



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

TABACO MASTICABLE (Chimó El Tigrito®) Y LA DISFUNCIÓN  
CARDÍACA: UN ESTUDIO EXPERIMENTAL EN MODELO  
LARVARIO DE PEZ CEBRA *Danio rerio*.

Autor: Farmacéutica Celsymar O. Mujica R.

Caracas, Febrero de 2016



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA



**TABACO MASTICABLE (Chimó El Tigrito®) Y LA DISFUNCIÓN  
CARDÍACA: UN ESTUDIO EXPERIMENTAL EN MODELO  
LARVARIO DE PEZ CEBRA *Danio rerio*.**

FARMACEUTICA CELSYMAR O. MUJICA R.

Trabajo de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela  
para optar al título de Magíster Scientiarum en Toxicología

TUTOR: DR. MARCO A. ALVAREZ O.

## DEDICATORIA

**A Dios, mi amado Padre celestial**, por su manifestación de amor constante en cada momento de mi vida, por iluminar mi mente y darme fortaleza en cada momento difícil, en sus manos he podido alcanzar cada meta que me he propuesto lograr.

**A mi madre**, quien espiritualmente siempre ha permanecido a mi lado y a quien dedico cada logro que tengo en la vida.

**A mi padre**, quien ha sido mi fuente de inspiración y mi ejemplo a seguir.

**A mi esposo y a mis hijos, Valeria y Manuel**, mi mayor bendición, a ellos dedico cada uno de mis logros, los amo infinitamente.

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi tutor Dr. Marco Álvarez, Director del Instituto Anatómico, a quien agradezco y admiro inmensamente, por poseer una extraordinaria calidad humana y cuya orientación a través del tiempo que duró el desarrollo de este trabajo, dejó en mí, más que enseñanzas académicas, enseñanzas para la vida.
- ❖ A la Profa. Gladys Romero de Galí, a quien debo la materialización de este trabajo, gracias a su constancia y confianza en mí.
- ❖ A la Lcda. Lourdes Perdomo del Laboratorio de Microscopia Electrónica, por todo el apoyo que me brindó como profesional y como amiga, con sus consejos tan sinceros y oportunos.
- ❖ Al grupo de trabajo del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Lic. Eliana Navarro y Marjorie Arias, por ese apoyo incondicional que se constituyó en un gran aporte para la culminación de este estudio.
- ❖ A la Lic. Yamileth Rivas, quien demostró ser una gran compañera en el trayecto que recorrimos hacia este logro.
- ❖ A mi familia, y a la que Dios me regaló al unirme a Roife, mi compañero de vida, a todos gracias por el apoyo que me brindaron cada vez que así lo requerí.
- ❖ Al Lic. Alexis Torres, a quien admiro y aprecio profundamente, por todo el conocimiento y apoyo que me ha brindado siempre.

- ❖ A mi grupo de trabajo, gracias por todo el apoyo que me brindaron, no siempre se tiene la fortuna de formar parte de un equipo con tanta calidad humana y valores.
- ❖ Al Ejército Bolivariano, digna institución castrense que me permitió llevar a cabo el presente estudio.
- ❖ A todas las personas que de una u otra forma, intervinieron para que este trabajo pudiera llegar a su culminación.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA



FACULTAD DE FARMACIA

## POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA

TABACO MASTICABLE (Chimó El Tigrito®) Y LA DISFUNCIÓN CARDÍACA: UN ESTUDIO EXPERIMENTAL EN MODELO LARVARIO DE PEZ CEBRA *Danio rerio*.

Farmacéutica Celsymar O. Mujica R.

### RESUMEN

El Tabaco Masticable Chimó El Tigrito® (TM-ChT®), es una pasta suave de tabaco alcalinizado y aromatizado de fabricación semi-industrial, altamente consumido en la población venezolana por jóvenes en edad escolar y adolescentes. Reportes clínicos y experimentales, han ilustrado algunas señales de toxicidad de este producto; sin embargo, poco se conoce de su contenido químico así como de aquellas estructuras orgánicas que puedan comprometerse por la acción toxica del mismo. En la presente investigación, se empleó la cromatografía gas-masa para identificar compuestos químicos de la pasta de TM-ChT®, como fitoesteroles y derivados de esteroides, así como alcaloides como la nicotina y cotinina, además de la 2-fluorofenilhidrazina, el cual debe ser manejado como un producto químico potencialmente peligrosos. Se emplearon procedimientos básicos de obtención larvaria, bioensayos de letalidad y toxicidad, técnicas semi-invasivas de registro videocardiográfico, microscopia estereoscópica y procedimientos histoquímicos; como cortes histológicos e improntas, fijadas y contrastadas con Giemsa, y procedimientos in vivo; marcados con colorantes vitales fluorescentes, como la Naranja de Acridina, además de la determinación del perfil isquémico de muestras controles y tratadas. Como efecto cardiotóxico predominante, se determinó una reducción significativa de la frecuencia cardíaca, vinculada con una desorganización de la arquitectura del tejido cardíaco, un incremento de las enzimas Creatinina quinasa y su sub unidad MB, junto con muerte celular por apoptosis. Cambios en la conducta de nado, curvatura troncal, edema del saco vitelino y vacuolización del tejido cerebral, también fueron observados. Estos hallazgos permitieron identificar al tejido cardíaco y al tejido nervioso, como posibles blancos de la acción toxica de este producto tan consumido en la población venezolana.

**Palabras Claves:** Chimó, pez cebra, disfunción, nicotina, frecuencia cardíaca, apoptosis.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA



**POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA**

**SMOKELESS TOBACCO (Chimó El Tigrito®) AND CARDIAC DYSFUNCTION:  
AN EXPERIMENTAL STUDY IN LARVAL ZEBRAFISH MODEL *Danio rerio*.**

Farmacéutica Celsymar O. Mujica R.

**SUMMARY**

The Smokeless Tobacco Chimó El Tigrito® (TM-ChT®) is a smooth paste flavored tobacco alkaline and semi-industrial manufacturing highly consumed in the Venezuelan population by school-age children and adolescents. Clinical and experimental reports have shown some signs of toxicity of this product; however, little is known of its chemical content as well as those who organizational structures could commit by the toxic action of the same. In the present investigation, the gas-mass chromatography was used to identify chemicals paste TM-ChT®, phytosterols and derivatives of sterols and alkaloids such as nicotine and cotinine, in addition to the 2-Fluorophenylhydrazine, which is must be handled as a potentially hazardous chemical. Basics of larval collection, lethality and toxicity bioassays were used, lethality and toxicity bioassays, semi-invasive techniques of cardiographic video registration, stereoscopic microscopy and histochemical procedures were employed; as histological sections and imprints, fixed and contrasted with Giemsa, and in vivo procedures; labeled with fluorescent vital dyes such as acridine orange, besides determining the profile ischemic controls and treated samples. As a predominant cardiotoxic effect, a significant reduction in heart rate was observed, associated with a disruption of the architecture of cardiac tissue, an increase in creatinine kinase enzymes and its subunit MB, with cell death by apoptosis was determined. Behavioral changes swim, backbone curvature, yolk sac edema and vacuolization of brain tissue were also observed. These findings allowed identifying the cardiac tissue and nervous tissue, as possible targets of toxic action of the product as consumed in the Venezuelan population.

**Keywords:** Chimó, zebrafish, dysfunction, nicotine, heart rate, apoptosis.

## TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	Iv
Resumen en español.....	vi
Resumen en inglés.....	vii
Tabla de contenido.....	viii
Lista de figuras.....	Xi
Lista de tablas.....	Xiv
Lista de abreviaturas.....	xv
I. Introducción.....	1
I.a. Tabaco masticable.....	5
I.a.1. Toxicidad del Tabaco Masticable.....	6
I.b. Disfunción Cardíaca.....	11
I.b.1. Alteraciones en la función cardiaca.....	11
I.b.2. Alteraciones en la morfología cardiaca.....	14
I.c. Pez Cebra <i>Danio rerio</i> .....	17
I.d. Objetivos.....	26
I.d.1. Objetivo general.....	26
I.d.2. Objetivos específicos.....	26
II. Materiales y métodos.....	28
II.a. Obtención e identificación de la composición química del Chimó El Tigrito® a través de Cromatografía de Gas con	

detector de Masa.....	28
II.a.1. Preparación de la muestra de Chimó El Tigrito <sup>®</sup> para ser sometida a estudio de cromatografía de gas con detector de masas.....	28
II.b. Obtención de los huevos y las larvas del pez cebra <i>Danio rerio</i> de 5 dpf.....	29
II.c. Bioensayo de toxicidad de EATM Chimó El Tigrito <sup>®</sup> sobre poblaciones larvianas de pez cebra <i>Danio rerio</i> de 5 dpf.....	31
II.d. Disfunción cardíaca.....	34
II.d.1. Evaluación del perfil isquémico.....	36
II.e. Señales generales de acción tóxica.....	36
II.f. Estadística.....	37
III. Resultados.....	39
III.a. Identificación de la composición química del TM Chimó El Tigrito <sup>®</sup> .....	39
III.b. Bioensayo de toxicidad de EATM Chimó El Tigrito <sup>®</sup> .....	41
III.b.1. Toxicidad (CT <sub>50</sub> ).....	43
III.c. Disfunción cardíaca.....	45
III.c.1. Disminución de la frecuencia cardíaca.....	45
III.c.2. Histopatología del tejido cardíaco.....	48
III.c.3. Tinción positiva a la Naranja de Acridina (NA) región cardíaca.....	49

III.c.4. Perfil isquémico.....	50
III.d. Efectos tóxicos.....	51
III.d.1. Cambios en la conducta de nado.....	52
III.d.2. Curvatura troncal.....	53
III.d.3. Edema del saco vitelino.....	54
III.d.4. Tinción positiva a la Naranja de Acridina (NA) porción cefálica.....	55
III.d.5. Vacuolización del tejido cerebral.....	56
IV. Discusión.....	58
IV.a. Componentes químicos del TM Chimó El Tigrito®.....	58
IV.a.1. Cromatografía Gas-Masa.....	58
IV.b. Bioensayo de toxicidad de EATM Chimó El Tigrito®.....	60
IV.b.1. Toxicidad.....	61
IV.c. Disfunción Cardíaca.....	62
IV.c.1. Cambio en la estructura cardíaca.....	65
V. Conclusiones.....	69
VI. Recomendaciones.....	70
Bibliografía.....	71
Glosario.....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcas comerciales de tabaco masticable.....	1
Figura 2. Presentación comercial del Tabaco masticable Chimó El Tigrito® .....	6
Figura 3. Representación esquemática del sistema de conducción eléctrica del corazón.....	12
Figura 4. Pez cebra macho y hembra.....	19
Figura 5. Representación de los órganos del pez cebra en estadios larvario (A) de 3 a 5 días (dpf) y adulto (B).....	21
Figura 6. Estadios del desarrollo cardíaco.....	22
Figura 7. Representación esquemática de la circulación sanguínea. Relación morfo-funcional de la plataforma de conducción eléctrica y Áreas cardíacas en corazón de larva de pez cebra <i>Danio rerio</i> .....	23
Figura 8. Recipientes de recolección de huevos de pez cebra <i>Danio rerio</i> .....	30
Figura 9. Estadios larvarios del pez cebra <i>Danio rerio</i> .....	31
Figura 10. Esquema representativo de los rangos de concentración letal cincuenta y concentración umbral.....	33
Figura 11. Curva concentración-respuesta de extracto acuoso de tabaco masticable y a las 24 horas de exposición.....	41
Figura 12. Relación entre el logaritmo de la concentración para el extracto acuoso de tabaco masticable y extracto hidroetanólico de tabaco masticable vs porcentaje de mortalidad.....	42

Figura 13. Curva concentración-respuesta para el extracto acuoso de tabaco masticable, extracto hidroetanólico de tabaco masticable y extracto de picadura de cigarrillo.....	43
Figura 14. Relación entre el logaritmo de la concentración del extracto acuoso de tabaco masticable, extracto hidroetanólico de tabaco masticable y extracto de picadura de cigarrillo vs el porcentaje de toxicidad.....	44
Figura 15. Imagen lateral de larvas control y tratadas con extracto acuoso de tabaco masticable y registro videocardiograma antes ( $T_0$ ) y luego del tratamiento (T3h).....	46
Figura 16. Representación gráfica concentración-respuesta del extracto acuoso de tabaco masticable, neostigmina, atropina y efedrina.....	47
Figura 17. Representación gráfica de la frecuencia cardiaca expresada de larvas tratadas con diversas concentraciones de extracto acuoso de tabaco masticable y extracto acuoso de picadura de cigarrillo.....	48
Figura 18. Corte histológico transversal del área cardíaca de larvas controles y tratadas con extracto acuoso de tabaco masticable y teñidos con Giemsa.....	49
Figura 19. Muestras de larvas de pez cebra <i>Danio rerio</i> control y tratadas con extracto acuoso de tabaco masticable y naranja de acridina área cardíaca.....	50
Figura 20. Representación gráfica de las enzimas marcadoras de daño muscular cardíaco.....	51

Figura 21. Representación gráfica del patrón de nado de larvas de pez cebra de 5 dpf, controles y tratadas.....	52
Figura 22. Imagen ventral y dorsal de larvas de pez cebra 5 dpf a diferentes concentraciones tóxicas de extracto acuoso de tabaco masticable.....	54
Figura 23. Imagen ventral de larvas de pez cebra 5 dpf a diferentes concentraciones de extracto acuoso de tabaco masticable.....	55
Figura 24. Muestras de larvas de pez cebra <i>Danio rerio</i> control y tratadas con extracto acuoso de tabaco masticable y naranja de acridina área cefálica.....	56
Figura 25. Monocapa de tejido cerebral de larvas control y tratadas con extracto acuoso de tabaco masticable.....	57

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Características físicas de la muestra de Chimó El Tigrito®.....	39
Tabla II.a. Compuestos químicos encontrados la muestra de Chimó El Tigrito® .....	40
Tabla II.b. Estructura de los compuestos químicos encontrados la muestra de Chimó El Tigrito® .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AST	Aspartato Amino Transferasa
CK	Creatinina quinasa
CK-MB	Creatinina quinasa y su sub-unidad MB
EAPC	Extracto acuoso de picadura de cigarrillo
EATM	Extracto acuoso de tabaco masticable
EHTM	Extracto hidroetanólico de tabaco masticable
FC	Frecuencia cardíaca
LDH	Lactato Deshidrogenasa
NA	Naranja de acridina
SNC	Sistema Nervioso Central
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TM	Tabaco masticable
TMChT <sup>®</sup>	Tabaco masticable Chimó El Tigrito <sup>®</sup>
NOD	Ratones transgénicos no obesos
ApoE	Apolipoproteína E

## I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se enmarca dentro de las líneas de investigación que se desarrollan en la Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, bajo la dirección del Dr. Marco A. Álvarez O., y que tiene entre sus objetivos generales, el estudio de señales de toxicidad sub-letal, vinculadas con productos de origen vegetal y de consumo indiscriminado. En este contexto, cabe destacar que en los últimos años, a nivel mundial e incluyendo a nuestro país, se han ido incrementando las alertas respecto al consumo indiscriminado, en la población juvenil, del denominado Tabaco Masticable (TM) o Chimó (Fig. 1).



Fig.1. Diversas presentaciones comerciales de Tabaco Masticable (TM) disponibles en Venezuela. 3rd. International Conference on Smokeless Tobacco, 2002.

El consumo indiscriminado del TM en jóvenes de la República Bolivariana de Venezuela, puede ser descrito como un evento endémico, ya que se restringe a poblaciones que lo hacen de manera tradicional e históricamente asociado a patrones culturales <sup>(1)</sup>. Su consumo además, se ha hecho popular en las ciudades, particularmente entre estudiantes de colegios

urbanos, quienes han adoptado su uso como una moda, en sustitución al uso de cigarrillos <sup>(2,3)</sup>.

El TM o Chimó, es consumido por vía oral, se obtiene a partir del sumo del tabaco, cocido varias veces y mezclado con cenizas y conchas de plátano, hasta obtener una pasta espesa de color negro <sup>(4)</sup>. La calidad de esta pasta es el resultado de la adición de distintos compuestos, propios de cada región geográfica en donde se produce <sup>(5,6)</sup>. Dicha pasta podría contener entre sus componentes: materia orgánica, hidratos de carbono como sacarosa y glucosa, pequeños porcentajes de residuos minerales como aluminio, hierro, magnesio, calcio, cloruro de sodio y potasio, y en la mayoría de los preparados, salvo excepciones, contiene elevadas concentraciones de nicotina y un bajo pH. El producto a ser consumido, es soluble en agua y medianamente en alcohol, y puede mostrar diferencias en la acidez por variaciones de pH <sup>(7)</sup>. Además, altas concentraciones de nicotina, alquitrán y otra variedad de compuestos altamente tóxicos, definen sus propiedades estimulantes, lo cual ha permitido que sea incorporado como una droga creadora de dependencia <sup>(8,9)</sup>.

Ante la problemática de dependencia que genera el consumo de este tipo de productos, entes gubernamentales nacionales e internacionales, como el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS); respectivamente, se han hecho partícipes de tal situación. Estas instituciones han advertido respecto a que, el hábito de consumir TM se encuentra asociado al desarrollo de lesiones pre-malignas y malignas en la cavidad bucal <sup>(10,11)</sup>, además de otros efectos nocivos como hiperacidez estomacal, hiper-estimulación del Sistema Nervioso Central, hiper-inflamación

de los tejidos que sostienen los alveolos dentarios, pérdida de los dientes así como halitosis <sup>(12-13)</sup>. Testimonios provenientes de los propios afectados así lo corroboran (Copio textualmente algunos de los testimonios. *Últimas Noticias* 20/02/09 Pág. 03)<sup>(14)</sup>.

*“Produce cáncer, en la boca, úlceras y otras enfermedades. “Si te lo tragas vas a ver a Dios” ¡Agárrate! A mí me dio una pálida que hasta se me bajó la tensión”. Así describió Juan, un liceísta de 16 años, lo que le pasó al mascar chimó que probó en Maracaibo y tragarse la saliva que genera esa pasta negra. Luis, otro joven de 18 años, comentó que trajo uno de Apure que le produjo sudoración y escalofríos al tenerlo un rato en su boca. Mascar chimó se ha convertido en una moda entre los jóvenes. En Caracas, según detalla Hernán Matute Brouzés, coordinador de la Cátedra Libre Antidrogas de la Upel, ha crecido el consumo entre estudiantes de 15 a 25 años. El más común es el de la caja amarilla. “Ese es el más suave. El tapa azul es más picante, hay otro tapa marrón y el tapa blanca es el peor, el más fuerte”, relataron los muchachos. El tapa amarilla se consigue en cualquier kiosko. Cuesta entre BsF. 1,5 y BsF. 2,5, mientras una caja de cigarros ronda por los siete bolívares. Luis explica que lo usa a veces, para “mantenerse activo”, y que si se traga produce bajas de tensión o malestares estomacales. “Si lo mantienes mucho tiempo en la boca te mareas”. Juan es más específico: “al principio sabe a cotufa acaramelada; luego pica un poquito y al*

*final sabe amargo. Te da un efecto como si estuvieras prendido, medio borracho. Vas escupiendo y al acabarse te queda el adormecimiento". Carlos, otro compañero, ve normal mascar chimó porque lo hacía su abuelo y afirma que causa adicción; "es como una droga", dice una chica que estaba junto a ellos, que el olor le provoca usarlo".*

La intención de estas alertas, por parte de los organismos de salud antes mencionados y los propios consumidores, ha sido principalmente crear impedimentos en la distribución y consumo de TM en personas menores de edad, además de crear un marco regulatorio de restricciones para el uso del TM, similar a las normas que regulan el consumo del cigarrillo <sup>(15,16)</sup>. Hasta el momento, ha habido poca insistencia al respecto, sin embargo, el Estado Venezolano y sus instituciones públicas, han promovido el diseño de programas educativos, enfocados a contribuir con un mejor conocimiento en la población, sobre los riesgos tóxicos asociados al consumo del chimó <sup>(17)</sup>. Esta situación ha incentivado la investigación en el campo de la toxicología del TM, a objeto de aportar información científica que apoye y fortalezca la comprensión de la acción tóxica y posible mecanismo de toxicidad vinculado con el TM.

En el presente trabajo se ha propuesto una investigación exploratoria y experimental de los efectos tóxicos vinculados con la pasta de chimó conocida como Chimó "El Tigrito<sup>®</sup>" altamente consumido en la población venezolana, ya que a pesar que varios reportes a nivel clínico y experimental ilustran la problemática referida a la acción tóxica del mismo, hasta el presente, poco se

conoce del contenido químico de esta pasta, específicamente, del Chimó El Tigrito<sup>®</sup> de nuestra región, así como de las estructuras orgánicas que puedan estar comprometidas ante la toxicidad de este importante producto.

### **I.a. Tabaco Masticable (TM)**

El chimó o también conocido como tabaco para mascar, es definido como un extracto suave de tabaco alcalinizado y aromatizado. En cuanto a su composición, se han descrito entre 3000 y 4200 químicos aproximadamente, la cual cambia a medida que es sometido al procesamiento para la obtención de la pasta para mascar <sup>(18)</sup>. Entre los químicos presentes en el TM, se ha descrito la nicotina, como alcaloide principal, así como otros, como la nornicotina, cotinina, anabasina, anatabina, hidrocarburos alifáticos y cientos de isoprenoides que producen el aroma típico de las hojas del tabaco. Este contenido varía inmensamente dependiendo de las condiciones del suelo, el uso de fertilizantes y el grado de madurez de la planta <sup>(19)</sup>.

También se ha reportado la presencia de metales como el mercurio y el plomo, así como al menos 28 agentes carcinógenos, que incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos, lactonas, cumarinas, etil carbamato, aldehídos volátiles, nitrosaminas volátiles, ácido nitrosamínico, nitrosaminas específicas del tabaco, compuestos inorgánicos, Polonio 210 radiactivo y Uranio 235 y 238. La N-nitrosornicotina (NNN), el 4-metilnitrosamino1-3-piridilbutanona (NNK) y el Ácido N-Nitrosamínico son los carcinógenos más prevalentes presentes en el TM. Tanto el NNK como el NNN, han sido clasificados como carcinogénicos para el humano del grupo I <sup>(20)</sup>.

Particularmente, el Chimó El Tigrito<sup>®</sup> (Fig. 2), utilizado en la presente investigación, es un producto de fabricación semi-industrial hecho en la República Bolivariana de Venezuela, calle 3, zona industrial III, parcela 28, Barquisimeto, estado Lara, registrado bajo el número CPE100917971, de peso neto 25g. y constituido por pasta de chimó, especies aromatizantes, edulcorantes y espesantes naturales, además de sales carbonatadas. A diferencia de la mayoría de los preparados de TM analizados en la literatura, el chimó El Tigrito<sup>®</sup>, presenta una concentración relativamente baja de nicotina, reportada con valores aproximados de 3.84 mg/g <sup>(21)</sup> y un pH más elevado, aproximadamente de 8,68 <sup>(22)</sup>. Todas estas características en su preparado, tanto el pH como el contenido de compuestos químicos, podrían definir su acción tóxica.



Fig. 2. Presentación comercial de Tabaco Masticable (TM) Chimó El Tigrito<sup>®</sup>. Imagen original. Mujica C, 2015. Laboratorio de Microscopía del Instituto Anatómico José Izquierdo.

### I.a.1. Toxicidad del Tabaco Masticable (TM)

Los efectos tóxicos sobre la salud, ocasionados por el uso del TM, han sido clasificados, a nivel clínico como eventos a corto, mediano y largo plazo.

<sup>(23)</sup>. De acuerdo a ello, los eventos a corto plazo más importantes, han sido relacionados con la absorción de la nicotina a través de la mucosa bucal. En este proceso de absorción, el extracto acuoso del TM que se forma en la boca, luego de la actividad salival durante su consumo, es absorbido a nivel local y también es absorbido a nivel sistémico. Cabe destacar, que la absorción de la nicotina a nivel local, aumenta o disminuye de acuerdo a los niveles de pH <sup>(24)</sup>. Cuando los niveles de pH sobrepasan el nivel de alcalinidad, por encima de pH 6.0, la nicotina presente en el TM, en forma no protonada como una base libre, se absorbe en un 9% a un pH de 7.0 y a un 50% a un pH 8. En estas condiciones, la nicotina es absorbida más fácilmente, alcanzando rápidamente el sistema nervioso central, causando así la sensación de bienestar. No así, a un nivel de acidez elevado, en donde la nicotina presente en el tabaco de mascar, se encuentra protonada en forma de sal con ácidos orgánicos, lo cual dificulta su absorción <sup>(25)</sup>.

A mediano plazo, el efecto tóxico del TM, luego de la absorción local, se manifiesta a través de la presencia de lesiones a nivel bucal, tales como la recesión gingival, la abrasión y las manchas en los dientes, acompañados de superficie rugosa de color blanco en la mucosa, además de una serie de estriaciones en el sitio en donde se coloca la porción del chimó o TM. Estas lesiones tienden a desaparecer si el usuario interrumpe el hábito o cambia el sitio de colocación del mismo <sup>(26)</sup>.

A largo plazo, además de las lesiones provocadas durante la absorción local, en pacientes con consumo de TM por tiempo prolongado, se han reportado lesiones neoplásicas a nivel de la cavidad oral, faringe, laringe,

acompañado también por el desarrollo de carcinoma espinocelular <sup>(27)</sup>. Así mismo, se ha descrito que el TM al ser colocado directamente en la boca, puede ser causa de cáncer en mejillas y encías en un 50% de los usuarios <sup>(28)</sup>. Este cáncer bucal es común en pobladores de la India, usuarios de TM en sus distintas localidades <sup>(29)</sup>.

Otros estudios clínicos, han sugerido una asociación entre el consumo por largo tiempo del TM y la alta probabilidad de desarrollar cáncer pancreático, probablemente, por la participación de las N-nitrosaminas del tabaco, las cuales son candidatas plausibles para la carcinogenicidad en el páncreas <sup>(30,31)</sup>. De igual manera, se ha reportado una asociación entre el cáncer de pulmón y el consumo de TM, donde el riesgo de cáncer de pulmón incrementó en hombres que cambiaron de cigarrillo a TM <sup>(32)</sup>. También se han sugerido implicaciones a nivel del sistema reproductivo, entre ellas, mortalidad perinatal, partos prematuros y reducción en la viabilidad de los espermatozoides, así como del sistema inmune, donde el uso del TM puede dar lugar a una interrupción en el equilibrio de las respuestas inmunes implicadas en la génesis del tumor, lo que podría conducir a un aumento en la susceptibilidad del huésped a los patógenos y/o cáncer <sup>(33)</sup>.

A nivel experimental, estudios realizados con extracto acuoso de TM, simulando el extracto acuoso que se forma en la boca durante la actividad salival, han reportado la inducción de muerte celular en tejido pulmonar, hepático y renal, además de un proceso de regulación significativa de la apoptosis <sup>(34)</sup>. En modelos de experimentación “in vitro”, la exposición al TM en varias líneas celulares, incluyendo queratinocitos orales y macrófagos <sup>(35)</sup>, se

han confirmado dichos efectos. Igualmente, los efectos del extracto acuoso de TM, han sido estudiados en modelos de experimentación “in vivo”, en donde la alteración en la producción de proteínas de choque térmico <sup>(36,37)</sup>, así como la inhibición del metabolismo celular acompañado de aberraciones nucleares, han sido reportados <sup>(38)</sup>.

A esta numerosa información clínica y experimental de la acción local y sistémica del TM, en órganos claves como el pulmón, páncreas, riñón y el sistema reproductivo, se le agrega una abundante información, también clínica, epidemiológica y experimental, que enfatiza sobre la relación entre el TM y posibles afecciones a nivel cardiovascular. Al respecto, estudios epidemiológicos, han revelado que el consumo de TM se vincula con una mayor incidencia de infartos al miocardio y accidentes cerebrovasculares <sup>(39)</sup>. Esto ha sido demostrado en diferentes poblaciones masculinas de edad comprendida entre 35-54 años y 55-64 años, sobre los cuales se ha reportado riesgo de infarto agudo. Sin embargo, en ambos grupos el riesgo de infarto del miocardio no fue significativamente diferente, respecto a los fumadores de cigarrillos <sup>(40)</sup>. El tamaño limitado del estudio ha disminuido la potencia estadística del mismo, resultando en un análisis con poca fuerza significativa en cuanto a la mortalidad por infarto de miocardio vinculada al consumo del TM.

A nivel clínico se ha descrito que el consumo de TM se encuentra relacionado con factores de riesgo cardíaco, como la elevada presión sanguínea <sup>(41)</sup> e hiperlipidemias <sup>(42,43)</sup>; así como una alta tasa de mortalidad por alteraciones cardiovasculares <sup>(44)</sup>. Cabe destacar que dependiendo del tiempo de consumo del TM, el usuario podría estar expuesto a niveles de nicotina en

sangre cercanos o superiores a los que presenta un fumador de cigarrillos promedio. Estos niveles de nicotina, podrían ejercer gran impacto en el sistema cardiovascular, alterando la presión sanguínea a través de su propiedad vasoconstrictora. Esto ha sido demostrado en jóvenes consumidores de TM en los cuales han sido registrados valores elevados de presión sanguínea <sup>(45)</sup>. Además, ha sido reportado que el TM aumenta las concentraciones de catecolaminas en la sangre y tiene efectos simpaticomiméticos inmediatos, por lo cual ha sido posible considerar que tenga un efecto agudo arritmogénico, que pudiera ser causa de muerte súbita.

A pesar de esta gran información existente, referida al compromiso cardiovascular vinculado con el consumo de TM, la misma es poca en comparación con la existente respecto al compromiso cardiovascular relacionado con el uso del cigarrillo. En tal sentido, solo efectos generalizados del consumo de TM han sido reportados, y la mayoría de los mecanismos de toxicidad han sido poco explorados.

Particularmente, un estudio experimental realizado empleando una solución de TM chimó El Tigrito<sup>®</sup>, suministrada por vía tópica sobre los tejidos periodontales de ratas, demostró a nivel local, irritación en los tejidos gingivales, daños en los tejidos sanos, con alteraciones además de los elementos celulares del epitelio bucal. Así como también, vasoconstricción con aumento de la presión arterial y desencadenamiento de una respuesta inflamatoria crónica <sup>(46)</sup>.

Ante los eventos previamente descritos que señalan la toxicidad del TM, y específicamente del Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, se destaca el compromiso sistémico generalizado vinculado con su acción tóxica, de lo cual surge la necesidad de

profundizar en los efectos relacionados con factores de riesgo cardíaco, tales como: la frecuencia y morfología cardíaca, la ritmicidad y la circulación, entre otros factores, ya que resulta evidente que el abordaje desde el punto de vista experimental de dicha problemática, permitiría aportar nuevas ideas alrededor de la etiología de la posible disfunción cardíaca, asociada con el consumo del TM y particularmente asociada al consumo del TM Chimó El Tigrito<sup>®</sup>.

### **I.b. Disfunción Cardíaca**

La disfunción cardíaca podría ser entendida como una alteración en la morfo-funcionalidad de este vital órgano. Esta alteración, podría ser inducida por diversos agentes tóxicos, entre otros factores, los cuales comprometerían la función del corazón a través de la modificación de parámetros fisiológicos como el ritmo y la fuerza de contracción, y por otra parte comprometerían la morfología de este órgano, hasta el punto de generar severos daños estructurales del miocardio <sup>(47)</sup>.

#### **I.b.1. Alteraciones en la función cardíaca.**

Cabe destacar, que entre las alteraciones en la función cardíaca vinculadas con la disfuncionalidad de este órgano, se encuentran las arritmias. Estas, han sido definidas como anormalidades cardíacas funcionales inmediatas (ACFI), derivadas de trastornos en la formación de la corriente iónica, trastornos en la conducción de la misma, o ambas <sup>(48)</sup>. Esta condición puede ser ocasionada por la influencia de diversos factores, entre ellos se han descrito condiciones como la isquemia, la hipoxia, la acidosis o alcalosis,

anormalidades electrolíticas, exposición excesiva a catecolaminas, influencias autonómicas, toxicidad de fármacos, el sobre-estiramiento de las fibras cardíacas y la presencia de tejido cicatrizal o afectado de algún otro modo.

En cuanto a los trastornos en la formación de la corriente iónica, cabe destacar la pérdida del equilibrio entre la fase de despolarización y repolarización de las células marcapaso. La alteración en alguna de estas fases, modifica la velocidad de conducción de estas células cardíacas, la cual es determinada por el potencial transmembrana de dichas células, ubicadas en el nodo seno atrial SA, en la pared superior de la aurícula derecha y las células marcapasos del nodo atrio ventricular AV, ubicadas al lado derecho del tabique auricular, muy ligado a las fibras de Purkinje, que facilitan la transmisión del impulso (Fig. 3). Es importante señalar que cambios, por ejemplo, en el potencial diastólico de -80 a -100 mV o cambios en el potencial de umbral de -65 a -45 mV, dan como resultado una prolongación del intervalo entre el primer potencial de acción y el segundo, siendo estos factores determinantes en la formación del impulso <sup>(49)</sup>.

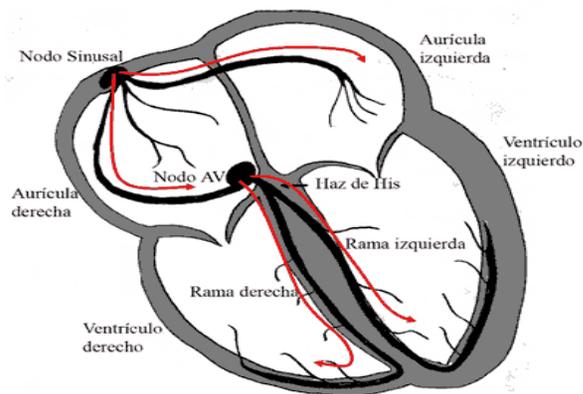


Fig. 3. Representación esquemática del sistema de conducción eléctrica del corazón <sup>(50)</sup>

En cuanto a los trastornos en la conducción del impulso, es preciso señalar, que una conducción gravemente disminuida puede dar como resultado un bloqueo simple, por ejemplo del nodo AV o de la rama del fascículo. En dicho fenómeno, es importante el control que ejerce el sistema parasimpático sobre la conducción AV, lo cual dentro de sus consecuencias más comunes es la generación o formación del fenómeno de reentrada o conocido también como movimiento circular o de reingreso. En este movimiento, el impulso excita áreas del corazón más de una vez, confinándose en áreas pequeñas dentro del nodo AV, afectando así porciones de las paredes auriculares y ventriculares. Un ejemplo de esta reducción de la velocidad de conducción, se ilustra a través de una depresión de la corriente de sodio o una baja en la corriente de calcio dentro de la célula marcapasos, o ambas, lo cual permitiría la reentrada de estos iones, a muchos sitios del corazón, tales como el nodo seno auricular (SA) o en el nodo atrio ventricular (AV), o en el propio miocardio ventricular, produciendo así un taquicardia ventricular <sup>(51)</sup>.

Otro factor importante vinculado con las ACFI es la actividad vagal. El principal efecto de la acetilcolina liberada del nervio vago, se traduce en una disminución de la fuerza de contracción del nodo atrio-ventricular (AV), una disminución de la velocidad de conducción a través de éste y un decaimiento en la frecuencia cardíaca. Por tanto, los impulsos vagales colinérgicos pueden producir un efecto inotrópico negativo. Por otra parte, la liberación de norepinefrina por la estimulación del nervio simpático, incrementa la tasa de respuesta del nodo seno atrial SA, generando una respuesta cronotrópica positiva, la cual es atribuida a un aumento de la corriente lenta de calcio hacia

el interior de la célula cardíaca, y por tanto un aumento en la actividad contráctil <sup>(52)</sup>. Este efecto es similar al efecto sobre el nodo AV y sobre otras fibras de conducción.

Todos estos eventos conducentes a las denominadas ACFI, han sido vinculados con cambios en la contractilidad, bien sea un incremento o una disminución de la misma; muy probablemente como una consecuencia de eventos iónicos y estimulación de vías de señalización enzimática. Particularmente, la estimulación del sistema adenilato ciclasa, a través de las catecolaminas, que estimulan los receptores B de las membranas, incrementan el AMPc, afectando el retículo sarcoplásmico que provee iones de calcio para las proteínas contráctiles <sup>(53)</sup>.

### **I.b.2. Alteraciones en la morfología cardíaca.**

Dentro de las alteraciones morfológicas del corazón, cabe destacar que han sido clasificadas en cuatro categorías que incluyen: la hipertrofia cardíaca, las cardiomiopatías, la pericarditis, y la necrosis cardíaca y miocarditis. Dentro de este grupo de la necrosis cardíaca y miocarditis, se destacan las alteraciones morfológicas inducidas por agentes tóxicos a nivel tisular y celular <sup>(54)</sup>.

A nivel tisular muchos mecanismos farmacológicos y bioquímicos, altamente específicos, pueden mediar estas alteraciones morfológicas. Particularmente, un severo daño al tejido miocárdico es percibido en la miocarditis toxica y en la cardiomiopatía inducida por drogas, en donde se registra la muerte del tejido cardíaco por efectos directos de químicos altamente tóxicos. En la miocarditis aguda, además, hay edema intersticial, áreas

multifocales de necrosis celular del musculo cardiaco con bandas de contracción, y un infiltrado celular inflamatorio consistente de linfocitos, células plasmáticas y leucocitos polimorfonucleares; puede haber eosinófilos, pero raramente son prominentes. Con el uso de sustancias como Adenosina difosfato (ADP), ciclofosfamida, catecolaminas y tromboxano A, han sido reportados presencia de microtrombos. Este tipo de toxicidad por agentes químicos es fundamentalmente dependiente de las dosis utilizadas <sup>(55)</sup>. Por su parte, las alteraciones morfológicas a nivel celular inducidas por agentes tóxicos, encuentran sus blancos de acción a nivel de organelos de las células del musculo cardiaco. A nivel mitocondrial, se ha reportado que agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa, como el dinitrofenol, compuestos que interfieren con enzimas mitocondriales, como el cianuro y la hormona tiroidea y compuestos que se enlazan al ADN mitocondrial como la acriflavina, inducen cambios morfológicos en este organelo. Otras estructuras como los microtúbulos, se han visto afectadas por compuestos como las aminos simpaticomiméticas, diuréticos que conducen a deficiencia del potasio, causando acumulaciones laminares electrón densas como formas visibles de estas estructuras. También, la dilatación masiva del retículo sarcoplásmico, ha sido reportada como consecuencia de la acción de agentes como las antraciclinas <sup>(56)</sup>.

Todas estas alteraciones expuestas tanto a nivel de la función, como a nivel de la morfología cardiaca, se traducen en disturbios del equilibrio en ambos niveles, que conllevan por tanto a un panorama generalizado del progreso o no, del daño tisular y celular, promoviendo una guía valiosa para

entender la disfuncionalidad cardiaca y particularmente, la disfuncionalidad posiblemente vinculada con el consumo de TM. Hasta el momento, la información referida a los efectos generalizados promovidos por el consumo del TM, en general, ha sido ampliamente reportada a través de datos epidemiológicos, clínicos y experimentales, sin embargo, pocos son los referidos específicamente al Chimó El Tigrito®.

Respecto a los efectos generalizados promovidos por el consumo del TM Chimó El Tigrito®, los mismos han sido reportados a través de algunos modelos animales de experimentación como los modelos murinos, así como a través de algunas estrategias metodológicas *in vivo* e *in vitro*. A través de ellos, se pone en evidencia la crítica necesidad de profundizar en el estudio de los posibles mecanismos relacionados con la toxicología del TM Chimó El Tigrito®, considerando el riesgo prevalente sobre la incidencia de su uso como potencial factor generador de enfermedades en el humano.

Ante esta crítica necesidad, se han sugerido estudios en diversos modelos animales diseñados con distintas patologías conocidas. Entre ellos, un modelo animal de diabetes, como el uso de ratones transgénicos no obesos (NOD), podría explicar cómo se verían afectadas estas patologías crónicas, por el consumo de TM y por otra parte la aterosclerosis, abordada mediante el uso de Apolipoproteína E (ApoE) en ratones, podría incrementar el entendimiento del efecto del TM sobre el sistema cardiovascular.

En este despliegue de diversos modelos experimentales para abordar la toxicología del TM, ha surgido un modelo de amplia utilidad como es el pez cebra *Danio rerio*. Dicho modelo se ubica entre los extremos de los sistemas

celulares in vitro menos complejos pero aislados, y los modelos animales y humanos, mucho más complejos, sin embargo de mayor costo y mayor restricción ética <sup>(57)</sup>.

Como es sabido, la acción sobre el sistema cardiovascular, de la mayoría de los productos químicos, agentes farmacéuticos y particularmente productos naturales, ha sido uno de los grandes temas en la investigación toxicológica. Así, numerosos compuestos farmacéuticos, han sido asociados con efectos como el alargamiento en la repolarización cardíaca y la prolongación del intervalo QT; fenómenos estos, asociados con una potencial causa de muerte súbita. Investigaciones con el pez cebra, han mostrado que al igual que en humanos, numerosos compuestos de origen farmacéutico, inducen anomalías en la repolarización y causan bradicardia en este modelo, lo que ha hecho de él un sistema eficiente para los bioensayos de acción cardiotóxica inducida por medicamentos <sup>(58)</sup>.

De estos datos se ha podido interpretar que este modelo de experimentación animal, surgido en las últimas décadas como un modelo de alta eficiencia en la experimentación biomédica, podría también contribuir con nuevos conocimientos de los parámetros de disfunción cardíaca, asociados a la cardiotoxicidad del TM y particularmente del TM Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, hasta el momento poco conocida.

### **I.c. Pez Cebra *Danio rerio***

El pez cebra *Danio rerio*, es un ciprínido vertebrado dulceacuícola y de aguas tropicales, originario del sureste asiático. La geografía de estas regiones

asiáticas, caracterizada por poseer climas monzónicos con lluvias abundantes y estaciones más secas, ejerce cambios drásticos en el medio ambiente de este pez, así como cambios en las condiciones físico-químicas, que conlleva a favorecer su adaptabilidad a sobrevivir en ambientes variables. El cambio en los factores de salinidad, pH o temperatura explica, probablemente, el amplio rango de tolerancia del pez cebra ante distintos factores, así como su fácil mantenimiento en cautividad <sup>(59)</sup>. En los últimos treinta años, el pez cebra *Danio rerio* se ha convertido en uno de los modelos biológicos más importantes dedicado a la experimentación en el campo de la genética, la bioquímica, la biología celular, molecular y particularmente en el campo del desarrollo cardiovascular, por encima de otros modelos animales como la *Drosophila melanogaster* y el *Mus musculus* o ratón de laboratorio <sup>(60)</sup>.

La versatilidad de las características que han hecho del pez cebra una herramienta de gran valor para estudiar la biología del desarrollo, se utilizan ahora para el descubrimiento de nuevos medicamentos, gracias a la posibilidad de realizar experimentos a gran escala. No solo tiene importancia en el campo de la biomedicina, sino también, en los últimos años ha sido utilizado en toxicogenómica y la nanotoxicidad, para analizar los efectos de la contaminación en el medio ambiente y para crear bioindicadores que emitan señales de alarma cuando hay un compuesto tóxico en el medio <sup>(61)</sup>.

Esta especie de actinopterigio del Superorden Teleostei, Orden Cypriniformes y Familia Cyprinidae, como es el pez cebra, tiene una longitud entre 3 y 5 cm en la edad adulta, presentando dimorfismo sexual tanto en el tamaño como en color. El macho se caracteriza por ser alargado, fusiforme, de

color dorado o plateado, presenta una aleta dorsal única; longitudinalmente posee de 5 a 9 bandas de color azul oscuro, dándole un aspecto cebrado, del que se toma el nombre <sup>(62)</sup>. Las hembras suelen ser más grandes que los machos y tienen un color de fondo plateado (Fig. 4).



Figura 4. Pez Cebra Macho y Hembra. Imagen Laboratorio de Microscopía del Instituto Anatómico José Izquierdo.

El pez cebrado puede ser mantenido con variaciones en los parámetros del agua y sobrevivir, con lo cual se asegura que a la hora de reproducirlos, la cantidad de huevos viables sea máxima. Es importante destacar esto, puesto que la mayoría de los experimentos que se realizan con pez cebrado, requieren más de embriones que de adultos <sup>(63)</sup>, lo que hace necesario cuidados óptimos que permitan mantener el máximo número de embriones.

La importancia de hacer uso de este organismo como modelo experimental, en comparación con otros modelos, radica en que su patrón de desarrollo es similar al de los vertebrados superiores, incluidos los mamíferos y por lo tanto el hombre <sup>(64)</sup>. También, se ha demostrado la similitud entre el

genoma humano y el del pez cebra, por eso muchas de las mutaciones que se producen en el pez cebra pueden dar lugar a fenotipos similares a los que presentan muchas enfermedades humanas <sup>(65)</sup>. Hay que destacar que este organismo es ideal para mantener acumuladas mutaciones seleccionadas sin que se produzca la muerte del embrión, a diferencia de lo que ocurre con otros mamíferos. Por ello, gracias a los estudios sobre cribados mutacionales, que consisten en alterar las secuencias de ciertos genes para generar cambios, se puede obtener la función del gen alterado y de este modo observar qué órgano se ve afectado por la mutación <sup>(66)</sup>.

Además de las características anteriormente mencionadas, la embriogénesis externa y la transparencia de los embriones, facilita la observación al microscopio de todos los estadios de su desarrollo, así como el seguimiento de la organogénesis. Dicho proceso es rápido, facilitando que a las 24 horas post-fecundación (24 hpf), ya sea posible apreciar la segmentación cefálica y la formación de estructuras como el tubo neural, la notocorda, precursor del músculo y los somitos, precursores del esqueleto. Al alcanzar los 5 días post-fecundación (dpf), es posible apreciar estructuras como el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, así como la formación de órganos sensoriales, comparables con los órganos en el estadio adulto (Fig. 5). Asimismo, los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales. En este momento el pez es totalmente capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos <sup>(67)</sup>, lo que hace eficiente al pez cebra en los estudios de la toxicidad de sustancias que son absorbidas del medio en que se los mantiene <sup>(68)</sup>.

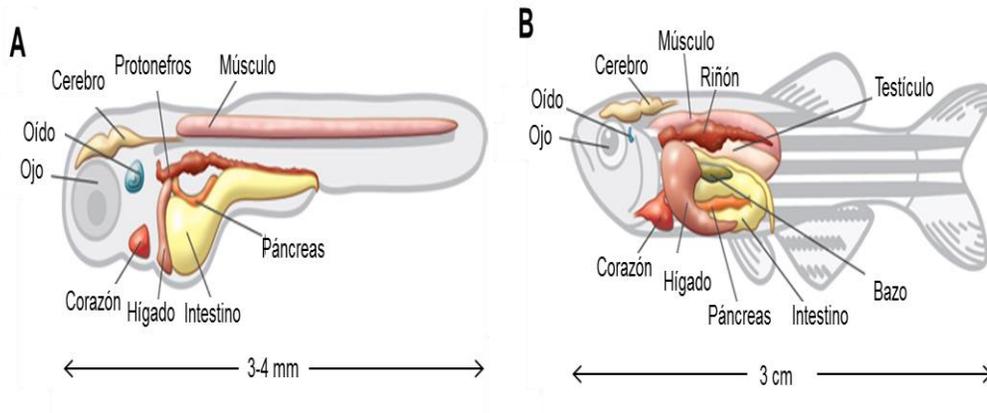


Fig. 5. Representación de los órganos del pez cebra en estadios larvario (A) de 3 a 5 días (dpf) y adulto (B) <sup>(69)</sup>. Modificado por Mujica C, 2015.

Durante la organogénesis del corazón (Fig. 6 a-d), se hace posible visualizar la morfología cardíaca de manera directa, el corazón presenta forma de tubo durante las primeras etapas del desarrollo, aproximadamente a las 22 horas post fertilización (hpf). A partir de las 24 hpf comienza esta estructura a latir de manera coordinada e independiente del sistema cardiovascular. Aproximadamente a las 36 hpf ocurre un movimiento de rotación con el cual alcanza una posición ventro-anterior y durante este período, se define el arreglo cardíaco en dos cámaras principales, aurícula y ventrículo (Fig. 6 e-g) <sup>(70)</sup>.

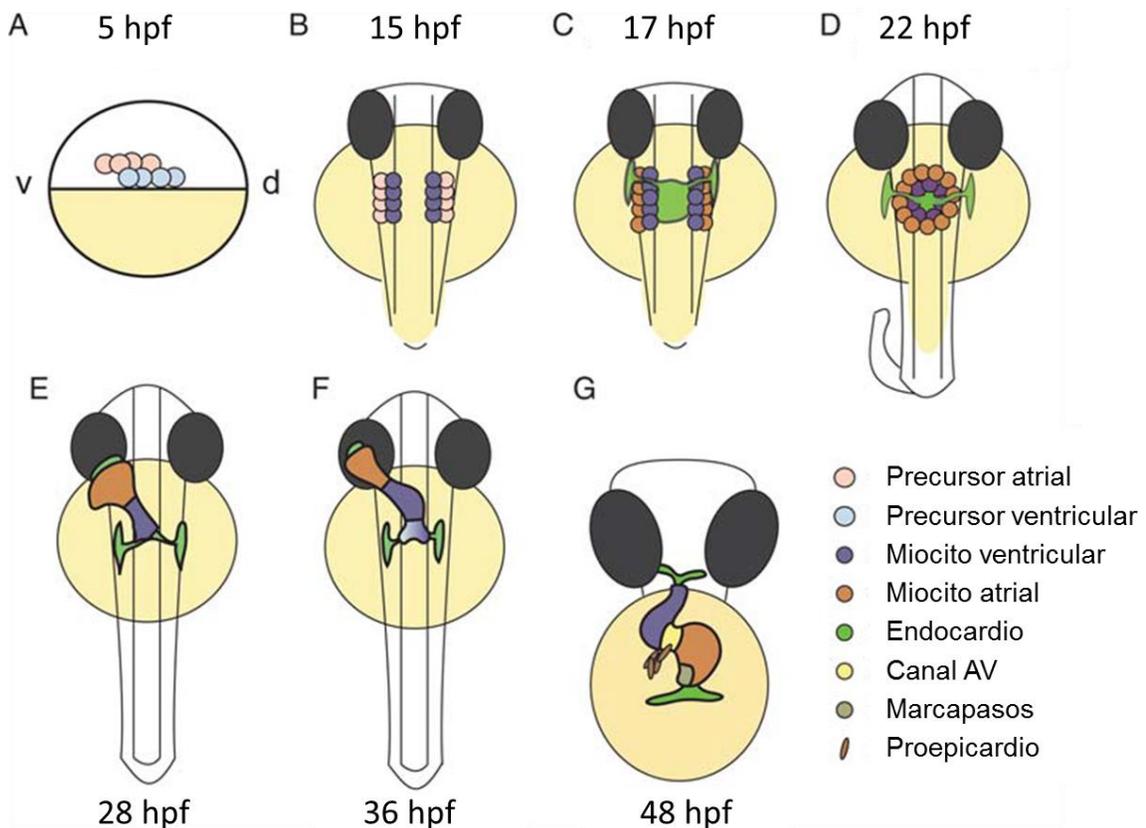


Fig. 6. Estadios del desarrollo cardíaco <sup>(71)</sup>. Modificado por Mujica C, 2015

De igual manera en la organogénesis, es posible apreciar la circulación, que se visualiza con la entrada sanguínea a través del seno venoso que fluye en serie a través del atrio, ventrículo y vulvo arterioso antes de salir hacia la aorta ventral (Fig. 7). Se destaca además, la plataforma anatómica de conducción eléctrica, y su recorrido desde la zona de marcapaso a lo largo de la zona atrial y ventricular del corazón tubular en larva de pez cebra. Esta relación morfo-funcional resulta similar en las aves, anfibios y mamíferos, durante etapas tempranas del desarrollo embrionario, por lo que se añade al conjunto

de características que fortalecen aún más el uso del pez cebra como modelo de experimentación y particularmente su contribución en el estudio de la disfuncionalidad cardíaca promovida por agentes químicos.

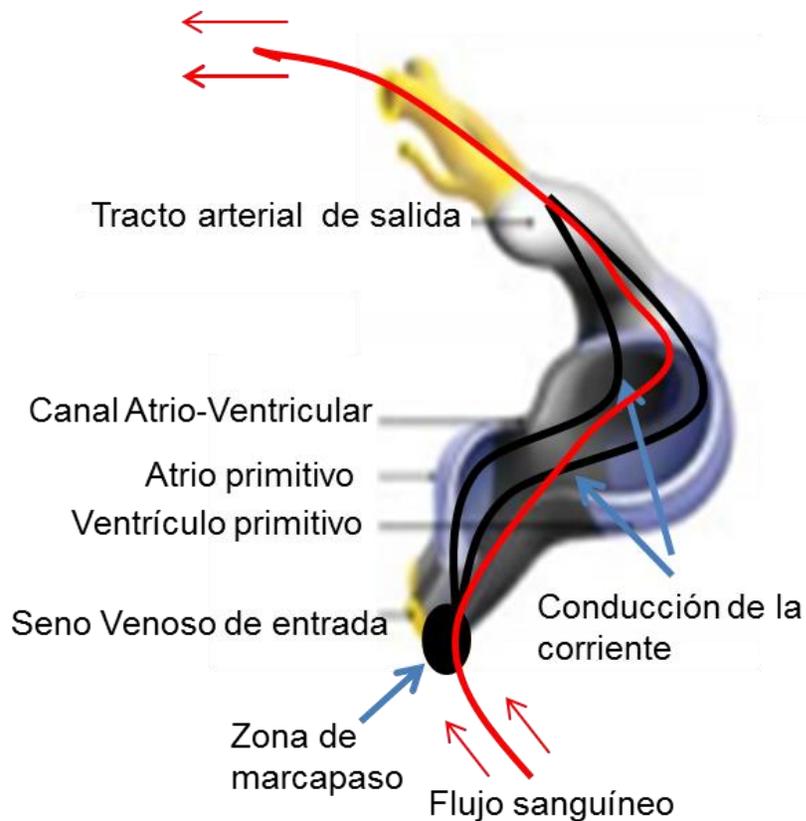


Figura 7. Representación esquemática de la circulación sanguínea (trazado rojo). Relación morfo-funcional de la plataforma de conducción eléctrica (trazado negro). Áreas cardíacas en corazón de larva de pez cebra *Danio rerio*<sup>(72)</sup>. Modificado por Mujica C, 2015.

Bioensayos sobre pez cebra *Danio rerio*, evaluando el efecto de fármacos como la clozapina, quinidina, eritromicina, lidocaína y verapamil, entre otros, han permitido determinar los rangos de concentración tóxica de estos compuestos, además de cambios en la frecuencia cardíaca, en la ritmicidad, presencia de edema pericárdico, cambios en la morfología cardíaca, presencia

de trombosis y hemorragias, entre otros cambios, asociados a dichas concentraciones <sup>(73)</sup>. Estos resultados han permitido ilustrar la alta eficiencia de este modelo animal, no solo en la predicción preclínica de aspectos farmacológicos, como la absorción, distribución, metabolismo y excreción, sino también en la predicción de la biología cardíaca nativa de complejos medicamentosos y otros agentes cardiotóxicos <sup>(74)</sup>.

Este modelo ha sido usado en numerosos estudios de cardiotoxicidad, empleando potenciales productos con conocida y desconocida actividad cardiotóxica. Un ejemplo de ellos, ha sido dado a través de estudios con mezclas complejas de hidrocarburos aromáticos policíclicos provenientes de derrames de petróleo crudo, de desconocida bioactividad cardíaca. Con estos productos han sido sometidas, experimentalmente, distintas poblaciones de pez cebra, resultando en ellas la aparición de numerosas señales de cardiotoxicidad, entre estas la presencia de edema pericárdico, defectos en el circuito cardíaco con reducción en la circulación arteriovenosa, además de la presencia de hemorragias <sup>(75)</sup>. Otras sustancias provenientes de diversos procesos industriales tipo dioxinas como el TCDD, conocidos como contaminantes ambientales altamente tóxicos, han demostrado anormalidades funcionales y morfológicas en el corazón del pez cebra <sup>(76)</sup>. También la aplicación de compuestos como el carbaril <sup>(77)</sup>, fármacos antipsicóticos atípicos <sup>(78)</sup>, inhibidores de la quinasa <sup>(79)</sup>, y agentes quimioterapéuticos <sup>(80)</sup>, han ilustrado el valor del pez cebra como paradigma de pruebas preclínicas para predecir efectos cardiotóxicos provocados por medicamentos en fase de desarrollo.

Recientemente, se ha aprovechado el análisis in vivo de la proliferación de los cardiomiocitos, para identificar compuestos químicos que podrían promover este proceso en embriones de pez cebra, abriendo así una ventana para el posible análisis in vivo de este importante proceso del desarrollo como lo es la proliferación celular. Además, se ha abierto la posibilidad de una efectiva contribución al perfeccionamiento de las terapias de reemplazo del tejido cardíaco dañado por infarto en humanos <sup>(81)</sup>. Todos estos aportes han fortalecido este modelo experimental ya que ilustran una respuesta tóxica bien definida, con la cual ha sido posible entender la disfuncionalidad cardíaca.

En Venezuela, específicamente, las tres primeras causas de muerte se encuentran vinculadas con las enfermedades cardíacas, el cáncer y las enfermedades cerebrovasculares <sup>(82)</sup>. Estas patologías, que pueden ser originadas por múltiples factores, normalmente, se relacionan con edades avanzadas y hábitos de vida propios de sociedades de consumo, uno de los cuales es el consumo del tabaco en todas sus formas.

Considerando las características del TM en general, así como la toxicidad del Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, vinculada posiblemente con alteraciones en la disfuncionalidad cardíaca, condición ésta donde el consumo del tabaco y sus derivados, constituyen un factor de riesgo importante y asociada a un problema de salud pública de gran prevalencia a nivel juvenil, tal como se puso en evidencia en la Encuesta Mundial sobre Tabaquismo en Jóvenes en 1999 <sup>(83)</sup>, donde se expresó que el consumo de Chimó, es un fenómeno urbano, sin distinción de clases socioeconómicas; aunado a la posibilidad de contar con un modelo experimental como el pez cebra *Danio rerio*, conlleva a considerar todo

esfuerzo que conduzca a establecer controles en su consumo y a conocer a mayor profundidad la toxicología vinculada al consumo del Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, hasta el momento poco claramente establecida.

Por lo que se puede deducir que el Chimó El Tigrito<sup>®</sup> podría estar vinculado con la disfunción cardíaca a través de los cambios en la función y en la morfología del corazón, producidos posiblemente por su intervención sobre la ritmicidad cardíaca y la estructura tisular y celular.

### **I.e. Objetivos.**

#### **I.e.1. Objetivo General.**

Estudiar la disfunción cardíaca inducida por el extracto acuoso de tabaco masticable (EATM) Chimó El Tigrito<sup>®</sup> en modelo experimental larvario de pez cebra *Danio rerio*.

#### **I.e.2. Objetivos Específicos.**

1. Identificar la composición química del Chimó El Tigrito<sup>®</sup> a través de Cromatografía de Gases con detector de Masas.
2. Determinar la concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>) de EATM Chimó El Tigrito<sup>®</sup> sobre poblaciones larvarias de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf.
3. Estimar la concentración tóxica cincuenta (CT<sub>50</sub>) del EATM Chimó El Tigrito<sup>®</sup> en un rango de concentraciones umbrales.

4. Evaluar alteraciones en la actividad cardíaca en población larvaria de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf, controles y tratadas, a través del registro de cambios funcionales y morfológicos.

5. Determinar muerte celular vinculada con la acción tóxica del EATM Chimó El Tigrito<sup>®</sup> haciendo uso de la tinción histoquímica de naranja de acridina (NA) en población larvaria de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf, controles y tratadas.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **II.a. Obtención e Identificación de la composición química del Chimó El Tigrito<sup>®</sup> a través de Cromatografía de Gas con detector de Masa**

El producto utilizado, denominado Chimó El Tigrito<sup>®</sup> fue adquirido en casa comercial de venta pública, específicamente en Quiosco ubicado en Fuerte Tiuna, Dtto. Capital. Para la estimación de la composición química del mismo, se contó con el análisis por Cromatografía de Gases con detector de masas, realizado en el Laboratorio de análisis Toxicológicos, Físicos-Químicos y Microbiológicos, Sedicomvet C.A., ubicado en la ciudad de Maracay, Edo. Aragua. Este laboratorio, como un centro acreditado, proporcionó resultados confiables y reproducibles del análisis químico de la muestra de TM Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, a través de equipos de alta tecnología.

### **II.a.2. Preparación de la muestra de Chimó El Tigrito<sup>®</sup> para ser sometida a estudio de cromatografía de gas con detector de masas.**

Las condiciones empleadas para la separación y detección de los diferentes productos de la muestra utilizada fueron las siguientes: se utilizaron reactivos como el etanol, metanol, acetonitrilo y hexano, para determinar la solubilidad de la muestra. Se procedió a pesar entre 1 y 5 g de la muestra, la cual se diluyó en un balón de 10 ml con el solvente apropiado. Posteriormente, se colocó en ultrasonido por 15 minutos, se filtró con un filtro de 0,45  $\mu$ , para seguidamente, realizar la inyección en el Cromatógrafo de gases.

Las condiciones cromatográficas para la inyección de la muestra fueron las siguientes: Se utilizó una columna HP-5; MS Agilent J&W GC, de 30 m de longitud, dimensiones 0,250 mm x 0,25 mm. Horno: next: 70 Hold: 15 °C; °C/min: 20 Next: 200 Hold: 15 °C; °C/min: 20 Next: 250 Hold: 30°C. El volumen de inyección fue de 5 µl.

Los cálculos de las concentraciones presentes en la pasta de tabaco, fueron realizados a través del software del equipo.

#### **II.b. Obtención de los huevos y las larvas del pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf.**

Para la obtención de los huevos y las larvas, a ser utilizadas en los distintos bioensayos de toxicidad, se recurrió a la adquisición de peces cebra adultos de tipo silvestre (wt), en la casa comercial Tienda “Las Mascotas” Los Chaguaramos. Una vez incorporados al Laboratorio, estos fueron acondicionados en las peceras respectivas, provistas de un sistema adecuado de oxigenación, iluminación y desinfección. Los peces adultos, fueron alimentados cuatro veces al día con alimento en hojuelas, 50% en proteínas (Pro Balance Blood Worms) y sometidos diariamente a ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, para la estimulación de la postura de los huevos. Una vez inducida la puesta de los huevos, estos son fertilizados externamente por los machos, y depositados por caída libre al fondo de la pecera, recolectándose a través de una malla, dentro de los respectivos recipientes de recolección o parideras (Fig. 8).



Fig. 8. Recipientes de recolección de huevos de pez cebra *Danio rerio*. Imagen tomada en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómica José Izquierdo. Mujica C., 2015.

Los huevos fertilizados, recolectados en tandas de 400 huevos por día, fueron extraídos, lavados y colocados en placas de Petri para ser incubados a 28 °C, hasta que alcanzaron los 5 días post-fertilización (5 dpf). Estas larvas fueron expuestas a las distintas concentraciones de EATM, definidas para los respectivos bioensayos (Fig. 9).

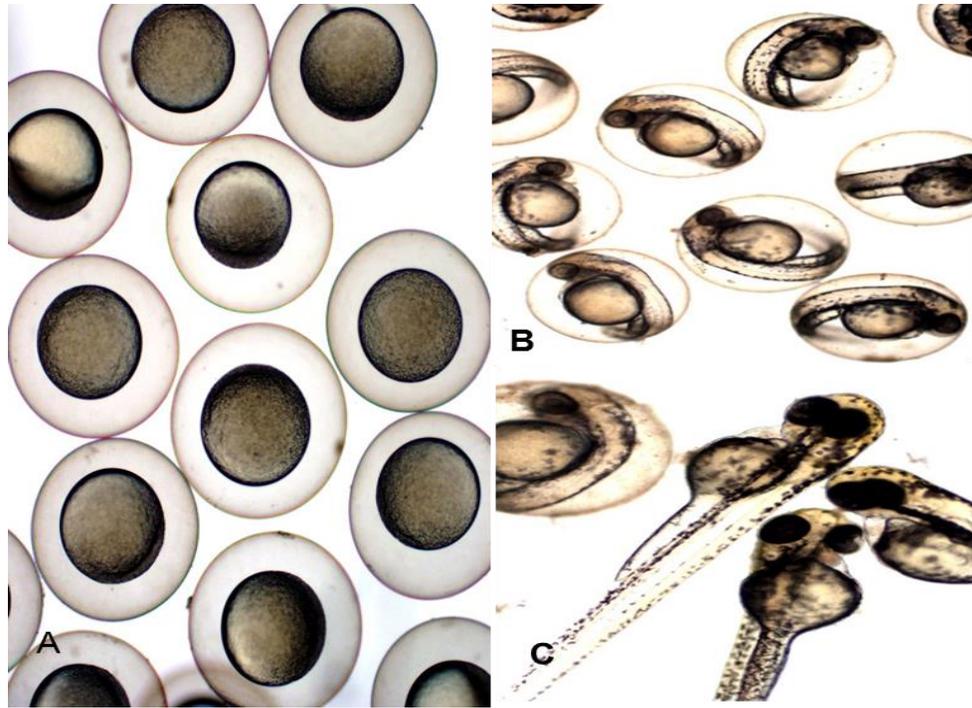


Fig. 9. Estadios larvarios del pez cebra *Danio rerio*. A. 1 dpf, B 4 dpf y C 5 dpf.

### **II.c. Bioensayo de toxicidad de EATM Chimó El Tigrito<sup>®</sup> sobre poblaciones larvarias de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf.**

Cabe destacar que dentro de la batería de ensayos de primera barrera para evaluar el potencial tóxico de sustancias desconocidas, se ha hecho uso de numerosos procedimientos que incluyen la prueba clásica de toxicidad aguda o método tradicional y las nuevas tendencias para el estudio de toxicidad. Entre éstas, se han destacado el Test de Clasificación de Toxicidad Aguda o Método de las Clases de Toxicidad <sup>(84)</sup>, el Procedimiento denominado Up and Down <sup>(85)</sup> y el Procedimiento de Dosis Fija <sup>(86)</sup>, el cual consiste en la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.

En la presente investigación, se hizo uso de la prueba clásica de toxicidad con modificaciones, adoptando los criterios regulatorios de validación y análisis de los métodos alternativos científicamente seguros, considerando el criterio de las tres R: reducción, refinación y reemplazamiento, acompañado de la responsabilidad en el manejo del modelo animal durante toda la investigación.

En este contexto, la estimación de la concentración letal cincuenta o  $CL_{50}$  del EATM, partió de una solución madre de Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, elaborada con 40 mg de pasta de chimó, la cual se disolvió en 1 mL de agua filtrada, con agitación constante por un período de 10 minutos, hasta disolución completa. Dicho peso, fue seleccionado en base a información referenciada por otros autores y adaptado a las condiciones del estudio <sup>(87)</sup>. Para la estimación de la  $CL_{50}$ , se procedió a realizar una curva concentración - respuesta, a fin de conocer la concentración de EATM capaz de generar el 50% de mortalidad en la población larvaria expuesta durante un período de 3 a 24 horas. Para ello, fue seleccionado un rango de concentraciones definido entre 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 mg/ml, el cual fue utilizado para estimar la  $CL_{50}$ .

En placas de dosificación de 24 pozos y volumen máximo de 1 ml, se colocaron las distintas diluciones del EATM, y fueron depositadas 5 larvas de pez triplicado a temperatura ambiente. Transcurrido el período de exposición, las respuestas emitidas por la población larvaria, particularmente el porcentaje de mortalidad, fue utilizado para calcular la  $CL_{50}$  por el método de Spearman-Kärber <sup>(88)</sup>.

Paralelamente, se evaluó el efecto de controles positivos como el Extracto Hidroetanólico de Tabaco Masticable Chimó El Tigrito<sup>®</sup> (EHTM), y un Extracto

Acuoso de Picadura de Cigarrillo (EAPC), ambos extractos, posiblemente inductores de respuestas comparables con la acción del Extracto Acuoso de Tabaco Masticable. Un control en agua de pecera también fue evaluado. El EHTM, fue preparado a partir de una solución de peso máximo de 40 mg. de pasta de chimó, por ml. de etanol al 100%. Una vez obtenida esta solución alcohólica, fue mezclada durante una hora y colocada luego en estufa a 60 °C durante 72 horas. El sedimento obtenido, fue resuspendido en agua de pecera y de igual manera se realizaron diluciones sucesivas a iguales rangos de concentración. El EAPC, fue obtenido a partir de un peso promedio de 0,63 g de picadura de cigarrillo comercial ® en 50 ml. de agua de pecera.

Para la estimación de la concentración umbral promotora de señales de acción tóxica, se procedió a realizar una relación concentración-respuesta, en un rango de concentraciones por debajo de la  $CL_{50}$  estimada, definido entre 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 mg/ml (Fig. 10).

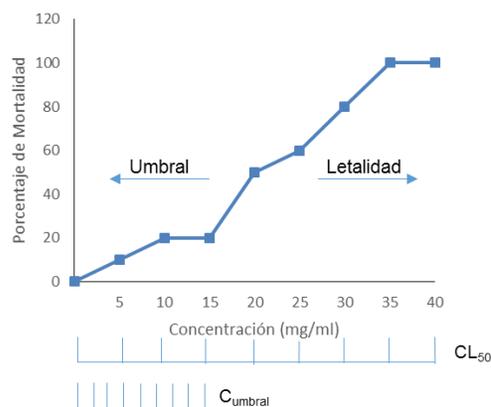


Fig. 10. Esquema representativo de los rangos de concentración letal cincuenta ( $CL_{50}$ ) y Concentración Umbral ( $C_{umbral}$ )

## **II.d. Disfunción cardíaca**

Cabe destacar que la disfunción cardíaca fue evaluada a través de la estimación de cambios en la función y la morfología del tejido cardíaco. En cuanto a los cambios en la función cardíaca, los mismos fueron monitoreados a través de las variaciones en el ritmo cardíaco de las larvas de pez cebra de 5 dpf tratadas con EATM y con sustancias moduladores de la frecuencia cardíaca, usadas como controles positivos. Entre estas sustancias se escogieron dos reductoras de la frecuencia cardíaca, como la atropina, la cual produce una disminución discreta de la frecuencia por estimulación vagal y la neostigmina, que a través de la inhibición de la colinesterasa, induce una disminución en la frecuencia. Por último, una sustancia que incrementa la frecuencia cardíaca como la efedrina, que a través de un efecto  $\beta_1$ , provoca un aumento de ésta.

Dicha evaluación fue realizada a través del método semi-invasivo de Videocardiograma (VCG). Para ello, las muestras de larvas controles y tratadas, depositadas en una capsula, fueron colocadas bajo un microscopio estereoscópico conectado a la cámara del video. La cámara, ajustada a una velocidad de 200 cuadros/seg, permitió obtener un videoregistro, el cual fue realizado sobre el área cardíaca de la larva siguiendo la actividad de contracción y relajación. El VCG registrado, fue almacenado y procesado mediante el programa ImageJ. El mismo, permite a través de las transformaciones matemáticas de Fourier, transformar el número de contracción y relajación en términos de puntos máximos de variación de luminosidad. El ajuste de esta variación de luminosidad nos arroja un valor estimado de la frecuencia cardíaca promedio en pulsaciones por minuto (P/min), aplicado en cada una de las larvas

de las distintas poblaciones controles y tratadas. Los VCG fueron registrados durante 60 segundos para cada uno de los bioensayos.

Para la obtención del VCG se realizó un enfoque sobre la región cardíaca de la larva, observada con un Microscopio Nikon SMZ800. Una vez delimitada el área cardíaca, se inició el programa ImageJ instalado en el computador, activando la secuencia de comandos correspondientes al programa de análisis de imagen: Plugins-Time Series Analyzer V2.0; ROI Manager-Add[t]; GetAverage. Luego de la activación de esta secuencia se obtuvo el VCG, el cual fue registrado y almacenado en la carpeta de resultados. Sobre estos registros videográficos, se determinó la tasa cardíaca o latidos/min y la ritmicidad o relación atrio-ventricular (AV). Una relación AV mayor a 1, es indicativo de irregularidad del ritmo.

En cuanto a los cambios en el tejido cardíaco, estos fueron descritos sobre individuos de la población larvaria, sometida a las distintas concentraciones de EATM, a través de cortes histológicos realizados sobre el área cardíaca, obtenida luego de 24 hrs. de tratamiento, los mismos fueron contrastados con Giemsa, una mezcla de derivados tiacínicos catiónicos, destinados a teñir núcleos celulares de color azul intenso y el citoplasma en tono rosado <sup>(89)</sup>.

También se realizaron preparaciones citológicas o improntas de tejido cerebral, constituidos por capas unicelulares de este tejido, los cuales fueron extendidos sobre portaobjetos, a través de contacto directo entre éste y la superficie del mismo. Una vez obtenida la capa de tejido, esta fue contrastada igualmente con tinción de Giemsa. Ambas preparaciones, fueron observadas a través del microscopio Olympus IX71.

### **II.d.1. Evaluación del Perfil isquémico**

Para evaluar la toxicidad cardíaca inducida por el EATM a las 24 h de tratamiento, se determinaron los niveles de Creatinina Quinasa (CK) y su isoenzima de subunidad MB, como marcadores bioquímicos del trauma cardíaco. Para ello, se hizo uso del método espectrofotométrico EAGLE <sup>(90)</sup>, con modificación para extracto de tejido homogenizado, proveniente de las larvas de pez cebra 24 h post tratamiento (30 larvas/200µl de agua de pecera), tanto controles como tratadas. La reacción enzimático-cinética de transformación de la Creatina-Fosfato, fue registrada a 340 nm. También se determinaron las actividades de la Aspartato Amino Transferasa (AST) y Lactato Deshidrogenasa (LDH), como grupo de biomarcadores complementarios de la evaluación del trauma cardíaco.

### **II.e. Señales generales de acción tóxica**

El registro de señales de acción tóxica no causantes de muerte, tales como: cambios en la conducta de nado, presencia de edema del saco vitelino, y torsión de la columna, fueron caracteres escogidos para ser considerados como patrón de modificaciones generales, como consecuencia de la acción tóxica del EATM.

Estas modificaciones, fueron monitoreadas bajo la observación del microscopio digital Selectron 443202, con programa Digital Microscopy Suite 2.0. Registros en video, fueron realizados al momento del primer contacto entre las larvas de pez cebra de 5 dpf y concentraciones sub-letales de EATM a temperatura ambiente y luego de 3 horas de exposición. Transcurrido este tiempo

las poblaciones larvarias, controles y tratadas, fueron sometidas a un estímulo mecánico y las respuestas fueron representadas gráficamente, a través de trazos de los patrones de nado, antes y después de cada tratamiento, de acuerdo a estudios de análisis de comportamiento, llevados a cabo por otros autores <sup>(91)</sup>.

Observaciones a mayor aumento, bajo microscopio estereoscópico, permitieron describir otras señales de toxicidad. Para ello, en las larvas controles y tratadas, fue observada la porción vitelina, el tronco larvario, el área cefálica y el área cardíaca. Las imágenes respectivas fueron registradas. La cuantificación de estos cambios fue realizada a través del análisis morfométrico.

La porción cefálica y la porción cardíaca, fueron visualizadas con el uso de sondas fluorescentes como la Naranja de Acridina (NA). Para ello, las muestras controles y tratadas, transcurridas las 24 horas de exposición, fueron sumergidas en una solución de  $10^{-1}$  M de NA durante 2 minutos, transcurrido este tiempo las muestras fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia Olympus IX71 con cámara digital DP71. El marcaje con NA es un ensayo rápido para la evaluación de apoptosis en embriones de pez cebra <sup>(92)</sup>.

## **II.f. Análisis estadístico**

A través del análisis estadístico, se calculó la linealidad de los datos de las variables dependiente (mortalidad) e independiente (concentración del tóxico) para una especie y un tiempo de exposición a través del método Probit, el cual es un método paramétrico que permite relacionar una variable independiente (concentración del tóxico) y una variable dependiente (respuesta). Para ello fueron definidos los siguientes parámetros: a) La concentración en mg/ml de

cada extracto utilizado (EATM y EHTM), transformada en logaritmo decimal (eje X) y b) La respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transformó a unidades probit (eje Y).

Una vez graficada la linealidad de los datos de las variables involucradas se calculó la correlación de los datos o coeficiente de determinación a través de la formula  $y=a+bx$ . El coeficiente de determinación es una medida estadística de la bondad del ajuste o fiabilidad del modelo estimado a los datos. Se representa por  $R^2$  e indica cuál es la proporción de la variación total en la variable dependiente (Y), es decir, mide la capacidad explicativa del modelo estimado. Una vez calculado el coeficiente de correlación, se halla la Concentración letal 50 a través del análisis de Spearman-Kärber, para el cálculo de las diferencias significativas con un 95% de confianza. También se aplicó la prueba estadística de t de student, para la comparación de valores medios  $\pm$  DE.

### III. RESULTADOS

#### III.a. Identificación de la composición química del TM Chimó El Tigrito®

De acuerdo a la metodología utilizada, los resultados obtenidos muestran el aspecto físico, concentración y factor de retención de distintos compuestos químicos presentes en la muestra de TM Chimó El Tigrito® ensayada (Tabla1).

Tabla I. Características físicas de la muestra de Chimó El Tigrito®

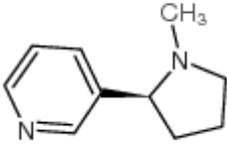
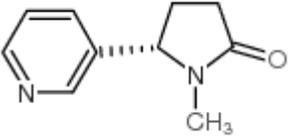
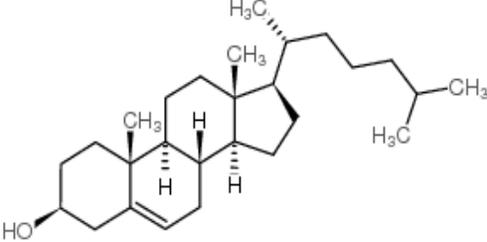
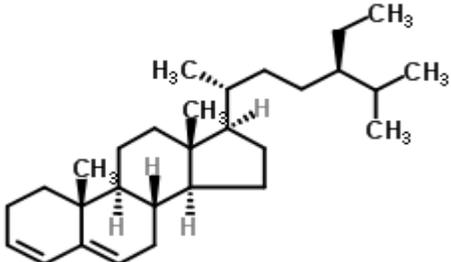
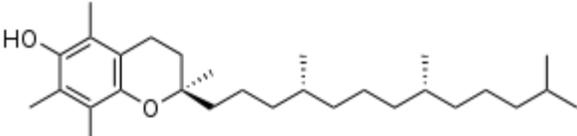
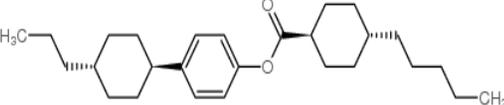
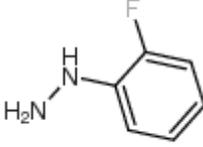
Muestra	COLOR	OLOR	TEXTURA
Chimó El Tigrito®	Negro	Tabaco	Crema

Tabla II.a. Compuestos químicos encontrados la muestra de Chimó El Tigrito®

Compuesto Químico	Concentración (ppm)	Factor De Retención
Nicotina <sup>(a)</sup>	10606.70	18,79
2-Fluorofenilhidrazina	3742.41	20,13
Cotinina <sup>(b)</sup>	2818.94	22,91
Colesterol	5607.60	49,73
Colest-8(14)-ene-3,15-dioni	1760.88	54,98
Estigmastan-3,5-diono	1524.12	57,45
D-alfa-Tocoferol	1681.58	64,83

<sup>(a), (b)</sup> Alcaloides del Tabaco.

Tabla II.b. Compuestos químicos encontrados en la muestra de TM Chimó El Tigrito®

Químico	Peso Molecular	Formula Molecular	Estructura Química
Nicotina <sup>(a)</sup>	162	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	
Cotina <sup>(b)</sup>	176	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	
Colesterol	386	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	
Estigmast an-3,5-diono	396	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub>	
D-alfa-Tocoferol	430	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	
Colest-8(14)-ene-3,15-dioni	398	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	
2-Fluorofenil hidrazina	126	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> FN <sub>2</sub>	

<sup>(a)</sup> <sup>(b)</sup> Alcaloides del Tabaco

### III.b. Bioensayo de Toxicidad de EATM Chimó El Tigrito®

La toxicidad del EATM quedó expresada a través de una relación concentración-respuesta, donde se graficó el porcentaje de mortalidad (%M) de la población larvaria en la coordenada Y, en función de las distintas concentraciones del EATM en la coordenada X, transcurridas 24 horas de tratamiento, representada por una curva. El % M aumentó en función de la concentración; a mayor concentración, mayor mortalidad. Por su parte, el EHTM presentó un comportamiento aproximadamente similar al del EATM (Figura 11).

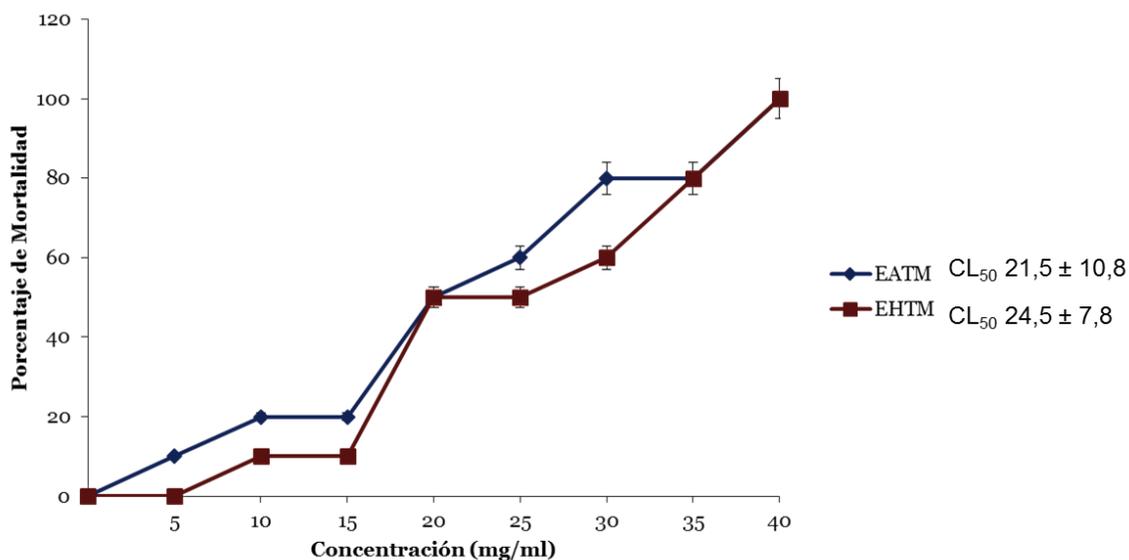


Figura 11. Curva concentración-respuesta de Extracto Acuoso (EATM) y Extracto Hidroetanólico (EHTM) de Tabaco Masticable a las 24 horas. Los resultados son expresados como % de Mortalidad vs. La concentración de los extractos. Cada punto graficado corresponde al valor promedio de tres experimentos realizados por duplicado.  $X \pm DE$ .  $N=30$  larvas/punto.

Al relacionar los logaritmos de las dosis con los porcentajes de respuestas de mortalidad, expresadas en términos de probabilidades del evento o unidades probit (Fig. 12), el cual corresponde a la proporción de mortalidad expresada en unidades de desviación estándar de la media de una curva normal, se obtuvo

una línea recta con un coeficiente de correlación que expresó una buena medida de asociación lineal entre las dos variables (concentraciones vs mortalidad), con un valor  $R^2$  muy cercano a 1, que es la variación total de la variable independiente (Fig. 12). De la gráfica obtenida se destaca una vinculación directa significativa entre ambas variables, a las 24 horas de exposición para los extractos.

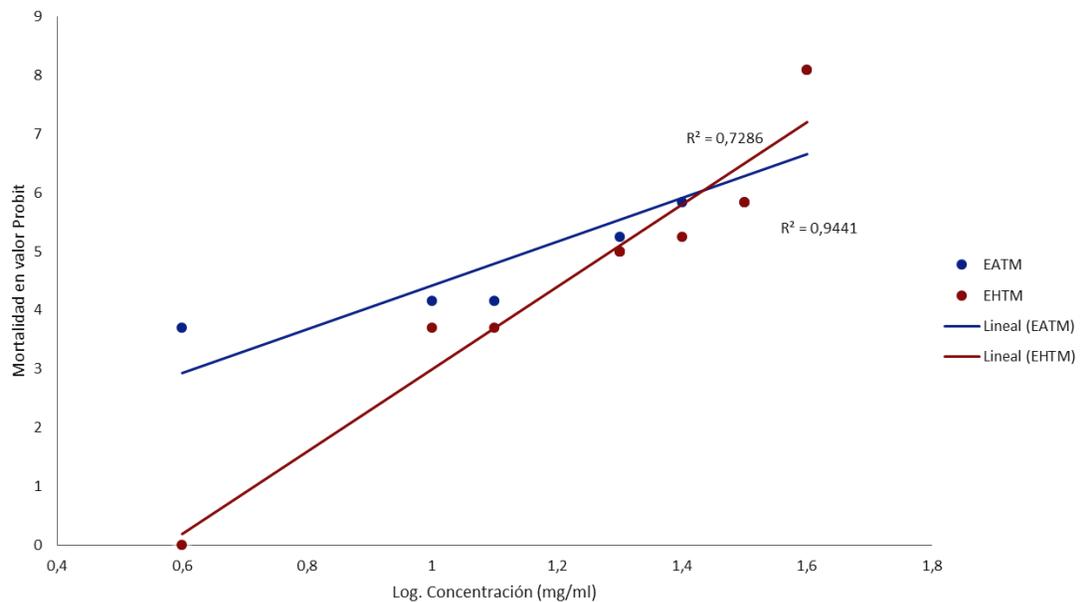


Fig. 12. Relación entre el logaritmo decimal de la concentración en mg/ml de EATM y EHTM, y el porcentaje de mortalidad en transformación Probit. Se destacan los coeficientes de correlación  $R^2$ .

Una vez obtenida la correlación positiva entre el porcentaje de mortalidad y la concentración de cada uno de los extractos, se procedió a calcular la concentración letal cincuenta ( $CL_{50}$ ), a las 24 h de exposición, la cual correspondió para el EATM a 21,5 mg/ml y para el EHTM a 24,5 mg/ml. Al incorporarle a la desviación estándar ( $S_m$ ) el valor de 95% de confianza, particularmente un factor de 1.645, se obtuvo la  $CL_{50} \pm S_m$ , para cada extracto.

Dicha expresión permitió determinar el rango de concentraciones tóxicas caracterizadas por intervalo supra-lethal correspondiente a  $CL_{50} + Sm$  y un intervalo umbral correspondiente  $CL_{50} - Sm$ .

### III.b.1. Toxicidad ( $CT_{50}$ )

Una vez obtenida la  $CL_{50}$  del EATM, se estimó el rango de concentración toxica. Éste, fue seleccionado en función de la reducción de la frecuencia cardíaca, como efecto tóxico de mayor prevalencia en el rango umbral de la  $CL_{50}$ , definido entre 0 y 12 mg/ml, durante 24 horas. La relación concentración-respuesta tóxica quedó expresada a través de curva (Fig. 13), que representó el creciente número de individuos con menor frecuencia cardíaca, en función de la concentración. Cabe destacar que dicha relación, se expresó de manera similar en todos los extractos ensayados, EATM / EHTM / EAPC.

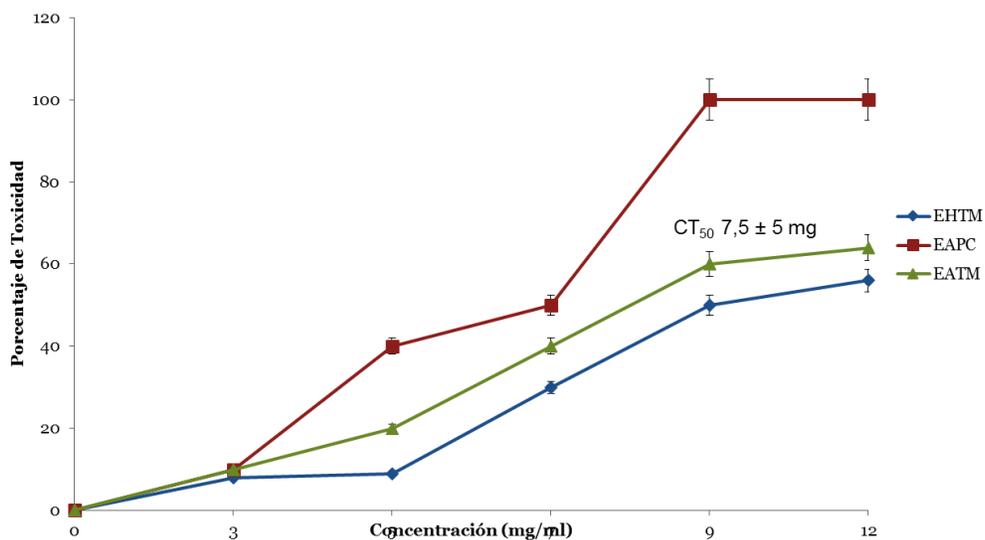


Fig. 13. Curva concentración-respuesta de las concentraciones de Extracto Acuoso (EATM), Extracto Hidroetanólico (EHTM) y Extracto Acuoso de Picadura de Cigarrillo (EAPC) como control positivo. Los resultados son expresados como % de toxicidad expresada en función de

la disminución de la frecuencia cardíaca. Se representa el valor promedio de tres experimentos realizados por duplicado durante 3 horas.  $X \pm DE$ .  $N=30$  larvas/punto.

Al relacionar los logaritmos de las concentraciones con los porcentajes de toxicidad, expresadas en unidades probit, se pudo obtener un conjunto de tres líneas rectas con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) que expresó una buena medida de asociación lineal entre las dos variables (concentración vs disminución de la frecuencia), con un valor  $R^2$  muy cercano a 1, que es la variación total de la variable independiente (Fig. 14). De la gráfica obtenida se destaca una vinculación directa significativa entre ambas variables, a las 24 horas de exposición para los extractos.

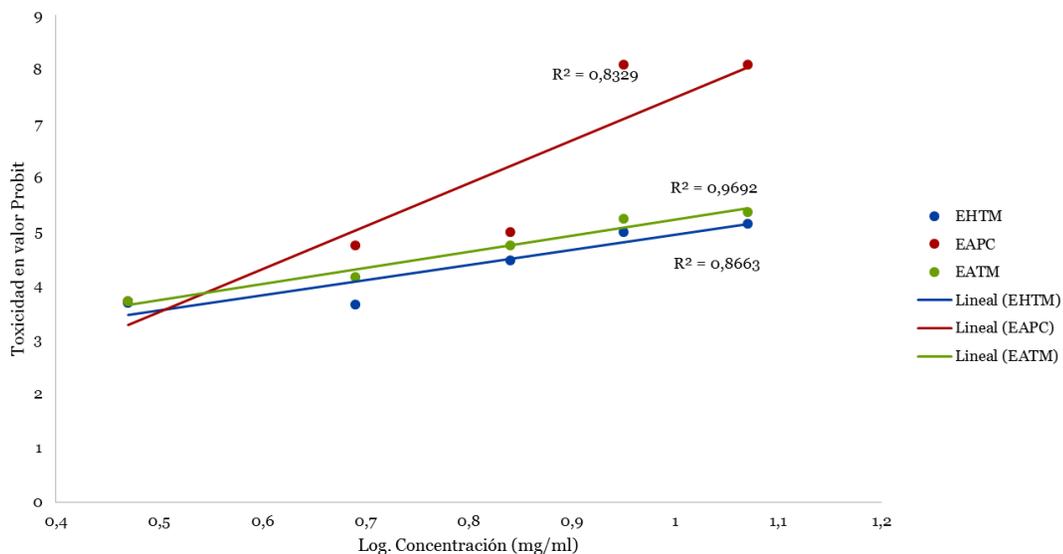


Fig. 14. Relación entre el logaritmo decimal de la concentración de EATM, EHTM y EAPC en mg/ml, y el porcentaje de toxicidad en transformación Probit. Se destacan los coeficientes de correlación  $R^2$ .

Una vez obtenida la relación de toxicidad, expresada en términos de la relación concentración-respuesta tóxica para el EATM, la concentración toxica cincuenta,  $CT_{50}$  estimada fue de 7,5 mg/ml. Al incorporarle a la desviación

estándar ( $S_m$ ) el valor de 95% de confianza, particularmente un factor de 1.645, se obtuvo la  $CT_{50} \pm S_m$ .

### **III.c. Disfunción cardíaca**

Como señal característica de disfunción cardíaca se observó la disminución de la frecuencia cardíaca, como efecto tóxico predominante, así como la tinción positiva a la NA en la región del corazón con alteraciones en el tejido y la bioquímica cardíaca.

#### **III.c.1. Disminución de la Frecuencia cardíaca**

Una visión lateral de larvas controles y tratadas con EATM (Fig. 15, panel superior), permitió visualizar una clara región cardíaca, con un ligero ensanchamiento del espacio sub epicardico (flechas). La representación gráfica del videocardiograma (VCG) mostró variación en la luminosidad antes ( $T_0$ ) y después ( $T_{3h}$ ) del tratamiento con EATM (Fig. 15, panel inferior).

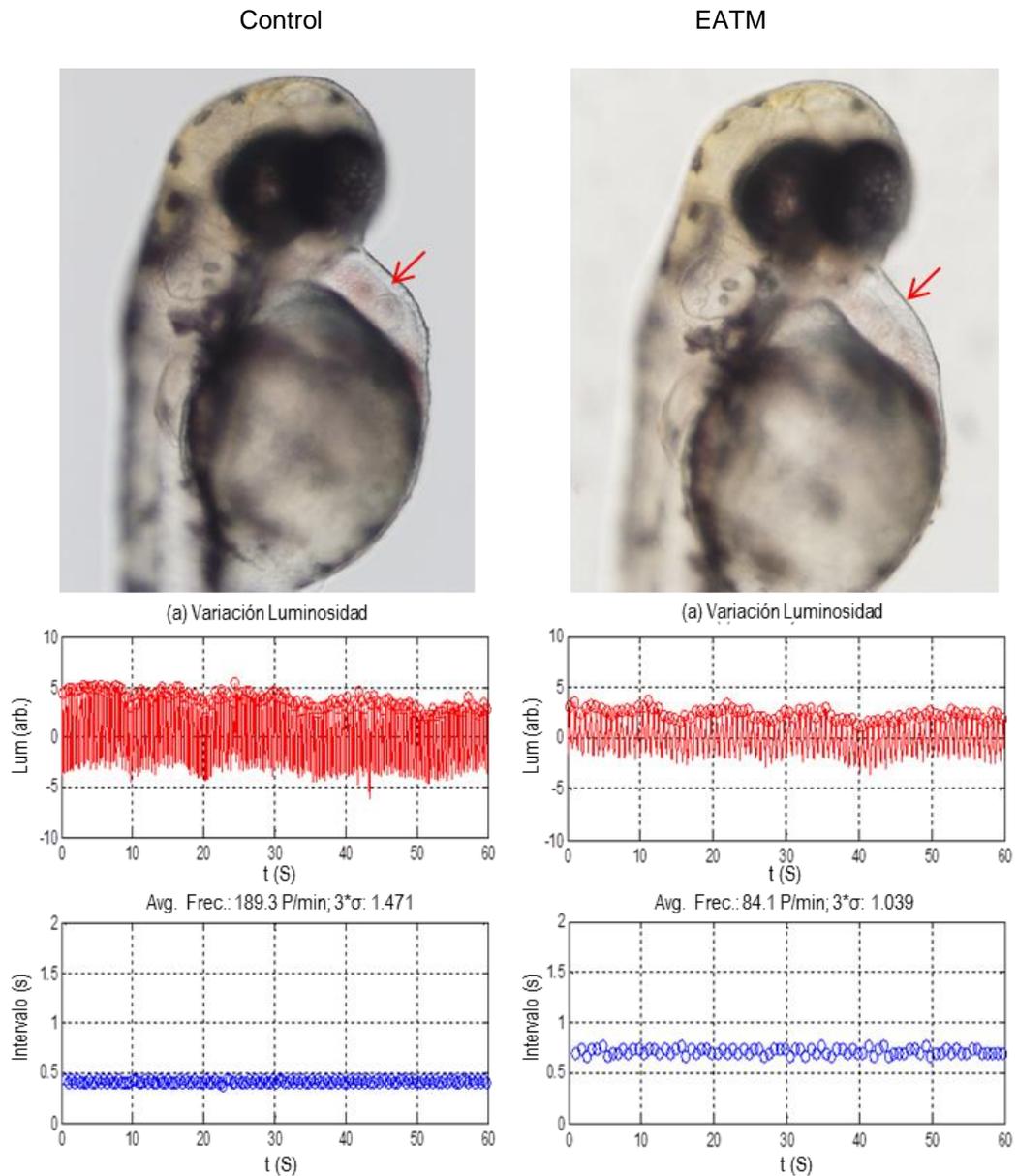


Fig. 15. Panel superior: Imagen lateral de larvas control y tratadas con EATM. Se destaca la región cardíaca (flecha). Panel inferior: Registro videocardiograma antes ( $T_0$ ) y luego del tratamiento ( $T_{3h}$ )

Dicha variación de luminosidad se tradujo en una reducción en la amplitud del espectro (trazado rojo), el cual luego de las transformaciones de Fourier, permitió determinar los valores promedio de la frecuencia cardíaca (trazado azul) de las larvas tratadas, en comparación a los controles. El

promedio de los valores de frecuencia cardíaca obtenidos para la población larvaria control fue de  $189,3 \pm 1,47$  P/min, mientras que para la población tratada con la  $CT_{50}$ , fue de  $84,1 \pm 1,03$  P/min. Dicha reducción se tradujo en un 55 % menos de Fc, respecto a los valores del estado inicial. Esta disminución inducida por el EATM, guarda poca relación con los cambios de Fc observados en una población larvaria tratada con sustancias como la Neostigmina, la Atropina y la Efedrina, usados también como controles positivos moduladores de la frecuencia cardíaca (Fig. 16).

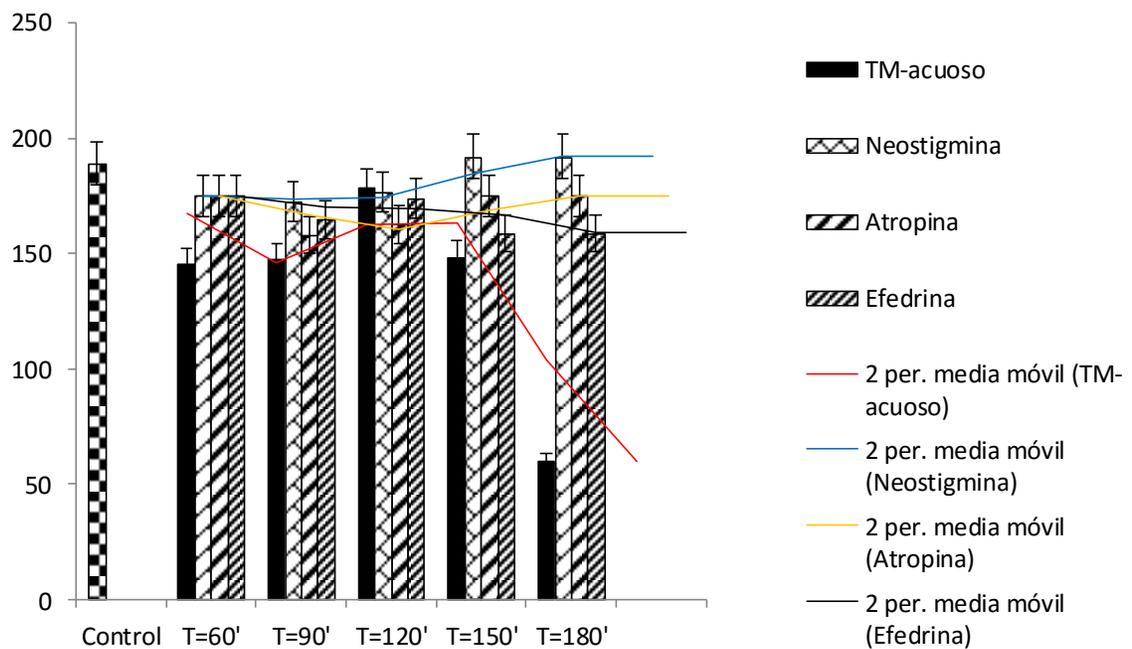


Fig. 16. Frecuencia cardíaca expresada en pulsaciones por minuto de larvas tratadas con diversas concentraciones de EATM y Neostigmina, Atropina y Efedrina, como sustancias moduladoras de la frecuencia cardíaca.  $X \pm DE$ .  $N=15$  larvas/punto.

Así, el comportamiento de la Fc en la población larvaria tratada con EATM, presentó una conducta bifásica, expresada con un incremento que alcanzó un máximo a los 120 min, seguido de una brusca caída al transcurrir

180 min del tratamiento, en contraste con un comportamiento no bifásico con ausencia de máximo a los 120 y una significativamente menor disminución de Fc a los 180 min de transcurrido el tratamiento. Por otra parte, la reducción de la frecuencia inducida por el EAPC, como control positivo, fue ligeramente mayor que la inducida por el EATM (Fig. 17).

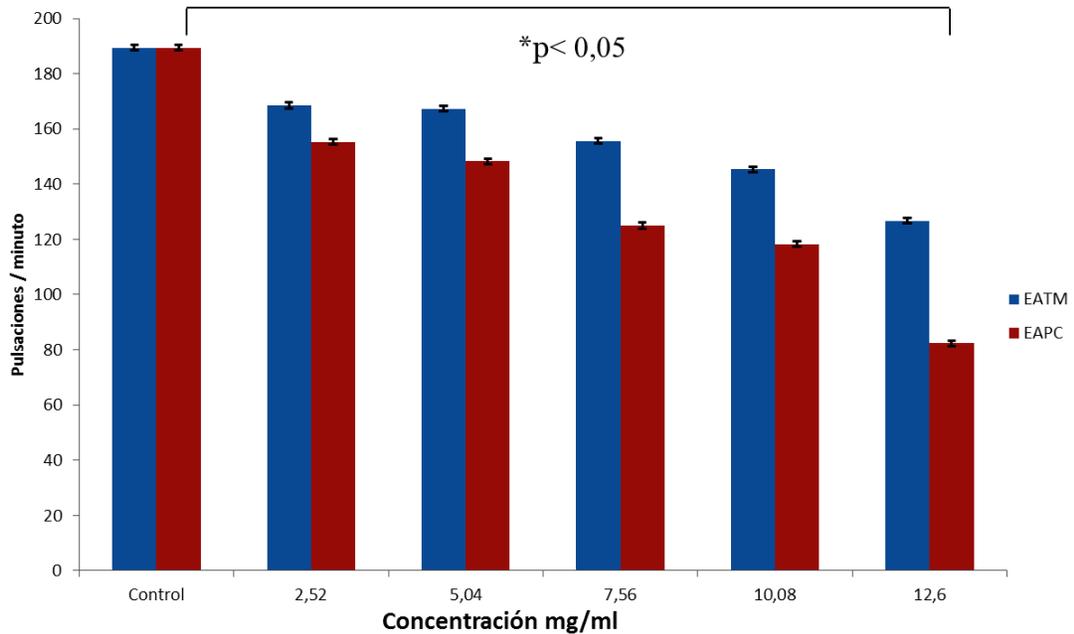


Fig. 17. Frecuencia cardiaca expresada en pulsaciones por minuto de larvas tratadas con diversas concentraciones de EATM y EAPC.  $X \pm DE$ .  $N=15$  larvas/punto.

### III.c.2. Histopatología del tejido cardíaco

El análisis histológico de cortes transversales sobre el área cardíaca de larvas controles y tratadas, permitió identificar las características estructurales de ésta área (Fig. 18). Así, fue posible visualizar, el área ventricular (V), atrial (A), espacio sub epicárdico (ESE) y el tejido miocárdico (m). A diferencia del control, en el área cardíaca de larvas tratadas con EATM, se pone en evidencia

el ensanchamiento del ESE y la pérdida de la estructura compacta del miocardio (doble flecha), en donde se observan la presencia de vacuolas (\*).

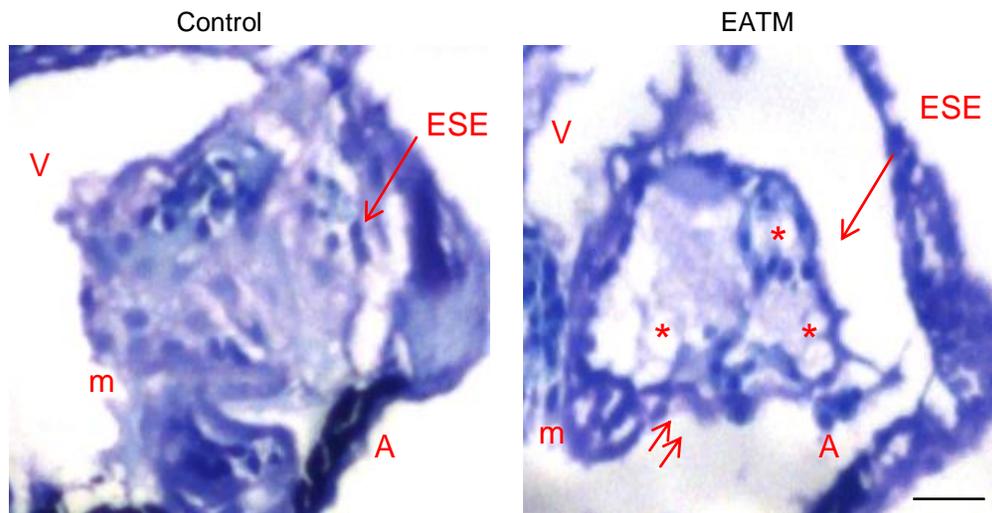


Fig. 18. Corte histológico transversal (5 $\mu$ m) teñidos con Giemsa, del área cardíaca de larvas controles y tratadas con EATM. Se destaca la orientación topográfica de las distintas regiones del corazón. Ventrículo (V), Atrio (A), Espacio sub epicárdico (ESE), miocardio (m) y vacuolas (\*). Magnificación 120x y escala de la Barra = 25 $\mu$ m

### III.c.3. Tinción positiva a la Naranja de Acridina (NA) región cardíaca.

El uso de NA permitió identificar un intenso color naranja en la porción cardíaca (recuadro rojo) de las larvas tratadas con EATM, en comparación a lo observado en la porción cardíaca (recuadro rojo) de las larvas control, la cual refleja una intensa fluorescencia verde (Fig. 19).

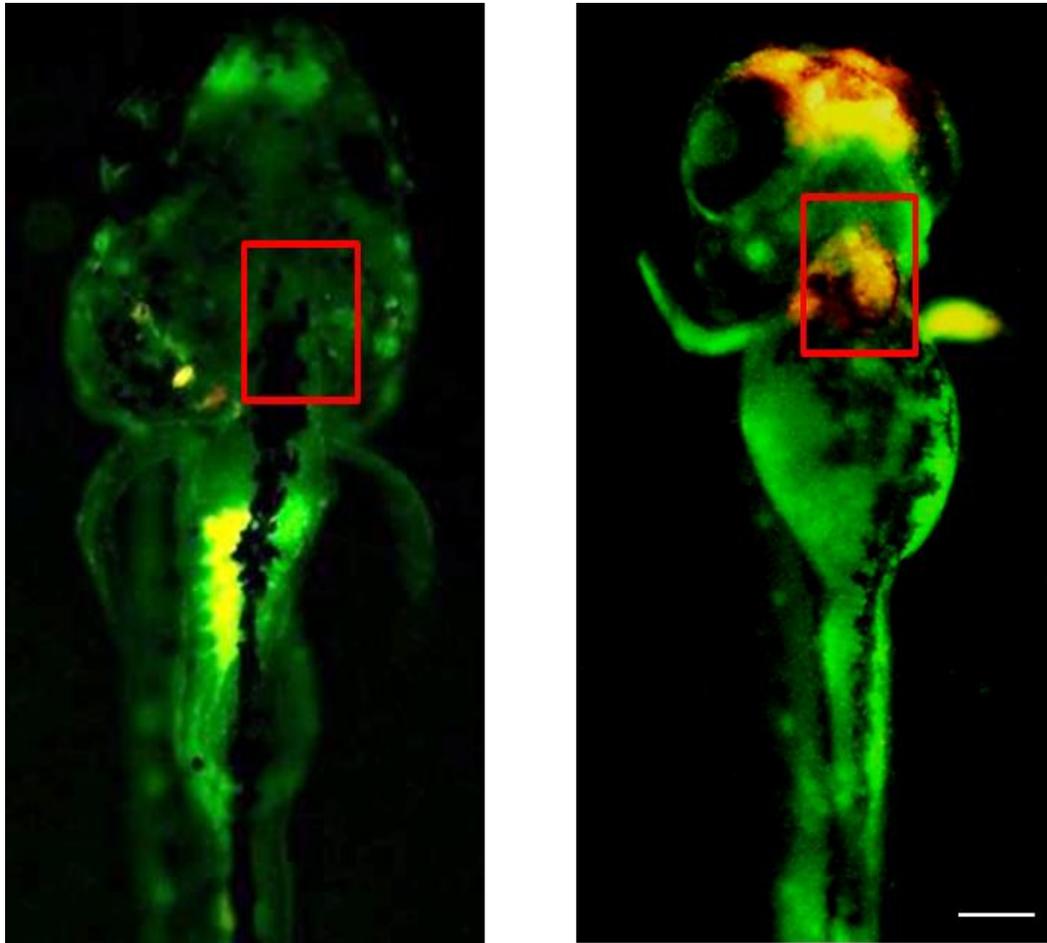


Fig. 19. Muestras de larvas de pez cebra *Danio rerio* control y tratadas con la CT de 2,5 mg/ml de EATM. La aplicación de la Naranja de Acridina (NA), permitió determinar muerte celular a nivel de la porción cardíaca en contraste con el control. Magnificación 10x y escala de la Barra= 500 $\mu$ m.

#### III.c.4. Perfil Isquémico

El perfil isquémico transcurridas las 3 horas de tratamiento con EATM, mostró variaciones significativas en el patrón basal de actividad de las enzimas marcadoras de trauma cardíaco. Así, siendo el patrón basal para la CK de 3249 UI/L, la misma alcanzó un valor de 6030 UI/L en las larvas tratadas, representando esto un 85,65% de aumento en la actividad de esta enzima. De igual manera, el patrón basal de su isoenzima CK-MB de 2588 UI/L, alcanzó un

nivel de actividad de 4283 UI/L, representando así un 65,49% de incremento. Los niveles basales de las enzimas AST y LDH, presentaron incrementos significativos de su actividad, partiendo de 430 UI/L a 759 UI/L y de 756 UI/L a 899 UI/L, respectivamente. Lo cual significó un incremento de 76,51% y 18,91%, por encima de la actividad basal de las mismas (Fig. 20).

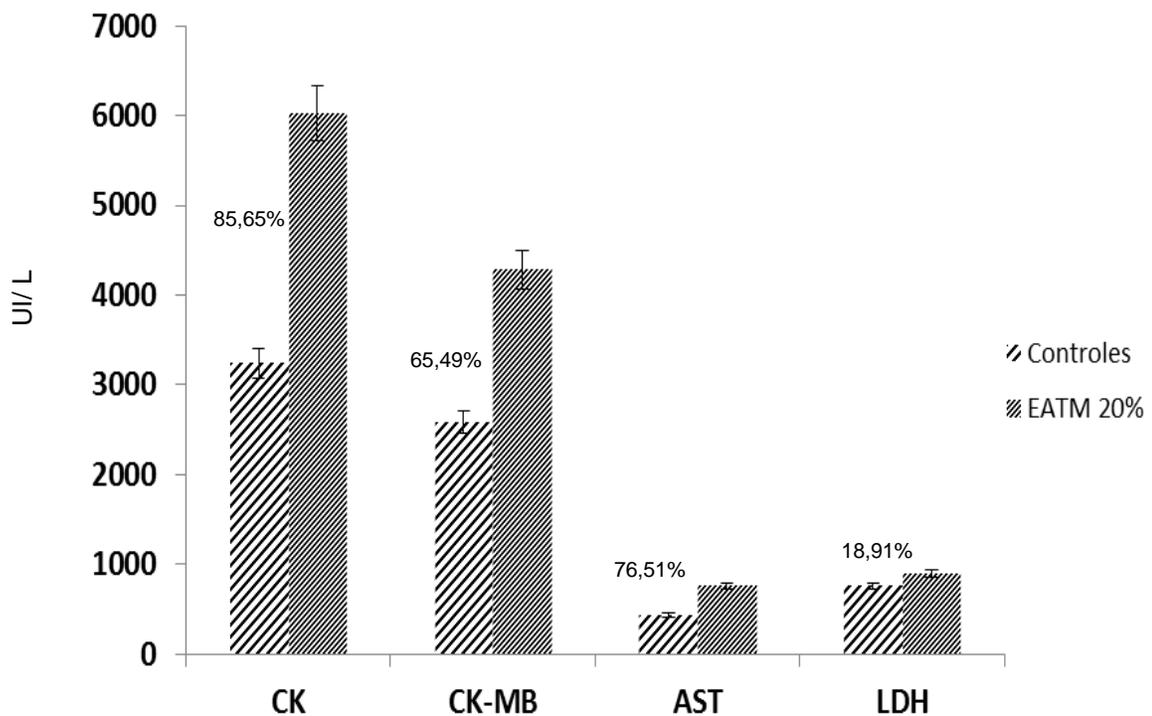


Fig. 20. Representación gráfica de incrementos en las enzimas marcadoras del daño muscular cardiaco. Creatinina Quinasa (CK) y su Isoenzima MB (CK-MB), Aspartato Amino Transferasa (AST) y Lactato Deshidrogenasa (LDH). CT EATM= 2,5 mg/ml. Unidades Internacional/litro (UI/L).

### III.d. Efectos tóxicos.

Cabe destacar, que debido a la similitud en las respuestas emitidas por la población larvaria, ante la presencia de EATM y EHTM, los efectos mostrados en el presente trabajo se ilustran con los obtenidos bajo el tratamiento con EATM.

Con respecto a los efectos tóxicos encontrados en el rango de concentraciones de 2,5; 7,5 y 12,5 mg/ml,  $CT_{50^-}$ ;  $CT_{50}$  y  $CT_{50+}$ , respectivamente, se observó la presencia de: cambios en la conducta de nado, curvatura troncal, edema del saco vitelino, además de tinción positiva de la NA en la porción cefálica y vacuolización del tejido cerebral.

### III.d.1. Cambios en la conducta de nado

El registro de los cambios en la conducta de nado, fue reportado al tiempo de inicio ( $T_0$ ) del contacto de la larva con el EATM y transcurridas las 3 horas de tratamiento (Fig. 21). Cabe destacar, que al contacto inicial de la larva con la solución de EATM, se observó una hiperactividad en la conducta de nado con movimientos corporales serpentinos acelerados, en comparación con el control, que registró un movimiento menor ante el estímulo táctil. Esto fue registrado en video (ver CD) y representado en trazado gráfico (Fig. 21 a, b).

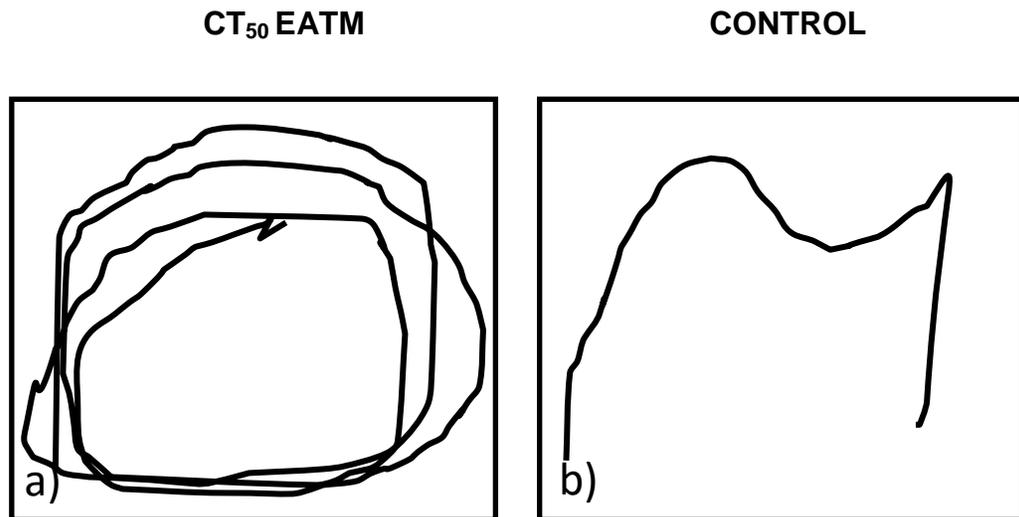


Fig. 21 a, b. Representación gráfica del patrón de nado de una larva de pez cebra de 5dpf, a los pocos minutos de contacto con el EATM a la  $CT_{50}$  de 7,5 mg/ml (a), en comparación a la respuesta de larva control sumergida en agua de pecera (b).

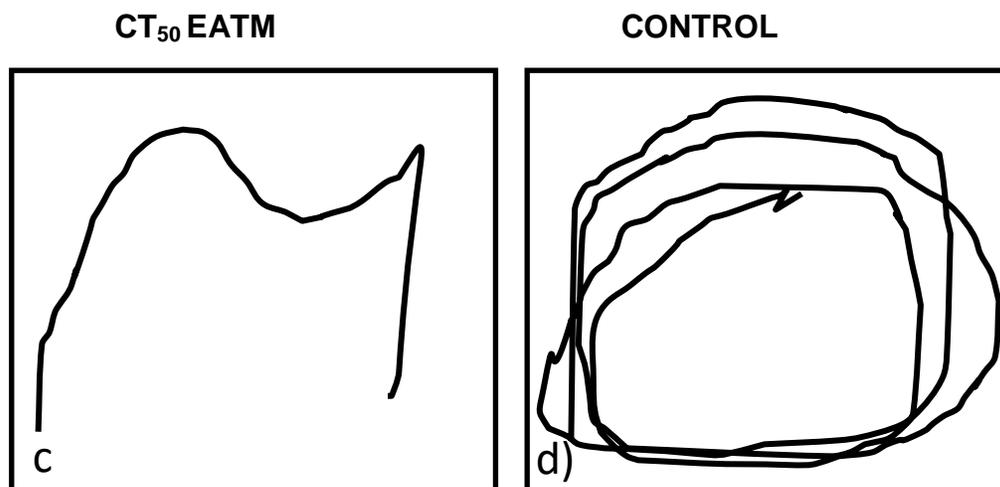


Fig. 21 c, d. Representación gráfica del patrón de nado transcurridas las 3 horas de estar en contacto con el EATM (c), a la  $CT_{50}$  de 7,5 mg/ml. Se destaca la inversión del trazado obtenido luego de la estimulación mecánica, respecto al control (d).

Transcurridas las 3 horas de tratamiento, se observó una respuesta diferencial ante el estímulo mecánico, ejercido sobre la población larvaria tratada, en comparación con el control. Cabe destacar, que ante el estímulo táctil, la respuesta de escape estuvo disminuida con reducción máxima de la hiperactividad de los movimientos corporales serpentinos. Esto puede ser observado en video (ver CD) y en la representación del trazo en gráfico (Fig. 21 c, d).

### III.d.2. Curvatura troncal

La curvatura troncal fue observada como un arqueo del eje vertical (flechas) de las larvas de pez cebra *Danio rerio*, siendo esta más pronunciada a mayor concentración (Fig. 22).

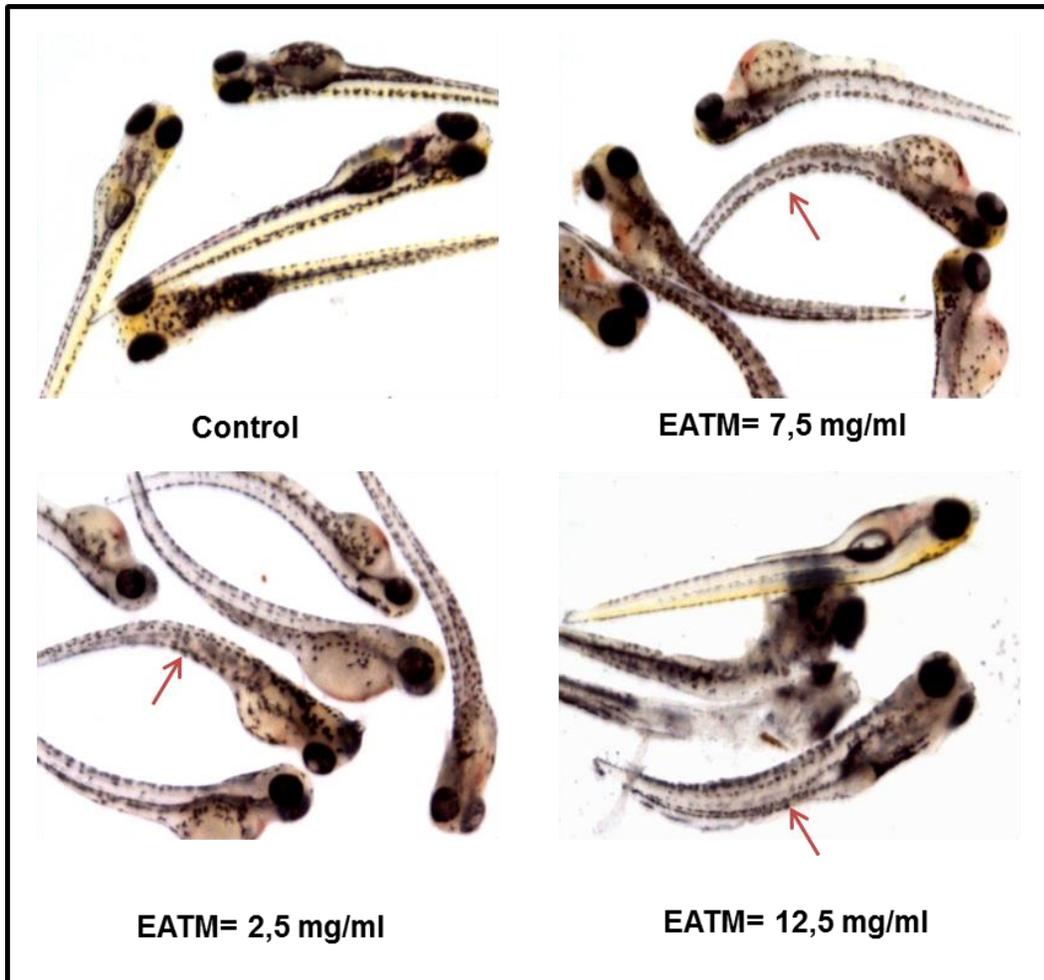


Fig. 22. Imagen ventral y dorsal de larvas de pez cebra 5 dpf a diferentes concentraciones tóxicas de EATM. Se destaca la curvatura troncal (flechas). Magnitud 40x.

### III.d.3. Edema del saco vitelino

El edema del saco vitelino fue observado como una protuberancia de la región de la capa sincicial del vitelo (flechas), la cual se hace mayor, a mayor concentración (Fig. 23).

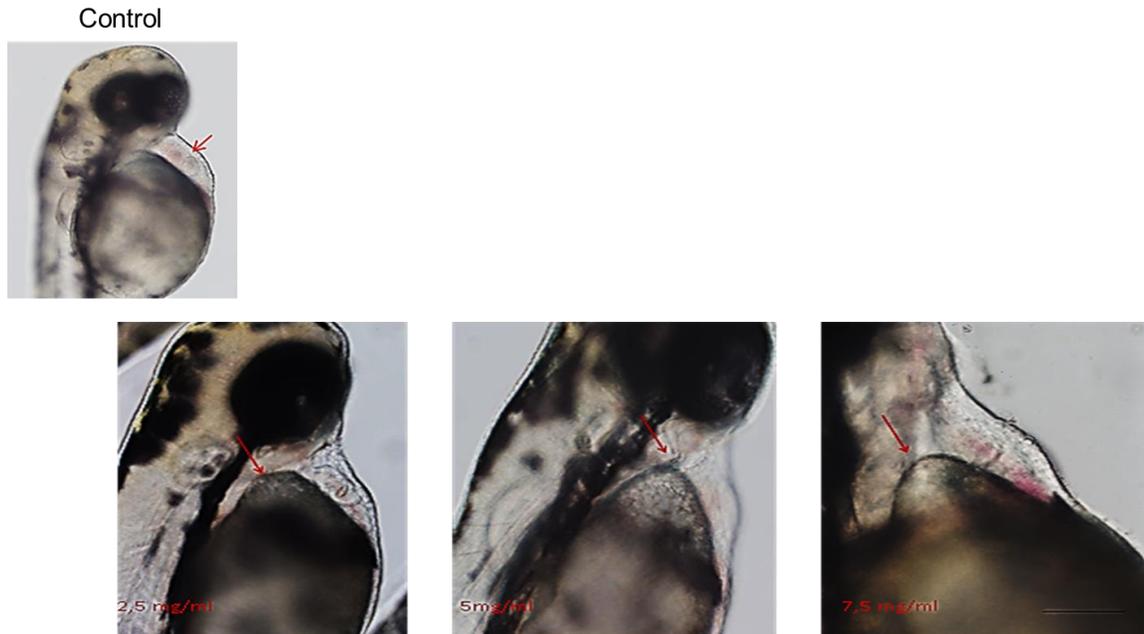


Fig. 23. Imagen ventral de larvas de pez cebra 5 dpf a diferentes concentraciones de EATM. Se destaca la capa sincicial del vitelo (flechas). Magnificación de 40x y escala de la barra =  $200\mu\text{m}$ .

#### III.d.4. Tinción positiva a la Naranja de Acridina (NA) porción cefálica

El uso de NA permitió identificar un intenso color naranja en la porción cefálica de las larvas tratadas con EATM, en comparación a lo observado en la porción cefálica de las larvas control, la cual refleja una intensa fluorescencia verde (Fig. 24).



Fig. 24. Muestras de larvas de pez cebra *Danio rerio* control (a) y tratadas (b) con la CT de 2,5 mg/ml de EATM. La aplicación de la Naranja de Acridina (NA), permitió determinar muerte celular a nivel de la porción cefálica en contraste con el control. Magnificación 10x y escala de la Barra= 500µm.

### III.d.5. Vacuolización del tejido cerebral

Las preparaciones citológicas en improntas de tejido cerebral de larvas tratadas con EATM, permitieron determinar la presencia de vacuolas (flechas) en comparación al tejido cerebral de las larvas controles (Fig. 25).

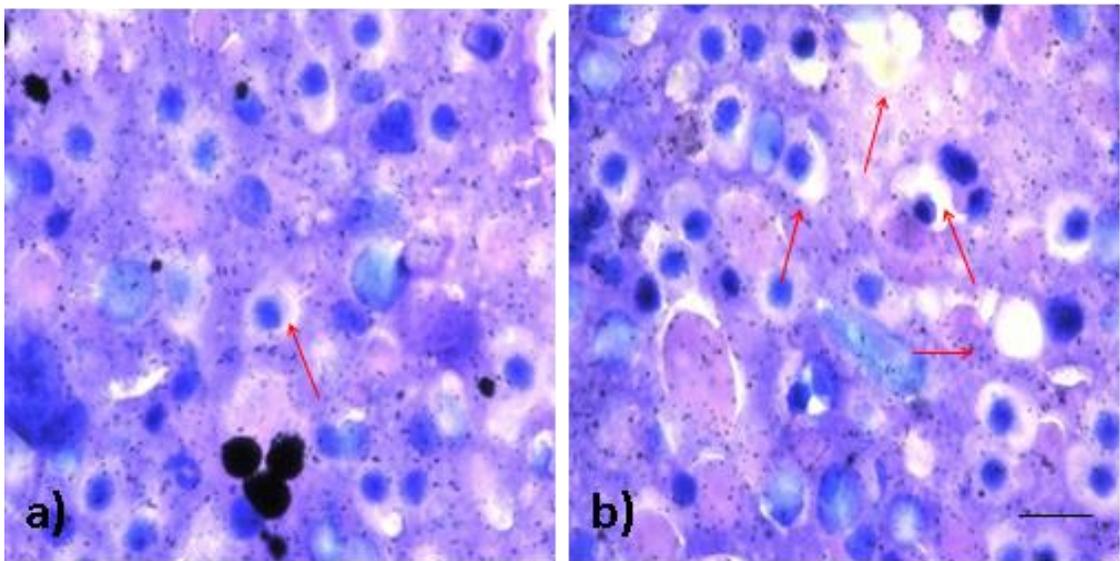


Fig. 25. Monocapa de tejido cerebral de larvas control (a) y tratadas con EATM (b). Se resalta la vacuolización (flechas) en comparación al control. Magnificación 100x y escala de la Barra= 10 $\mu$ m.

## IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron identificar diversos componentes químicos presentes en el tabaco masticable Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, así como estimar la letalidad y toxicidad del EATM y del EHTM, hasta el presente no identificadas. Por otra parte, permitieron describir la acción cardiotóxica del EATM, expresada a través de alteraciones en el ritmo y en el tejido cardíaco con cambios en el patrón de enzimas marcadoras de daño tisular y también describir alteraciones del tejido cerebral de preparaciones de larvas de pez cebra tratadas con el EATM.

### IV.a. Componentes químicos del TM Chimó El Tigrito<sup>®</sup>

#### IV.a.1. Cromatografía Gas-Masa

La existencia de numerosos componentes químicos, presentes en preparaciones de tabaco, en distintas cantidades y calidad de los mismos, ha sido vinculada con la metodología empleada en el proceso de manufactura de la pasta de mascar. En cuanto a cantidad, la disminución del contenido de almidón, un incremento en los azúcares reductores y una disminución en los polifenoles y carbohidratos de las mismas, ha sido reportado como eventos dependientes del proceso de fermentación<sup>(93)</sup>. Por otra parte, en cuanto a calidad, la presencia de compuestos tipo aldehído volátil, hidrocarburos aromáticos policíclicos y nitrosaminas, con posible acción tóxica y carcinogénica, así como la modificación de su contenido, también ha sido reportada<sup>(94)</sup>.

En este contexto, el análisis químico de la muestra de TM Chimó El Tigrito<sup>®</sup> estudiada en el presente trabajo, ha confirmado también, en cuanto a cantidad y calidad, la existencia de compuestos con posible acción tóxica. Entre estos, fue posible cuantificar en ppm, fitoesteroles como el colesterol y derivados de esteroides como el Colest-8(14)-ene-3,15-dionol, Estigmastan-3,5-diono y el D-alfa-tocoferol, alcaloides tipo nicotina y cotinina, además de hidrocarburos aromáticos, como la 2-fluoro fenilhidrazina, el cual está catalogado como un producto químico potencialmente peligroso (Hoja de Seguridad).

Estos resultados son comparables a los obtenidos por Corredor Aranguren A, 2012 <sup>(21)</sup>, donde a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), se determinó el contenido de nicotina de una muestra de chimó elaborado artesanalmente, así como el contenido de nicotina de cinco presentaciones de chimó semi-industrial, entre ellos, Chimó El Tigrito<sup>®</sup> con 3,84 mg/g de nicotina.

En cuanto a la calidad de los compuestos obtenidos, cabe destacar que los mismos, parecieran tener la característica de ser producto de la transformación de los ingredientes originales que componen la muestra. Ejemplo de ello lo constituye la cotinina, que ha sido reportada como un metabolito de la nicotina <sup>(95)</sup>, así como el Estigmastan-3,5-diono y el D-alfa-tocoferol, que han sido reportados como compuestos derivados de la deshidratación de aceites naturales <sup>(96)</sup>.

Esta particularidad, que define en parte la composición química del TM Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, hasta el momento no reportada, podría estar definiendo la posible acción toxica de este producto de alto consumo. Si el origen de los mismos, es consecuencia del proceso de manufactura a través del cual ha sido elaborado el Chimó utilizado, en el presente trabajo no se ha podido identificar, sin embargo, la característica de metabolitos secundarios de los productos obtenidos, así lo sugieren.

#### **IV.b. Bioensayo de Toxicidad de EATM Chimó El Tigrito<sup>®</sup>**

Al evaluar la exposición de las larvas de pez cebra *Danio rerio* a los distintos extractos, se pudo predecir una toxicidad diferencial vinculada con estos preparados, que hasta el presente no había sido demostrada experimentalmente. Cabe destacar, que la diferencia entre la toxicidad expresada por el EATM y EHTM, se fundamentó en la relación concentración-respuesta, analizada a través del estudio de la correlación, entre el efecto cuántico de la mortalidad de los organismos expuestos y las distintas concentraciones ensayadas.

Tanto el EATM como el EHTM, presentaron una marcada pendiente, reflejo del desarrollo de la respuesta farmacológica de estos. Dicha respuesta, entre un extracto y el otro, fue comparable a través del análisis de las concentraciones requeridas para producir el efecto esperado. Particularmente, con la administración del EATM a una concentración de 21,5 mg/ml y la administración del EHTM en una concentración de 24,5 mg/ml, se alcanzó igual

porcentaje de mortalidad, por lo que la toxicidad podría estar fundamentada en la diferente potencia expresada por ambos extractos. De allí que, a pesar que el EHTM indujo sobre la población larvaria respuestas similares, fue requerida menor cantidad del extracto acuoso para generar una respuesta letal del 50% en la población ensayada. En tal sentido, la toxicidad diferencial podría quedar expresada en términos de la potencia (P) de ambos extractos, y particularmente, bajo la relación  $P_{EATM} > P_{EHTM}$ .

### **V.b.2. Toxicidad**

En cuanto a la acción tóxica de un compuesto, cabe destacar que la misma ha podido ser entendida como la relación entre la concentración mínima inductora de una acción tóxica generalizada (ZG) y la concentración mínima inductora de una acción tóxica específica (ZE), de donde la relación  $ZG/ZE > 1$ , nos indica la especificidad de la respuesta <sup>(97)</sup>.

Particularmente, en el caso del EATM, al considerar el cambio en la conducta de nado como una respuesta generalizada de acción tóxica (ZG), a una concentración mínima de 7,5 mg/ml, y la alteración del tejido cerebral del cerebro de larvas de pez cebra, como una respuesta específica (ZE), a una concentración mínima de 2,5 mg/ml, la relación entre  $ZG/ZE$  resultó mayor a 1, lo cual hace posible definir la acción tóxica del EATM, como una acción específica.

Esta relación de toxicidad, también pudo ser visualizada a nivel del sistema cardiovascular. Así, al considerar la reducción de la frecuencia cardíaca ( $F_c$ ) como una respuesta generalizada de acción tóxica (ZG), a una concentración

de 7,5 mg/ml y el incremento en las enzimas específicas de daño cardíaco, como una respuesta específica (ZE), a una concentración de 2,5 mg/ml, la relación entre ZG/ZE resultó mayor a 1.

La acción tóxica de las sustancias químicas afecta comúnmente a todo el organismo, si bien el daño primario puede estar localizado en un órgano u órganos específicos, en los cuales la acción tóxica se puede revelar en términos de disfunción o enfermedad manifiesta. Según Sanocki (1975<sup>a</sup>), la especificidad de la acción tóxica aguda se puede expresar en términos de una “zona de acción específica (Zs)”, que es la relación entre la dosis umbral<sup>b</sup> de un efecto agudo a nivel del organismo total y la dosis umbral de un efecto agudo a nivel de un órgano o sistema específico. Cuando  $Z_{sp} > 1$ , la acción tóxica es específica; cuando  $Z_{sp} < 1$ , la acción tóxica es inespecífica.

Ambas expresiones de toxicidad reportadas, a nivel de la conducta y el sistema cardíaco, han permitido por tanto definir la acción tóxica del tabaco masticable Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, como una acción tóxica sistémica, con un daño primario localizado sobre órganos específicos como el cerebro y el corazón; permitiendo sobre este último definir una disfuncionalidad cardíaca, probablemente vinculada con alteraciones en estructuras específicas de otros sistemas como el tejido nervioso.

#### **IV.c. Disfunción Cardíaca**

La disfunción cardíaca ha sido interpretada como cambios en la función y en la morfología del corazón; cambios estos caracterizados por una

modificación de la frecuencia cardíaca, posiblemente acompañada de fallas en el proceso de formación y/o conducción de la corriente iónica, así como cambios a nivel de la morfología del corazón, caracterizados por alteraciones en la citoarquitectura del tejido cardíaco.

Respecto a la modificación de la frecuencia cardíaca, a través de cambios en la corriente iónica, cabe destacar que la misma ha sido atribuida, entre otras razones, a alteraciones en los eventos de despolarización-repolarización cardíaca, entendida ésta, como un proceso dependiente de factores como la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa del miocardiocito, en donde los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , modulan el  $\text{Ca}^{+2}$  disponible en el retículo sarcoplásmico, estructura que lo regula. En cuanto a la conducción de la corriente iónica, cabe destacar que esta es dirigida a través de una estructura anatómicamente definida, que va desde el nodo sinusal hasta los ventrículos, a través del Haz de His, lo cual hace pensar que la pérdida de la estructura compacta del tejido cardíaco, podría interrumpir dicho proceso.

Resulta evidente que en la relación morfo-funcional de la actividad cardíaca, se encuentran presentes dos elementos principales como son, la actividad eléctrica persé y la plataforma anatómica de conducción, caracterizada por estructuras como el musculo cardíaco ventricular, el musculo cardíaco auricular, el endocardio, el epicardio, el pericardio y el tejido de conducción, y a través de la cual es posible el desarrollo de tal actividad.

En ese sentido, la disfuncionalidad cardiaca inducida por el EATM en modelo larvario de pez cebra, no podría ser interpretada como una modificación de la corriente iónica, ya que registros de algún cambio en los patrones de electrolitos, vinculados con modificaciones en la corriente de alguno de estos iones, no han sido puestos en evidencia en la presente investigación. Por lo que, dicho argumento dificulta el sugerir que sea una alteración en el proceso de formación de la corriente eléctrica persé, el posible origen de la disfuncionalidad registrada.

Además, es importante resaltar, que la frecuencia cardiaca se encuentra bajo la regulación de factores extrínsecos e intrínsecos. Mientras que los factores extrínsecos, ejercen su función de regulación a través de vías de señalización definidas por la división simpática y parasimpática del sistema nervioso central (SNC), los factores intrínsecos, como la actividad del marcapaso, se encuentran regulados por la modificación de estructuras celulares y tisulares que conforman el corazón.

Es de hacer notar, que el estadio de desarrollo seleccionado en esta investigación, no cumple con la estructura anatomo-funcional de las vías estimuladoras extrínsecas, es decir, la comunicación entre el corazón y el SNC a través de las vías simpática y parasimpática, no se encuentran aun totalmente estructuradas <sup>(98)</sup>. Esta característica ha sido manifestada en este modelo de experimentación, a través de la pobre respuesta generada por compuestos moduladores de la frecuencia cardiaca a nivel del SNC, particularmente, la atropina, la neostigmina y la efedrina, y es también corroborada en otros

modelos experimentales, como el embrión de pollo en estadios tempranos de desarrollo <sup>(99)</sup>.

Ante esta situación, cabría pensar que el efecto observado, o disminución de la FC inducida por los distintos extractos de tabaco masticable Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, no sea una consecuencia de intervención sobre las vías de regulación del sistema nervioso, ni consecuencia de una alteración de la corriente eléctrica persé, sino de una acción directa sobre la estructura tisular y celular que conforma el corazón. De ser así, cobra relevancia el argumento de que sea una alteración en la plataforma anatómica de conducción de la corriente iónica, la posible causa del origen de la misma, ya que la pérdida de la estructura compacta del miocardio, la presencia de vacuolas en el tejido cardíaco y el incremento de enzimas marcadoras de daño cardíaco reportadas acá, así lo sugieren.

#### **IV.c.1. Cambio en la estructura cardíaca**

El compendio de alteraciones cardíacas asociadas al EATM, previamente descritas, recuerdan las señales de cardiotoxicidad vinculadas con el uso de agentes tóxicos de origen químico, tales como herbicidas y drogas antiarrítmicas <sup>(100)</sup>, con los cuales se han descrito intensas lesiones sobre distintos tejidos del área cardíaca, asociadas a severas alteraciones en la conducción de la corriente eléctrica, con lesiones en el tejido del Haz de His y a través de múltiples mecanismos; por ejemplo, procesos inflamatorios o no, así como procesos de muerte celular por apoptosis <sup>(101)</sup>.

A diferencia de estos reportes, que vinculan la disminución de la frecuencia con alteraciones en la formación de la corriente iónica o alteraciones en el proceso de despolarización-repolarización, los resultados en la presente investigación la reportan, como una posible falla en la conducción eléctrica, debida a trastornos o lesiones en el soporte anatómico de la misma. Si el daño miocárdico reportado, incluye daño en el tejido de conducción, no fue posible identificarlo, sin embargo, el daño en el tejido cardíaco fue evidente. Esto fue corroborado a través del registro de un aumento en las enzimas marcadoras de trauma cardíaco, tales como la CK y la CK-MB <sup>(102)</sup>.

Esta evidente alteración del tejido miocárdico, inducida por el EATM en el corazón de larvas de pez cebra *Danio rerio*, se asemeja con severas alteraciones en la homeostasis celular, vinculadas con cambios en los niveles energéticos de la célula cardíaca a razón de un acelerado consumo de ATP <sup>(103,104)</sup>. Como es sabido, una disminución en las concentraciones de ATP, conduce a un desequilibrio de la dinámica de proteínas musculares como la tubulina, la troponina o los filamentos de tropomiosina, filamentos gruesos de miosina y filamentos delgados de actina, cuyo desequilibrio compromete la arquitectura del corazón; por lo que una alteración en la mecánica cardíaca también podría ser interpretada como la etiología de la reducción de la frecuencia cardíaca.

Todas estas proteínas antes mencionadas, constituyen la base de la denominada citoarquitectura de la célula, en la cual los microtúbulos, son uno de los mayores componentes de dicha estructura. Su participación como blanco

del extracto acuoso de tabaco, ha sido demostrada en células de mamíferos tratadas con extracto acuoso de tabaco masticable. Dicho tratamiento ha permitido determinar una disminución de la viabilidad celular, como un proceso dependiente de la concentración, sumado a la inducción de apoptosis, con dependencia mitocondrial de activación de la caspasa 3 <sup>(105)</sup>. Un mecanismo propuesto para esta pérdida de viabilidad, ha sido vinculado con la alteración de puntos reactivos, como los residuos de cisteína y grupos sulfidrilos, presentes en la tubulina; lo cual afecta funciones importantes de esta proteína, como son el plegamiento y la polimerización, conduciendo probablemente a una degradación proteosomal de esta proteína tubulina, a través de un proceso de apoptosis en células de mamíferos <sup>(106)</sup>.

Esta participación de la tubulina en un proceso de apoptosis, ha sido demostrada con el uso de citoquímicos como las parabenzoquinonas (PBQ), presentes en el humo de cigarrillos y en el humo de combustión vehicular, con lo cual se ha registrado una pérdida en la arquitectura y en las propiedades migratorias de las células tratadas de manera dosis dependiente e irreversible.

En concordancia con los resultados expuestos, un proceso de muerte celular por apoptosis ha sido puesto en evidencia a través de uso de la NA <sup>(107)</sup>. Si la apoptosis demostrada es consecuencia de una disrupción de proteínas como las tubulinas, entre otras, no fue demostrada en la presente investigación. Sin embargo, pese a que la muerte celular por apoptosis es un evento fisiológico, la acción de agentes químicos y biológicos, puede incrementar y/o

acelerar dicho proceso, lo que podría estar correlacionado con el intenso color naranja observado en los resultados reportados en la presente investigación.

Otros mecanismos claves para entender la etiología de la disfuncionalidad inducida por el EATM, a través de la modificación de la plataforma anatómica de conducción de la corriente iónica podrían estar asociados a la peroxidación lipídica, reducción del citocromo C y/o a una fragmentación del ADN, como fue reportado por Bagchi M y col., 1999 <sup>(108)</sup>, donde células normales de queratinocito oral humano fueron expuestas a extracto de tabaco masticable, observándose dichos efectos.

En síntesis, los resultados obtenidos en cuanto a las alteraciones en la morfo-funcionalidad cardíaca, permitieron caracterizar la acción cardiotoxica del EATM Chimó El Tigrito<sup>®</sup>, inducida probablemente por los componentes químicos reportados, a través de una acción toxica específica. La misma se tradujo a nivel funcional, en una disminución bifásica de la frecuencia cardiaca, mientras que a nivel morfológico, se tradujo en una disrupción del tejido miocárdico, asociado a un proceso de muerte celular por apoptosis. Estas características de toxicidad del EATM, recuerdan señales de cardiotoxicidad, asociadas a eventos isquémicos, en donde un bloqueo en la conducción de la corriente eléctrica como consecuencia de daños en la estructura del tejido cardiaco, como se muestra claramente en estos resultados, podría estar modulando esta toxicidad cardiaca inducida por el EATM Chimó El Tigrito<sup>®</sup>.

## V. CONCLUSIONES

- El contenido del TM Chimó El Tigrito<sup>®</sup> empleado en esta investigación, es comparable con el contenido de la mayoría de las preparaciones disponibles en el país, lo que refleja que de acuerdo a su preparación, sus componentes pueden estar en mayor o menor proporción.
- Se le puede atribuir una vinculación con la acción a nivel del tejido cardíaco y el tejido cerebral.
- Se puso en evidencia que la apoptosis pudiera estar vinculada como una etapa en el mecanismo de acción tóxica del mismo.
- El TM Chimó El Tigrito<sup>®</sup> induce incremento de las enzimas marcadoras de daño muscular cardíaco, particularmente, Creatinina Quinasa (CK) y su Isoenzima MB (CK-MB), Aspartato Amino Transferasa (AST) y Lactato Deshidrogenasa (LDH).

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Profundizar en la investigación, a nivel clínico y experimental, de las distintas formas de tabaco masticable disponibles en el país, a fin de alcanzar una caracterización completa, que permita explicar los mecanismos de toxicidad, vinculados al consumo de este tipo de productos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Seelkopf C y Rojas A. Estudio Sobre El Chimó. Artículo. 1960. Mérida. Venezuela.
2. Severson HH, Klein K, Lichtensein E, Kaufman N, Orleans CT. Smokeless tobacco use among professional baseball players: survey results, 1998 to 2003. *Tob Control* 2005; 14:31-36.
3. Connolly GN, Orleans CT, Kogan M. Use of smokeless tobacco in major league baseball. *N Engl J Med* 1988; 318:1281-85.
4. Baldini FD, Skinner JS, Landers DM, O'Connor JS. Effects of varying doses of smokeless tobacco at rest and during brief, high-intensity exercise. *Mil Med* 1992; 157:51-55.
5. National Cancer Institute, Centers for Disease Control and Prevention, and Stockholm Centre of Public Health. Smokeless Tobacco Fact Sheets. En: 3rd. International Conference on Smokeless Tobacco, September 20-25, 2002. Stockholm. Sweden.
6. Ebbert JO, Carr AB, Dale LC. Smokeless tobacco: an emerging addiction. *Med Clin N Am* 2004; 88:1593-1605.
7. Warnakulasuriya S. Smokeless tobacco and oral cancer. *Oral Dis* 2004; 10(1):1-4.
8. Jarpa P. Medición del pH de 12 preparaciones distintas de pasta de Tabaco de mascar, relacionándolas con la adicción a la nicotina. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 2003; 45(2):7-11.
9. Hatsukami DK, Ebbert JO, Feuer RM, Stepanov I, Hecht SS. Changing smokeless tobacco products new tobacco delivery systems. *Am J Prev Med* 2007; 33(6):S368-78.
10. World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 89: Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines. [PDF-3.18 MB] Lyon (France): World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2007 [accessed 2014 Oct 31].
11. Jordi Parra, Elizabeth Tovitto, Patricio Jarpa, Gerardo Moreno, Rosalba Florido, Carlos Omaña. Determinación de cambios celulares en pacientes consumidores de chimó a través del estudio citológico. *RevVenezInvestOdont IADR* 2014; 2 (2): 116-125.

12. Rodu B, Jansson C. Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(5):252-63.
13. Winn DM. Tobacco Use and Oral disease. *J Dent Educ.* 2001; 65(4): 306-12.
14. Fames. Los chamos mascan chimó sin saber las consecuencias. Últimas noticias. 20 de febrero de 2009. Disponible en: <http://fundacionfames.blogspot.com/2009/02/los-chamos-mascan-chimo-sin-saber-las.html> (Último acceso 16 de enero de 2015)
15. Resolución N° 011 de 8 de febrero de 2006 del Ministerio de Salud, por la cual se regulan los Puntos y Formas de Venta de Productos derivados del Tabaco. *Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela* N° 38.375 del 8 de febrero de 2006.
16. Resolución N° 012 de 8 de febrero de 2006 del Ministerio de Salud, por la cual no se permite la colocación transitoria o permanente, distribución o promoción en medios publicitarios o cualquier tipo de publicidad exterior, que inciten, promuevan o estimulen de cualquier forma el consumo de Productos derivados del Tabaco. *Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela* N° 38.375 del 8 de febrero de 2006.
17. Resolución N° 109 del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, por medio de la cual se establece la regulación y control del cigarrillo y demás productos derivados del tabaco destinados al consumo humano. *Gaceta Oficial*: 38.051 del 22 de octubre de 2004.
18. Rivera H, Bentolila R, Santos M, Socorro M, Gómez D, Torres J, et al. Uso de tabaco no fumado (TNF) Chimó en niños y adolescentes en el estado Portuguesa. *Acta Odontológica Venezolana* 2010; 48(3):1-10.
19. Tso T. Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant. Beltsville, MD; *Ideals* 1990; 595-614.
20. Borgerding MF, Bodnar JA, Curtin GM, Swauger JE. The chemical composition of smokeless tobacco: A survey of products sold in the United States in 2006 and 2007. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 64(3):367-87.
21. Corredor A, Chidiak S, Jarpa P, Urdaneta L, Sánchez N, Aparicio R, et al. Determinación del nivel de nicotina en el chimó venezolano. *Rev Fac Farm* 2013; 55 (2): 6-10.
22. Jarpa P. Medición del pH de 12 preparaciones distintas de pasta de tabaco de mascar, relacionándolas con la adicción a la nicotina. *Rev Fac Farm.* 2003; 45 (2): 7-11.

23. Squier CA, Lilly G. Smokeless Tobacco - Better eschewed than chewed. *Iowa Dent J* 1987; 73(1):49-51.
24. Armitage AK, Turner DM. Absorption of nicotine in cigarette and cigar smoke through oral mucosa. *Nature* 1970; 226(5252):1231-2.
25. Benowitz NL. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med* 1988; 319(20):1318-30.
26. Granero R. El problema del tabaquismo en odontología: creencias, conocimientos, actitudes y práctica clínica de profesionales de la odontología en relación al tabaco de uso oral. *Acta Odontol Venezolana*. 2006; 44 (1): 64-69
27. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984; 53(3):563-8.
28. Colilla SA. An epidemiologic review of smokeless tobacco health effects and harms reduction potential. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010; 56:197-211.
29. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9(7):667-75.
30. Boffetta P, Aagnes B, Weiderpass E, Andersen A. Smokeless tobacco use and risk of cancer of the pancreas and other organs. *Int J Cancer* 2005; 114(6): 992-5.
31. Luo J, Ye W, Zendehdel K, Adami J, Adami HO, Boffetta P, et al. Oral use Swedish moist snuff (snus) and risk for cancer of the mouth, lung, and pancreas in male construction workers: a retrospective cohort study. *Lancet* 2007; 369(9578):2015-20.
32. Henley SJ, Connell CJ, Ritcher P, Husten C, Pechacek T, Calle EE, Thun MJ. Tobacco-related disease mortality among men who switched from cigarettes to spit tobacco. *Tob Control* 2007; 16(1):22-28.
33. Willis D, Popovech M, Gany F, Zelikoff J. Toxicology of smokeless tobacco: implications for immune, reproductive, and cardiovascular systems. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2012; 15(5):317-31.
34. Lombard C, Farthing D, Sun J, Fariss MW, McKallip RJ. Reference moist smokeless tobacco-induced apoptosis in human monocytes/macrophages cell line MM6. *Int Immunopharmacol* 2010; 10(9): 1029-1040.
35. Bagchi M, Balmoori J, Bagchi D, Ray SD, Kuszynski C, Stohs SJ. Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis and antioxidants in human oral keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(7-8): 992-1000.

36. Gross AJ, Lackland DT, Tu DS. Oral cancer and smokeless tobacco: Literature review and meta-analysis. *Environ Int* 1995; 21(4):381-94.
37. Bagchi M, Bagchi D, Stohs SJ. In vitro effects of a smokeless tobacco extract on the production of reactive oxygen species by human oral epidermal cells and rat hepatic mitochondria and microsomes, and peritoneal macrophages. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996; 30(3):418-22.
38. Livingston GK, Reed RN, Olson BL, Lockey JE. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ Mol Mutagen* 1990; 15(3):136-44.
39. Eliasson M, Lundblad D, Hägg E. Cardiovascular risk factors in young snuff-users and cigarette smokers. *J Intern Med* 1991; 230(1):17-22.
40. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* 2002; 88(2):119-24.
41. Wolk R, Shamsuzzaman AS, Svatikova A, Huyber CM, Huck C, Narkiewicz K, et al. Hemodynamic and autonomic effects of smokeless tobacco in healthy young men. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(6):910-4.
42. Tucker LA. Use of smokeless tobacco, cigarette smoking, and hypercholesterolemia. *Am J Public Health* 1989; 79(8):1048-1050.
43. Norberg M, Stenlund H, Lindahl B, Boman K, Weinehall L. Contribution of Swedish moist snuff to the metabolic syndrome: a wolf in sheep's clothing? *Scand J Public Health* 2006; 34(6):576-83.
44. Bolinder G, Alfredsson L, Englund A, de Faire U. Smokeless tobacco use and increased cardiovascular mortality among Swedish construction workers. *Am J Public Health* 1994; 84(3):399-404.
45. Schroeder KL, Chen MS Jr. Smokeless Tobacco and Blood Pressure. *N Engl J Med* 1985; 312(14):919.
46. Rosales A, Sosa L, Davila L, Quiñonez B, Jarpa P. Cambios clínicos periodontales ocasionados por el chimó en animales de experimentación. *Revista Odontológica de los Andes* 2008; 3(2): 21-7.
47. Balazs T, Ferrans V, Haning J, Herman E. Cardiac Toxicity. En: Cohen G. (Comp.) *Target Organ Toxicity*. 1991; II:19-43. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

48. Bowman C, Rand M. The heart and drugs affecting cardiac function. En: Textbook of pharmacology.1980; Bowman W y Rand M (eds). Blackwell Scientific. Oxford.
49. Harris DM, Mills GD, Chen X, Kubo H, Berretta RM, Votaw VS, et al. Alterations in early action potential repolarization causes localized failure of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res* 2005; 96(5):543-50.
50. Tesis de investigadores. Sistema de conducción eléctrica del corazón. Yaquelin Franco. <http://tesisdeinvestigadores.blogspot.com/2011/05/sistema-de-conduccion-electrica-del.html> (último acceso 17 de marzo de 2015).
51. Roden D. Antiarrítmicos. En: Goodman & Gilman Las Bases farmacológicas de la terapéutica. Brunton L, Lazo J y Parker K. McGraw Hill Interamericana. Undécima edición. Mexico. D.F. 2007. 899.
52. Braunwald E, Ross J Jr, Sonnenblick EH. Mechanisms of contraction of the normal and failing heart. *N Engl J Med* 1967; 277(17):962-71.
53. Parmley W, Wikman J. Physiology of muscular contraction. En: Cardiology, Parmley WW y Chatterjee K- Lipincott (eds). Williams & Wilkins, USA, 1998.
54. Gandhi MS, Kamalov G, Shahbaz AU, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Sun Y, et al. Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis. *Heart Fail Rev* 2011; 16(1):23-34.
55. Bhave M, Nausheen A, Rosen ST. Cardiovascular Toxicity of Biologic Agents for Cancer Therapy. *Revista Cancernetwork home of the journal oncology*. [Artículo en línea] 2014. [Consultado 13 sep 2015] Disponible en: <http://www.cancernetwork.com>)
56. Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High- resolution model of the microtubule. *Cell* 1999; 96(1):79-88.
57. Rizzo LY, Golombek SK, Mertens ME, Pan Y, Laaf D, Broda J, et al. In vivo nanotoxicity testing using the Zebrafish embryo assay. *J Mater Chem B Mater Biol Med* 2013; 1-13.
58. Arnaout R, Ferrer T, Huisken J, Spitzer K, Stainier DY, Tristani-Firouzi M, et al. Zebrafish model for human long QT síndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(27):11316-21.
59. Harper C, Laurence C. The laboratory Zebrafish. Taylor and Francis Group LLC. 2011. 274.

60a. (Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio* Barney Reed & Maggy Jennings Research Animals Department, Science Group, RSPCA First published: November 2010 Last updated: May 2011)

60. Rojas A, Bernard A, Izpisúa J. El pez cebrá, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia* 2007; 366:66-69.

61. Van Aerle R, Lange A, Moorhouse A, Paszkiewicz K, Ball K, Johnston BD, et al. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environ Sci Technol* 2013; 47(14):8005-14.

62. Burgos J, Alfaro J. El Pez Cebrá, Un modelo incipiente para la evaluación de ingredientes. *Monográfico de Ingredientes y Materias Primas. Técnicos 2* 2008; 82-84.

63. Rocha A, Ruiz S, Coll J. Método sencillo para producir huevos embrionarios de pez cebrá. *Invest Agr Prod Sanid Anim* 2002; 17(1-2):93-102.

64. Rocha A, Ruiz S, Estepa A, Coll JM. Biología molecular de los peces: interés y aplicaciones. *Revista AquaTIC [Artículo en línea]* 2001 [Consultado 13 feb 2015].

Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=129>

65. Aleström P, Holter JL, Nourizadeh-Lillabadi R. Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol* 2006; 24(1):15-21.

66. Bopp S, Minuzzo M, Lettieri T. The Zebrafish (*Danio rerio*): an emerging model organism in the environmental field. *Scientific and Technical Research series* 2006;1-24.

67. Maldonado E. Experimentación en el pez-cebrá, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje Bioquímico* 2003; XXVII:147-56.

68. Lozada J, Palmeros B, Ramírez M, Fernández M. El pez cebrá: una especie modelo. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana [Artículo en línea]* 2012. [Consultado 13 feb 2015]. Disponible en: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num1/articulos/pez>

69. Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 2012; 122(7):2337-43.

70. Chico TJA, Ingham PW, Crossman DC. Modeling Cardiovascular Disease in the Zebrafish. *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18:150-155.

71. Bakkens J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovas Res* 2011; 91(2):279-88.

72. Christoffels VM, Moorman AF. Development of the cardiac conduction system why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others? *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009; 2(2):195-207.
73. D'Amico L, Ling W, Yang Y, Suter W. Assessment of drug-induced cardiotoxicity in zebrafish. In: McGrath P, editor. *Zebrafish Methods for assessing drug safety and toxicity*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2012. p. 45-54.
74. Millan D, MacRae C. Cardiotoxicity studies in zebrafish. In: McGrath P, editor. *Zebrafish Methods for assessing drug safety and toxicity*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2012. p. 55-63.
75. Incardona JP, Swarts TL, Edmunds RC, Linbo TL, Aquilina-Beck A, Sloan CA, et al. Exxon Valdez to Deepwater Horizon: comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. *Aquat Toxicol*. 2013;142-143: 303-16.
76. Antkiewicz DS, Burns CG, Carney SA, Peterson RE, Heideman W. Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. *Toxicol Sci* 2005; 84(2):1-10.
77. Lin CC, Hui MN, Cheng SH. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 222(2): 159-68.
78. Lee SH, Kim HR, Han RX, Oqani RK, Jin DI. Cardiovascular risk assessment of atypical antipsychotic drugs in a zebrafish model. *J Appl Toxicol* 2013; 33(6):466-70.
79. Cheng H, Kari G, Dicker AP, Rodeck U, Koch WJ, Force T. A novel preclinical strategy for identifying cardiotoxic kinase inhibitors and mechanisms of cardiotoxicity. *Circ Res* 2011; 109(12):1401-9.
80. Lal H, Kolaja KL, Force T. Cancer genetics and the cardiotoxicity of the therapeutics. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61(3):267-74.
81. Choi WY, Gemberling M, Wang J, Holdway JE, Shen MC, Karlstrom RO, et al. In vivo monitoring of cardiomyocyte proliferation to identify chemical modifiers of heart regeneration. *Development* 2013; 140(3):660-6.
82. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de mortalidad 2011. 2014. Caracas. Venezuela.
83. Granero R, Jarpa P. Uso de chimó entre adolescentes en Venezuela. Encuesta mundial sobre tabaquismo en jóvenes 1999-2008. *Acta Odontológica Venezolana* 2011; 49(3)1-9.

84. OECD. Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 423, 2000 [Revised Draft Guideline October 2000]. Disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 10 de agosto de 2014]
85. OECD. Guideline for testing of chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 425, 2001. Up and Down Procedure. Disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 10 de julio de 2015]
86. Organization for Economic Co-operation and Development. Revised Draft Guideline 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 2000. Disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 10 de julio de 2015]
87. Rohatgi N, Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Smokeless tobacco (khaini) extracts modulate gene expression in epithelial cell culture from an oral hyperplasia. *Oral Oncol* 2005; 41(8):806-20.
88. Osorio J, Martínez P. Análisis del procedimiento para la determinación de la DL50. *Revista de investigaciones de la Universidad del Quindío*; 4(12):1-3. [Libro electrónico] [Consultado 17 Ene 2015]. Disponible en: <http://www.ilustrados.com/tema/3965/Analisis-procedimiento-para-determinacion-dl50-dosis.html>
89. García R. Conceptos de preparación histológicas. Extensión citológica e impronta. 1ra. ed. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill. 1993. p.1-14.
90. Burtis C, Ashwood E, Bruns D. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4ta. ed. USA: Elsevier Saunders. 2006. p. 2448.
91. Hung MW, Zhang ZJ, Li S, Lei B, Yuan S, Cui GZ, et al. From omics to drug metabolism and high content screen of natural product in zebrafish: A new model for discovery of neuroactive compound. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 1-20.
92. Tucker B, Lardelli M. A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos. *Zebrafish* 2007; 4(2): 113-6.
93. Bhisey RA. Chemistry and toxicology of smokeless tobacco. *Indian J Cancer* 2012; 49(4):364-72.
94. Bush L, Cui M, Shi H, Burton H, Fannin F, Lei L, et al. Formation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured tobacco. *Recent Adv Tob Sci* 2001; 27:23-46.
95. Ljungberg LU, Persson K, Eriksson AC, Green H, Whiss PA. Effects of nicotine, its metabolites and tobacco extracts on human platelet function in vitro. *Toxicol in Vitro* 2013; 27(2):932-8.

96. León-Camacho M, Alvarez Serrano M, Graciani Constante E. Formation of stigmasta-3,5-diene in olive oil during deodorization and/or physical refining using nitrogen as stripping gas. *Grasas y Aceites* 2004; 55(3): 227-32.
97. Relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta (Artículo en línea) Consultado 3 de octubre de 2014. Disponible en:  
<http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/eco/004415/04415-08.pdf>
98. Schwerte T, Prem C, Mairösl A, Pelster B. Development of the sympatho-vagal balance in the cardiovascular system in zebrafish (*Danio rerio*) characterized by power spectrum and classical signal analysis. *J Exp Biol* 2006; 209(Pt 6):1093-100.
99. Haring OM, Patterson JR, Sarche MA. Prenatal development of the cardiovascular system in the chicken. *Arch Pathol* 1970; 89(6): 537-47.
100. Sommer RJ, Hume AJ, Ciak JM, Vannostrand JJ, Friggens M, Walker MK. Early developmental 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure decreases chick embryos heart chronotropic response to isoproterenol but not to agents affecting signals downstream of the beta-adrenergic receptor. *Toxicol Sci* 2005; 83(2):363-71.
101. Lazzari L, De Paolis M, Bovelli D, Boschetti E. Target therapies-induced Cardiotoxicity. *European Oncology & Haematology* 2013; 9(1):56-60.
102. Alvarez M, Perdomo L, Hernández C. Fruta planta 'meizitac' como factor de riesgo cardíaco: una aproximación experimental en larvas de pez cebra *Danio rerio*. *Retel* 2014; 1-16.
103. Gómez M. Choque séptico: fisiopatología y manejo. *Rev Col Anest* 1995; 23 (2): 203-9.
104. Inserte J. Muerte celular durante la reperfusión miocárdica. Mecanismos y nuevas dianas terapéuticas. [Tesis doctoral] [Español]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2003.
105. Das A, Bhattacharya A, Chakrabarty S, Ganguli A, Chakrabarti G. Smokeless tobacco extract (STE)-induced toxicity in mammalian cells is mediated by the disruption of cellular microtubule network: a key mechanism of cytotoxicity. *PLoS ONE* 2013; 8(7)1-12.
106. Mi L, Xiao Z, Hood BL, Dakshanamurthy S, Wang X, Govind S, et al. Covalent binding to tubulin by isothiocyanates. A mechanism of cell growth arrest and apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283(32): 22136-46.

107. Álvarez M, Urbina G, Perdomo L. Excretion Product of *Shigella dysenteriae* (SdyEP) Induced Cell Death in Early Larval Stage of Zebrafish (*Danio rerio*): Acridine Orange and Ethidium Bromide (AO/EB) in vivo Staining. *Int J Morphol*. [Internet]. 2013 Dic [citado 2015 Feb 21]; 31( 4 ): 1175-1180. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022013000400005&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022013000400005&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000400005>.

108. Bagchi M, Balmoori J, Bagchi D, Ray SD, Kuszynski C, Stohs SJ. Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(7-8):992-1000.

## GLOSARIO

TCDD: Compuesto orgánico persistente de la rama de las dioxinas, formado por dos anillos bencílicos unidos por dos éteres y con cuatro cloros en las posiciones 2,3,7 y 8. Es la dioxina más potente y se ha hecho conocida por algunos incidentes a lo largo de la historia, por ejemplo como producto secundario en la elaboración de un herbicida utilizado por Estados Unidos en la guerra de Vietnam llamado Agente Naranja. Esta dioxina se forma como subproducto de la síntesis del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) que es uno de los componentes principales del Agente Naranja. (Wikipedia)

VACUOLAS: Son compartimentos cerrados o limitados por la membrana plasmática ya que contienen diferentes fluidos, como agua o enzimas, aunque en algunos casos puede contener sólidos como por ejemplo azúcares, sales, proteínas y otros nutrientes. La mayoría de las vacuolas se forman por la fusión de múltiples vesículas membranosas. El orgánulo no posee una forma definida, su estructura varía según las necesidades de la célula en particular.

APOPTOSIS: Muerte celular programada o provocada por el propio organismo, con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento, está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. La apoptosis tiene una función muy importante en los organismos, pues hace posible la destrucción de las células dañadas, evitando la aparición de enfermedades como el cáncer, consecuencia de una replicación indiscriminada de una célula dañada.

CATECOLAMINAS: Neurotransmisores que se vierten al torrente sanguíneo (además de las hendiduras sinápticas, como corresponde a los neurotransmisores). Son un grupo de sustancias que incluyen la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina, las cuales son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina. Contienen un grupo catecol y un grupo amino.