

# Alteración del desarrollo embrionario de pollo (*Gallus gallus domesticus*) por tratamiento con extractos acuoso y etílico de guaraná (*Paullina cupana*)

Rosas Paredes Aurora, Chirino Galindo Gladys, Palomar Morales Martín\*

Universidad Nacional Autónoma de México, Laboratorio de Metabolismo de la Diabetes Mellitus, Unidad de Morfología y Función Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Avenida de los Barrios Número 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado. México. C. P 54090, México.

\*Autor para correspondencia: martin\_palomar2004@yahoo.com.mx

**Recibido:**  
05/julio/2018

**Aceptado:**  
02/agosto/2018

**Palabras clave:**  
Teratogénesis,  
embrión de pollo,  
*Paullina cupana*

**Keywords:**  
Teratogenesis,  
chick embryo,  
*Paullina cupana*

## RESUMEN

La semilla de guaraná (*Paullinia cupana*) tiene un alto contenido en cafeína, taninos, flavonoides, entre otras sustancias; las semillas son utilizadas para elaborar bebidas energéticas que pueden ser consumidas por cualquier persona, incluyendo mujeres embarazadas, sin saber que potencialmente son capaces de causar daño fetal. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la administración de extracto de semilla de guaraná afecta el desarrollo embrionario de pollo. Se administró el extracto, acuoso o alcohólico, a dosis de 50 %, 75 % y 100 %, en huevos embrionados, y se hicieron estudios morfológicos de los embriones en los estadios 21 y 37; además, se realizaron cortes histológicos. La administración del extracto causa malformaciones tales como gastrosquisis, dextrocardias, falla de cierre del tubo neural, daño en el cerebro y retardo en el crecimiento de los embriones. En conclusión, existe una fuerte correlación entre el daño a nivel histológico y la aparición de malformaciones.

## ABSTRACT

The seed of guarana (*Paullinia cupana*) has a high content of caffeine, tannin, flavonoids, among other substances; the seeds are used to make energetic beverages that could be consumed by any person, including pregnant women, unaware that are potentially capable of causing fetal damage. The purpose of the present study was to evaluate the effect of the administration of guarana seed extract over chick embryonic development. Water or alcoholic extract was administered at doses of 50 %, 75 % and 100 % to chicken embryos, and thus morphologic studies in embryo stages 21 and 37 were performed; also, histological analysis were also made. The results indicate that the administration of the extract cause malformations such as gastroschisis, dextrocardias, failure of closure of the neural tube, brain damage and delay in embryo growth, which are correlated with damage at histologic level.

## Introducción

*Paullinia cupana*, conocido comúnmente como guaraná, es un arbusto originario de la Amazonia, encontrado en Perú, Brasil, Colombia y Venezuela, que se utiliza para la elaboración de bebidas energéticas, ya que contiene un alto contenido de alcaloides como cafeína, taninos, teofilina, que actúan como estimulantes del sistema nervioso y cardiovascular. Se ha evaluado el contenido de cafeína en diferentes variedades de la planta, además de estudiar sus efectos adelgazantes y/o estimulantes (Kuskoski et al., 2005).

Esta planta contiene como principio activo cafeína ó 3, 7 trimetilxantina (entre un 3 y un 5 %), acompañada de trazas de teofilina y teobromina (Polania, 2015); otros estudios sugieren que el contenido de cafeína es entre 6.2 a 8 % (Cote et al., 2011). El guaraná tiene efecto estimulante del sistema nervioso central por su alto contenido en cafeína, la cual se une a los receptores cerebrales adenosínicos, aumentando el estado de vigilia, tiene un efecto ergogénico (aumenta la capacidad de realizar esfuerzo físico), produce estimulación cardíaca (efecto inotropo positivo), vasodilatación periférica y vasoconstricción a nivel craneal, por lo que se ha sugerido su empleo como antimigrañoso. También estimula la musculatura esquelética y el centro de la respiración; además, aumenta la secreción ácida gástrica y la diuresis (Polania, 2015). La ingestión de grandes cantidades de semilla de guaraná por animales puede causar intoxicación o hasta la muerte (Cote et al., 2011).

Varios estudios demuestran que ingerir guaraná puede inducir elevación de la presión arterial y aumento del gasto cardíaco, pueden presentarse palpitaciones, insomnio, aumento en la frecuencia de la deposición, cefalea (dolor de cabeza intenso y persistente que va acompañado de sensación de pesadez), pirosis (sensación de quemadura que sube desde el estómago hasta la faringe, producida por la regurgitación de líquido estomacal cargado de ácido), náuseas, emesis (vómito) y cambio en la coloración de las heces (Kennedy et al., 2004).

El uso de algunos componentes de hierbas en bebidas energéticas, como guaraná o sus extractos, aumenta la cantidad de cafeína y otras metilxantinas que se ingieren, lo que multiplica cualquier posible toxicidad de dichas moléculas. Zeidán-Chulíá et al. (2013) encontraron que el guaraná induce apoptosis y malformaciones celulares en células neuronales humanas (SH-SY5Y); a mayores concentraciones se mostraron inflamaciones y acortamiento neuronal (por retracción o falta de crecimiento), también se presentaron apoptosis,

hinchamiento de membrana celular, pérdida volumen celular y mayor granularidad.

A pesar del uso frecuente de estos productos, se han realizado pocos estudios que demuestren si existe algún efecto sobre el desarrollo fetal al consumirse durante la gestación.

El desarrollo embrionario y fetal normal pueden ser alterados por diversos factores externos, como agentes físicos, químicos o biológicos, los que al inducir alguna anomalía suelen ser causa de defectos congénitos, y por ello se les ha denominado teratógenos (Landeiro et al., 2002). Estas anomalías congénitas son alteraciones estructurales o funcionales que pueden estar presentes al nacimiento, ser de origen genético o adquirido, o la combinación de ambos factores (Moore y Shiota, 1996).

Un defecto congénito mayor puede ser definido como una anomalía que de no ser corregida, compromete significativamente el funcionamiento corporal normal, o que reduce la expectativa normal de vida. La anomalía menor es aquella alteración que tiene primariamente una significación cosmética, pero no compromete tan seriamente la forma o funcionalidad corporal (Moore y Shiota, 1996).

Las anomalías pueden ser causadas por diversos factores como lo son los factores citogenéticos que afectan al 5 % de la población; factores genéticos (mendelianos) y mutaciones génicas 15-20 %; y factores desconocidos 65-70 %. También las etiologías más claras suelen ser causas exógenas, tales como la infección materna en útero, 3 %; alguna patología materna en el embarazo (fenilcetonuria, diabetes, tabaquismo, alcoholismo, desnutrición), 4 %; fuerzas externas en útero, 2 %; otras causas como medicamentos, químicos, irradiación, hipertermia, etc., 1 % (Landeiro et al., 2002).

La gran contribución de las aves como modelo de investigación biomédica es incuestionable. Distintas especies (gallina, codorniz, pato, etc.) han sido utilizadas como modelos en estudios tanto del desarrollo, como en ciertas patologías o estudios quirúrgicos. El huevo de ave ofrece un mecanismo para el estudio del desarrollo embrionario y la patología de forma muy accesible y detallada, sirve como modelo para el estudio de múltiples aspectos ontogénicos y teratógenicos (Palomar et al., 2016).

El embrión de pollo es similar al del humano en las etapas tempranas del desarrollo, característica que valida su uso en estudios de morfogénesis. Algunos aspectos morfológicos se pueden abordar observando

estos modelos, y, aunque son bien conocidos, son útiles para conocer de cerca el fenómeno y para despertar inquietudes de investigación. El desarrollo del embrión de pollo se lleva a cabo a través de 46 estadios, cada uno caracterizado por algún evento celular o morfológico. El pollo resulta útil en experimentos de teratogénesis en los que se desea evaluar el efecto de fármacos, metales pesados, micotoxinas, extractos de plantas y otras sustancias. El empleo de algún agente teratogénico en este modelo depende de la susceptibilidad a él, de la vía de inoculación, y del mecanismo y tiempo en el que ejerce su acción en el embrión (Drake et al., 2006).

Los efectos tóxicos de distintos metabolitos de origen vegetal han comenzado a abordarse en los últimos años, como por ejemplo el estudio de efectos de los alcaloides como la cafeína sobre la salud, que ha generado gran interés, en especial por la posibilidad de que puedan promover un desarrollo anormal en el feto cuando las mujeres la ingieren. En el pollo, la administración de cafeína durante el desarrollo embrionario temprano promueve defectos en el cierre del tubo neural (Ma et al., 2012).

En el humano no se sabe si guaraná y sus componentes son tóxicos, debido a los pocos estudios que hay en el desarrollo embrionario del ser humano. Estudios realizados en ovario de hámster demostraron que puede causar efectos genotóxicos, mutagénicos y citotóxicos. También se han realizado estudios en bacterias como antimicrobiano o mutagénicos, pero ningún estudio se ha enfocado en el desarrollo de los organismos, por el cual, nuestro objetivo es probar el extracto de pastillas del guaraná en diferentes concentraciones en embriones de pollo (*Gallus gallus domesticus*), e identificar si causa malformaciones en el embrión.

## Metodología

### Preparación de extracto de guaraná

En tiendas naturistas se obtuvieron cápsulas de guaraná en polvo, de la marca GNC (en presentación de 250 mg por porción). Las cápsulas se abrieron y de dos de ellas, se pesó y mezcló el contenido, que fue sometido a maceración en agua por dos días, en oscuridad. Por separado, se realizó el mismo procedimiento con otras dos cápsulas, que se maceraron en alcohol al 96 %. Al término de la maceración, los fluidos obtenidos se filtraron para eliminar el residuo; y acto seguido se sometieron a pruebas colorimétricas para comprobar la presencia de flavonoides, taninos y alcaloides. Posteriormente, se realizaron diluciones de los extractos al 75 % y 50 %, en agua destilada.

## Material biológico

Se adquirieron 60 huevos fertilizados, en la empresa ALPES, los cuales fueron incubados a 37-38° C, con 65 % de humedad, en una incubadora para huevos de pollo marca Cassel, que consta de un sistema de movimiento de embriones cada dos horas. El extracto (acuoso o etanólico) a concentraciones de 50, 75 ó 100 % fue aplicado una sola vez con una microjeringa Hamilton en un volumen final de 10 µL; otros huevos fueron inyectados de igual manera con el mismo volumen de agua destilada, y se consideraron como grupo control. Posteriormente, los embriones fueron incubados por 3 ½ días para estudiar el efecto de guaraná en embriones de estadio 21; o por 11 días para estudiar el efecto de guaraná en embriones de estadio 37.

## Análisis morfológico y morfométrico

Al término de la incubación, se abrieron los huevos, y los embriones se fijaron en formol al 10 % o fluido de Bouin. Dentro de las siguientes 48 horas, los embriones fijados en fluido de Bouin fueron pesados con una balanza semianalítica, medidos con una regleta vernier, y posteriormente fueron examinados con ayuda de un microscopio estereoscópico Leica MZ6, y se tomaron fotos con una cámara digital Moticam 5.0. Adicionalmente, para los embriones del estadio 37, se hicieron cortes anatómicos, por el método de Hashizume et al. (1993). Por último, de los embriones fijados en formol, se realizaron cortes histológicos siguiendo la técnica histológica convencional de rutina H y E.

## Resultados y discusión

Las pruebas colorimétricas realizadas indicaron que la presentación comercial del guaraná posee alcaloides, taninos y flavonoides (Tabla 1). Se sabe que el guaraná en polvo es rico en cafeína, y se consume por su actividad estimulante.

**Tabla 1.** Pruebas fitoquímicas cualitativas realizadas en el extracto de guaraná.

Prueba	Resultado
Alcaloides	+++++
Taninos	+++++
Flavonoides	++

## Desarrollo embrionario

El peso y talla de los embriones en estadio 21 y 37 no se ve afectado por el tratamiento con ninguno de los dos

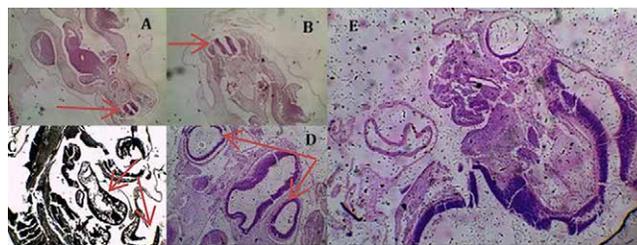
extractos, en todas las dosis utilizadas (Tabla 2). Por otra parte, el análisis morfológico grueso y fino demostró que todos los embriones sometidos a tratamiento con extractos acuoso o etanólico de guaraná, evaluados en estadio 37, mostraron malformaciones (porcentaje de 100 % de teratogénesis), mientras que en estado 21 también se encontraron malformaciones, aunque en un porcentaje menor. Las malformaciones se clasificaron de acuerdo al glosario más reciente publicado (Solecki et al., 2015).

**Tabla 2.** Parámetros morfométricos de los embriones de pollo sometidos a tratamiento con extracto de guaraná.

Estadio 21				
Extracto	Acuoso		Etanólico	
	Peso (g)	Tamaño (mm)	Peso (g)	Tamaño (mm)
Control	0.04 ± 0.20	4.75 ± 2.17	0.03 ± 0.17	3.87 ± 1.96
50 %	0.04 ± 0.20	4.75 ± 2.17	0.09 ± 0.30	5.50 ± 2.34
75 %	0.09 ± 0.30	6.25 ± 2.50	0.06 ± 0.25	4.75 ± 2.17
100 %	0.03 ± 0.19	4.50 ± 2.12	0.10 ± 0.32	6.00 ± 2.44
Estadio 37				
Extracto	Acuoso		Etanólico	
	Peso (g)	Tamaño (mm)	Peso (g)	Tamaño (mm)
Control	1.41 ± 1.18	20.25 ± 4.5	1.44 ± 1.20	18.75 ± 4.3
50 %	2.24 ± 1.49	27.25 ± 5.2	1.66 ± 1.29	19.75 ± 4.4
75 %	2.26 ± 1.50	27.17 ± 5.2	2.53 ± 1.59	27.00 ± 5.1
100 %	2.14 ± 1.46	26.75 ± 5.1	2.69 ± 1.64	33.75 ± 5.8

Promedio ± error estándar de al menos cinco determinaciones independientes. No hay diferencias estadísticas entre grupos.

Aun cuando no se encontró efecto de la administración del extracto sobre peso y tamaño, si se observaron daños morfológicos. De esta forma, en el estadio 21 se vio afectado el cierre del tubo neural, así como el desarrollo incompleto del corazón (Figura 1). Los embriones desarrollaron corazones triloculares, biloculares y un organismo presento un corazón con una sola cavidad.



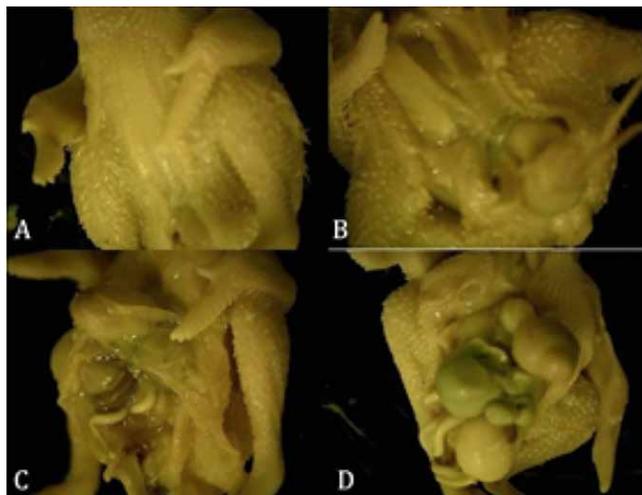
**Figura 1.** Cortes histológicos de embriones en estadio 21 con extracto etílico al 50 %. (A,B) donde se observa el tubo neural sin cerrar; y con extracto etílico al 100 %, en los que también se observa daño cardíaco y adelgazamiento del tubo neural (C),ojos asimétricos(D) Control (E).

Esto puede deberse a que en este estadio, que sucede durante la fase premorfofogenética del desarrollo, no existe una estructura anatómica que identifique al corazón, sólo están presentes las células que paulatinamente son determinadas para transformarse en miocardio. En el pollo la etapa más temprana en que se han detectado células con esta característica es en la blástula, se han descrito dos preáreas cardiogénicas, ubicadas en el epiblasto, a cada lado de la mitad posterior de la línea primitiva, cuyas células apenas han iniciado la especificación para transformarse en miocardio (Montgomeri et al., 1994). Esta etapa del desarrollo es muy sensible a los compuestos que puedan interferir y algunos alcaloides del extracto pudieran estar interfiriendo con el desarrollo de células del miocardio (Rojas y Walker, 2012).

En el estadio 37, ya hay corazón formado en pollos controles, mientras que en los tratados con extractos tanto acuosos como etanólicos, se encontraron malformaciones severas, en estudios experimentales en aves se ha demostrado que los segmentos que se integran en el extremo caudal del corazón embrionario provienen del mesodermo espláncnico, caudal al corazón en tubo recto (De la Cruz, 1998), mientras que las células que forman los segmentos cefálicos vienen del segundo campo cardiogénico, constituido por mesénquima presente en el piso de la faringe (Waldo et al., 2001). Esto podría indicar que los compuestos que tiene el guaraná están implicados desde el inicio de la formación del tubo cardíaco pero que estarían interfiriendo en la conformación de la estructura del corazón en estadios más avanzados; no se conocen todavía los mecanismos responsables de que el tubo cardíaco mantenga su camino y se curve hacia la derecha, no obstante existen evidencias de la implicación de una serie de genes que se expresan desde etapas muy tempranas de la embriogénesis (Salazar et al., 2006).

La gastrosquisis es un defecto congénito de la pared abdominal caracterizado por un orificio, que pone en exposición permanente las partes del intestino (Callejas

et al., 2018); ésta fue la malformación que se presentó con más frecuencia en las tres dosis empleadas (50, 75 y 100 %) en embriones de estadio 37, como se aprecia en la figura 2, tanto en el extracto acuoso como etanólico. Es probable que esto se deba a que el guaraná tiene alto contenido en taninos. Giménez (2014) menciona que los primeros en estudiar esta sustancia fueron Mc Clymant y Duncan en 1852, que reportaron que el sorgo es dañino en aves debido a su alto contenido en taninos, pues deprime el crecimiento del organismo ya que interfiere con la digestión; es posible que un efecto similar cause el retraso de desarrollo embrionario.



**Figura 2.** Embriones de pollo tratados con extracto etanólico de guaraná a diferentes concentraciones: 50 % (B); 75 % (C), y 100 % (D), con respecto a un embrión no tratado (A).

Por otra parte, los embriones de pollo en estadio 21 sin adición muestran el desarrollo normal. En la figura 3A, se pueden apreciar las flexiones normales para esta etapa de desarrollo, los primeros arcos viscerales, los ojos pero sin pigmentación, y los primordios de alas, el embrión muestra entre 39 y 41 somitas. Los embriones sometidos a tratamiento con extracto de guaraná manifiestan muchos daños; por ejemplo, en la figura 3B, para un embrión tratado con extracto acuoso al 50 %, se observa una deformación en la cola, no hay un desarrollo completo de los primordios de alas, tampoco se aprecia el contorno del tronco medio. En la figura 3C, se muestra un embrión sometido a extracto al 75 %, se observa poco desarrollo del ojo, no hay una buena flexión del embrión, el número de somitas es menor al de los parámetros normales. La incubación en presencia de extracto al 100 % muestra también daño, así, en el caso del panel D, el embrión no presenta ninguna flexión, tampoco hay desarrollo completo de los primordios, no hay pigmentación en el ojo, hay deformaciones en la cola, no tienen el número de somitas para su estadio y su tamaño es pequeño comparado con los embriones anteriores; mientras que en el caso

del embrión de la figura 3E se observa el embrión con poca flexión, desarrollo incompleto en los primordios de las alas así como en la cola, y no se observa el contorno del tronco medio en línea recta (Hamburger y Hamilton, 1951).



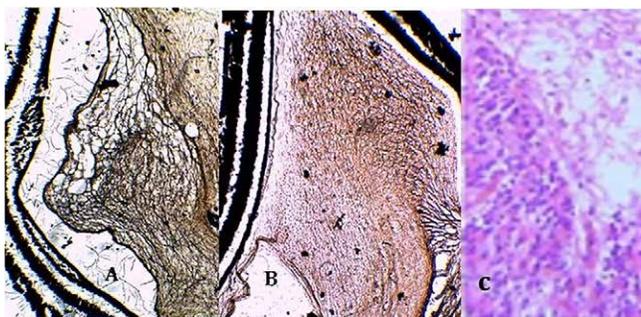
**Figura 3.** Embriones en estadio 21 tratados con extracto acuoso al 50 % (B), 75 % (C), 100 % (D), y etílico al 100 % (E), con respecto a un embrión sin extracto (A).

El tratamiento con guaraná en algunos casos indujo poca densidad de células piramidales en cerebro de pollo en desarrollo, como se observa en la figura 4; la corteza cerebral en el pollo normal se caracteriza por presentar una capa principal de neuronas, la capa de las células piramidales, que hace una trayectoria en forma de una C invertida, aquí se observa que estas células tienen poca densidad y gran cantidad de espacios vacíos.

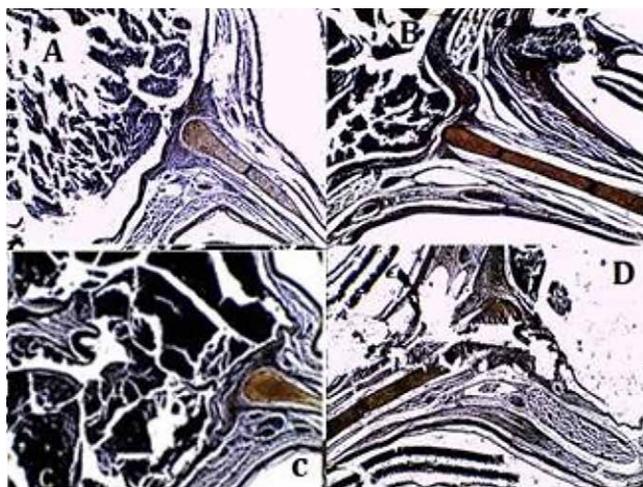
En la figura 5 se observa el pico de los embriones de pollo en estadio 37, en la mayoría se ve la lengua definida, pero la formación ocular se observa hueca, esto se correlaciona con la poca densidad de células en la corteza cerebral, ya que estas estructuras vienen de las mismas placas ectodérmicas (Gilbert y Barresi, 2016).

Esto podría deberse a la cafeína del guaraná ya que se sabe que es teratogénica y que produce una gran variedad de defectos en el desarrollo embrionario como en sistema nervioso, sistema cardiovascular, placodas ópticas, placodas óticas y somitas, como lo menciona Martínez et al. (2006).

Se ha demostrado que las bebidas energizantes ricas en cafeína y taurina disminuyen la supervivencia y afectan la fertilidad y fecundidad de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (Salgado-Carrillo y Ramos-Morales, 2012); así como alta mutagenicidad, evaluada por la prueba SMART (Sandra Díaz-Barriga, comunicación personal, resultados no publicados).



**Figura 4.** Cortes histológicos de cabeza de pollo de estadio 37, sometidos a tratamiento con extracto etanólico al 50 % (panel A) o 75 % (panel B). control (C).



**Figura 5.** Cortes histológicos de cabeza de embrión en estadio 37 tratados con extracto etílico (A,B,C) y acuoso (D).

Los taninos pueden ocasionar una disminución en la absorción de proteínas y carbohidratos, ambos efectos son ocasionados por su habilidad de formar complejos con macromoléculas, el principal motivo por el cual la ingesta de taninos interfiere con la alimentación, además se ha observado su interacción con minerales divalentes como el hierro no hemático, inhibe la absorción de los metales, por lo que es probable que los niños con alguna deficiencia de minerales o en situación de riesgo de desnutrición en general, mujeres embarazadas y poblaciones con alguna deficiencia de proteínas (Vázquez et al., 2012). Posiblemente, la alta cantidad de taninos, no permitió la absorción de nutrientes en los embriones, por lo que éstos no tuvieron un crecimiento normal.

Los flavonoides son compuestos fenólicos con dos anillos aromáticos, unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. generadas por el metabolismo secundario de los vegetales (López, 2002) tienen actividades farmacológicas como antioxidantes en el Sistema Nervioso Central; tienen propiedades

como: sedantes, antidepresivos y anticonvulsivos; dichos efectos son mediados por los receptores GABA. La exposición a niveles altos de flavonoides, ya sea por medio de la dieta o por consumo de suplementos, puede potencialmente saturar al sistema, propicia una sobreproducción de especies ERO (Especies Reactivas de Oxígeno), lo que produce posteriormente daño al DNA y a sus procesos de replicación. Estos efectos pueden ser mayores durante el desarrollo fetal, momento en que el crecimiento celular es rápido y tiene que ser preciso, lo cual puede incrementar la sensibilidad a la exposición a diversos compuestos (Estrada et al., 2012), por lo que se piensa que el extracto de guaraná causó daños tanto en el sistema nervioso como en el sistema circulatorio y sistema digestivo.

En base a los resultados obtenidos, se puede recomendar, con las debidas reservas, y la prohibición para los grupos vulnerables, en particular mujeres embarazadas, el uso de bebidas energéticas, ya que su ingesta podría tener repercusiones indeseables para la salud propia y del producto.

### Conclusiones

1. El extracto de guaraná presenta taninos, alcaloides, como lo es la cafeína y flavonoides.
2. Se sugiere realizar pruebas para determinar la cantidad de sustancias que podrían ser dañinas.
3. El extracto de guaraná causa malformaciones en embriones de pollo, como la gastrosquisis, dextrocardia y abertura del tubo neural.
4. El alto contenido de taninos y alcaloides en el guaraná, es posible, que sean las principales sustancias que causaron anomalías en los organismos.

### Agradecimientos

Los autores reconocen la ayuda de Samantha Jiménez García, Hugo Moreno Porras e Isela Monserrath Santana Lugo, en la obtención de muestras biológicas.

### Referencias

Callejas G. H., Figueira R. L., Gonçalves F. L. L., Volpe F. A. P., Zuardi A. W., Crippa J. A., Hallak J. E., Sbragia L. (2018). Maternal administration of cannabidiol promotes an anti-inflammatory effects of the intestinal Wall in a gastroschisis rat model. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 51(5):e7132. doi: 10.1590/1414-431X20177132.

- Cote M., Rangel C., Sánchez M., Medina A. (2011). Bebidas energizantes: ¿hidratantes o estimulantes? *Rev. Fac. Med.* 59:3. Recuperado el 16 de noviembre de 2017 de [www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v59n3/v59n3a08.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v59n3/v59n3a08.pdf)
- Drake V. J., Koprowski S. L., Lough J. W., Smith S. M. (2006). Gastrulating chick embryo as a model for evaluating teratogenicity: a comparison of three approaches. *Birth Def. Res.*, 76: 58-66.
- Estrada R. R., Ubaldo S. D., Araujo E. A. G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*, 35: 375-384.
- Gilbert S. F., Barresi M. J. F. (2016). *Developmental biology*. 11<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 810 pp.
- Giménez J. (2014). Efecto de taninos del sorgo en la nutrición de aves. Recuperado el 17 de noviembre de 2017, de <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/efecto-taninos-sorgo-nutricion-t31276.htm>
- Hamburger V., Hamilton H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.
- Hashizume R., Noda A., Itoh M., Yamamoto Y., Masui S., Oka M. (1993). A method for detecting malformations in chicken embryo. *Jpn. J. Poult. Sci.*, 30: 298-305.
- Kennedy D., Haskell C., Wesnes K., Scholey A. B. (2004). cognitive performance in human volunteers following administration of 114 guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 79: 401-411.
- Kuskoski E. M., Roseane F., García A. A., Troncoso G. A. M. (2005). Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná. *Vitae, Rev. Fac. Quím. Farm.* 12: 45-52.
- Landeiro P. A., Allende-Bandrés M. A., Fernández M. J. A., Palomo P. P. (2002). Teratogénesis: clasificaciones. *Farm. Hosp.*, 26: 171-177.
- López L. M. T. (2002). Flavonoides. *Ámb. Farm.*, 21: 108-114.
- Ma Z.-L., Qin Y., Wang G., Li X.-D., He R.-R., Chuaia M., Kurihara H., Yang X. (2012). Exploring the caffeine-induced teratogenicity on neurodevelopment using early chick embryo. *Plos One*, 7: e34278. doi: 10.1371/journal.pone.0034278.
- Martínez R. A., Sandoval A., Domínguez A., González R., Aznar E., Reyes-Esparza J., Rodríguez-Fragoso L. (2006). Evaluación toxicológica comparativa de dos productos farmacéuticos a base de hierro. *Rev. Biomed.*, 17: 183-194.
- Montgomeri M. O., Litvin J., González-Sánchez A., Bader D. (1994). Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes. *Dev Biol.*, 164: 63-71.
- Moore L. K., Shiota K. P. (1996). Atlas de embriología clínica. Ed. Médica Panamericana, México. 272 pp.
- Palomar M. M., Chirino G. G., Álvarez R. A., Villanueva S. M. G. (2016). Embriología y Teratología. Manual de animales de laboratorio. FES Iztacala, UNAM. 115 pp.
- Polania L. M. (2015). Bebidas energizantes: Composición química y efectos sobre el organismo. Tesis de Licenciatura Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Rojas M., Walker L. (2012). Malformaciones congénitas: Aspectos generales y genéticos. *Int. J. Morphol.*, 30: 1256-1265.
- Salazar G. M., Sánchez G. C., Contreras R. A., Carrillo Á. B. A., Revilla M. M. C. Palomino G, M. A. (2006). Los segmentos cardíacos primitivos, su implicación en la cardiogénesis normal aplicada a la cardiología pediátrica. *Arch. Cardiol. Méx.*, 76 (Supl. 4): 46-57.
- Salgado-Carrillo M. V., Ramos-Morales P. (2012). Efecto de la bebida energizante mforce (una noche) en la fertilidad y fecundidad de *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Amb.* 28 (Supl. 2): 121.
- Solecki R., Rauch M., Gall A., Buschmann J., Clark R., Fuchs A., Kan H., Heinrich V., Kellner R., Knudsen T.B., Li W., Makris S.L., Ooshima Y., Paumgarten F., Piersma A. H., Schönfelder G., Oelgeschläger M., Schaefer C., Shiota K., Ulbrich B., Ding X., Chahoud I. (2015). Continuing harmonization of terminology and innovations for methodologies in developmental toxicology: report of the 8<sup>th</sup> Berlin workshop on developmental toxicity, 14-16 may 2014. *Reprod. Toxicol.*, 57: 140-146.
- Vázquez F. A., Álvarez P. E., López D. J. A., Wall M. A., de la Rosa L. A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*, 6: 84-93.
- Waldo K. L., Kumiski D. H., Wallis K. T., Stadt H. A., Hutson M. R., Platt D. h., Kirby M. L. (2001). Conotruncal

myocardium arises from a secondary heart field.  
*Development*, 128: 3179-3188.

Zeidán-Chuliá F, Gelain D. P, Kolling E. A., Rybarczyk-Filho J. L., Ambrosi P, Resende T. S., Pires A. S., Texeira R. J. B., Behr G. A., Fonseca M. J. C. (2013). Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and guarana) exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive oxygen species production. *Oxid. Med. Cell. Long.* 2013: Article 791795. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/791795>