuestos nitrosados (ej. ácido nitroso). |
| Análogos de purinas y pirimidinas (ej. 2-aminopurina, 5-bromouracilo). | Metales (ej. arsénico, cromo). Alquil epóxidos. |

El estudio de las aberraciones cromosómicas inducidas por agentes físicos y químicos tiene un significado biológico importante, que se puede resumir en los siguientes puntos:

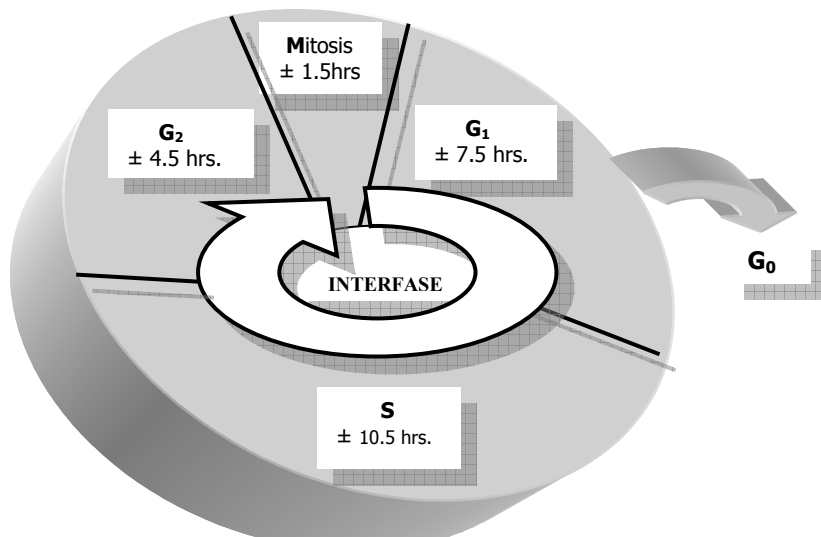
- a) La presencia de aberraciones cromosómicas estructurales constituye un indicador de exposición a agentes genotóxicos, los cuales pueden estar en el ambiente o bien tratarse de una exposición ocupacional médica. De esta manera se puede desarrollar una estrategia de control biológico e incluso, la legislación pertinente para el control de la exposición, si es el caso (Russell, 1998).
- b) En células somáticas, la presencia de aberraciones cromosómicas tiene un papel importante en la etiología y en la progresión del cáncer. Los

síndromes de inestabilidad cromosómica predisponen a ciertos tipos de cáncer, tales como el Síndrome de Bloom, la ataxia telangectasia, y la anemia de Fanconi (Russell, 1998).

- c) Aproximadamente el 50% de los abortos espontáneos en los seres humanos presentan aberraciones cromosómicas estructurales (Russell, 1998).
- d) En casi todos los cultivos celulares, así como en las personas, en especial de mayor edad, existen rupturas cromosómicas espontáneas y rearrreglos de origen indeterminado. Los efectos de los rayos cósmicos, la exposición médica u ocupacional a la radiación, el consumo de fármacos, el acortamiento progresivo de los telómeros, infecciones virales o incluso las fiebres altas pueden contribuir al incremento de las rupturas cromosómicas en edad avanzada (Russell, 1998).

Células sanguíneas

La sangre presenta muchos tipos celulares con funciones muy diversas, que abarcan desde el transporte de oxígeno hasta la producción de anticuerpos. Algunas de estas funciones celulares tienen lugar enteramente en el sistema vascular, mientras otras utilizan dicho sistema vascular sólo como medio de



transporte y llevan a cabo su función en otro lugar. Sin embargo, todas las células sanguíneas presentan similitudes en su ciclo vital (Fig. 7). Todas ellas tienen una duración limitada y se reproducen de forma continua a lo largo de la vida animal. La característica más

Figura 7. Ciclo celular de linfocitos *in vitro*. Tomado de Alberts (1996).

notable, sin embargo, es que todas ellas se generan en último término a partir de una célula madre común de la médula ósea. Esta célula madre hematopoyética (o formadora de sangre) es, por tanto, pluripotencial, ya que da lugar a los distintos tipos de células sanguíneas diferenciadas que se dividen profusamente bajo la influencia de varias moléculas proteicas y posteriormente se diferencian en células sanguíneas adultas, las que generalmente mueren al cabo de unos cuantos días o semanas (Alberts, 1996).

Las células sanguíneas se pueden clasificar en glóbulos rojos y glóbulos blancos. Los glóbulos rojos, o eritrocitos, permanecen en el interior de los vasos sanguíneos transportando O_2 y CO_2 permaneciendo unidos a la hemoglobina. Los glóbulos blancos, o leucocitos, combaten las infecciones y, en algunos casos, fagocitan y digieren sustancias residuales. Tradicionalmente las células sanguíneas se agrupan en tres grandes categorías con base en su aspecto bajo el microscopio óptico, estas son: granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos y linfocitos; estos últimos regulan a los dos tipos principales de respuestas inmunitarias, las células T que se originan en el timo y son responsables de la inmunidad mediada por células, y las células B, que en los adultos se originan en la médula ósea (Tabla III) (Alberts, 1996).

Tabla III. Células sanguíneas. Tomado de Alberts (1996).

| Tipo celular | Funciones Principales | Concentraciones en sangre humana (células/litro) |
|--|---|---|
| Glóbulos rojos Eritrocitos | Transportan O ₂ y CO ₂ | 5x10 ¹² |
| Glóbulos blancos (leucocitos) Granulocitos Neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares) | Fagocitan y destruyen bacterias invasoras | 5x10 ⁹ |
| Eosinófilos | Destruyen parásitos y modulan respuestas inflamatorias de tipo alérgico | 2x10 ⁸ |
| Basófilos | Liberan histamina y serotonina en ciertas reacciones inmunitarias | 4x10 ⁷ |
| Monocitos | Macrófagos de microorganismos invasores y células viejas en tejidos | 4x10 ⁸ |
| Linfocitos Células B | Fabrican anticuerpos | 2x10 ⁹ |
| Células T | Matan células infectadas por virus y regulan la actividad de otros leucocitos | 1x10 ⁹ |
| Células asesinas(células NK) | Matan células infectadas por virus y algunas células tumorales. | 1x10 ⁸ |
| Plaquetas | Inician proceso de coagulación | 3x10 ¹¹ |

Técnica de Micronúcleos

Durante los años de 1930 y 1940 diferentes investigadores describieron la aparición de micronúcleos después de una exposición a rayos X en algunos tipos celulares como: neuroblastos de saltamontes, meristemos de la raíz de la cebolla y granos de polen de *Tradescantia*. También se demostraron los efectos mutagénicos de la radiación en *Drosophila* y en el maíz (Fenech et al. 1999b). En 1973 Heddle propuso la medición de micronúcleos (MN) como una alternativa y un acercamiento simple para evaluar el daño cromosómico in vivo, este

evento fue también conocido por los hematólogos como cuerpos de Howell – Jolly por haber poblaciones celulares en división como en la medula ósea. Posteriormente se demostró que la prueba de micronúcleos es efectiva para detectar daño cromosómico en linfocitos en sangre periférica de humanos *in vitro* (Fenech *et al.* 1999b).

Uno de los primeros problemas con el análisis de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica de humanos, fue la fragilidad de las células durante la preparación, las cuales sufrían desplazamiento del micronúcleo de la células en donde se habían originado. Este problema se solucionó empleando una solución hipotónica modificada que permitía preservar al citoplasma junto con su micronúcleo dentro de la membrana celular (Fenech *et al.* 1999b).

Era entonces evidente, que el ensayo no podía ser usado eficientemente o cuantitativamente en poblaciones celulares que no estuvieran en división o en poblaciones celulares en división, donde no se entendiera o controlara la cinética de la división celular debido a que las células se dividen en diferentes proporciones tanto *in vivo* como *in vitro* dependiendo de las condiciones fisiológicas, genéticas y de micronutrientes. Consecuentemente, había una necesidad para desarrollar un método en donde se pudiera distinguir entre células que no estuvieran en división de aquellas células que entraran a mitosis dentro de una población celular. Y más aún, debido a la inseguridad del destino de los MN que siguen más de una división nuclear, era importante identificar células que han completado solo una división nuclear(Fenech *et al.* 1999b).

Muchos métodos habían sido propuestos para resolver este problema, pero el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN) fue el más reconocido debido a que esta prueba puede arrojar datos confiables si se escogen MN que estén en células que hayan completado una división nuclear por medio del bloqueo de la citocinesis usando citocalacina B (Cy t- B), la cual detiene la división del citoplasma (o citocinesis) sin inhibición de la división nuclear, lo que permite a tales células ser reconocidas como células binucleadas (Fig. 8) (Fenech *et al.* 1999b).

La Cyt - B es una sustancia inhibidora de la polimerización de actina, requerida para la formación de anillos de microfilamentos que comprimen el citoplasma y dividen al núcleo de la célula hija durante la citocinesis. Por lo tanto, el uso de Cyt-B facilita la identificación de prácticamente todas las células con una división en una etapa binucleada, con dos divisiones en una etapa tetranucleada y así sucesivamente. Los MN son entonces registrados solamente en células binucleadas, las cuales brindan comparaciones fieles de daño cromosómico entre poblaciones celulares que pueden diferir en su cinética de división celular. Las células mononucleadas con micronúcleos pueden ser consideradas en el registro de micronúcleos, ya que indican daño en el DNA que estaba presente en las células antes de que éstas fueran expuestas al tratamiento, mientras que las células binucleadas pueden contener también MN pre - existentes así como MN expresados durante el tiempo de cultivo como resultado de rompimientos cromosómicos acumulados durante la fase Go *in vivo* (Fig. 9) (Fenech *et al.* 1999b).

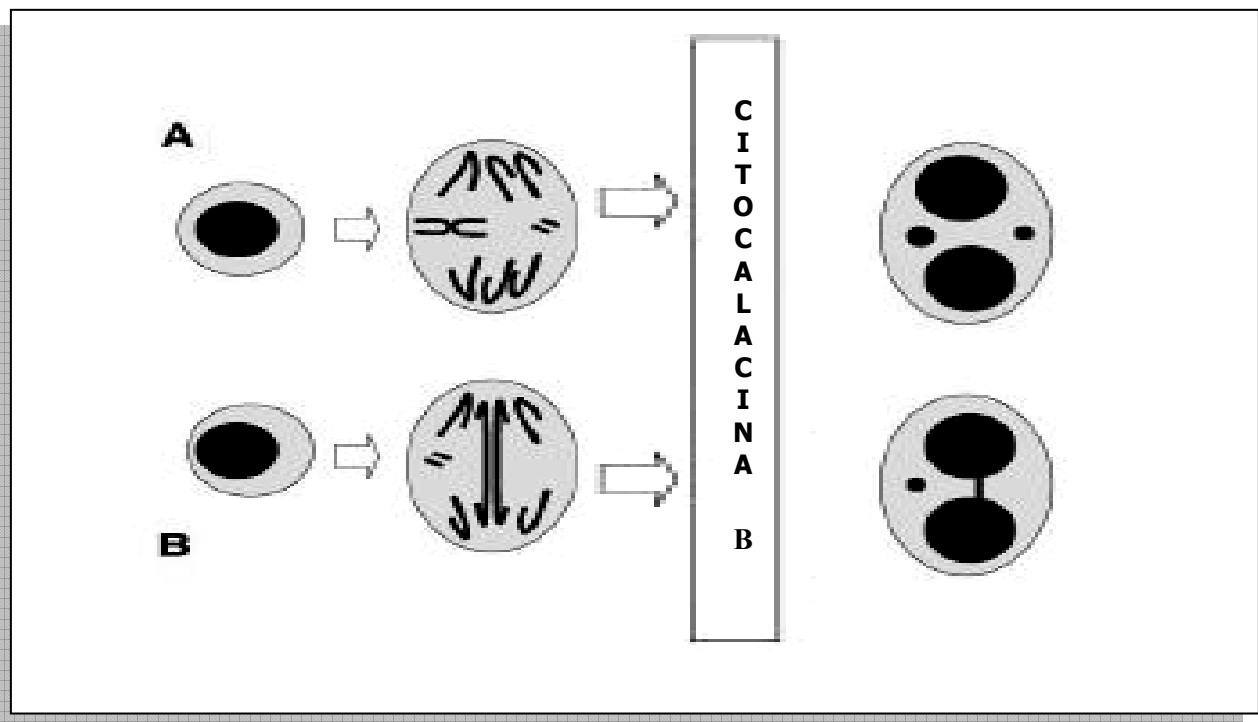


Figura 8. Se ilustra A) El origen de micronúcleos de un cromosoma rezagado y de fragmentos de cromosomas acéntricos en anafase. B) La formación de puentes nucleoplasmáticos de un cromosoma dicéntrico en el cual los centrómeros son empujados hacia polos opuestos de la célula. Así como el papel importante de la citocalacina B al bloquear células en división. Tomado de Fenech *et al.* 1999b.

Los MN son entonces, expresados en células en división que contienen rompimiento cromosómico o pérdida de centrómeros (fragmentos acéntricos) y/o todo el cromosoma que no es capaz de viajar a los polos del huso durante la mitosis. En la telofase, una envoltura nuclear se forma alrededor tanto de los cromosomas rezagados como de los fragmentos cromosómicos los que gradualmente asumen la morfología de un núcleo en interfase con la excepción que éstos son más pequeños que el núcleo principal en la célula, de aquí el término "micronúcleo".

Los micronúcleos por consiguiente, son un conveniente y fiel índice tanto de rompimiento cromosómico, como de mala segregación de cromosomas (no disyunción) (Fenech, 1985b), eventos estrechamente relacionados con el cáncer (Evans, 1990; Dellarco *et al.* 1985).

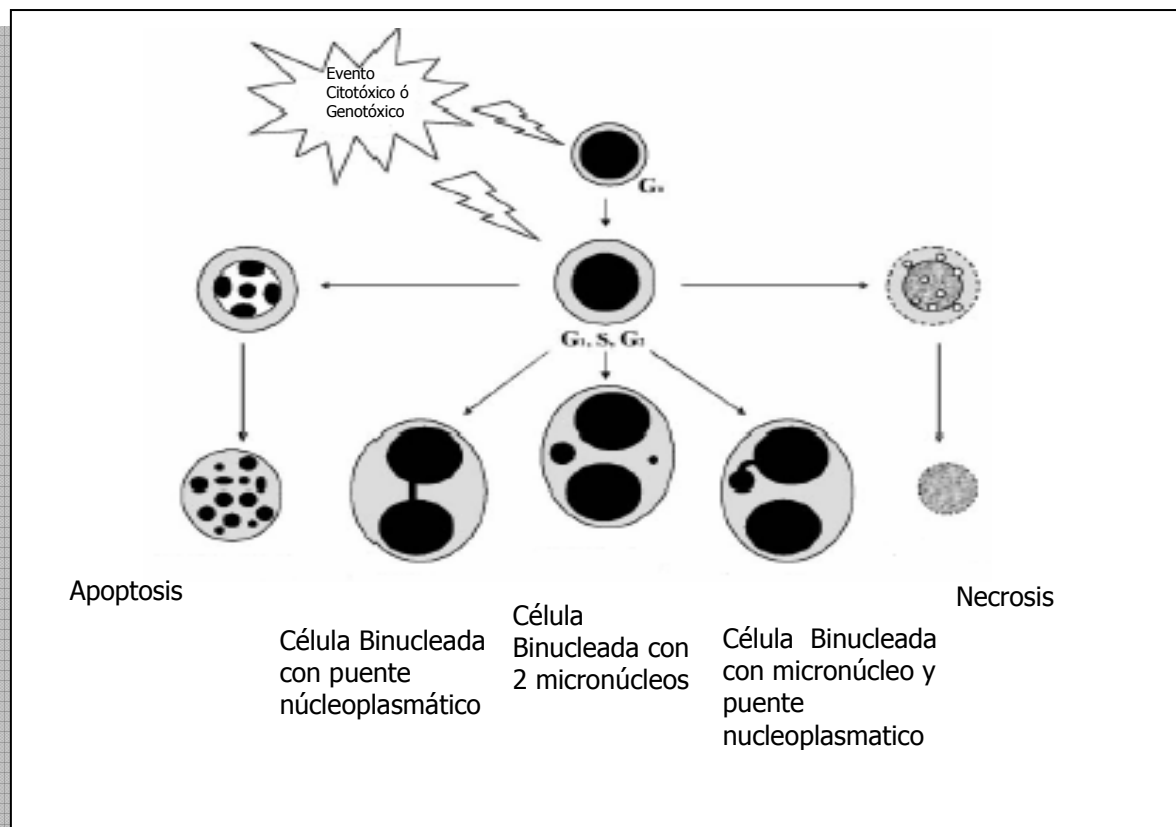


Figura 9. Diferentes destinos que las células siguen con la Cyt-B después de la exposición a agentes genotóxicos o citotóxicos. Tomado de Fenech *et al.* 1999b.

Ocasionalmente los puentes nucleoplasmáticos entre núcleos en una célula binucleada son observados, éstos son probablemente cromosomas dicéntricos en los cuales los dos centrómeros fueron empujados hacia polos opuestos de la célula y el DNA en el puente resultante es cubierto por una membrana nuclear. Así, los puentes nucleoplasmáticos en las células binucleadas dan una medida adicional y complementaria del rearrreglo cromosómico, que puede ser evaluado junto con el conteo de micronúcleos (Fig. 8).

El ensayo de CBMN fue inicialmente desarrollado para cultivos de linfocitos humanos, pero ahora ha sido adaptado a diferentes tipos celulares de tumores sólidos y a células de la médula ósea (Masunaga *et al.* 1991; Odagiri *et al.* 1994).

En plantas se han utilizado los tejidos meristemáticos de la raíz de plántulas de *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Tradescantia* y *Vicia faba*, para estudiar las alteraciones cromosómicas especialmente por la ventaja que ofrecen estos organismos para ser empleados como sensores ambientales (Fenech *et al.* 1999b).

Nuevos descubrimientos han permitido 1) distinguir micronúcleos originados de todo el cromosoma, micronúcleos originados de fragmentos cromosómicos y la detección de eventos de no disyunción gracias a la técnica de hibridación *in situ* que identifica regiones centroméricas y aunque es más cara y laboriosa, puede darnos esta especificidad necesaria (Elhajouji *et al.* 1995; Farooqi *et al.* 1993), 2) la conversión de sitios de excisión- reparación a micronúcleos con una división celular 3) el uso de pruebas moleculares para identificar eventos de no disyunción en células binucleadas (Schuler *et al.* 1997) y 4) la integración de células necróticas y apoptóticas dentro del ensayo de CBMN (Kirsch-Volders *et al.* 1997; Fenech *et al.* 1999b).

Finalmente, la prueba de MN es hoy en día uno de los ensayos citogenéticos *in vivo* e *in vitro* más reconocidos en el campo de la toxicología genética, debido a que ha mostrado ser un indicador sensible de daño a nivel cromosómico; la ventaja clave del ensayo, es la relativa facilidad de marcar con Cyt-B las poblaciones celulares que son típicamente usadas por el análisis metafásico (binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas, etc.), (Fenech *et al.* 1999b; Fenech, 2000), así como también su amplia utilización para evaluar daño genético con

aplicaciones en la ecotoxicología (Gauthier *et al.* 1999), nutrición (Fenech y Rinaldi 1995), muestreo de sensibilidad a la radiación para la optimización de radioterapia (Masunaga, 1991), biomonitoreo de poblaciones humanas (Fenech *et al.* 1999a) y el muestreo de nuevos fármacos y agroquímicos (Kirsch-Volders *et al.* 1997; 2000).

Justificación

El uso de plantas medicinales esta ampliamente arraigado en nuestra sociedad, debido principalmente a que existen numerosas plantas con propiedades medicinales, a las escasas instituciones de salud en comunidades rurales, al bajo nivel económico en estas poblaciones y los altos costos de la medicina de patente; lo que ha llevado a encontrar remedios alternativos a la medicina institucional pese a que el contenido químico de las plantas puede llegar a ser nocivo para la salud, es decir englobe efectos secundarios, ya que en la planta puede haber sustancias cuya acción sobre el organismo humano no se conozca a científicamente.

Debido a que se han encontrado una gran cantidad de plantas hipoglucemiantes para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, nos da la base para evaluar en este trabajo el efecto genotóxicos de *Equisetum myriochaetum* como planta con propiedades medicinales en el tratamiento de ésta enfermedad, que como se mencionó anteriormente es la de mayor incidencia tanto en el ámbito nacional (cerca del 90% de los casos) como a escala mundial.

Objetivo

Determinar el daño genotóxico y citotóxico *in vitro* del extracto de *Equisetum myriochaetum* en linfocitos de sangre periférica.

Objetivos particulares

- Estimar como marcador de genotoxicidad la presencia de micronúcleos (MN) en cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de *Equisetum myriochaetum*.
- Determinar como biomarcador de citotoxicidad la cinética de proliferación en linfocitos de sangre periférica expuestos a las diferentes concentraciones del extracto de *Equisetum myriochaetum* en cultivos de 72 horas.

Hipótesis

Si el extracto de *Equisetum myriochaetum* aumenta la frecuencia *in vitro* de micronúcleos de manera significativa y / o modifica la cinética de proliferación celular en linfocitos de sangre periférica (cultivos de 72 h) con respecto al control entonces el extracto de *Equisetum myriochaetum* es genotóxico y / o citotóxico.

Ho: El extracto de *Equisetum myriochaetum* no produce un efecto genotóxico, por lo que la frecuencia de micronúcleos en las diferentes concentraciones respecto al testigo concurrente no será significativamente diferente.

Ha: El extracto de *Equisetum myriochaetum* producirá un efecto genotóxico, lo que llevará a una frecuencia significativamente mayor de micronúcleos en las diferentes concentraciones que en el testigo concurrente.

Materiales y Métodos

Criterios para el registro de células binucleadas

- Los dos núcleos de la célula binucleada deben tener su membrana nuclear intacta y además encontrarse dentro del citoplasma celular.
- La célula binucleada debe tener el mismo volumen y tamaño en los dos núcleos.
- Los dos núcleos pueden estar unidos por un fino puente nucleoplasmático, que no debe ser más ancho que una cuarta parte del diámetro del núcleo.
- La membrana que rodea al citoplasma tiene que encontrarse intacta, es decir, debe distinguirse a la célula como una unidad (Fig.10) (Fenech *et al.* 2002).

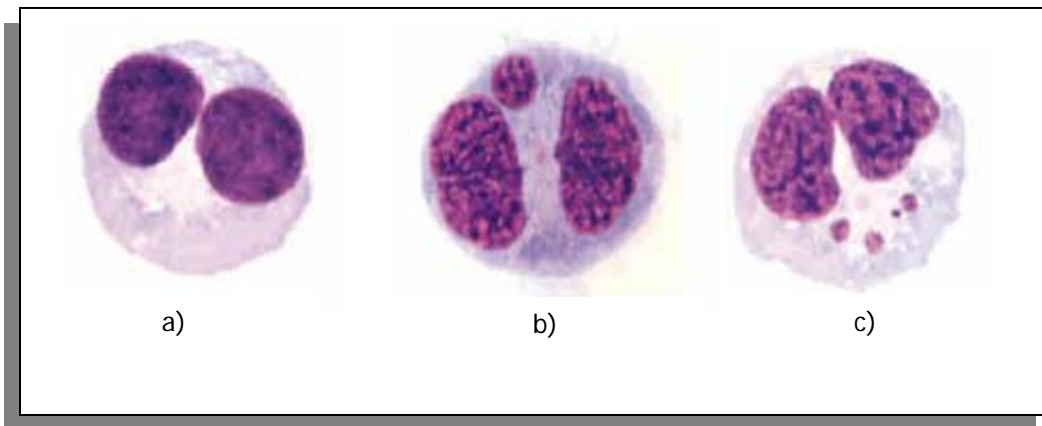


Figura 10. Diferentes células binucleadas: a) Célula Binucleada sin micronúcleo b) Célula Binucleada con un micronúcleo c) Célula Binucleada con tres micronúcleos. Tomado de Fenech *et al.* 2002.

Criterios para el análisis de micronúcleos

- Los micronúcleos son morfológicamente más pequeños que el núcleo.
- El diámetro del micronúcleo en linfocitos humanos usualmente varia entre $1/6$ y $1/3$ de la media del diámetro del núcleo.
- Los micronúcleos tienen que ser redondos u ovalados de preferencia.
- Los micronúcleos no deben de estar unidos a los núcleos de la célula binucleada.
- Generalmente los micronúcleos están teñidos más intensamente que los núcleos (Fig. 10 b y c) (Fenech *et al.* 2002).

Población de estudio

Durante el año 2005 se seleccionaron cuatro individuos sanos (2 mujeres y 2 hombres) con un rango de edad de 24 a 25 años de la Universidad Nacional Autónoma de México (tabla IV) bajo el criterio de que fueran personas con hábitos saludables para lo cual se aplicó un cuestionario (tabla V) a fin de conocer su estado nutricional, sus antecedentes ocupacionales, sus hábitos de tabaquismo y de consumo de alcohol.

Tabla IV. 4 Individuos (2 Mujeres y 2 Hombres) sanos con una repetición

| Individuo | Sexo | Edad | Fecha de colecta de las muestras |
|-----------|-----------|------|----------------------------------|
| D1 | Femenino | 24 | 16-04-05 |
| | | | 31-05-05 |
| D2 | Femenino | 24 | 08-04-05 |
| | | | 03-05-05 |
| D3 | Masculino | 25 | 22-03-05 |
| | | | 26-04-05 |
| D4 | Masculino | 25 | 19-05-05 |
| | | | 24-05-05 |

Criterios de inclusión

Individuos sanos, con un rango de edad de 24 a 34 años de edad, estudiantes de la UNAM, que no fumen, que nunca hayan tomado drogas y que en el momento de la toma de la muestra, no se encuentren enfermos o estén tomando medicamentos.

Fitomedicamento

Cápsulas de 500 mg con extracto homogenizado y liofilizado de *Equisetum myriochaetum* proporcionadas por el Dr. Adolfo Andrade Cetto del grupo de Etnofarmacia, Facultad de Ciencias UNAM. Se tomaron cuatro concentraciones [12.5, 25, 50 y 500 ppm] de una solución stock del fitomedicamento utilizando agua destilada como solvente.



Tabla V. Cuestionario que se aplicó a los donadores del proyecto de investigación: Valoración de la inducción de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos *in vitro* por el extracto fitoterapéutico de *Equisetum myriochaetum*



Laboratorio de Genética

| | | |
|---|-------------------|---------|
| Apellido paterno: | Apellido materno: | Nombre: |
| Estudiante de la carrera: | | |
| Facultad: | | |
| Estado Civil; | | |
| Dirección Particular: | | |
| Teléfono trabajo: | | |
| Teléfono casa: | | |
| E- mail: | | |
| Edad: | | |
| Sexo: | | |
| Estatura: cm | Peso: Kg | |
| Medicamentos que actualmente estas tomando: | | |
| Padecimiento actual: | | |

Facultad de Ciencias UNAM

| | | |
|---|----|----|
| 1. ¿Toma café? | Si | No |
| Si toma, ¿Cuántas tazas al día? | | |
| 2. ¿Toma Té? | Si | No |
| Si toma, ¿Cuántas tazas al día? | | |
| 3. Ingiere bebidas alcohólicas? | Si | No |
| Si Toma ¿Con que frecuencia? | | |
| 4. ¿Fumas? | Si | No |
| Si fuma, ¿Cuántos cigarrillos al día? | | |
| Si no fuma, ¿ Ha fumado en alguna época de su vida? | Si | No |
| Cuando fumaba. ¿Cuántos cigarrillos al día? | | |
| ¿Cuándo dejo de fumar? | | |
| 5. ¿Qué come normalmente? | | |
| Desayuno | | |
| Almuerzo | | |
| Comida | | |
| Cena | | |
| 6. ¿Toma alguna droga? | Si | No |
| Si Toma ¿Con que frecuencia? | | |
| 7. ¿Toma algún antidepresivo? | Si | No |
| Si Toma ¿Con que frecuencia? | | |

Obtención de la muestra

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por venopunción en las primeras horas del día, utilizando 0.1 ml de heparina como anticoagulante para su posterior procesamiento.

Siembra de linfocitos

1.- De cada individuo se sembraron 6 tubos de propileno con fondo cónico de 10 ml de capacidad en un área de trabajo esterilizada por la campana de flujo laminar aseada previamente con alcohol.

Para cada tubo se utilizó:

- 5 ml de medio de cultivo para linfocitos Mc Coy's 5^a Gibco (suplementado con suero fetal, Gibco [10 %], fitohemaglutinina, Gibco [2.8 %], estreptomicina-penicilina, Gibco [1%]).
- 1 ml de la muestra de sangre del donador.

2.- Se incubaron a 37° C por 72 hrs.

3.- A las 24 horas después de la siembra, se adicionó a 4 cultivos el extracto de *Equisetum myrioachaetum* en diferentes concentraciones [12.5, 25, 50 y 500 ppm] al mismo tiempo se agregó al control positivo 0.2 ml de Mitomicina C (MMC), Sigma [80 ng], y al control negativo 0.2 ml de H₂O destilada.

4.- A las 44 horas se adicionó a todos los tubos 0.3 ml de citocalacina B, Sigma [3mg/ml].

5.- Finalmente a las 72 horas se realizó la cosecha de los cultivos.

Cosecha de linfocitos

A las 72 hrs, los cultivos fueron centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular. Enseguida se les agregó una solución hipotónica a 37° C (2.79mg KCl /500ml H₂O) por 5 minutos para después centrifugar por 10 minutos a 1500 rpm. Una vez eliminado el sobrenadante, el botón celular fue resuspendido y se adicionó 1 ml del fijador (metanol, y ácido acético glacial

3:1). Finalmente se centrifugó a 500 rpm y después se eliminó el sobrenadante para obtener el botón celular resuspendido en pocas gotas de fijador (Fenech, 2000).

Preparación de laminillas

Se realizaron preparaciones por goteo del material sobre portaobjetos limpios (los cuales se lavaron con etanol y enfriaron previamente en alcohol de caña al 70 %). Se resuspendió el botón celular con una pipeta Pasteur y se dejaron caer algunas gotas sobre la laminilla procurando colocar todo el material a lo largo de ésta misma. Finalmente se tiñeron con Giemsa [2.5%] (45 ml de solución Sorensen y 5 ml de Giemsa) por 3 minutos y se eliminó el exceso de colorante con agua corriente (Fig.11). Las laminillas fueron codificadas para realizar el estudio a ciegas



Tiempo 0
Siembra de 6 cultivos por individuo



Cada cultivo

- 5ml de medio Mc Coy's 5^a Gibco suplementado con suero fetal al 10% y estreptomicina-penicilina al 1% Gibco.
- 0.25 ml fitohemaglutinina, Gibco.
- 1 ml de muestra de sangre.



Toma de la muestra por venopunción con jeringa y 0.1 heparina.

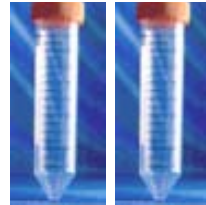


Tiempo 1
24 hrs después de la siembra se añaden las concentraciones del extracto y los controles positivo y negativo

Control Negativo Control Positivo

H₂O
0.2ml

MMC
0.2ml

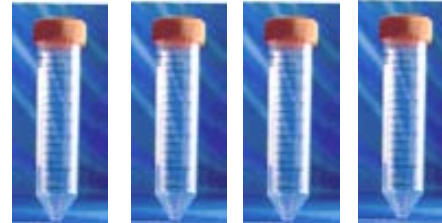


12.5 ppm

25 ppm

50 ppm

500 ppm



Tiempo 2

44 hrs después de la siembra se añade 0.3ml de Cyt-B [3mg/ml]

Control Negativo Control Positivo

H₂O

MMC

0.2ml

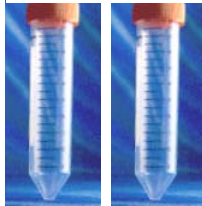
0.2ml

12.5 ppm

25 ppm

50 ppm

500 ppm



Tiempo 3

72 hrs después de la siembra se realiza la cosecha de los cultivos

- Se sacaron los cultivos de la incubadora.
- Se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos.



- Se eliminó el sobrenadante resuspendiendo el botón celular.
- Se les agregó una solución hipotónica a 37° C por 5 minutos para después centrifugar por 10 minutos a 1500 rpm.
- Finalmente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en pocas gotas de fijador.
- Se elaboraron laminillas.

Figura 11. Metodología para la determinación de la genotoxicidad y toxicidad *in vitro* de *Equisetum myriochaetum* por medio de la prueba de micronúcleos (MN) en sangre periférica de linfocitos humanos.

Para cada individuo

- 1) Se analizaron 2000 células binucleadas para el registro de micronúcleos (1000 del experimento y 1000 de su repetición)
- 2) Se cuantificó el número de micronúcleos (0,1,2,3,4,5,6) por célula, también el número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, y tetranucleadas presentes en cada una de las preparaciones para obtener el índice de proliferación de la citocinesis bloqueada (CBPI), de acuerdo a la fórmula de:

$$CBPI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4 + 5M_5}{N}$$

Figura 12. Donde **M** indica el número de células que tienen de 1 a 5 núcleos y **N** el número total de células analizadas.

- 3) Se cuantificó el número de células con puentes y con micronúcleos.
- 4) Por medio de la prueba de ANOVA se analizó la distribución de micronúcleos en las células binucleadas y el índice de proliferación (CBPI).

Resultados

En la tabla VI se engloban todos los parámetros tomados en cuenta para el análisis de genotoxicidad y citotoxicidad, como es la distribución de células de acuerdo al número de núcleos, la distribución de células binucleadas de acuerdo al número de micronúcleos, frecuencia de micronúcleos y el índice de proliferación celular de la citocinesis bloqueada (CBPI).

Las células observadas en los cultivos celulares obtenidos mediante la prueba de micronúcleos se muestran en la figura 13.

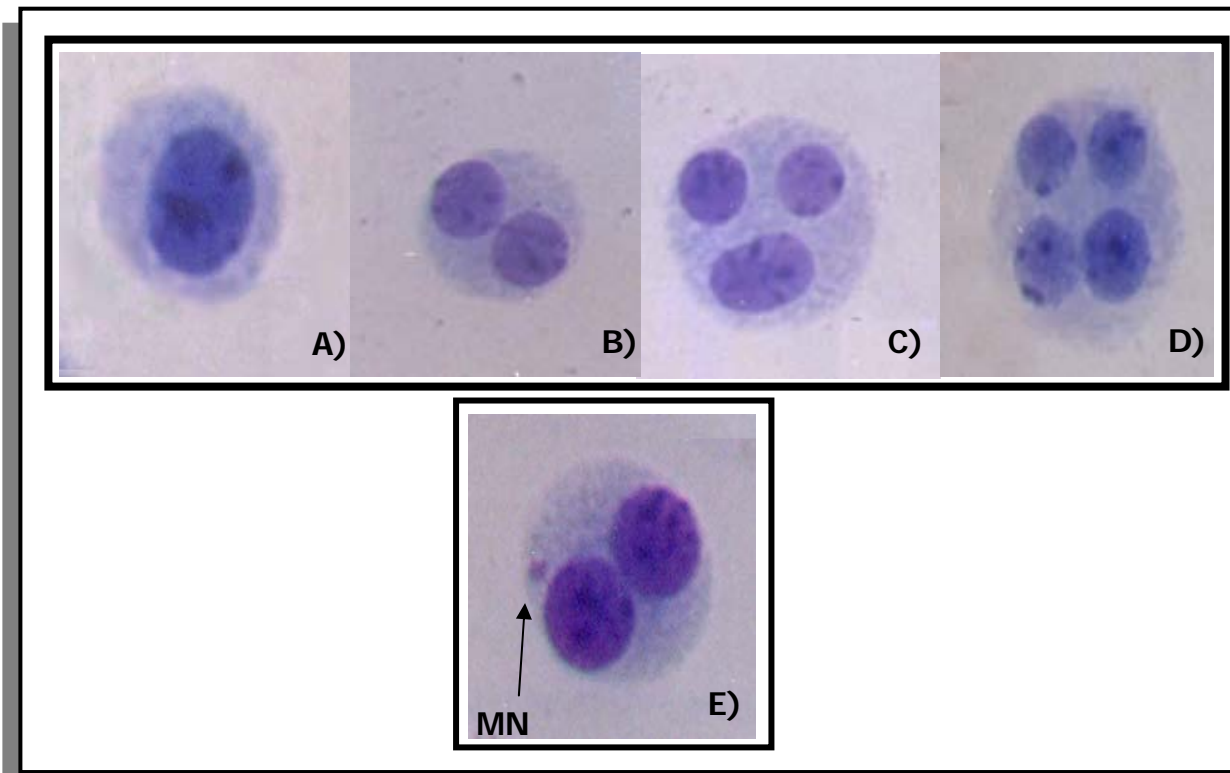


Figura 13. Células observadas en la técnica de micronúcleos. A) Célula mononucleada B) Célula binucleada C) Célula trinucleada D) Célula tetranucleada E) Célula binucleada con micronúcleo.

Tabla VI. Número y distribución de micronúcleos, frecuencia de células mono, bi, tri y tetranucleadas e índice de proliferación celular obtenidos al tratar linfocitos humanos *in vitro* provenientes de 4 donadores con diferentes concentraciones de *E. myriochaetum* y con controles negativo y positivo.

| Donador | Concentración [ppm] | Células binucleadas | | | | | | | Total de células binucleadas | No. Total de MN | Frecuencia de MN | Células Binucleadas con MN | Distribución y frecuencia de células de acuerdo al número de núcleos | | | | Total de células | % BN | CBPI |
|---------|---------------------|-----------------------------------|----|----|---|---|---|---|------------------------------|-----------------|------------------|----------------------------|--|-------------|--------------|----------------|------------------|-------|------|
| | | Distribución de micronúcleos (MN) | | | | | | | | | | | Mononucleadas | Binucleadas | Trinucleadas | Tetranucleadas | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | | | | | | | | | |
| D1 | Control | 2015 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2022 | 7 | 0.003 | 7 | 233 (0.09) | 2022 (0.82) | 155 (0.06) | 64 (0.03) | 2474 | 81.73 | 1.99 |
| D1 | MMC | 2008 | 52 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2061 | 54 | 0.026 | 53 | 291 (0.11) | 2061 (0.81) | 125 (0.05) | 71 (0.03) | 2548 | 80.89 | 1.96 |
| D1 | 12.5 | 2020 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2026 | 6 | 0.003 | 6 | 356 (0.13) | 2026 (0.76) | 235 (0.09) | 59 (0.02) | 2676 | 75.71 | 1.98 |
| D1 | 25 | 2061 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2071 | 10 | 0.005 | 10 | 347 (0.13) | 2071 (0.79) | 143 (0.05) | 63 (0.02) | 2624 | 78.93 | 1.95 |
| D1 | 50 | 2078 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2086 | 8 | 0.004 | 8 | 258 (0.09) | 2086 (0.78) | 223 (0.08) | 93 (0.03) | 2660 | 78.42 | 2.02 |
| D1 | 500 | 2018 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2029 | 12 | 0.006 | 11 | 564 (0.21) | 2029 (0.76) | 51 (0.02) | 19 (0.01) | 2663 | 76.19 | 1.81 |
| D2 | Control | 2040 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2052 | 12 | 0.006 | 12 | 409 (0.16) | 2052 (0.81) | 30 (0.01) | 34 (0.01) | 2525 | 81.27 | 1.86 |
| D2 | MMC | 2021 | 73 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2095 | 75 | 0.036 | 74 | 607 (0.22) | 2095 (0.75) | 46 (0.02) | 39 (0.01) | 2787 | 75.17 | 1.81 |
| D2 | 12.5 | 2023 | 22 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2046 | 24 | 0.012 | 23 | 786 (0.26) | 2046 (0.69) | 78 (0.03) | 58 (0.02) | 2968 | 68.94 | 1.78 |
| D2 | 25 | 2049 | 48 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2108 | 70 | 0.033 | 59 | 1912 (0.47) | 2108 (0.52) | 20 (0.00) | 24 (0.01) | 4064 | 51.87 | 1.54 |
| D2 | 50 | 2173 | 50 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2227 | 58 | 0.026 | 54 | 1076 (0.31) | 2227 (0.65) | 89 (0.03) | 50 (0.01) | 3442 | 64.70 | 1.73 |
| D2 | 500 | 2031 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2041 | 10 | 0.005 | 10 | 1840 (0.47) | 2041 (0.53) | 2 (0.00) | 0 (0.00) | 3883 | 52.56 | 1.53 |
| D3 | Control | 2133 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2158 | 25 | 0.012 | 25 | 716 (0.23) | 2158 (0.69) | 148 (0.05) | 117 (0.04) | 3139 | 68.75 | 1.86 |
| D3 | MMC | 2090 | 86 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2191 | 116 | 0.053 | 101 | 728 (0.24) | 2191 (0.72) | 41 (0.01) | 70 (0.02) | 3030 | 72.31 | 1.80 |
| D3 | 12.5 | 2056 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2071 | 15 | 0.007 | 15 | 1248 (0.33) | 2071 (0.56) | 239 (0.06) | 173 (0.05) | 3731 | 55.51 | 1.78 |
| D3 | 25 | 2046 | 12 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2060 | 16 | 0.008 | 14 | 635 (0.21) | 2060 (0.68) | 213 (0.07) | 140 (0.05) | 3048 | 67.59 | 1.91 |
| D3 | 50 | 2054 | 24 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2087 | 42 | 0.020 | 33 | 489 (0.17) | 2087 (0.73) | 219 (0.08) | 82 (0.03) | 2877 | 72.54 | 1.93 |
| D3 | 500 | 2119 | 21 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2142 | 25 | 0.012 | 23 | 1295 (0.37) | 2142 (0.62) | 11 (0.00) | 24 (0.01) | 3472 | 61.69 | 1.64 |
| D4 | Control | 2045 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2051 | 6 | 0.003 | 6 | 672 (0.23) | 2051 (0.69) | 107 (0.04) | 131 (0.04) | 2961 | 69.27 | 1.85 |
| D4 | MMC | 2000 | 26 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2027 | 28 | 0.014 | 27 | 750 (0.25) | 2027 (0.68) | 100 (0.03) | 112 (0.04) | 2989 | 67.82 | 1.82 |
| D4 | 12.5 | 2106 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2110 | 4 | 0.002 | 4 | 581 (0.20) | 2110 (0.72) | 205 (0.07) | 40 (0.01) | 2936 | 71.87 | 1.89 |
| D4 | 25 | 2043 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2049 | 6 | 0.003 | 6 | 569 (0.19) | 2049 (0.69) | 184 (0.06) | 179 (0.06) | 2981 | 68.74 | 1.93 |
| D4 | 50 | 2006 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2012 | 6 | 0.003 | 6 | 552 (0.18) | 2012 (0.66) | 207 (0.07) | 266 (0.09) | 3037 | 66.25 | 1.97 |
| D4 | 500 | 2035 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2043 | 8 | 0.004 | 8 | 533 (0.19) | 2043 (0.75) | 77 (0.03) | 88 (0.03) | 2741 | 74.53 | 1.87 |

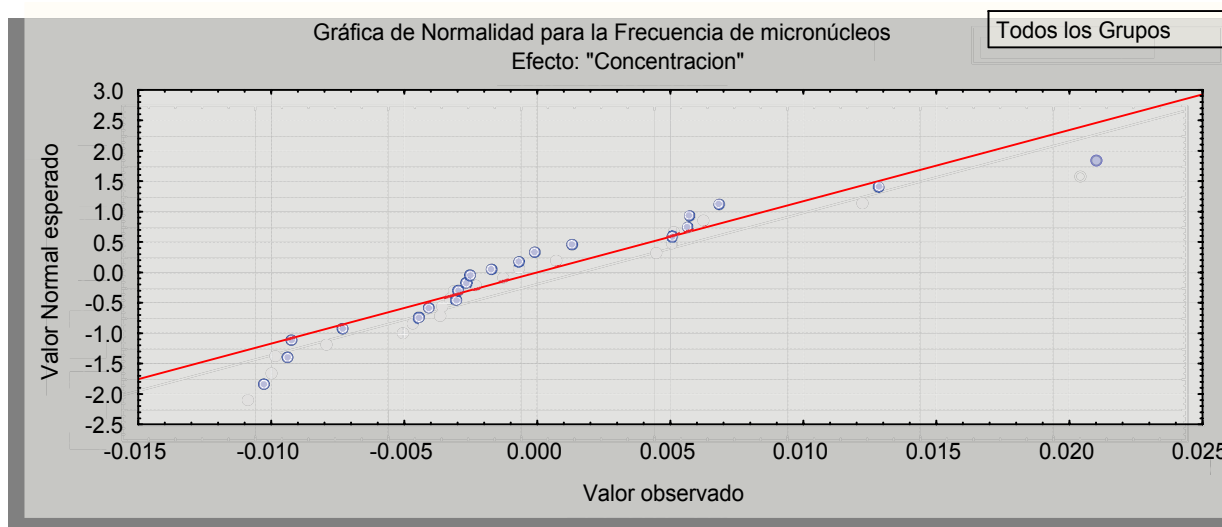
BN= Células binucleadas, CBPI= Índice de proliferación de la citocinesis bloqueada, MMC= Mitomicina C.

Se realizó la prueba de Kastenbaum – Bowman para determinar que los datos obtenidos de las muestras de los donadores y su respectiva repetición no eran diferentes, por lo que se sumaron (Tabla VII).

Tabla VII. Número total de células binucleadas analizadas por donador.

| Individuo | Sexo | 12.5 ppm | 25 ppm | 50 ppm | 500 ppm | MMC | Control |
|------------------|-------------|-----------------|---------------|---------------|----------------|------------|----------------|
| D1 | Femenino | 2026 | 2071 | 2086 | 2029 | 2061 | 2022 |
| D2 | Femenino | 2046 | 2108 | 2227 | 2041 | 2095 | 2052 |
| D3 | Masculino | 2071 | 2060 | 2087 | 2142 | 2191 | 2158 |
| D4 | Masculino | 2110 | 2049 | 2012 | 2043 | 2027 | 2051 |

Para la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas se realizó un análisis de residuos donde se encontró que los resultados se comportan aleatoriamente y sin sesgo (Statistica Vers. 6.0) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Prueba de Normalidad para la frecuencia de micronúcleos (MN)

Con base a la tabla VI se realizó la prueba de ANOVA de una vía tipo 1 para valores anidados con el objetivo de evaluar la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas entre las concentraciones del fitomedicamento y el control negativo.

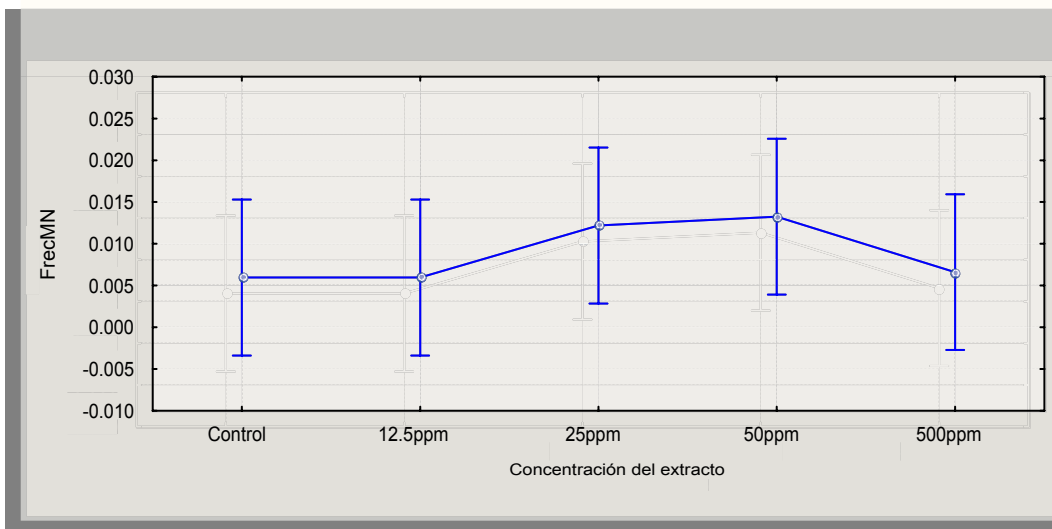
La prueba de ANOVA indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones del fitomedicamento y el control negativo, es decir el extracto de *Equisetum myriochaetum* no incrementó la frecuencia de micronúcleos al comparar las concentraciones con el control negativo (tabla VIII y IX Statistica Vers. 6.0). Esto mismo se puede observar en la grafica 2, en la que los grupos experimentales muestran un comportamiento similar para todas las concentraciones del extracto, lo cual evidencia un resultado sin efecto genotóxico ni citotóxico.

Tabla VIII. Tabla de ANOVA de una vía para la frecuencia de micronúcleos

| Tabla de ANOVA de una vía para la Frecuencia de Micronúcleos | | | | | |
|--|-------------------|--------------------|--------------|---------|----------|
| Efecto: | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Varianzas-CM | F-RV | p |
| Concentracion | 0.000209 | 4 | 0.000052 | 0.68114 | 0.615726 |
| Error | 0.001150 | 15 | 0.000077 | | |

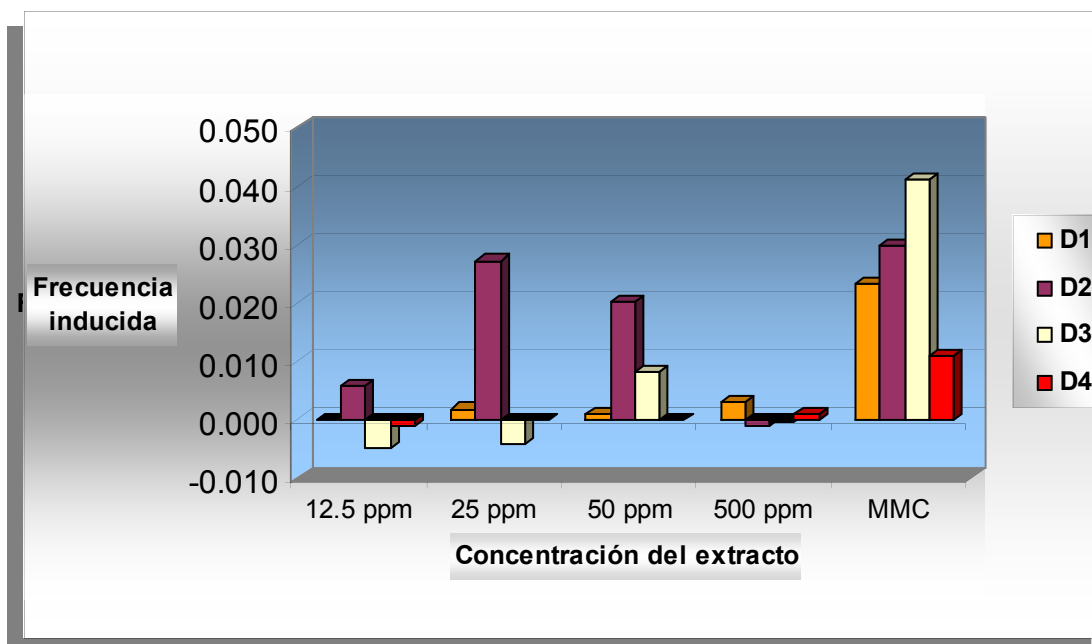
Tabla IX. Prueba desbalanceada de Tukey.

| Variable: Frecuencia de micronúcleos (Datos tabla de ANOVA una vía) Error: Entre CM = 0.00008, gl = 15 | | | | | | |
|---|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Concentración | {1} | {2} | {3} | {4} | {5} |
| | | .00596 | .00596 | .01218 | .01325 | .00660 |
| 1 | Control | | 1.000000 | 0.848785 | 0.763613 | 0.999972 |
| 2 | 12.5ppm | 1.000000 | | 0.848970 | 0.763835 | 0.999972 |
| 3 | 25ppm | 0.848785 | 0.848970 | | 0.999794 | 0.891936 |
| 4 | 50ppm | 0.763613 | 0.763835 | 0.999794 | | 0.817143 |
| 5 | 500ppm | 0.999972 | 0.999972 | 0.891936 | 0.817143 | |



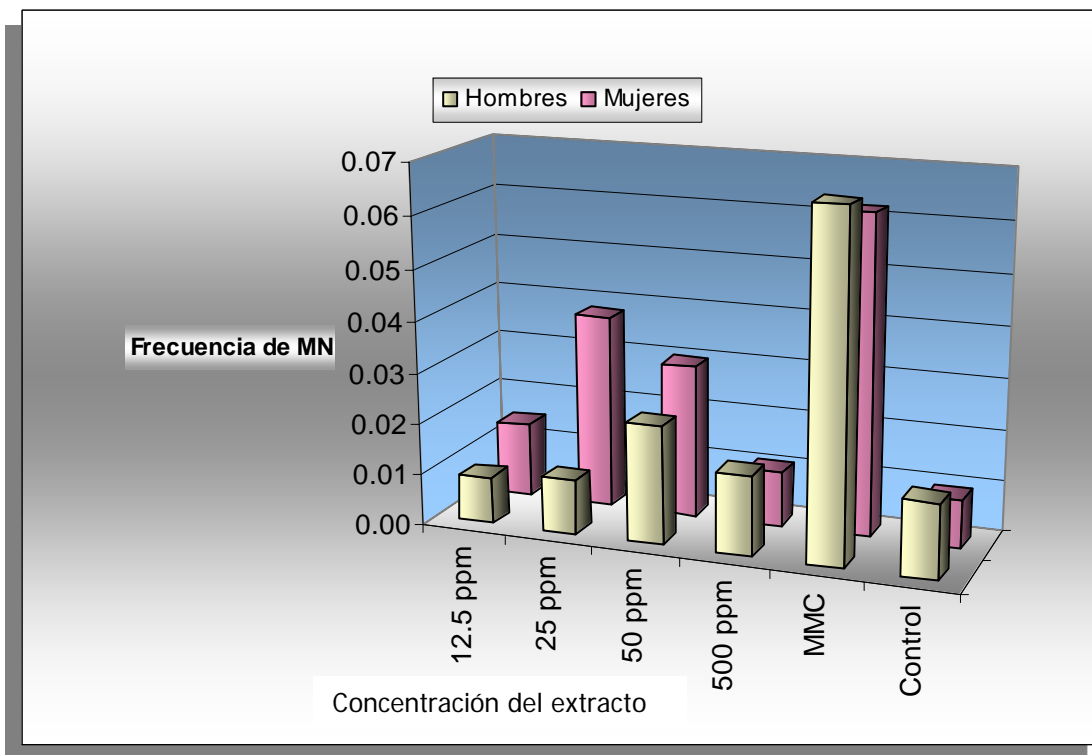
Gráfica 2. Gráfica de ANOVA para una vía de la frecuencia de micronúcleos. Para 4.15 grados de libertad $F = 0.68114$, $p = 0.61573$

La frecuencia inducida de micronúcleos se obtuvo a partir de la frecuencia de micronúcleos a la que se restó el valor obtenido del control negativo. (Gráfica 3)



Gráfica 3. Frecuencia inducida de micronúcleos (MN) en células binucleadas de linfocitos expuestos al extracto de *Equisetum myriochaetum*.

Se analizó la frecuencia de micronúcleos entre sexos con la finalidad de evaluar si existía diferencia entre los dos grupos mediante una prueba de ANOVA de una vía; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las frecuencias de micronúcleos entre géneros. (Gráfica 4, Statistica Vers. 6.0)



Gráfica 4. Frecuencia de micronúcleos entre géneros.

Discusión

Hoy día la necesidad de encontrar fármacos útiles para combatir algunas enfermedades es el más fuerte incentivo para continuar con labores de investigación. Aunque la farmacología moderna guarda estrecha relación con la medicina, depende en gran parte de ciencias básicas como la física, la química y la biología para el completo entendimiento de un nuevo fármaco (Bevan *et. al.* 1982).

El valor de las plantas medicinales está dado por sus constituyentes químicos generalmente los metabolitos secundarios como los alcaloides, terpenoides, glicósidos, flavonoides y lignanos que producen efectos fisiológicos sobre el organismo humano, que en la mayoría de los casos no se conocen, pudiendo llegar a ser nocivos; es decir, estas sustancias se pueden encontrar aunadas a las sustancias benéficas, pero su efecto ocasionará que la planta no sea costeaable en términos de salud. Es por ello que el inventario químico y la evaluación farmacológica de las plantas medicinales mexicanas es todavía más incompleto que el inventario taxonómico (Rosas, 2000).

Recientemente encontramos muchos estudios de plantas de las cuales se han logrado aislar una gran variedad de compuestos con el objetivo principal de desarrollar medicinas útiles y especialmente fitomedicinas o suplementos nutricionales que beneficien el tratamiento de una determinada enfermedad. A principios de los años 60's la Food and Drug Administration (FDA) dispuso que antes de que los nuevos compuestos químicos entraran al mercado comercial, fuesen sometidos a pruebas de toxicidad y genotoxicidad, debido a que la mayoría de las drogas que se usaban en la medicina del siglo XIX eran sustancias o principios activos naturales empleados en el ser humano de forma empírica sin previa evaluación en el laboratorio (Swinyard, 1992).

El conocimiento sobre los mecanismos de acción de un agente químico permite comprender los efectos colaterales que éste produce en un organismo. Los efectos carcinógenos de las sustancias químicas por lo regular tienen un largo

período de latencia y a veces transcurren de 20 a 30 años para que surjan neoplasias. Efectos tan tardíos no pueden evaluarse durante un periodo razonable de estudio inicial de un compuesto químico, por lo que existe la necesidad urgente de crear pruebas confiables para la detección de dicha toxicidad y de vigilar de una manera sistemática los efectos a largo plazo (Klaassen, 1994).

A fin de saber si un compuesto es genotóxico para el ser humano, se han establecido diferentes técnicas de laboratorio tanto *in vivo* como *in vitro*. Las pruebas *in vivo* evalúan el efecto del compuesto suministrado a un organismo en una etapa ó durante todo su ciclo de vida, permitiendo así detectar genotoxicidad por diferentes métodos (Klaassen, 1994). Con respecto a las técnicas *in vitro* es necesario mencionar que idealmente cada compuesto químico debe ser estudiado en las diferentes etapas del ciclo celular para evaluar su potencial genotóxico, debido a que las células en sus diferentes fases del ciclo celular (M, G₁, S y G₂) muestran diversos grados de sensibilidad a los efectos genotóxicos, por ello es importante exponer a los cultivos celulares cuando la mayoría de las células se estén dividiendo (Fenech *et al.* 2002).

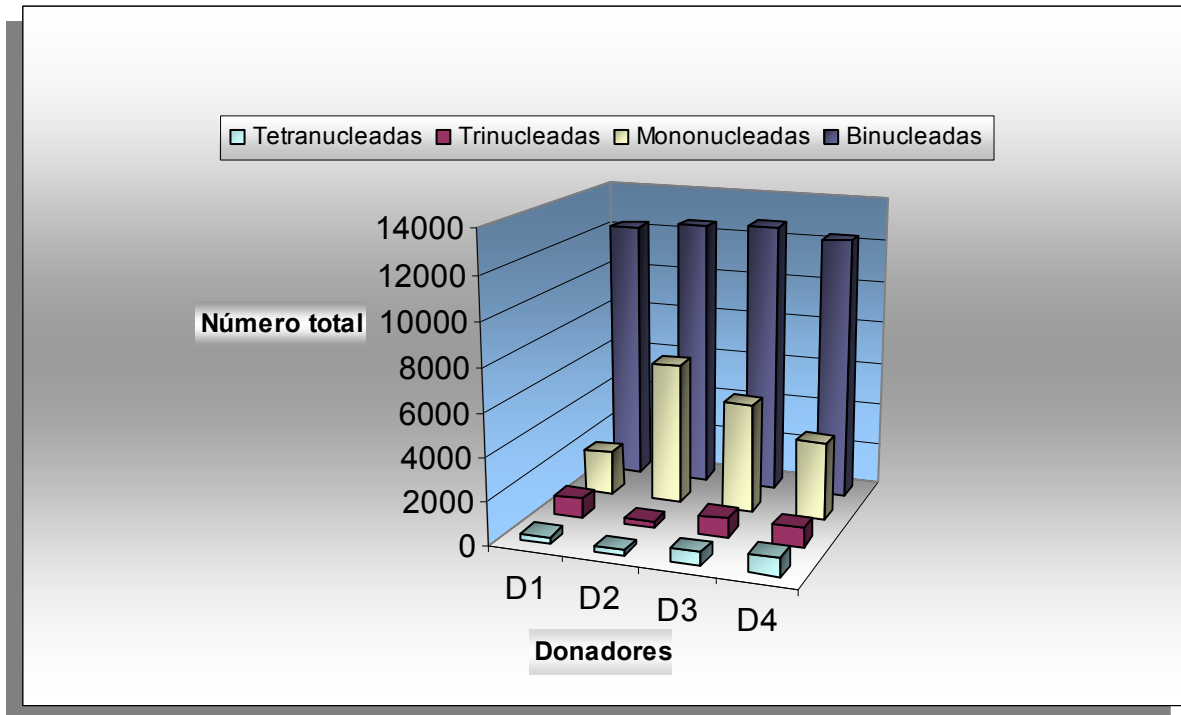
Las concentraciones a las que se expusieron los cultivos celulares en este estudio fueron 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm y 500 ppm y se designaron tomando en consideración:

1) Los trabajos realizados por Andrade en el 2000 y Revilla en el 2002, éste último evaluó los efectos hipoglucémicos de *Equisetum myriochaetum* en pacientes diabéticos a quienes se administró el extracto de acuerdo a su peso, es decir se tomaron 0.33 g de la planta seca (partes aéreas) por cada kilogramo de peso del paciente.

2) El trabajo realizado en el Laboratorio de Genética de la UNAM por Bárcenas en el 2004 quien utilizó las concentraciones de 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 500 ppm del extracto homogenizado y liofilizado de las partes aéreas de *Equisetum myriochaetum* para evaluar la genotoxicidad *in vivo* utilizando células somáticas de *Drosophila melanogaster* donde la concentración de 1.56 ppm correspondía a la dosis empleada en el ser humano.

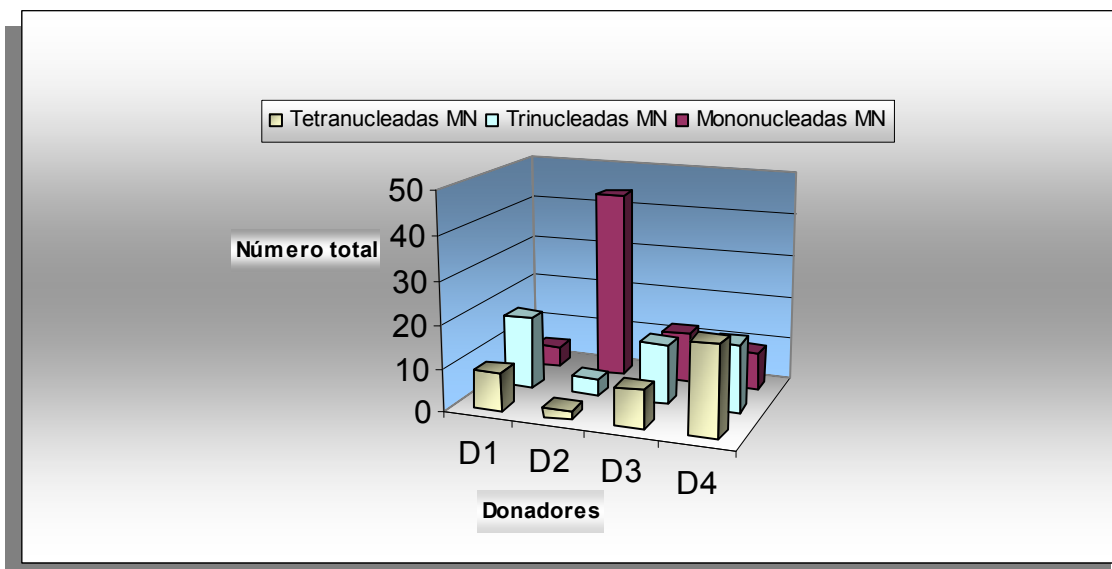
La utilización del ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN) en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro* se llevo a cabo para determinar la capacidad genotóxica y citotóxica del extracto homogenizado y liofilizado de las partes aéreas de *Equisetum myriochaetum*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se enlistan en la tabla VI y gráfica 5 donde se muestran las distribuciones de células de acuerdo al número de núcleos (mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas) evidenciado una distribución mayor en células binucleadas con respecto a las otras células para cada uno de los donadores, es decir para cada concentración de cada donador se encontró un porcentaje de células binucleadas mayor al 50 %, lo que asegura que la prueba fue realizada correctamente debido que al tener mayor cantidad de células binucleadas (en donde se realizó el análisis de genotoxicidad) inferimos que los cultivos sufrieron una ronda de división después de añadir la Citocalacina B, factor importante para la técnica de micrónucleos. Con relación a las células mononucleadas suponemos que son todas aquellas células que no sufrieron una estimulación necesaria para llegar a dividirse. Pese a que no se encontraron una gran cantidad de células trinucleadas, el origen de éstas en todas las concentraciones e incluso en los controles de los donadores es incierto debido a que teóricamente se esperaría tener células binucleadas que han sufrido un ciclo de división o células tetranucleadas con dos ciclos de divisiones. Finalmente es importante mencionar que en la literatura no hay estudios donde aborden el origen de estas células, sin embargo en la mayoría de los trabajos que utilizan la técnica de micronúcleos hay presencia de células trinucleadas (Fenech *et al.* 1999a).



Gráfica 5. Distribución de células de acuerdo al número de núcleos.

La frecuencia de micronúcleos en las células mononucleadas, trinucleadas y tetranucleadas fue cero o cercana a cero para algunas concentraciones, por lo que estas células no se contemplaron al hacer el análisis estadístico, sin embargo se sumó el número total de éstas mismas para cada donador a fin de representar su distribución en la gráfica 6, donde se observa que el número total de micronúcleos está por debajo de veinte, para los tres tipos celulares en los donadores a excepción del donador dos, que tiene células mononucleadas con micronúcleos alrededor de cincuenta.



Gráfica 6. Distribución de células con micronúcleos (MN).

Los resultados no mostraron ser positivos para genotoxicidad al comparar la frecuencia de micronúcleos de las concentraciones con su control por medio de la prueba de ANOVA (tabla VIII). Sin embargo, cuando se analizó la frecuencia de MN en forma individual, en el donador dos (D2) se observó en las concentraciones 25 ppm y 50 ppm un incremento en la frecuencia de MN de 0.33 y 0.026 con respecto al control de 0.006, sin embargo, no resultó estadísticamente significativo para considerarlo como positivo (valor de $p= 0.6157$). La explicación al incremento diferencial en la frecuencia de micronúcleos del donador dos con relación a los demás donadores podría deberse a la variación intrínseca de cada persona para responder a un agente químico debido en gran parte a las capacidades metabólicas y a las diferencias en los mecanismos de reparación, es por ello que en estudios con poblaciones humanas es común encontrar variaciones incluso en los controles negativos (Hirvonen, 1995). Aunado a esto es importante mencionar que fue precisamente el donador dos quien presentó el mayor número de células mononucleadas con micronúcleos (gráfica 6) por lo que es muy probable que este aumento se deba a un elevado número de micronúcleos basales que como se mencionó anteriormente, la presencia de estas células es un indicador de un daño pre-existente. Otra explicación es que algunos de los polimorfismos genéticos para las enzimas de reparación del material genético pueden afectar la función de estas

proteínas, permitiendo un incremento en la susceptibilidad en una exposición a agentes químicos o ambientales. Entre los polimorfismos genéticos encontramos a APE1 y a su alelo APE1 148G/u que esta fuertemente relacionado con el retraso mitótico de cultivos de linfocitos de sangre periférica (Hu *et al.* 2001). Los números de alelos variantes para los genotipos APE1 están asociados significativamente con un retraso prolongado en el ciclo celular en sujetos sanos (Hu *et al.* 2002).

Con respecto al análisis de citotoxicidad se calculó el índice de proliferación celular de la citocinesis bloqueada (CBPI) para cada una de las concentraciones en los diferentes individuos (tabla VI) con la prueba de ANOVA para una vía. Se concluyó que no ocurrieron alteraciones en las divisiones celulares de los cultivos, es decir, no se encontró evidencia suficiente para asegurar que las concentraciones del extracto modifican la cinética de proliferación celular *in vitro* lo que sugiere que las dosis a las que fueron expuestos los cultivos no son citotóxicas, lo que coincide con lo reportado por Bárcenas (2004) quien no encontró toxicidad en el extracto de *Equisetum myriochaetum* aún en concentraciones tan altas como 3,700 ppm para determinar la LD₅₀ de su trabajo. También coincide con lo reportado por (Chávez, 1991) quien realizó un análisis de toxicidad en *Artemia Salina* con el extracto de las partes aéreas *Equisetum myriochaetum*. Se concluyo que había un bajo porcentaje de mortalidad por el extracto en su totalidad, pero al realizar la misma prueba para los dos compuestos bioactivos, pinocembrina (LC₅₀=8.2) y crisina (LC₅₀=8.2) mostraron tener una considerable toxicidad. La pinocembrina posee actividad ovicida, larvicida, fasciolocida y antimicrobiana, (Camacho, 1990). Con relación a la crisina se ha demostrado la actividad antimicrobiana, específicamente contra *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans* (Rojas, 1990).

En suma, el extracto de las partes aéreas *Equisetum myriochaetum* no presentó actividad genotóxica ni citotóxica *in vitro*. Estos resultados son congruentes con los realizados por Bárcenas en el 2004, quien concluyó que no había un incremento significativo en las frecuencias de mutaciones de las series experimentales con respecto a las del testigo, es decir, los compuestos contenidos en el extracto de la planta no fueron capaces de inducir alteraciones genéticas en

los discos imaginales que dan origen a las alas de las moscas. También se realizó la prueba de teratogénesis del mismo extracto, resultando ser negativa ya que no se observó ningún tipo de alteración morfológica en las moscas adultas tratadas.

Con todo esto podemos decir que el extracto de las partes aéreas *Equisetum myriochaetum* se perfila como un auxiliar en el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2.

Conclusiones

De acuerdo a las condiciones del experimento el extracto de *Equisetum myriochaetum* mostró:

- No ser genotóxico en cultivos de linfocitos de sangre periférica de cuatro individuos.
- No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos debidas al género.
- Nula actividad citotóxica al no alterar el índice de proliferación celular.

Sugerencia:

Se propone realizar estudios con el extracto de *Equisetum myriochaetum* en seres humanos con diabetes melitus tipo 2 para evaluar su efecto para contra la diabetes.

Referencias

- ADA American Diabetes Assosiation. (2006) Página web <http://www.diabetes.org/home.jsp> (acceso en Febrero 2006).
- Alarcón-Aguilar, F.J., Román Ramos, R., Jiménez, M., Reyes-Chilpa, R., González, B.Y., Flores, J.L., (1997). Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 55; 171–177.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Román-Ramos, R., Pérez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., Flores-Saenz, J.L., (1998) Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J. Ethnopharmacol.* 61; 101–110.
- Alarcón Aguilar, F.J., Jiménez, M., Reyes-Chilpa, R., Romáan Ramos, R., (2000a). Hypoglycaemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* 72; 21–27.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., González-Paredes, B., Contreras-Weber, C., Roman-Ramos, R., (2000b). Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 69; 207–215.
- Alberts B. (1996) Biología molecular de la célula. Tercera edición. *Ediciones Omega, S.A.*, Barcelona, 1387p.
- Andrade-Cetto, A. (1999) Estudio etnofarmacológico de *Equisetum myriochaetum* Schlechtendal y Cham y *Cecropia obtusifolia* Bertol. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias, UNAM. 97pp.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., Revilla-Monsalve, M.C., Islas, A.S., (2000). Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on Streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol* 72; 129–133.
- Andrade-Cetto, A. (2005) Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol* 99; 325-348.
- Argueta A. (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, *Instituto Nacional Indigenista, México*. Tomo I, 1193p

- Bárcenas-Rodríguez, H., 2004. Determinación del efecto genotóxico de *Equisetum myriochaetum* en células somáticas de alas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, 75.
- Betancourt, Y. (2001) 1000 plantas medicinales y aromáticas de México. Jardín botánico de Tlaxcala. <http://www.sdnpc.undp.org/rc/forums/mgr/sdnca/msg/264/.htm>
- Bevan, J. A, Thompson, J. H; Thomas, J. A; Jones, J. E; Beckerman, J.H; Lomax, P; Ruth, R.H; Westfall, T.C; Paulus, H. E; Cho, A, K; (1982). Fundamentos de Farmacología México. HARLA S.A. de C.V; (ed), pp 285.
- Bye, R; Linares, E. (1999) Plantas medicinales del México prehispánico En: Arqueología Mexicana. Plantas Medicinales Prehispánicas. Vol. VII N° 39; 4-13.
- Camacho, M. R. (1990) Nuevos metabolitos de la *Hintoria latifora* (sesse et mucino ex D. C.) y aislamiento de compuestos bioactivos del *Teloxys graveolens*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- Camacho, M. R; Chávez, D, Mata, R; Palacios-Rios, M. (1992) Estudio Químico de *Equisetum myriochaetum*. *Fitoterapia*. 63; 471.
- Chávez, V. D. (1991) Estudio Químico de *Equisetum myriochaetum* (Schlect & cham.) *Tesis de Licenciatura*, UNAM, México, D.F. p 34-79.
- Cragg, G.M; Newman, D.J; Snader, K.M. (1997) Natural Products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 60; 52-60.
- Dellarco, V. L., Mavournin, K. H., and Tice, R. R. (1985) Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environ. Mutagen.* 7; 405–424.
- Elhajouji, A., Van Hummellen, P., and Kirsch-Volders, M. (1995) Indications for a threshold of chemically induced aneuploidy *in vitro* in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 26; 292–304.
- Evans, H. J. (1990) Cytogenetics: overview. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340B, 301–323.
- Farooqi, Z., Darroudi, F., and Natarajan, A. T. (1993) Use of fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* 8; 329–334.
- Fenech, M. and Morley, A. A. (1985b) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147; 29–36.
- Fenech, M. and Rinaldi, J. (1995) A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. *Carcinogenesis* 16(2); 223–230
- Fenech M. Holland N. Chang W.P., Zeiger E., Bonassi S. (1999a). The Human Micronucleus Project- An international collaborative study on the use of the

micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428; 271- 283.

- Fenech, M., Crott, J., Turner, J., and Brown, S. (1999b) Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14(6), 605–612.
- Fenech M; (2000).The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455; 81-95.
- Fenech M; Chang W.P; Kirsch- Volders, Holland N; Bonassi S. Zeiger E. (2002) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 534; 65-75
- Fitoterapia, (2001) <http://www.personal.redestb.es/martin/fito.htm>
- Gaedcke, W.F. y Steinhoff, K.B. (2003) Herbal Medicinal Products. CRC press. Stuttgart. 177 p.
- Gauthier, J. M., Dubeau, H., Rassart, E., Jarman, W. M., and Wells, R. S. (1999) Biomarkers of DNA damage in marine mammals. *Mutat. Res.* 444(2); 427–439.
- Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A y Witteman J. (2002), Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *Clin. Nutr.* 75; 880 – 886.
- Hernández, X E. (1976) La etnobotánica tres puntos de vista y una perspectiva. Barrera A. Ed. 1983 INIREB. Jalapa, Veracruz México. 13-18p.
- Hertog MGL, Hollman PCH y Putte van de B. (1996) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 41; 1242 – 1246.
- Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O y Kondo K.(2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci.* 47; 357 – 362.
- Hirvonen A. (1995). Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *JOEM* 37: 37-43.
- Holmsted, B. (1991) Historical perspective and future of ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 32 (1); 7-24.
- Hu JJ, Smith TS, Miller MS, Mohronweiser HW, Golden A, Case LD. (2001). Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22; 917-922.
- Hu JJ, Smith TR, Miller MX, Lohman K, Case LD. (2002). Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Env. Mol. Mutagen* 39; 208-2015.

- Islas S. Y Miranda P. (1993) Diabetes Mellitus Concepto y Clasificación. En: Diabetes Mellitus. 1993. Islas S. Y A. Lifshitz ed. *Interamericana México*. 303-328 p.
- 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.
- Jin-Ming, K; Ngoh-Khang, G; Lian-Sai, C y Tet-Fatt, C. (2003).Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Act. Pharmacol. Sin.* 24(1), 7-21.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., and Van Hummelen, P. (1997) The *in vitro* micronucleus test: a multi-end-point assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* 392; 19–30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., et al. (2000) Report from the *in vitro* micronucleus assay working group Washington International Workshop on Genotoxicity_ *Test Procedures*, 25–26.
- Klaassen, C.D; (1994). Principios de toxicología y tratamiento de intoxicación. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México. *Goddman C.S. Gilman (eds)*. Médica panamericana, pp: 69-74
- Lozoya, X. Lozoya, M.(1992) Flora Medicinal de México, Primera parte: Plantas Indígenas, editado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S.)
- Lozoya, X. (1999) Códice Badiano En: Arqueología Mexicana. Plantas Medicinales Prehispánicas. Vol. VII N° 39; 22-23.
- Mann J. (1987) Secondary Metabolism. Oxford Chemistry series New York. 207p
- 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.
- Masunaga, S., Ono, K., and Abe, M. (1991) A method for the selective measurement of the radiosensitivity of quiescent cells in solid tumours— combination of immunofluorescence staining to BrdU and micronucleus assay. *Rad. Res.* 125; 243–247.
- Miller O. J; Therman E. (2001) Human chromosomes. 4th edition. *Springer-Verlag*. New York, EUA, pp. 207-221.
- Odagiri, Y., Takemoto, K., and Fenech, M. (1994) Micronucleus induction in cytokinesis-blocked mouse bone-marrow cells *in vitro* following *in vivo* exposure to X-irradiation and cyclophosphamide. *Env. Mol. Mutagen.* 24; 61–67.
- Palacios – Rios, M. (1992) Equisetaceae. En: Flora de Veracruz. V. Sosa (ed) 69; 13 – 22.

- Palacios- Rios, M. (1998) Equisetaceae. En: Flora del Bajío y de regiones adyacentes. J. Rzedowski y G. Calderón de Rzedowski (eds.) (en prensa):1-6.
- Pérez Pasten L.E. (1997) Manual para el Paciente con Diabetes mellitus, tercera edición, Ed. *Soluciones Gráficas Foli de México*, México, México, D.F. 216 p.
- Revilla, M.C; Andrade-Cetto, A; Islas, S; Wiedenfeld, H. (2002) Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. *J. Ethnopharmacol.* 81; 117-120.
- Rojas, M. A; (1990) Constituyentes bioactivos de *Raticida latipalearis richards* y evaluación de la actividad antimicrobiana potencial de varios metabolitos secundarios aislados de plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, México.
- Román-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Partida-Hernández, G., Lara-Lemus, A., Alarcon-Aguilar, F., (1991) Experimental study of the hypoglycaemic effect of some antidiabetic plants. *Arch. Inv. Méd. México* 22; 87–93.
- Román-Ramos, R., Contreras-Weber, C.C., Nohpal-Grajeda, G., Flores-Sáenz, J.L., Alarcón-Aguilar, F.J., 2001. Blood glucose level decrease caused by extracts and fractions from *Lepechinia caulescens* in healthy and alloxan-diabetic mice. *Pharmac. Biol.* 39; 317–321.
- Rosas, A. H. (2000) Análisis fitoquímico de *Cytocarpa procera* HBK y *Amphipterygium adstringes* Shiede ex Schecht. *Tesis de Mestría. Colegio de Postgraduados*. Instituto de Recursos Naturales. Estado de México. Pp 3-19.
- Russell P.J. (1998) Genetics. 5th edition. Addison-Wesley Longman. California, EUA, pp. 610, 611, 629-643.
- Schuler, M., Rupa, D. S., and Eastmond, D. A. (1997) A critical evaluation of centromeric labelling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage *in vitro*. *Mutat. Res.* 392; 81–5.
- SSA, 2004. Página de la Secretaría de Salud, Gobierno de México. Página Web. <http://www.ssa.gob.mx> (acceso en noviembre 2004)
- Stahl W, Ale – Agha N y Polidori M.C. (2002) Non – antioxidant proprieties of carotenoids *Biol. Chem.* 383: 553 – 558.
- Swinyard, E. A. (1992). Introducción de drogas nuevas. México. *Remington, Médica panamericana (ed)*, 17^aed; Vol.2 pp: 1836-1852.
- Taxol, (2002) <http://taxol.com/timeli.htm/>
- Terao J, Yamaguchi S, Shirai M y Collaborators. (2001) Protection by queracitin and quercetin 3 –O – beta – D- glucuronide of peroxyinitrite –

induced antioxidant consumption in human plasma low – density lipoprotein. *Free Radic. Res.* 35; 925 – 931.

- Trease, G. E, Evans, W. (1987) Tratado de Farmacognosia. 12va ED. Nueva Editorial Interamericana. México. pp78-85
- Trease; Evans, W.C. (1991). Farmacognosia. 13va ed. *Interamericana Mc Graw Hill*. México. 901p.
- 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.
- Wiedenfeld, H; Andrade, C.A; Perez, A.C. (2000) Flavonol Glycosides from *Equisetum myriochaetum*. *Biochem. Systemat. Ecol.* 28; 395-397.
- World Health Organization (WHO) (1998) World Diabetes. A newsletter from the world Health Organization, En: Organización Mundial de la Salud (OMS), Página de Internet http://www.who.ch/ncd/dia/nl_no_3.htm.
- World Health Organization (WHO) (2005) Página web <http://www.who.org> (acceso en Noviembre 2005).