



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

***Passiflora edulis f. flavicarpa* (Parchita) Y SU
ACCIÓN CARDIOTÓXICA EN MODELO EXPERIMENTAL
DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*): EVALUACIÓN
MORFOFUNCIONAL**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la bachiller Cornejo Quinto
Mónica Clemen como requisito
parcial para optar al título de
Licenciado en Biología

Tutor(a): Dr. Álvarez, Marco.

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE – 2012

**Si comienza uno con certezas, terminarás con dudas,
Más si se acepta empezar con dudas,
llegará a terminar con certezas
(Sir Francis Bacon)...**

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por la llegada de este momento con la culminación de mi carrera universitaria. Les agradezco a mis padres Horacio y Clemen por haberme inculcado valores de constancia y perseverancia, y por enseñarme que en los pequeños detalles siempre está el amor más profundo de todos, sus consejos, presencia y cariño fue algo que nunca me faltó y que me ha llenado siempre. Gracias a mi hermano mayor Mark, porque ha representado en mi vida un pilar de tranquilidad y confianza, y ha sido mi compañero fiel e incondicional de todos los mejores y peores momentos presentes hasta este momento, gracias infinitas hermano.

Gracias a mi querido tutor y amigo Dr. Marco Álvarez, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él. Su experiencia, paciencia y dedicación, me permite llegar hoy a optar el título universitario. Muchas gracias por sus buenos consejos. Igualmente agradezco a la Señora Lourdes, por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo, además del carisma diario que impartía junto con el Profesor en el laboratorio. Gracias Sr. Perdo.

Los amigos son la familia que uno va escogiendo a lo largo de la vida, por eso esta parte del párrafo está dedicada a las grandes amistades que han perdurado a lo largo del tiempo como mi gran amiga Adriana, Así como también las personas que conocí durante mis estudios, gracias por el apoyo cuando la presión de la carrera era mucha, la paciencia al momento de trabajar en equipo o en la realización de informes y también por todos los momentos de diversión

compartidos juntas: Nélide, Dio, Arleth, Mili, Mary y Zuro. También agradezco a las personas que conocí que formaron parte importante para mi dentro de la universidad entre ellos: Daznia, Leito, Xime, Grace, Rony, Mala Copa, Denis, Marquitos, Eduardo, Punketo.

Agradezco a la participación inicial del Dr. Ercolino por la enseñanza del modelo experimental del Pez Cebra. También a querido Asesor académico Dr. Jesús Romero, por los buenos consejos que siempre tuvo además del tiempo dedicado en el desarrollo de la Tesis. Agradezco a la profesora Elizabeth Merentes como guía en el camino de búsqueda de laboratorio, igualmente agradezco a mis Jurados Dra. Lorena Marquez y Dra. Cidalia Urbina, por el tiempo dedicado en las correcciones y por la participación en la evaluación del Trabajo Especial de Grado.

Agradezco a Puli, por el apoyo y la paciencia que me ha brindado en esta última etapa de mi carrera universitaria, gracias novio.

Finalmente le agradezco a mi querida Universidad Central de Venezuela UCV, quien a través de sus profesores transmitió el conocimiento que hoy hago realizado con la presentación de mi primer Trabajo Especial de Grado.

RESUMEN

Las bases farmacológicas de la *Passiflora edulis f. flavicarpa* o parchita, ha motivado en los últimos años, el desarrollo de bioensayos en nuevos modelos animales de experimentación. Esto ha puesto en evidencia, la producción de señales tóxicas y particularmente señales cardiotóxicas, hasta el momento poco estudiadas en vinculación con la planta. En el presente trabajo se propuso estudiar, la acción cardiotóxica de distintos extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* en el modelo experimental larvario de pez cebra (*Danio rerio*). Para ello, fueron obtenidos los extracto puro (EP), acuoso (EA) y etanólico (EE), provenientes de hojas frescas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, a los cuales se le estimó la concentración letal 50 (CL₅₀). La disfuncionalidad cardíaca, fue evaluada a través del método semi-invasivo de Videocardiograma (VCG) y del análisis histológico del área cardíaca en el modelo experimental. Observaciones morfológicas y el uso de microscopía de fluorescencia, con la aplicación de sondas fluorescentes, como la naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE), permitieron determinar efectos generalizados. En un rango de concentraciones entre 0,015 mg/mL y 1 mg/mL fue determinado el valor de 0,11 mg/mL como CL₅₀ del EP; 0,14 mg/mL como CL₅₀ del EE y de 0,47 mg/mL como CL₅₀ del EA. El EP, indujo un 31,34% de reducción de la frecuencia cardíaca respecto a la población control, mientras que con el EE y el EA, la reducción de frecuencia cardíaca fue de 12,12% y 5,70% respectivamente. La acción cardiotóxica quedo reflejada, en una disminución de la frecuencia cardíaca, acompañada de un edema pericárdico. Estos fenómenos fueron explicados a través del mecanismo de vasodilatación

dependiente de endotelio, vinculado con la homeostasis cardiaca del Oxido Nitrico (ON). La cardiotoxicidad registrada, estuvo vinculada con cambios morfológicos generalizados, tales como: la curvatura troncal de la larva, puntos hemorrágicos y muerte celular por apoptosis. Los resultados permiten concluir la eficiencia en el uso del modelo experimental, para el estudio de la cardiotoxicidad, así como profundizar sobre la comprensión de posibles mecanismos vinculados con esta acción cardiotóxica asociada a la *Passiflora edulis f. flavicarpa*, y demostrada con la presente investigación.

INDICE GENERAL

RESUMEN

ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Passiflora</i>	4
1.1.1 <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> : Aspectos taxonómicos	4
1.1.2 <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> : Aspectos etnofarmacológicos	6
1.1.3 <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> : Aspectos fitoquímicos	7
1.2 Fitoterapia	10
1.3 Cardiotoxicidad ante tóxicos ambientales	11
1.3.1 Efectos generalizados como consecuencia de la acción tóxica de los fitoquímicos	13
1.4 El Pez Cebra (<i>Danio rerio</i>)	15
1.4.1 Anatomía y fisiología del corazón del Pez Cebra (<i>Danio rerio</i>)	20
2. ANTECEDENTES	24
2.1 Toxicidad del género <i>Passiflora</i>	24

2.2 El Pez Cebra en la cardiotoxicidad	25
3. HIPÓTESIS.....	28
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo General.....	28
4.2 Objetivos específicos.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Obtención de extractos de hojas de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> partir de la hojas frescas.....	30
5.2 Manejo del Modelo Biológico de Pez Cebra (<i>Danio rerio</i>).....	32
5.2.1 Material Biológico.....	32
5.2.2 Puesta y desinfección de huevos fertilizados	33
5.2.3 Identificación y supervivencia de Embriones	34
5.3 Bioensayo de Toxicidad Aguda	35
5.3.1 Determinación de la relación concentración-respuesta y la determinación de la concentración Letal 50 (CL ₅₀) de EP, EA, EE de hojas de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa (parchita)</i>	35
5.4 Monitoreo Cardíaco Videocardiograma (VCG)	37
5.4.1 Cambios funcionales: monitoreo cardiaco y variación de la frecuencia Cardíaca	38
5.4.2 Caracterización histológica de la región cardiaca	39
5.5 Efectos generalizados	42
5.5.1 Cambios morfológicos	42

5.5.2 Viabilidad Celular con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio: Microscopia de fluorescencia.....	42
6. Resultados.....	44
6.1 Obtención de extractos de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> (Parchita) a partir de la hojas frescas.....	44
6.2 Aislamiento, identificación y manejo del modelo larvario de pez cebra en distintos estadios de desarrollo.....	45
6.3 Bioensayos de toxicidad aguda. Cálculo de las concentraciones letales cincuenta (CL ₅₀) de cada uno de los extractos obtenidos.....	48
6.4 Determinación de la disfunción cardiaca de las larvas inducidas por los diferentes extractos de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>	50
6.4.1 Cambios funcionales. Análisis de la frecuencia cardiaca mediante VCG.....	50
6.4.2 Cambios estructurales. Análisis histológicos	54
6.5 Efectos generalizados en larvas de 72 hpf con los diferentes extractos	56
6.5.1 Cambios morfológicos	56
6.5.2 Apoptosis <i>In Situ</i> : Método por microscopia de fluorescencia	58
7. DISCUSIÓN	60
8. CONCLUSIÓN	72
9. RECOMENDACIONES	73
10. BIBLIOGRÁFICAS	74
11. APÉNDICES	86

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I Características taxonómicas de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>	6
TABLA II Impacto del modelo biológico de Pez Cebra en Biomedicina y Biotecnología	19
Tabla III. Representación de las concentraciones empleadas de <i>passiflora edulis f. flavicarpa</i> para cada extracto	37
TABLA IV Características morfofuncionales en larvas bajo distintos tratamientos en comparación con grupo control	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. <i>Passiflora edulis f flavicarpa</i> (Parchita) Hoja simples y alternas con flores solitarias, fragantes y vistosas (A). Fruto en baya esférica color amarillo (B)	4
Fig. 2. Estructura química del Flavonoide	8
Fig. 3. Distintos estadios de desarrollo del Pez cebra (<i>Danio rerio</i>). Tomado de Rojas-Muñoz (2007).....	17
Fig. 4. Vista ventral de embrión de Pez Cebra de 72 hpf. Tomado de Barret, 2005	21
Fig.5 Morfología y comparación del corazón de varios vertebrados (A) Humanos (B) ratón (C) Pez Cebra	22
Fig. 6. Esquema del procedimiento para la obtención de extractos provenientes de hojas de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>	31
Fig. 7. Acuario de peces Cebra Instituto Anatómico “José Izquierdo”	32
Fig. 8 Esquema de postura y fertilización de los huevos	34
Fig. 9 Bioensayo de toxicidad aguda en Pez Cebra	37

Fig.10 Esquema del procedimiento para la obtención de VCG.....	39
Fig. 11. Metodología de fijación e inclusión de las muestras de larvas Pez Cebra (<i>Danio rerio</i>) tratadas.....	41
Fig. 12. Metodología y disposición de los bloques de parafina en la obtención de cortes transversales	42
Fig. 13. Fig. 13. Esquema del procedimiento para determinar viabilidad celular <i>In Situ</i> mediante microscopía de fluorescencia.....	43
Fig. 14. Extractos obtenido de hojas de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>	44
Fig. 15. Estadios tempranos. A: cigoto B: cigoto con polo animal y polo vegetal. Período de clivaje C: estadio de 16 células D: estadio de 64 células. C=espacio corionico, pv=polo vegetal, pa=polo animal Barra de escala 625 μ m.....	46
Fig. 16. Estadios tardios. A: larva en organogénesis temprana 12 hpf B: larva 24 hpf con morfología visible C: Larvas dentro de la envoltura coriónica con pigmentación 72 hpf D: Población larvaria liberada del corion 72 hpf Barra de escala 250 μ m.....	47
Fig. 17. Porcentaje de mortalidad de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> en EP (A), EE (B) y EA (C) en larvas de Pez Cebra 72 hpf bajo distintas concentraciones. Individuos por/concentración n=4, replicas n=3	49
Fig. 18. Función lineal que relaciona el valor Probit de la mortalidad en larvas de Pez cebra 72 hpf contra los logaritmos de las concentraciones del Extracto puro,	

Extracto etanólico y extracto acuoso de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.....49

Fig. 19. Larvas de 72 hpf. Control. **A:** Registro de VCG **B:** Luminosidad vs el tiempo **C:** Ajuste de la linealidad de los puntos obtenidos por el cambio de contraste de luz, obtención de valores promedio de la frecuencia cardiaca. N=60

..... 51

Fig. 20. Larvas de pez Cebra tratadas con EP (**A**), EE (**B**) y EA (**C**) de hojas *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Registros de luminosidad vs el tiempo, variación de la frecuencia cardiaca (flechas). Cambios morfológicos visibles en EP y EE (*)...... 52

Fig 21. Media aritmética de la Frecuencia Cardíaca (p/min) N=60 obtenido para cada tratamiento con distintos extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*..... 53

Fig. 22. Secuencia de cortes histológicos de larvas de pez cebra (*Danio rerio*) 72 hpf. Controles y tratados con la CL₅₀ del extracto etanolico de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.(*) presencia de edema pericárdico.10X 55

Fig. 23. Imágenes de larvas de 72 hpf. Características morfofuncionales de toxicidad que destacan la curvatura del tronco **B** (doble flecha), en larvas tratadas con extractos Puro de *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Barra de escala 625 µm... 57

Fig. 24. Detección de muerte celular Naranja de acridina (NA) Bromuro de etidio (BE) en larvas controles (A) y tratadas con CL₅₀ del EE (B). Fluorescencia verde

células vivas (inset), fluorescencia naranja células muertas (inset). (*) Edema pericárdico. Barra de escala 625 µm. 40X..... 59

Fig. 25. Estructura química del Isoorientina 63

Fig. 26. Estructura química del Luteolina 63

Fig. 27. Fig. 27. Esquema que muestra el posible mecanismo de acción de ON y epinefrina sobre el tejido endotelial de las larvas de pez cebra 72 hpf, antes de la inervación funcional del sistema vascular periférico. Tomado de Fritsche y col, 2000..... 70

Fig. 28. Esquema propuesto que muestra la posible vía de acción de los extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, dependiente de los fitocompuestos, sobre el musculo cardíaco de larvas de pez cebra. Formación de ON y Vasodilatación - - - - . Formación en exceso de ON, acción tóxica. - - - - (Cornejo, M, 2012)..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS

BE: Bromuro de Etidio

BL: Blastodisco.

CL₅₀: Concentración Letal 50

CT: Curvatura troncal

EA: Extracto acuoso

EE: Extracto etanólico

EP: Extracto Puro

FC: Frecuencia Cardiaca

HCN: Cianuro de Hidrógeno

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

kcnh2: Gen responsable del Síndrome de Qt largo que induce la arritmia cardiaca

µl: Microlitro

MPTP: 1,metil, 4 fenil, 1,2,3,6 tetrahidroxipiridina

NA: Naranja de Acridina

ON: Oxido Nitrico

PA: Polo Animal

Pul/min: Pulsaciones por minuto

PV: Polo Vegetal

SQTL: Síndrome de QT largo que induce la arritmia cardiaca.

TCDD: tetraclorodibenceno-para-dioxin

VCG: Video Cardiograma

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de fuentes terapéuticas en el reino vegetal, ha conducido al establecimiento de una relación muy cercana y productiva entre el hombre y las plantas. Dicha relación ha sido orientada a la utilización de los constituyentes farmacológicamente activos presentes en la mayoría de las especies de este Reino, y ha permitido definir lo que se entiende como terapéutica herbaria o medicina natural (García y col, 2009).

La mayoría de las medicinas provenientes del reino vegetal que ahora usamos, no fueron descubiertas por las ciencias de las sociedades modernas, sino por las pruebas de ensayo y error practicadas durante milenios. Dichas pruebas son el resultado de la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las creencias y experiencias de diferentes culturas para el mantenimiento de la salud (Carballo y col, 2005). En algunos países se utilizan indistintamente los términos medicina complementaria/ alternativa/ no convencional y medicina natural (Sukhdev y col, 2008). Hoy día, según la Organización Mundial de la Salud se estima que la medicina herbaria o natural está tres o cuatro veces más difundida en el mundo que la medicina ortodoxa. Más aún, se considera que casi la mitad de los medicamentos modernos proceden del reino vegetal (García y col, 2009).

El incremento en el uso de productos farmacéuticos ha dado como resultado, la disminución en el consumo de preparados tradicionales en la

medicina natural. Sin embargo, en algunas áreas rurales, la medicina natural es aún utilizada en igual o mayor medida que las formulaciones farmacéuticas y en algunos casos, los tratamientos tradicionales sustituyen a la medicina académica. En general, en estas poblaciones es aceptado que los efectos beneficiosos de las plantas medicinales se pueden obtener a partir de principios activos presentes en todas las partes de las plantas (flores, frutos, raíces u hojas). En la actualidad hay individuos que prefieren llevar personalmente el control de su salud, no sólo en la prevención de enfermedades, sino también en el tratamiento de las mismas, ya que el público y algunos profesionales de la salud creen que las hierbas medicinales son relativamente seguras porque son “naturales”. Esta posición, ha empezado a ser considerado como un verdadero problema de salud pública, ya que el consumo indiscriminado de los productos naturales sin tomar en cuenta el potencial riesgo tóxico asociado a la diversidad de constituyentes o elementos químicos presentes en las hierbas, estarían comprometiendo la salud del individuo. (Rodríguez-Fragoso y col, 2008).

Ejemplo de ello, lo encontramos reportado en observaciones clínicas y experimentales llevados a cabo por un grupo investigación asociado al laboratorio, quienes correlacionaron la depresión neonatal, en el producto de nacimiento, con el consumo de la infusión de hojas de planta de higo *Ficus carica* por parte de mujeres embarazadas, quienes la ingirieron con la finalidad de mejorar el trabajo de parto. Por otra parte, registraron a nivel experimental una alta mortalidad en las crías de ratas sometidas a la infusión de hojas de planta de higo *Ficus carica*, durante la gestación. (Castro y col, 2011). Otro ejemplo aportado en el laboratorio

ha sido la identificación de intoxicación en jóvenes consumidoras de *Thevetia peruviana* o Semilla Hindú ® como reductor de peso. Dicha intoxicación fue demostrada experimentalmente en embriones de pollo a través de cambios en la morfofuncionalidad cardíaca, probablemente como una consecuencia del alto contenido de cianuro presente en el extracto acuoso (Sequera y col, 2010). Igualmente en nuestro laboratorio, se ha demostrado: la vasodilatación del ventrículo derecho, vasoconstricción del ventrículo izquierdo, acompañada por un incremento en la tasa de apoptosis a nivel del pericardio en corazones provenientes de embriones de pollo tratados con extracto acuoso de la semilla. *In vitro* ha sido posible determinar, con el uso de sondas fluorescentes, alteraciones a nivel mitocondrial (datos no publicados).

Estos hallazgos han permitido profundizar sobre la necesidad de evaluar las actividades biológicas y la identificación de los componentes fitoquímicos presentes en los extractos provenientes de plantas con potencial terapéutico, a objeto de identificar posibles efectos secundarios y actividades tóxicas que comprometan la funcionalidad de los sistemas vivos que lo consumen. En tal sentido, en el presente trabajo se hace uso de la planta de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, debido a su alto consumo promovido por la potencialidad fitoterapéutica, fundamentada en los efectos fisiológicos beneficiosos durante el tratamiento de numerosas afecciones orgánicas, tales como: hipertensión, trastornos del sueño, sedación, entre otros.

1.1 *Passiflora*

Dentro de la medicina herbaria, el género *Passiflora* comprende cerca de 500 especies y es el más grande de la familia *Passifloraceae*. Particularmente, las formas mayormente conocidas pertenecen a la variedad de frutos púrpura (*Passiflora edulis f. edulis*) y frutos amarillos (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). La primera especie está mejor adaptada a zonas templadas, por lo que puede cultivarse a mayor altura; sus requisitos de pluviosidad son altas y se encuentra predominantemente en África y la India. La segunda, es la especie más importante del género *Passiflora*; debido a sus actividades de alto valor comercial. Se cultiva ampliamente en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo por su fruto, el cual se utiliza para el procesamiento de jugo. Crece y se desarrolla muy bien en zonas tropicales, requiere más de 1000 mm³ anuales de lluvia y su aspecto es más rústico y vigoroso que la maracuyá púrpura además de producir cosechas más regulares. Se encuentra predominantemente en Sudamérica, Hawái y Australia (Deng y Col, 2010).

1.1.1 *Passiflora edulis f. flavicarpa*: Aspectos taxonómicos

La especie de mayor importancia *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Fig. 1) conocida como parchita o maracuyá. Es una planta leñosa perenne, de hábito trepador y de rápido desarrollo, que puede alcanzar hasta 10 m de largo; las hojas son simples, alternas, con estípulas y un zarcillo en la axila, con márgenes aserrados; las flores son solitarias y axilares, fragantes y vistosas; el fruto es una baya esférica, globosa o elipsoide, que mide hasta 10 cm de diámetro y pesa

hasta 190 g, de color amarillo con una pulpa muy aromática. Su clasificación taxonómica se expresan a continuación (Tabla I)

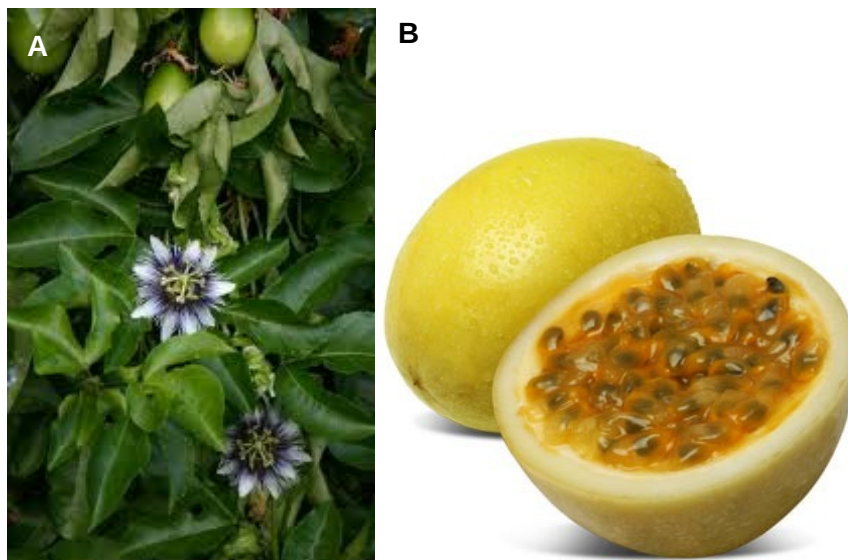


Fig. 1. *Passiflora edulis f. flavicarpa* (*Parchita*) Hoja simples y alternas con flores solitarias, fragantes y vistosas (A). Fruto en baya esférica color amarillo (B).

Clasificación taxonómica

Clase: Dicotyledoneae

Subclasse: Archiclamydeae

Orden: Violales

Suborden: Flacourtiineae

Familia: Passifloraceae

Género: ***Passiflora***

Subgénero: *Passiflora*

Serie: Incarnata

Especie: ***Passiflora edulis f. flavicarpa.***

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Tomado y modificado. Deng y Col, 2010.

1.1.2 *Passiflora edulis f. flavicarpa*: Aspectos etnofarmacológicos.

La información etnofarmacológica, revela que la *Passiflora edulis f. flavicarpa* ha sido utilizada en medicina tradicional en diversas partes del mundo. Es bastante rica en minerales, como el calcio, el hierro y el fósforo. Contiene

vitaminas del tipo A, B y C además de contenido en niacina, que resulta muy adecuada para el tratamiento del colesterol y el perfecto estado de nervios (D'Amico y col, 2006). En la India, las hojas frescas de esta planta son hervidas en pequeña cantidad de agua y el extracto es bebido para el tratamiento de alteraciones de ritmo cardiaco así como para el tratamiento de la hipertensión (Santosh y col, 2011; Rocha y col, 2006; Rojas, 2009). En Sudamérica, se bebe la infusión de hojas y flores como sedante. La infusión de las partes aéreas de la planta se utiliza en el tratamiento de tétanos, epilepsia, insomnio e hipertensión; además, es indicada como relajante muscular, diurético, para tratar dolores estomacales, tumores intestinales y fiebre (Desmarchelier y Witting, 2000). La *Passiflora edulis f. flavicarpa* es conocido como un calmante de origen natural. Se utiliza en remedios tradicionales para la ansiedad o nerviosismo y trastornos de ansiedad generalizada. Durante el siglo XX, esta hierba se ha incluido en muchos medicamentos de venta libre como sedantes en gotas y pastillas para dormir por ejemplo: Pasivit Laboratorio Inprovit®, Sedival Laboratorios Meyer®.

1.1.3 *Passiflora edulis f. flavicarpa*: Aspectos fitoquímicos

Entre los compuestos fitoquímicos de importancia en el Reino vegetal se encuentra los polifenoles. Estos compuestos constituyen una clase de metabolitos secundarios, biosintetizados por el reino vegetal y encontrado en alimentos derivados de fuentes vegetales. Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos y cuenta por lo menos con

un grupo hidroxilo. Entre ellos, podemos mencionar a los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y ligninas, etc. (Romero y col, 2003)

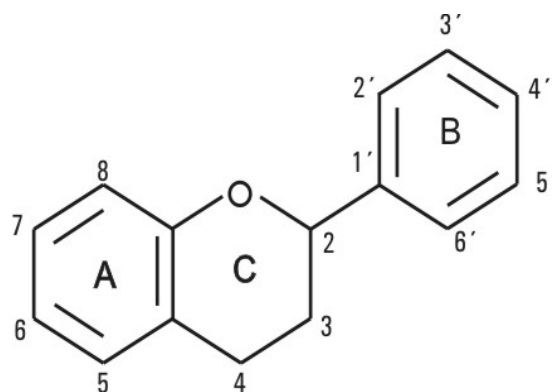


Fig. 2 Estructura química del Flavonoide. Tomado de Tenorio y col, 2006

Los flavonoides son un amplio grupo de metabolitos secundarios, de bajo peso molecular que se encuentran en plantas vasculares. Estructuralmente, pueden ser considerados como fenilbenzo-pironas, compuestos de dos anillos bencénicos (anillo A y B), unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C) (Fig.2). De acuerdo a los sustituyentes presentes en estas tres estructuras cíclicas, los flavonoides pueden ser divididos en función de: 1) la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del anillo C, 2) de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C y 3) de la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B. En función de sus sustituyentes químicos los flavonoides se clasifican en: (1) flavanoles, (2) antocianidinas, (3) flavonas, flavononas y chalconas. Los flavonoides son por lo

general, altamente polares y esta propiedad es aprovechada para su aislamiento. Son altamente hidrofílicas y se ubican dentro de las vacuolas. La extracción con agua o solventes acuosos puede presentar, como desventajas la co-extracción de otros compuestos hidrosolubles difíciles de separar, tales como azúcares, péptidos, o enzimas. Con solventes acuosos se dificulta el aislamiento de aquellos flavonoides incluidos en los cloroplastos y otros organelos, pues se requiere de solventes lipídicos para destruir la membrana y permitir su flujo hacia el medio (Matute, 2006). Particularmente, estudios fitoquímicos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* han demostrado la presencia de estos compuestos polifenólicos en distintas partes de la planta. Entre los constituyentes reportados se encuentran: la passiflorina, glucósidos flavonoides, glucósidos cianogénicos; alcaloides: harmano y harmol; triterpenos y saponinas; fenoles, carotenoides, antocianinas, ácido L-ascórbico, esteroides, aceites volátiles, eugenol, aminoácidos, carbohidratos y minerales. Los compuestos polifenólicos, especialmente los flavonoides, han demostrado tener efecto antihipertensivo en diferentes modelos experimentales. (Seigler y col, 2002). Igualmente estos compuestos son conocidos por poseer propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, antitrombóticas. Todos los compuestos antes descritos tienen efectos muy importantes en la bioquímica y fisiología de los humanos a través de la fitoterapia de prevención o tratamiento de patologías de diferentes etiologías.

1.2 La Fitoterapia

La fitoterapia es la ciencia que hace uso de los constituyentes, farmacológicamente activos, presentes en las plantas medicinales o sus derivados con fines terapéuticos. Su objeto ha sido el de tratar o prevenir patologías de distintas etiologías. Cabe destacar, que este concepto pudiera ser aplicado en la evaluación de los efectos beneficiosos o de riesgo, vinculado con la aplicación de constituyentes farmacológicamente activos sobre modelos experimentales. Día a día se suman importantes investigaciones clínicas que han descubierto o confirmado numerosos efectos beneficiosos y tóxicos, muchos de ellos ya conocidos por culturas milenarias (Muñoz y col, 2007). La fitoterapia pertenece al ámbito de la medicina y se relaciona estrechamente con la botánica (Carballo y col, 2005). Los compuestos químicos con acciones farmacológicamente activas son denominados principios activos. Los mismos constituyen muchas veces los ingredientes primarios utilizados por laboratorios farmacéuticos como punto de partida en el desarrollo de formas comerciales que serán patentadas para su uso terapéutico. De esta manera al utilizar recursos vegetales para la preparación de extractos estandarizados con propiedades medicinales, nos encontramos en presencia de los llamados fitofármacos (García y col, 2009).

Todo lo anteriormente expuesto respecto a las características taxonómicas, etnofarmacológicas, fitoquímicas y fitoterapéuticas de esta planta, nos conduce a destacar la importancia de la *Passiflora edulis f. flavicarpa* como un recurso natural beneficioso por su enorme potencial fitoterapéutico. Debido a la gran variedad de

efectos a nivel biológico y farmacológico que se le asignan, la aproximación experimental en modelos animales *in vivo*, *in vitro*, para la estimación de propiedades beneficiosas y/o tóxicas, ha resultado en los últimos años de interés en la búsqueda de blancos terapéuticos particularmente, a nivel cardiovascular (Tenorio y col, 2006). Sin embargo, hasta donde conocemos respecto a si el beneficio aportado por *Passiflora edulis f. flavicarpa*, se encuentra vinculado con la generación de efectos tóxicos, no está claramente establecido. Esta deficiente de información al respecto, ha incentivado los estudios de los posibles riesgos tóxicos y particularmente cardiotoxicos en modelos de experimentación a objeto de contribuir con la mejor comprensión de la relación: beneficio /riesgo de este producto natural con potenciales terapéuticos.

1.3 Cardiotoxicidad ante factores tóxicos ambientales.

La Cardiotoxicidad es el mayor problema del uso de los agentes farmacéuticos y de los productos de origen natural. La Cardiotoxicidad que resulta de la agresión por factores ambientales, ha sido reconocida desde hace mucho; sin embargo, sólo en años recientes se han realizado estudios exhaustivos de los mecanismos participantes. La agresión tóxica y particularmente cardiotoxica inducida por diversos agentes, desencadenan una serie de reacciones que producen cambios apreciables a nivel de la morfología, la fisiología, la bioquímica del tejido y la célula cardiaca. A nivel fisiológico, la medida de la tasa cardiaca o medida de la frecuencia cardiaca en condiciones normales y de experimentación, ha sido considerada, por años, un indicador de la acción cardiotoxica. Ejemplo de ello es

la exhaustiva Cardiotoxicidad inducida por la toxina ambiental tetraclorodibenceno-para-dioxin (TCDD), entre otras tantas, que reducen la frecuencia cardiaca en numerosos ensayos en animales de experimentación (Henry y col, 1997). Además de la regulación exógena de la frecuencia cardiaca por contaminantes químicos ambientales, existen también compuestos químicos altamente conocidos como la adrenalina, que regulan de manera endógena dicha actividad cardiaca (Milan y col, 2003). Muchos de los compuestos químicos exógenos que inducen cambios en la tasa cardiaca, pueden también mediar acciones sobre la estructura del corazón, por lo que dicha variación de frecuencia pudiera ser interpretada como consecuencia de alteraciones morfológicas. Recientemente, ha sido demostrado que el mismo TCDD causa severos defectos en el corazón en desarrollo. Un ejemplo de los cambios morfológicos, lo constituye el edema de la cavidad pericárdica, el cual ha sido considerado como otro de los indicadores de toxicidad cardiaca en modelos animales de experimentación (Rubistein, 2006).

Las alteraciones fisiológicas, particularmente el cambio en la frecuencia cardiaca ocurre como respuesta temprana antes los tóxicos ambientales, y como evento posterior a la última etapa de evolución de la cardiomiopatía. La alteración de la función cardiaca más evidente que ocurre durante las respuestas tempranas ante tóxicos es la arritmia cardíaca (Peterson y col, 2000), siendo esta, el resultado de los cambios en las concentraciones de calcio intracelular y de otras alteraciones bioquímicas que producen fallas en la comunicación celular y en la conducción de electricidad (Peterson y col, 2001).

En la actualidad, se ha ido incrementado la información concerniente a los eventos celulares, rutas de señalización celular y mecanismos moleculares de respuestas toxicológicas del miocardio ante tóxicos y contaminantes ambientales. Las agresiones tóxicas, agudas y severas, producen la muerte instantánea de la célula cardíaca. La muerte celular por activación de factores mitocondriales y otras vías constituyen un mecanismo celular significativo en el cambio de la función de la actividad del corazón (Kang, 2001). Por otra parte, ha sido reportado que los cambios en la morfología miocárdica pueden ser una consecuencia de las agresiones tóxicas masivas que se imponen en el corazón durante la exposición al tóxico de manera persistente, siendo el blanco tisular final, en la cardiotoxicidad, las células cardíacas (Kang, 2001).

1.3.1 Efectos generalizados como consecuencia de la acción tóxica de los fitoquímicos

Las agresiones tóxicas desencadenadas por agentes fitoquímicos, además de estar reflejadas sobre el sistema cardiovascular como principal blanco de acción tóxica, pueden ser también reflejados sobre otros sistemas. Tales efectos incluyen la teratogénesis. Como ejemplo de ello ha sido extensamente estudiado el efecto del etanol, con el cual se ha demostrado la inducción de ciclópea, cuando los embriones en gastrulación son expuestos a esta sustancia (Blader y Strahlu, 1998). Por otra parte, el efecto sobre el sistema nervioso ha sido observado con el uso de neurotoxinas, como la 1, metil, 4 fenil, 1,2,3,6 tetrahidroxipiridina (MPTP), conocida como la causante del Síndrome de Parkinson en humanos. En animales

de experimentación tratados con la misma, se produce un retardo en la motilidad (Mckinley y col, 2005). Otro tipo de afecciones vinculadas con cambios en la estructura corporal han sido descritas. Particularmente, el fenotipo de la estructura dorsal, como una consecuencia del efecto del tóxico, sobre la línea media del embrión en desarrollo (Brant y col, 1996). También existe una gran cantidad de marcadores histoquímicos, específicamente marcadores para tejido y células individuales, disponibles para la identificación de alteraciones morfológicas y alteración de rutas de señalización intervenidas por agentes tóxicos. Ejemplo de ello, son los ensayos de inmunohistoquímicos expresiones genéticas seguidas a la exposición de hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos poliaromáticos en animales de experimentación (Andersen y col, 2003). En otras investigaciones se ha demostrado que las células endoteliales del sistema cardiovascular resultan ser sitios de acción de estos compuestos. Particularmente, a través de la activación de rutas de señalización como la del Oxido Nítrico (ON) (Achike y Kwan, 2003). Entre otro efecto generalizado producido por agentes químicos, se encuentra la inducción de la apoptosis ectópica (Chang y Cheng, 2003). En términos generales la apoptosis o muerte celular programada es un importante mecanismo para la morfogénesis y la homeostasis celular. Anormalidades en la apoptosis se encuentran involucradas en muchas enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades degenerativas. (Nüsstein-Volhard y Dahm, 2002). Organismos multicelulares eliminan células dañadas por medio de la apoptosis. Durante el desarrollo normal embrionario o embriogénesis, el proceso de apoptosis se encuentra controlado genéticamente.

En este proceso se van eliminando células para esculpir el embrión. En cualquiera de los casos, bien sea en células dañadas así como en procesos de modelaje embrionario, la respuesta y la decisión de iniciar la apoptosis puede provenir de la misma célula o ser mediada por agentes inductores de apoptosis (Parng y col, 2002). Varios métodos han sido desarrollados en animales de experimentación *in vivo* y en células de experimentación aisladas *in vitro*, para el etiquetado de células en apoptosis. Entre ellos, la permeabilización de colorantes vitales o sondas fluorescentes, tales como naranja de acridina, bromuro de etidio, ioduro de propidio, entre otros, han servido a identificar dichas células. (Ham y col, 2010).

Cabe destacar que en la caracterización de señales de cardiotoxicidad así como de efectos tóxicos generalizados como consecuencia de la acción de compuestos fitoquímicos, se ha recurrido a diversos modelos de experimentación a objeto de descifrar los posibles mecanismos de acción tóxicos vinculadas al consumo de productos naturales. En los últimos años el Pez Cebra (*Danio rerio*) ha sido el modelo vertebrado de preferencial selección para la investigación biomédica moderna, genética, bioquímica, farmacológica, toxicológica, entre otras muchas; con una enorme brecha de eficiencia respecto a otros modelos de vertebrados (Maldonado, 2003; Rojas-Muñoz y col, 2007; Drapeau y Drapeau, 2012).

1.4 El Pez Cebra (*Danio rerio*).

El pez Cebra (*Danio rerio*) (Fig.3) pertenece al agua dulce. Es un pez con forma alargada, que se destaca por las bandas doradas y plateadas presentes en toda la superficie del cuerpo. Los organismos adultos pueden llegar hasta 3 cm de longitud, y presentan dimorfismo sexual ó características morfológicamente distintas entre ambos sexos. Los machos son alargados y aplanados ventralmente mientras que las hembras son de mayor tamaño y la superficie ventral es más abultada. Las hembras producen cientos de huevos y los mismos son fertilizados externamente, por lo que los embriones están disponibles para la observación y manipulación experimental en todas las etapas de desarrollo. Los embriones del pez cebra son ópticamente transparentes, por lo que se hace posible observar el desarrollo de los órganos internos directamente de forma no invasiva (Weistein y Fishman col, 1996; Wixon Jo. 2000). La mayor parte de los órganos internos de dicho modelo experimental, incluyendo el sistema cardiovascular, el intestino, el hígado y el riñón, se desarrollan rápidamente en las primeras 24-48 post fertilización (hpf). Esto facilita la observación y el análisis de todos los tejidos precursores del cerebro, ojos, corazón y la musculatura a través de la microscopía de luz. En contraste con los modelos de otros vertebrados, la base morfológica y molecular de los tejidos es, en general, similar a los seres humanos (Rojas y col, 2006; Leong y col, 2010).

El estadio larvario es permeable a las moléculas pequeñas lo que proporciona un fácil acceso para la administración de numerosos componentes, tanto de fármacos como de fitofármacos. Pequeñas moléculas, incluyendo péptidos, tintes y drogas pueden ser simplemente disueltos en el agua de los peces y estos

difundir libremente a través del organismo (D'Amico y col 2006; Sisma 2010; Parng y col 2004).



Fig. 3. Distintos estadios de desarrollo del Pez cebra (*Danio rerio*). Tomado de Rojas-Muñoz (2007).

Esta especie presenta una gran resistencia física a diferentes condiciones ambientales. Son organismos buenos para trabajos toxicológicos y adicionalmente, cuentan con características que son ideales para evaluar los efectos de cada componente (Usenko y col, 2008; Rubistein, 2006). Dentro de estas características encontramos:

- Tasa de crecimiento acelerada. Permite evaluar los efectos causados por los contaminantes a corto, mediano y largo plazo.
- Utilización de los compuestos fármacos sintéticos o compuestos naturales en muy bajas dosis, simplificando la cantidad de medicamentos y economizando el análisis.
- Períodos reproductivos continuos y alta tasa de fecundidad. Características ideales para poder evaluar los efectos generacionales
- Fácil cultivo. Pueden ser cultivados en estanques y soportan altas densidades poblacionales. (Zapata y Pedrero, 2003).

De esta forma el uso del pez cebra como modelo animal de experimentación se ha extendido ampliamente en todas las áreas de la Biomedicina (Hill y col, 2005; Barros y col, 2008, Leong y col, 2010 Drapeu Drapeu, 2012). Esto debido a todas las características positivas que el mismo ofrece (Tabla II). Particularmente, el Pez Cebra constituye un modelo emergente de vertebrados en la investigación cardiovascular, ya que las propiedades fundamentales de la conducción eléctrica son bastante similares a la de los humanos. Esta característica garantiza una eficiente evolución de la disfuncionalidad cardíaca en tiempo real, presentada por diferentes fármacos y

compuestos naturales (Henry t col, 1997; Cheng y col, 2008; Yu y col , 2010; Leong y col, 2010).

IMPACTO DEL PEZ CEBRA EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGIA		
CAMPO DE APLICACIÓN	EJEMPLO	COMENTARIO /DIANA
Desarrollo de nuevos fármacos		
Descubrimiento	Control de arritmia severa Regulación de señalización Cáncer	Ortólogo de HERG Proteínas G heterotriméricas Genérico
Mecanismo de acción	Angiogénesis Fenotipos tempranos inducidos por fármacos	(MetAP-2) Proteína ribosómicas
Metabolismo excreción	Metabolismo de moléculas pequeñas	
Farmacodinámica y farmacocinética	Ruta de absorción	Genérico
Mutágeno	Efectos sobre la integridad del genoma	Genérico
Modelos de enfermedad		
Cáncer	Leucemia Metástasis Genética y cribado	c-myc
Trastornos del sistema inmunitario	Genérico/Básico Trasplante	
Cardiovascular	Mutante Gridlock Insuficiencia circulatoria	Hey2 Syndecan-2
Trastornos del comportamiento	Alteraciones del sueño y drogodependencias	Receptores de opiáceos
Enfermedades raras	Síndrome de DiGeorge Anemia de Fanconi Atrofia muscular espinal	Mutación Van Gogh (tbx 1) FANCD2 Smn
Enfermedades infecciosas	Patogénesis estreptocócica	Genérico
Factores ambientales	Efecto de la dieta en la patología Neurológica Patología Osteoporosis	Piruvato deshidrogenasa Regulación de expresión genética Microgravedad
Toxigenómica		
Contaminación ambiental	Evaluación de la calidad del agua Compuestos orgánicos Metilmercurio Cadmio	Genérico Genérico Genérico HSp70

Tabla II. Impacto del modelo biológico de Pez Cebra en Biomedicina y Biotecnología. Tomado de Rojaz-Muños y col., 2007.

1.4.1 Anatomía y fisiología del corazón del Pez Cebra (*Danio rerio*)

Desde el punto de vista anatómico el corazón embrionario del pez cebra, tiene una estructura tubular y presenta 4 cámaras interconectadas; Atrium, Ventrículo, Seno venoso y Bulbo Arterioso, además de una red vascular que se desarrolla en los primeros días después de la fertilización. Este órgano de 4 cámaras se encuentra incluido dentro de la denominada cavidad pericárdica. El ventrículo es de forma cónica y es el encargado de bombear la sangre oxigenada hacia el cuerpo a través del bulbo arterioso. Este arreglo de las cámaras es esencialmente idéntico al de las primeras etapas embrionarias del desarrollo cardiaco en aves, anfibios y mamíferos. A las 36 hpf el corazón de pez cebra se encuentra ubicado en una posición ventro-anterior lo que hace muy fácil visualizar las 4 cámaras de forma no invasiva y manipularlo experimentalmente (Hu y col, 2000; García y col, 2009). (Fig 4). Por otra parte, el desarrollo de la red vascular del pez cebra tiene mucho en común con el desarrollo vascular, en las primeras etapas, de otros vertebrados (Alfaro y col 2010). Ejemplo de ello lo observamos en el sistema cardiovascular de mamíferos como el ratón, el cual consta de una vena cava derecha e izquierda, una vena pulmonar y una arteria pulmonar (Fig.5B). En los humanos la vena cava se ubica en la parte superior y en la parte inferior, igualmente la vena y arteria pulmonar se encuentran en ángulos distintos al descrito en el corazón de ratón (Fig.5A) (Leong y col 2010).

Desde el punto de vista de la fisiología cardíaca, a las 48 hpf el sistema cardiovascular del pez es funcional. Tanto el corazón del pez cebra como el de mamíferos se ha demostrado que comparten mecanismos moleculares y características funcionales altamente conservadas. La contracción responde a la señal eléctrica que se genera en el nódulo seno-auricular y viaja por una red especializada de fibras eléctricas causando la contracción completa del corazón. (Leong y col 2010). De esta forma podemos observar que el pez Cebra representa un modelo adecuado para el estudio de la funcionalidad a nivel cardíaco, y los efectos producidos, por diversos compuestos ya que pudieran ser cercanamente extrapolados a los seres humanos (Kari y col, 2007).

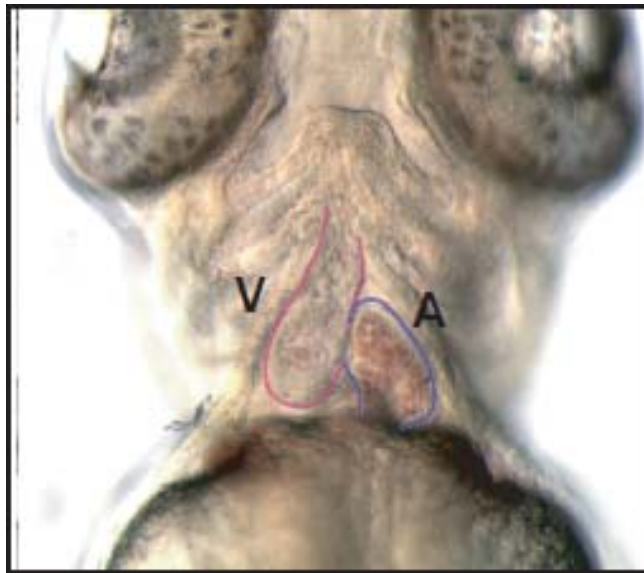


Fig. 4 Vista ventral de embrión de Pez Cebra de 72 hpf. Tomado de Barrett, 2005.

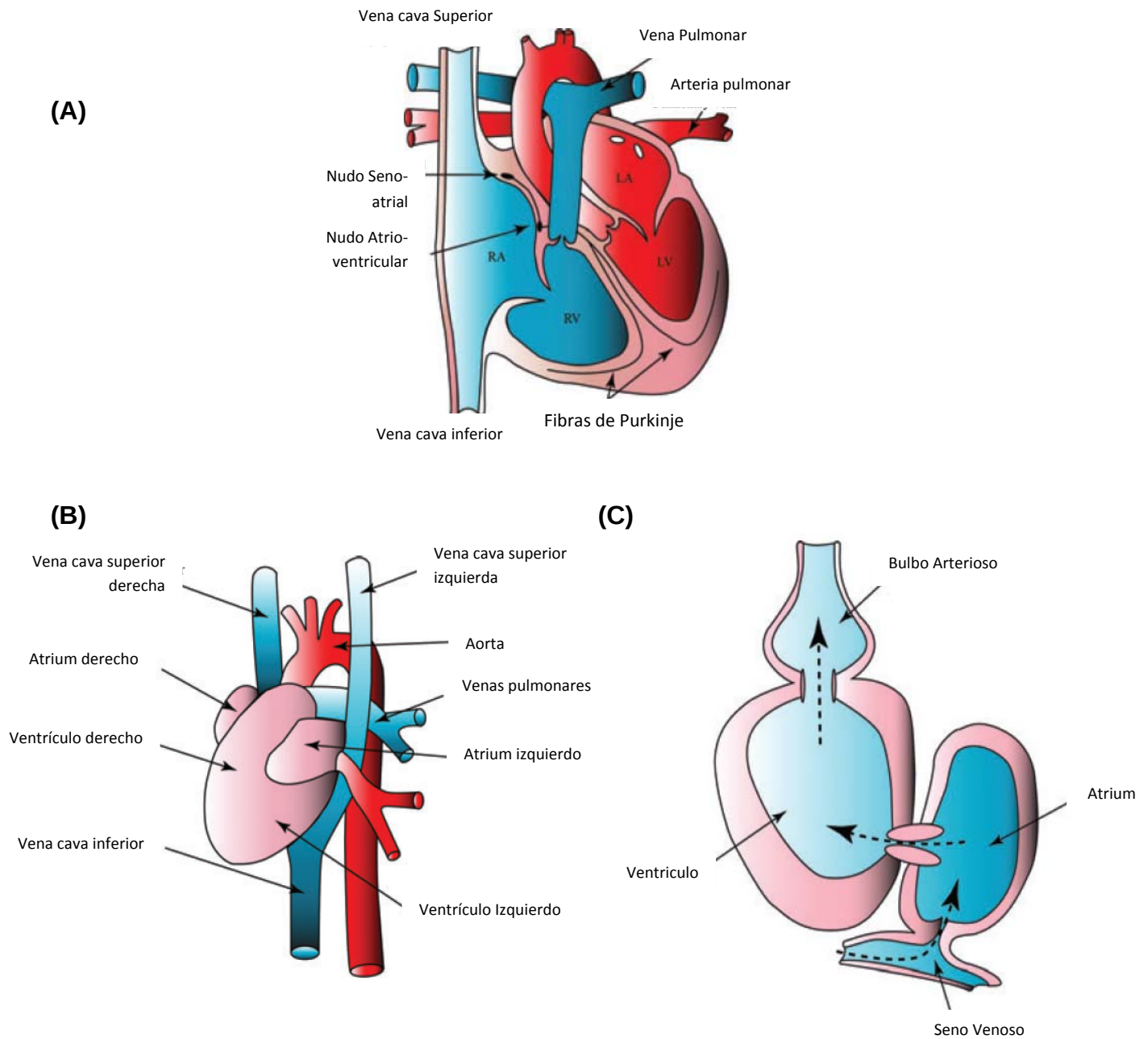


Fig. 5 Morfología y comparación del corazón de varios vertebrados (A) Humanos (B) Ratón (C) Pez Cebra. Tomado de Leong y col 2010

Todos estos conceptos descritos hasta el momento de manera general, nos conduce a abordar los fenómenos de toxicidad y particularmente de cardiotoxicidad vinculados probablemente con las propiedades beneficiosas de la *Passiflora edulis f. flavicarpa*, haciendo uso, igualmente, de las virtudes y ventajas que presenta el modelo experimental pez cebra (*Danio rerio*). Dicho abordaje conduciría a profundizar sobre las características de toxicidad de la *Passiflora edulis f. flavicarpa*, a través del análisis de las alteraciones morfo funcionales inducidas por los distintos extractos y distintos componentes presentes en preparados de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Toxicidad del género *Passiflora*.

Muchas plantas del jardín son potencialmente peligrosas y la *Passiflora* no es menos que la mayoría, ya que contiene algunas sustancias que podrían ser dañinas cuando están concentradas (Rojas y col, 2006). Se conoce que varias especies de *Passiflora* son cianogénicas. Estas contienen glucósidos cianogénicos concentrados en las vacuolas dentro de las células. Los mismos son liberados a través de la lisis o ruptura de dichas vacuolas, como consecuencia del consumo por parte de los animales y humanos, liberándose así el cianuro de hidrógeno (HCN) altamente tóxico para los organismos vivos. Cabe destacar que la presencia de glucósidos cianogénicos, en muchas plantas, actúa como defensa contra depredadores potenciales. La familia Passifloraceae, posee el glucósido cianogénico denominado decyclopentenyl (gynocardin), además de su β -glycosidasa específica. Ambos, han sido aislados del tejido fino de la *Passiflora* (Fisher y col, 2000).

Los flavonoides y saponinas representan buenos marcadores químicos para proporcionar diferencias entre especies de *Passiflora* estrechamente relacionadas. En el estudio realizado con diferentes extractos de hojas de *Passiflora alata*, se identificó la saponina quadranguloside. La misma, es considerada el responsable de la toxicidad causada en ratas (Yuldasheva y col, 2005).

Con la *Passiflora alata curtis* se ha podido evaluar la toxicidad aguda, subaguda y genotoxicidad. En ratas tratadas con una solución acuosa, han sido observadas alteraciones en los parámetros de comportamiento, así como en

parámetros hematológicos, bioquímicos e histológicos. Los resultados han reportado que la *Passiflora alata curtis* presenta efecto genotóxico sugiriendo una mayor evaluación de la toxicidad con el fin de garantizar su seguridad para uso humano (Boeira y col, 2010).

Cabe destacar, que la información documentada respecto a los efectos tóxicos y particularmente cardiotóxicos descritos en la familia pasiflora, particularmente para en la *Pasiflora edulis f. flavicarpa*, es escasa. Sin embargo, con otras especies como *Passiflora incarnata* suministrada en dosis terapéuticas a través de fórmulas comerciales en pacientes con alteración de la conciencia, se han reportado episodios de taquicardia ventricular (Solbaken y col, 1997). La posible asociación de los síntomas con la *Passiflora incarnata* no fue reconocida en estos pacientes sino después de haber transcurrido varios días. Sin embargo, los pacientes requirieron admisión en el hospital para la supervisión cardíaca y terapia fluida intravenosa (Fisher y col, 2000). En otros casos se han reportado desarrollo de náuseas severas y somnolencia.

2.2 El Pez Cebra en la evaluación de la cardiotoxicidad

El pez cebra (*Danio rerio*) se está convirtiendo en un sistema modelo para estudiar los mecanismos por los cuales compuestos tóxicos perturban el desarrollo normal. Embriones de Pez cebra de corto periodo post-fertilización, al ser expuestos, por ejemplo al TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), el cual es un contaminante ambiental que se bioacumula a través de la cadena alimentaria, generan edema pericárdico y reducen el flujo de sangre. Para la mejor comprensión de la progresión de la toxicidad de las dioxinas en los peces Cebra, se examinaron

los efectos de TCDD en el desarrollo del corazón. Los embriones mostraron alteraciones del músculo cardíaco, con las aurículas en posición claramente posterior a los ventrículos, presencia de edema pericárdico, reducción del volumen del tejido cardíaco y la disminución del número total de cardiomiocitos (Antkiewicz y col, 2005).

Los mamíferos tienen una capacidad muy limitada para reparar tejidos perdidos y particularmente para recuperar el tejido cardíaco dañado. Sin embargo, el pez cebra representa un sistema muy útil para estudiar la regeneración del corazón, ya que, hasta el presente, es el único vertebrado conocido con la capacidad de regenerar daño cardíaco. La combinación de herramientas genéticas disponibles en la actualidad ha permitido profundizar sobre la regeneración del pez cebra y aprender cómo las células cardíacas progenitoras se pueden utilizar con éxito en la regeneración. La comprensión del desarrollo del corazón se ha beneficiado enormemente con el uso de los mutantes de pez cebra, ya que con los mismos se ha podido estudiar específicamente la alteración de la forma y función cardiovascular (Major y Poss, 2007). Usando un mapeo genético se ha podido identificar una población de cardiomiocitos, los cuales se activan después de la resección del ápice ventricular, contribuyendo prominentemente a la regeneración del músculo cardíaco (Kikuchi y col, 2010).

El tratamiento agudo con concentraciones mili-molares de cafeína provocó una reducción dosis-dependiente de la Frecuencia Cardíaca en embriones de pez cebra de 2-3 dpf. La presencia de la arritmia cardíaca y un efecto de curvatura de la región troncal, ha sido descrito, como consecuencia del tratamiento con cafeína

en larvas de pez Cebra identificadas como características de los efectos cardiotóxicos. (Rana y col, 2010)

Estudios sobre mutantes de pez cebra (*Danio rerio*), han permiti6 identificar el gen responsable del SQT. Dicho gen modela un trastorno de re-polarizaci6n ventricular que predispone mortalmente a los individuos afectados por arritmias. El mismo se identific6 como *kcnh2*, que codifica el canal responsable de la activaci6n r6pida como para K⁺. Los resultados de este trabajo proporcionaron la ampliaci6n del uso del Pez cebra como un sistema modelo para el estudio de arritmias presentes en humanos (Rana y col, 2010).

Seg6n los estudios realizados sobre la existencia de una posible toxicidad vinculada a la familia de *Passiflora*, es posible realizar un estudio sobre el efecto t6xico y particularmente cardiot6xico con las hojas de la especie *Passiflora edulis f. flavicarpa* utilizando el modelo biol6gico del pez cebra (*Danio rerio*), cuyas caracter6sticas presentes en el coraz6n son similares a los humanos.

3. HIP6TESIS

Si, con las numerosas bondades terapéuticas vinculadas con el consumo de extractos provenientes de la *Passiflora edulis f. flavicarpa*, se encuentran asociadas señales de toxicidad que comprometen la funcionalidad de los organismos y particularmente la funcionalidad del corazón, entonces el monitoreo cardíaco acompañado de una análisis de la estructura del órgano, resultan indicadores de relevancia a ser evaluados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto cardiotóxico de extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa* sobre el modelo larvario de Pez Cebra (*Danio rerio*) bajo monitoreo cardíaco.

4.2 Objetivos Específicos:

1. Obtener los extractos puro, acuoso y etanólico a partir de hojas frescas de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (parchita).
2. Aislar, identificar y manejar el modelo larvario de pez cebra en distintos estadios de desarrollo.
3. Establecer bioensayos de toxicidad aguda para el cálculo de las concentraciones letales cincuenta (CL₅₀) de cada uno de los extractos obtenidos.

4. Determinar la disfuncionalidad cardíaca a través de:

4.1. Registros de variación de frecuencia cardíaca mediante el método semi-invasivo de Videocardiograma (VCG). Cambios Funcionales. Análisis de la frecuencia cardíaca mediante VCG.

4.2 Registros de cambios morfológicos a través del análisis de cortes histológicos del corazón de Pez Cebra (*Danio rerio*), teñidos con hematoxilina-eosina, bajo condiciones experimentales en comparación a los controles. Cambios estructurales. Análisis histológicos.

5. Determinación de efectos generalizados a través de:

5.1 Análisis morfológico de las larvas controles y tratados.

5.2 Determinación de apoptosis *In Situ* haciendo uso del marcaje con Naranja de Acridina (NA) y Bromuro de etidio (BE).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de Extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Parchita)

Para la obtención de los distintos extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, se procedió siguiendo la secuencia de eventos propuestos por la medicina herbaria para la obtención de extractos a partir de las partes aéreas de las plantas con potencial terapéutico. Para ello, se ha propuesto 1) El uso de hojas frescas o desecadas al Sol, haciendo descarte de las hojas en malas condiciones por deterioro o infección y cualquier otra señal de daño. En el material seleccionado se descarta la nervadura y el resto del material es cortado para su mejor manipulación y macerado 2) Para la separación de los diferentes extractos, se hace uso del calentamiento a altas temperaturas o bien, se hace uso de solventes, tales como el Etanol, Butanol entre otros 3) El proceso de filtración es empleado para el descarte de contaminantes y principalmente para la obtención del compuesto concentrado (Handa y col, 2008). En el presente trabajo los distintos extractos: extracto puro (EP), extracto acuoso (EA) y extracto etanólico (EE) (Fig. 6), fueron obtenidos a partir de la recolecta de las hojas frescas provenientes de planta *Passiflora edulis f. flavicarpa* ubicadas en la región montañosa de Filas de Mariche, del estado Miranda, identificado bajo la experticia de un campesino de la zona (Sr. Raúl Guanaco) . El EP se obtuvo luego de la maceración total de 3 mg de hojas frescas, realizada en un mortero y en ausencia de diluyente. El EE fue obtenido a partir de la maceración de 3 mg de hojas frescas en etanol puro 100% en una relación 3:1. El macerado se mantuvo en agitación continua 15 minutos diarios por 10 días, a objeto de eliminar el solvente

residual y obtener el extracto. Por último, el EA fue obtenido a partir de una infusión preparada con 3 mg de hojas frescas hervidas a 90° durante 10 minutos (Sena y col, 2009).

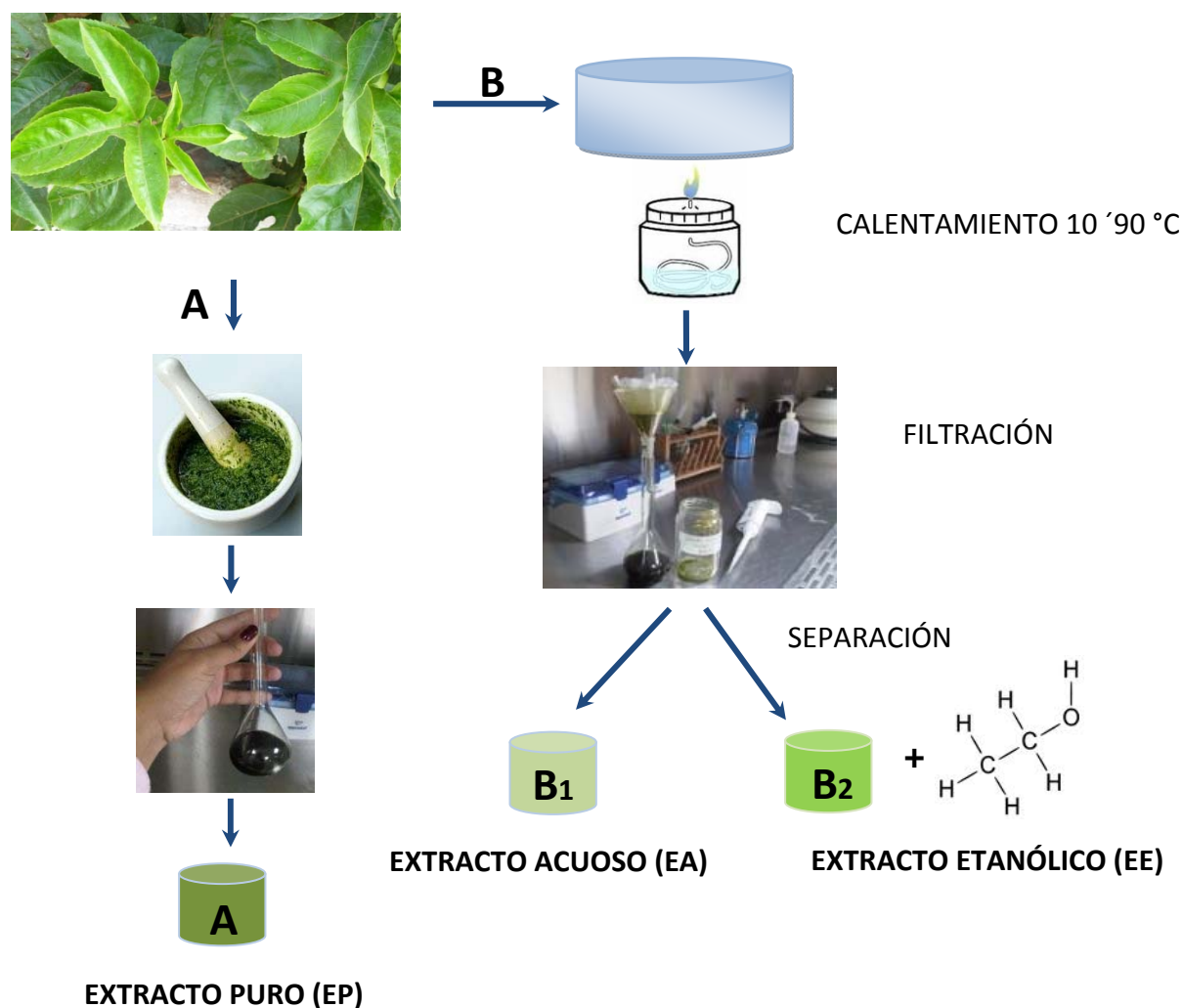


Fig. 6. Esquema del procedimiento para la obtención de extractos provenientes de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.

5.2 Manejo del modelo Biológico de Pez Cebra

5.2.1 Material Biológico

Las larvas utilizadas para las pruebas toxicológicas, fueron colectadas como crías de una misma camada a partir de peces Cebra tipo salvaje (*Danio rerio*) en edad adulta. Dicho peces adultos, fueron obtenidos en una casa comercial y mantenidos en el acuario de agua dulce ubicado en el Centro de Microscopia del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina, UCV.



Fig. 7. Acuario de peces Cebra Instituto Anatómico “José Izquierdo”

5.2.2 Puesta y desinfección de los huevos fertilizados.

La obtención de los huevos, se dió a partir de la estimulación de los peces adultos, a través de ciclos de luz/oscuridad, particularmente ciclos de 12 horas de

iluminación y 10 horas de oscuridad. La iluminación se mantuvo por encima del acuario con 2 lámparas de 11 voltios de intensidad y la temperatura se mantuvo constante a 25 °C medido con un termómetro. El periodo de iluminación de la pecera ocurrió de manera simultánea con las horas tempranas del amanecer natural. Este momento es considerado el estado óptimo para el desove de los huevos por parte de las hembras y la inseminación externa por parte del macho. El agua de pecera fue tratada con azul de metileno para el control de bacterias y hongos.

La población de huevos fertilizados, fueron depositados al fondo de la pecera. Son dirigidos allí a través de una malla cuyo diámetro de apertura es de 2x2 cm. La presencia de la malla (Fig.7) (flecha) en el fondo de la pecera, evita la depredación de los huevos por parte de los organismos adultos. Los huevos fertilizados, fueron recolectados diariamente a través de un proceso de sifoneo, utilizando una manguera delgada de 5 cm de diámetro. Los huevos recolectados, fueron colocados en agua de pecera estéril o agua de pecera filtrada, para asegurar el descarte de desechos o detritus así como las condiciones de limpieza y estabilidad del medio ambiente. Una vez desinfectados los huevos, fueron repartidos en placas de Petri con un volumen saturado de agua de la pecera estéril e incubados a 28 °C en estufa marca HERAEUS, hasta alcanzar los distintos estadios de desarrollo larvario (Rocha y col, 2002).

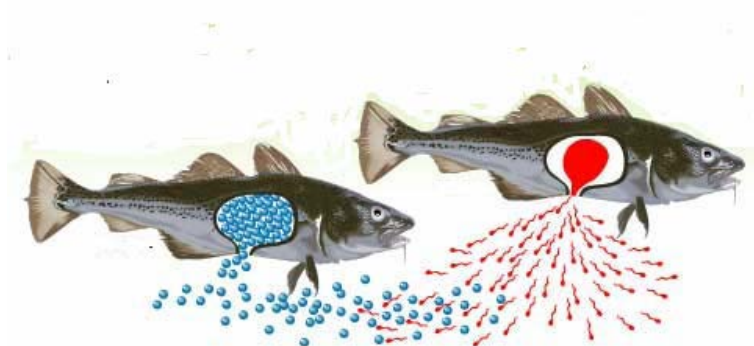


Fig. 8 Esquema de postura y fertilización de los huevos.

5.2.3 Identificación y supervivencia de los embriones

Los distintos estadios embrionarios de pez Cebra (*Danio rerio*) obtenidos en el laboratorio fueron clasificados de acuerdo al estadio de desarrollo y la similitud de edades (Kimmel y col, 1985). Esto permitió estimar la edad respecto al tiempo de desarrollo a partir del momento de la fertilización, expresado como horas post fertilización (hpf). Mediante la observación directa a través del microscopio estereoscópico Nikon SMZ800, fue posible identificar estadios tempranos y estadios tardíos del desarrollo de larvas del pez cebra (*Danio rerio*). Para la identificación de los estadios tempranos (2 hpf-8 hpf), se realizó la observación de características tales como: presencia de polo animal, presencia de polo vegetal, formación del blastodisco, división meroblástica, contenido de vitelo, envoltura coriónica. Para la observación de estadios larvarios tardíos (24 hpf-72 hpf) fueron

consideradas aquellas liberadas de la envoltura coriónica, con características tales como: transparencia total del cuerpo de la larva, saco vitelino de gran tamaño, ausencia de aletas dorsales, ausencia de movilidad de los órganos oculares (Kimmel, 1985; Gilbert, 2008)

5.3 Bioensayo de Toxicidad aguda

5.3.1 Determinación de la relación concentración-respuesta y la determinación de la concentración Letal 50 (CL₅₀) de EP, EA, EE de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (parchita).

Para el estudio del efecto tóxico de un determinado compuesto químico o extracto natural, con potencial terapéutico sobre un determinado modelo experimental, se estima como primer paso proceder a la obtención de la relación concentración/respuesta. Dicha relación, queda expresada como una línea sigmoidea, ubicada entre las coordenadas “Y” correspondiente, de manera convencional, al porcentaje de mortalidad (%); y el eje “X” que representa el logaritmo de las distintas concentraciones utilizadas a ser ensayadas. Esta relación nos permite estimar la concentración del producto utilizado que es capaz de inducir el 50 % de mortalidad en la población estudiada. El 50% de mortalidad correspondiente a la concentración a la cual se induce el 50% del efecto tóxico a ser evaluado, es entonces calculado a partir de la transformación de la línea sigmoidea a una línea recta, a través de la transformación del porcentaje (%) del efecto observado a unidades Probit (Apendice 9.1). Esta transformación lineal, asume que la respuesta de los individuos ocurre de forma normal y que cumple

con la fórmula de una línea recta $Y=mx+b$; en donde “m” representa la pendiente de la recta y nos permite estimar la Concentración letal 50 (CL₅₀) (Apendice 9.2) (Gil y Muñozl, 1978; Litter, 1985; Katzung, 1987).

Para el bioensayo del presente trabajo fueron utilizados larvas de 72 hpf, las cuales fueron sometidas a distintas concentraciones de cada uno de los extractos preparados. El ensayo se hizo por triplicado, con 10 concentraciones conocidas para cada extracto, expresados en mg/mL teniendo como diluyente el agua de la pecera (0,015; 0,03; 0,052; 0,075; 0,112; 0,15; 0,22; 0,3; 0,6; 1) (Tabla III). Los controles fueron larvas directamente inmersas en agua de pecera. Para el estudio de la toxicidad, 4 larvas sanas para cada concentración, fueron transferidas a una placa de 24 pozos en un volumen final de 2000 µl. La exposición del efecto *In Vivo* tuvo una duración de 1 h para cada concentración utilizada (Fig. 9) (Usenko y col, 2008). La concentración letal 50 (CL₅₀), fue estimada a partir del valor de la pendiente de la expresión lineal de la curva concentración-respuesta.

Extractos de Hojas de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> <i>Puro, Acuoso y Etanólico</i>			
n° Bioensayos	Concentración (mg/mL)	n° larvas	% Mortalidad
3	CONTROL	4	?
3	0,015	4	?
3	0,03	4	

3	0,0525	4	?
3	0,075	4	?
3	0,112	4	?
3	0,15	4	?
3	0,225	4	?
3	0,3	4	?
3	06	4	?
3	1	4	?

Tabla III. Representación de las concentraciones empleadas de *Passiflora edulis f. flavicarpa* para cada extracto

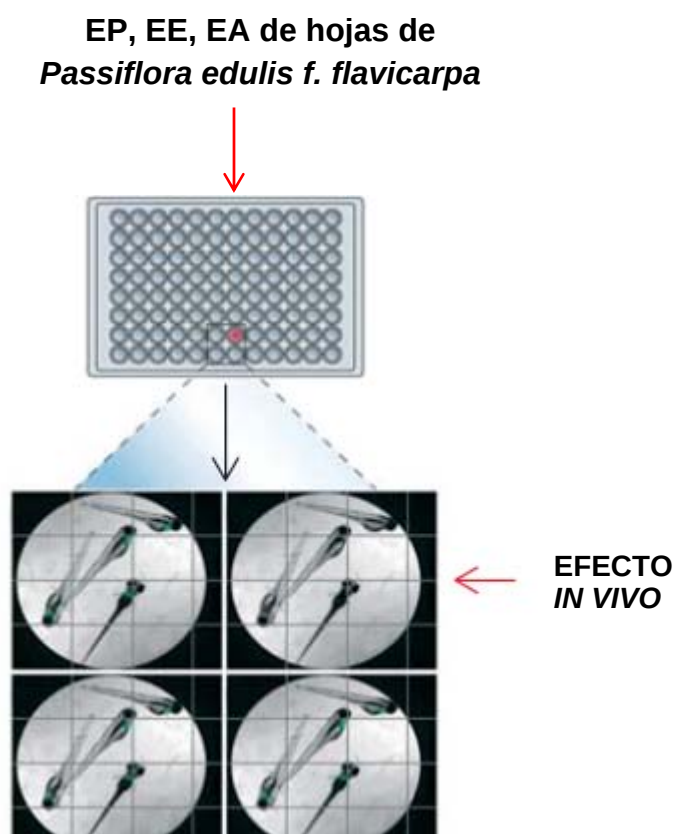


Fig. 9 Bioensayo de toxicidad aguda en Pez Cebra.

5.4 Monitoreo Cardíaco.

5.4.1 Cambios funcionales: monitoreo cardiaco y variación de la frecuencia cardíaca

El monitoreo cardiaco fue realizado a través del método semi-invasivo de Videocardiograma (VCG), para ello, las muestras de larvas controles y tratadas depositadas en una cápsula (Fig. 10 A), son colocadas bajo un microscopio estereoscópico conectado a la cámara de video (Fig.10 B). La cámara, ajustada a una velocidad de 200 cuadros/seg, permite obtener un videoregistro, este es realizado sobre el área cardiaca de la larva siguiendo la actividad de contracción y relajación (Fig.10 C).El videocardiograma registrado, es almacenado y procesado mediante el programa MATLAB (Fig. 10D). 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 (flechas). El ajuste de estas variación de luminosidad (línea azul flecha) nos arroja un valor estimado de la frecuencia cardiaca promedio en pulsaciones por minuto (P/min). En la presente investigación, dicho método fue aplicado en cada una de las larvas de las distintas poblaciones tratadas. Los videocardiogramas, fueron registrados durante 60 seg. para cada uno de los extractos.

Los pasos a seguir para la obtención del VCG se resumen a continuación (Fig.10):

- 1) Enfoque de la región cardiaca de la larva seleccionada. Microscopio Nikon SMZ800
- 2) Iniciar el programa MATLAB® en el computador

- 3) Iniciar los siguientes Comandos en el programa: VideoLog_Menu.m;
RUN;VideoLog; 60:100; OK
- 4) Ubicación del musculo contráctil (corazón) e iniciación del Video.

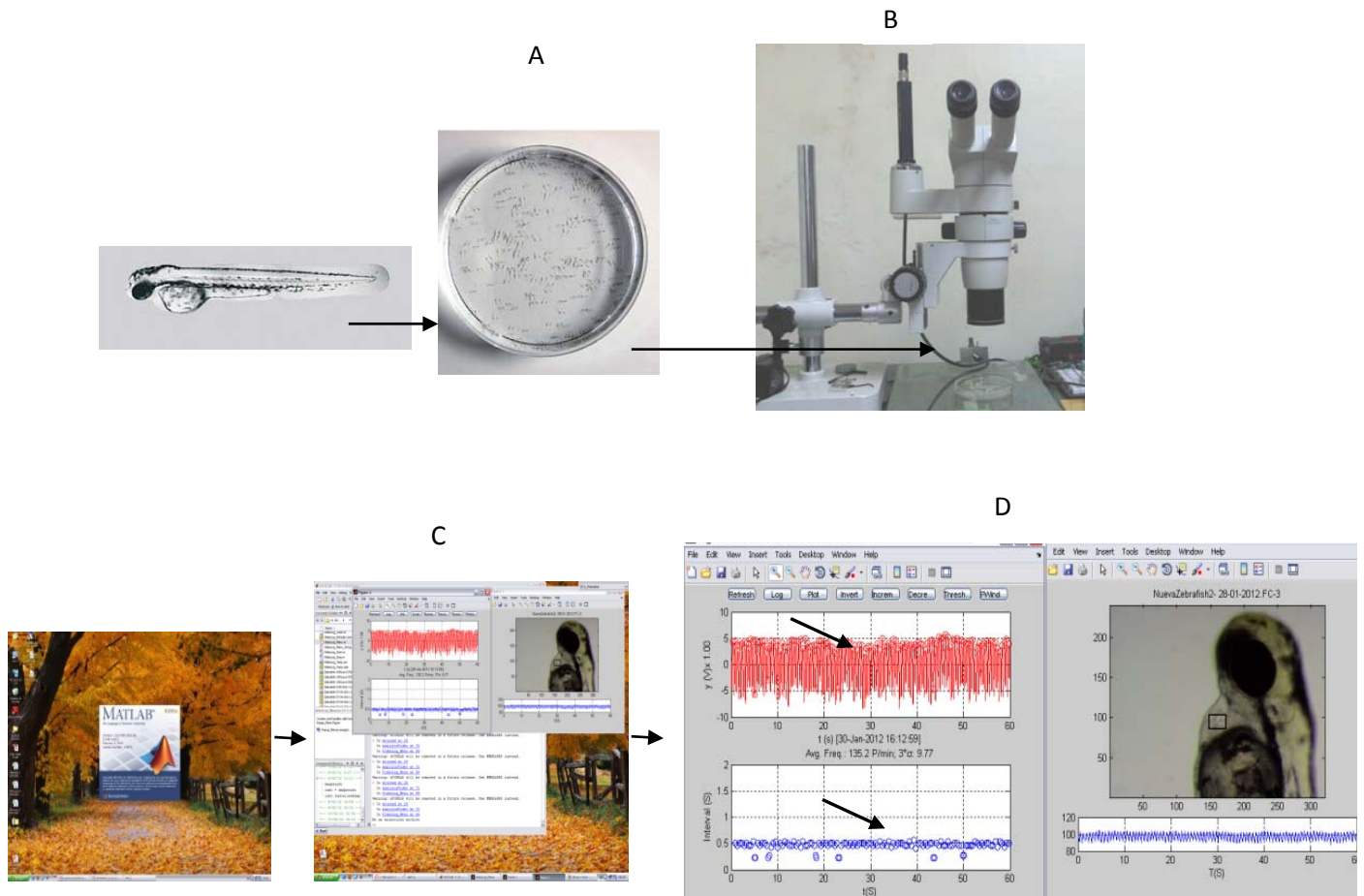


Fig.10 Esquema del procedimiento para la obtención de VCG.

5.4.2 Caracterización histológica de la región cardíaca.

Las muestras controles y tratadas, fueron fijadas en formol buferado 10 % durante 6 días. Luego de este periodo, se procedió a la deshidratación en concentraciones crecientes de etanol 70-100% 15'1X. Finalizado el tiempo de

deshidratación, se realizó el aclaramiento utilizando Xilol 100%, 15'2X y se procedió a un pre-infiltrado de las larvas en posición ventral sobre moldes de inclusión en parafina. Las larvas, fueron colocadas en número de 5 por cada molde de inclusión. Este pre-infiltrado, se realizó de manera rápida en función de la temperatura ambiente. Los bloques obtenidos en el primer pre-infiltrado, con larvas orientadas en posición ventral, fueron seccionados y las larvas fueron reorientadas en posición frontal a través de una reclusión en moldes plásticos, en una segunda parafina a una profundidad de 3 mm (Fig.11). Las larvas ubicadas de manera frontal, en los respectivos moldes, fueron llevadas a congelación a - 20°C para la solidificación completa de la parafina. La reorientación de las larvas en una posición frontal, facilitó el seccionamiento transversal y la identificación, a 3 niveles de profundidad de corte (NI, NII, NIII), las distintas estructuras anatómicas de las larvas controles y tratadas. Los cortes fueron realizados utilizando un Microtomo RM2255 Leica Microsystems (Fig.12). Los cortes realizados en los 3 niveles de profundidad, fueron coloreados con hematoxilina-eosina y fotografiados con un microscopio OLYMPUS IX71. Los registros fotográficos, permitieron analizar los cambios morfológicos vinculados a la toxicidad de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.

Tinciones Histoquímicas

Hematoxilina – Eosina (H-E): La combinación (H-E) es el método de tinción más utilizado para las coloraciones histológicas, ya que colorea los componentes nucleares de azul violacio, mientras que el citoplasma adquiere una tonalidad rosada. Esto, debido a las características químicas de cada uno de los colorantes.

Particularmente, un compuesto básico como la Hematoxilina y un compuesto ácido como la Eósina, actúan de manera diferencial con los distintos componentes celulares (Hill y col, 2001).

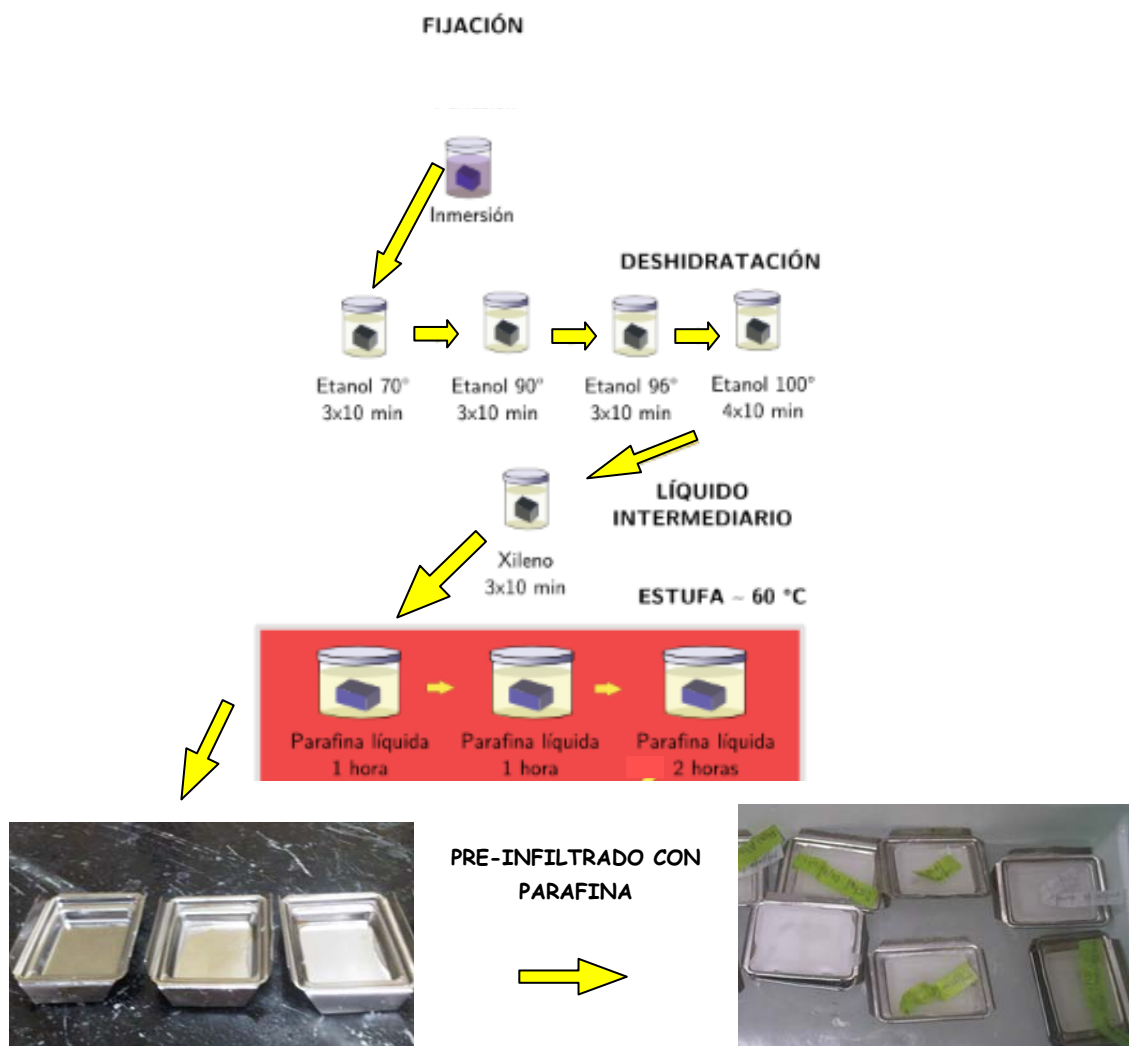


Fig. 11. Metodología de fijación e inclusión de las muestras de larvas *Pez Cebra* (*Danio rerio*) tratadas. Tomada de Sullivan y col, 2010 modificado por Cornejo, 2012.

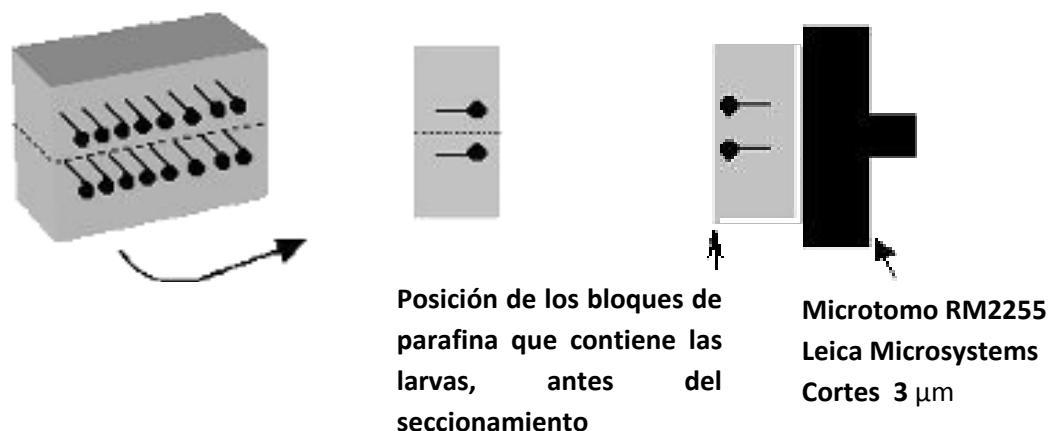


Fig. 12. Metodología y disposición de los bloques de parafina en la obtención de cortes transversales.

5.5. Efectos generalizados

5.5.1 Cambios morfológicos

Las muestras controles y tratadas con los distintos extractos con *Passiflora edulis f. flavicarpa*, fueron sometidas a observación macroscópica (Lupa Nikon SMZ800) para la identificación, además de los cambios cardiacos de señales de toxicidad tales como: curvatura troncal, muerte celular y puntos hemorrágicos, definidas como parámetros cardiotóxicos (Rubinstein, 2006)

5.5.2 Viabilidad Celular con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio: Microscopia de fluorescencia

La determinación de viabilidad celular, se realizó mediante el uso de Naranja de acridina y Bromuro de Etidio (Dhalluin y col, 1999). Las observaciones,

fueron realizadas por microscopia de fluorescencia a 495 nm. El procedimiento *In situ* consistió en una serie de pasos a seguir, que incluyen la colocación las muestras, controles y tratadas, en una solución de Naranja de acridina 0,15 mg/ml y bromuro de etidio 0,5 mg/ml en proporción 1:1 durante 1 hora, a temperatura ambiente y en oscuridad (Fig.13). (Cole y Ross, 2002):

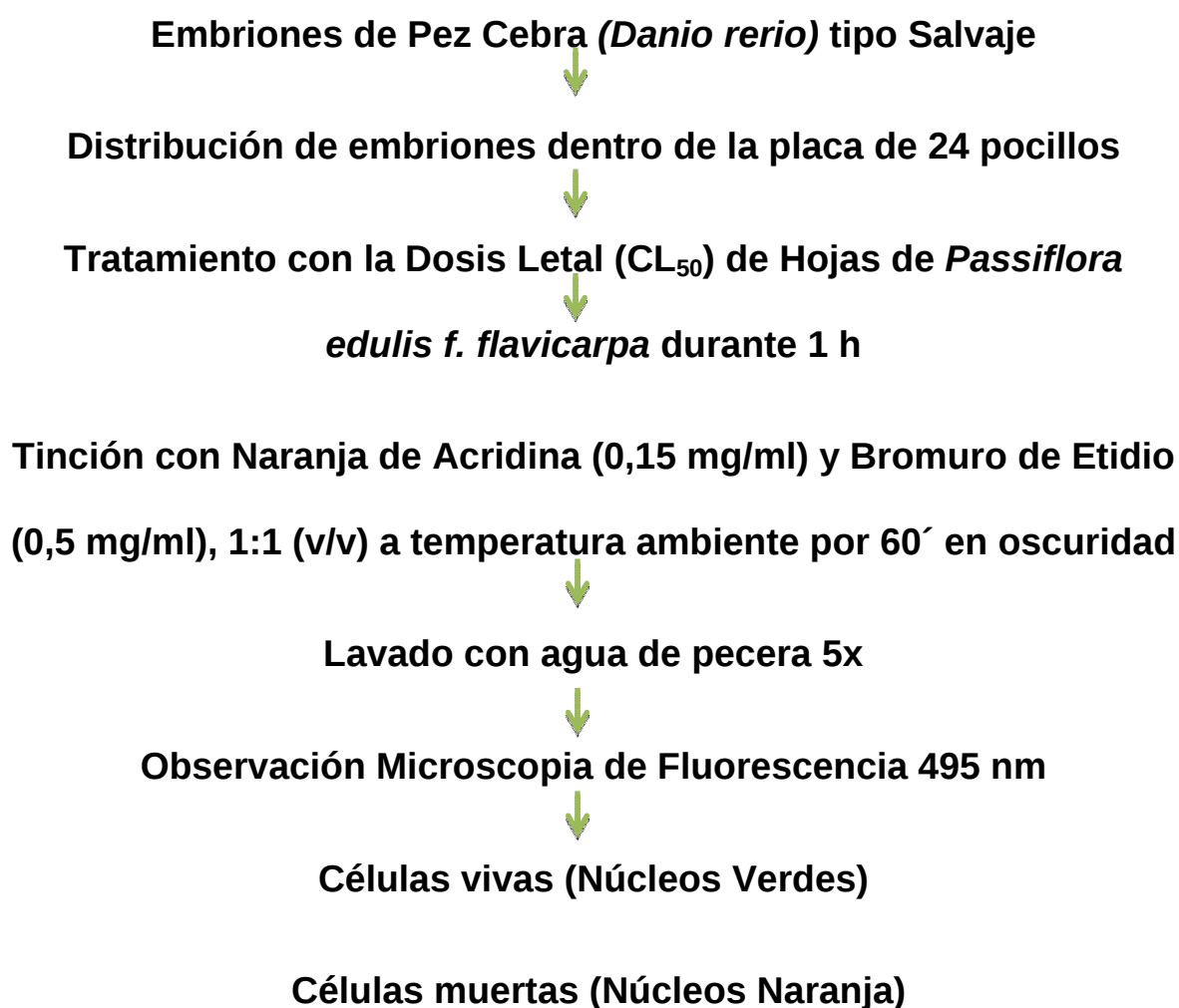


Fig. 13. Esquema del procedimiento para determinar viabilidad celular *In Situ* mediante microscopía de fluorescencia

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Parchita) a partir de las hojas frescas.

Los respectivos extractos obtenidos, cada uno a partir de la maceración total de 3 mg de hojas frescas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, fueron diferenciados, a través de una gradiente de coloración verde (Fig.14). El extracto puro EP, se caracterizó por un color verde oscuro (Fig.14A), el extracto etanólico EE se caracterizó por un color verde intenso (Fig.14B) y finalmente el extracto acuoso EA se caracterizó por un color verde claro (Fig.14C).

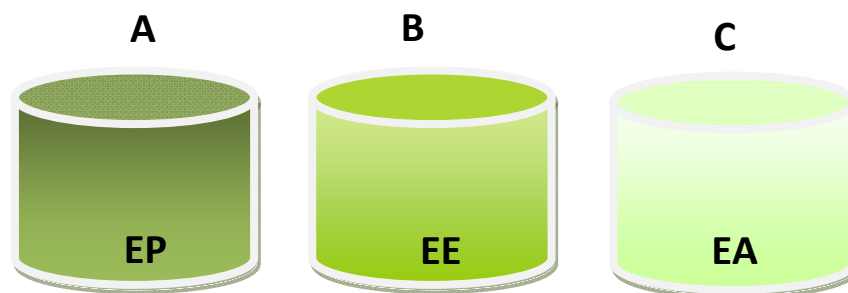


Fig. 14. Extractos obtenido de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*

6.2 Aislamiento, identificación y manejo del modelo larvario de pez cebra en distintos estadios de desarrollo.

El procedimiento utilizado para la obtención de los huevos fertilizados de pez cebra, permitió, de manera simplificada, contar con una población de huevos en distintas etapas de desarrollo (Fig.15). Particularmente, fue posible identificar estadios tempranos y estadios tardíos del desarrollo larvario de pez Cebra.

Entre los estadios tempranos del pez cebra, se pudo identificar una población de estadio cigoto (Fig.15A), caracterizado por un tipo de huevo telolecítico, ocupado en su mayor parte por vitelo (v), de aproximadamente 0,7 mm de diámetro en el momento de la fecundación. Otro estadio encontrado fue el estadio cigoto con diferenciación del polo animal (pa) y polo vegetal (pv). Se observó el inicio de la segmentación (división meroblástica), en el blastodisco, una delgada región de citoplasma libre de vitelo en el polo animal (Fig.15B). También se destaca la presencia de embriones en periodo de clivaje o formación de blastómeros. Particularmente, huevos fertilizados en periodo de 16 células 1.5 hpf (Fig.15C) y embriones en periodo de clivaje de 256 células de 3 hpf (Fig.15D). En los mismos se observó la producción de unidades blastoméricas, ubicadas en la región de polo animal (pa) (flechas).

Respecto a los estadios tardíos, encontramos embriones en periodos tempranos de la organogénesis, en donde se observa el área del desarrollo del embrión hacia el polo animal (flecha) (Fig.16A) y embriones de mayor edad, en donde se observó la estructura completa de las larvas. Se destaca la región

cefálica (cf), región caudal (rc), vesículas ópticas (vo) y vitelo (v) (Fig.16B). También fue posible obtener estadios larvarios con vivas señales de pigmentación, encapsuladas dentro de la envoltura coriónica (flecha) (Fig.16C) además de larvas eclosionadas de 72 hpf, con una estructura morfológica bien definida, con vesículas oculares color oscura, presencia de vitelo, cuerpo alargado y recto y pigmentación en todo el cuerpo (Fig.16D).

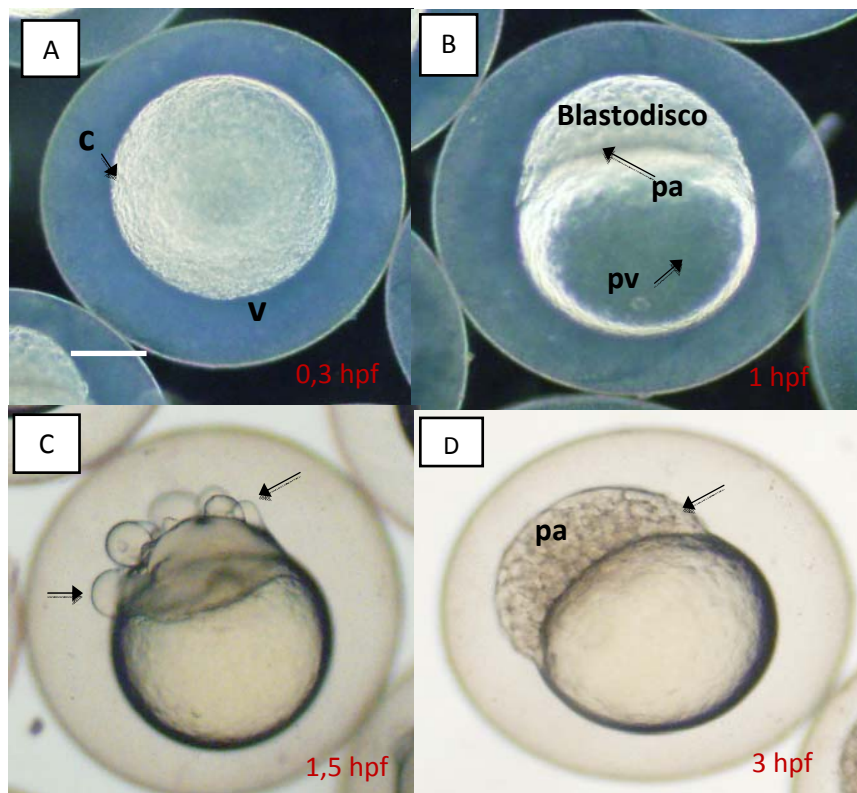


Fig. 15. Estadios tempranos. A: cigoto; B: cigoto con diferenciación del polo animal y polo vegetal; Período de clivaje C: estadio de 16 células; D: estadio de 256 células. c=espacio coriónico, pv=polo vegetal, pa=polo animal. Barra de escala 625 μ m.

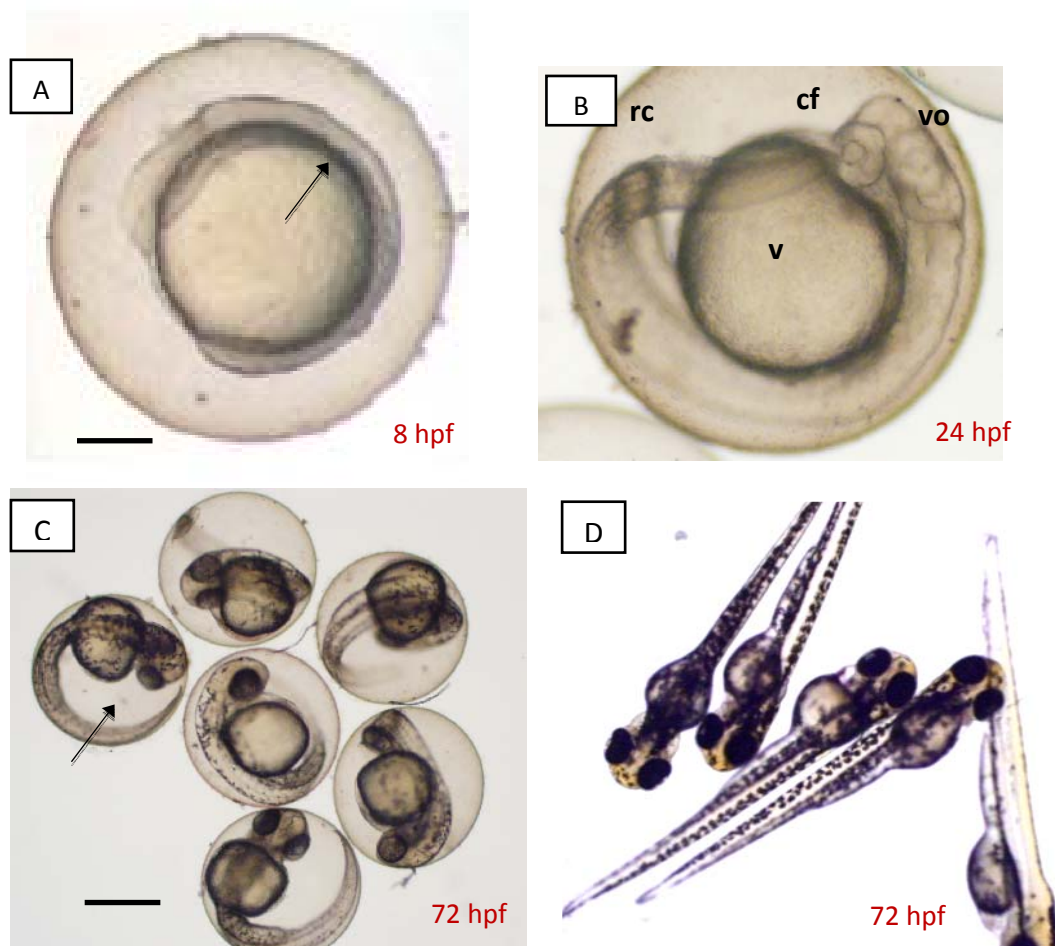


Fig. 16. Estadios tardios. A: larva en organogénesis temprana 8 hpf; B: larva 24 hpf con morfología visible. Barra de escala 625 μm ; C: Larvas dentro de la envoltura coriónica con pigmentación (Flecha) 72 hpf; D: Población larvaria liberada del corion 72 hpf. Barra de escala 250 μm .

6.3 Bioensayos de toxicidad aguda. Cálculo de las concentraciones letales cincuenta (CL_{50}) de cada uno de los extractos obtenidos.

La representación gráfica del % de mortalidad vs la concentración mg/mL (Fig. 17), nos permitió determinar el comportamiento sigmoideo de la respuesta tóxica de los distintos extractos. Se observa, que el porcentaje de mortalidad de las larvas, incrementa, de manera dependiente de las concentraciones empleadas con cada extracto. Así, a mayor concentración de los extractos, es mayor la mortalidad presentada. Cabe destacar que, tanto el extracto puro (Fig17A) con el cual como el extracto etanólico (Fig17B), presentan un comportamiento muy similar, alcanzando el 100 % de mortalidad a bajas concentraciones, aproximadamente entre el rango de 0,1 y 0,3 mg/mL. A diferencia del extracto acuoso, (Fig.17C) que si bien, presenta el mismo comportamiento sigmoideo, el 100% de mortalidad se alcanza a mayores concentraciones, alrededor de ± 1 mg/mL. Al relacionar los logaritmos de las dosis con los porcentajes de las respuestas de mortalidad expresadas en unidades Probit (Fig.18), se obtuvo una línea recta, que hace posible la comparación entre los extractos preparados. De esta manera la relación lineal Log concentración vs Unidades Probit, nos permitió estimar directamente los valores de CL_{50} de cada extracto utilizado. A partir de dicha recta obtuvimos un valor de $CL_{50} = 0,11$ mg/mL para el extracto puro (EP), un valor de $CL_{50} = 0,14$ mg/mL para el extracto etanólico y finalmente un valor de $CL_{50} = 0,47$ mg/mL para el extracto acuoso.

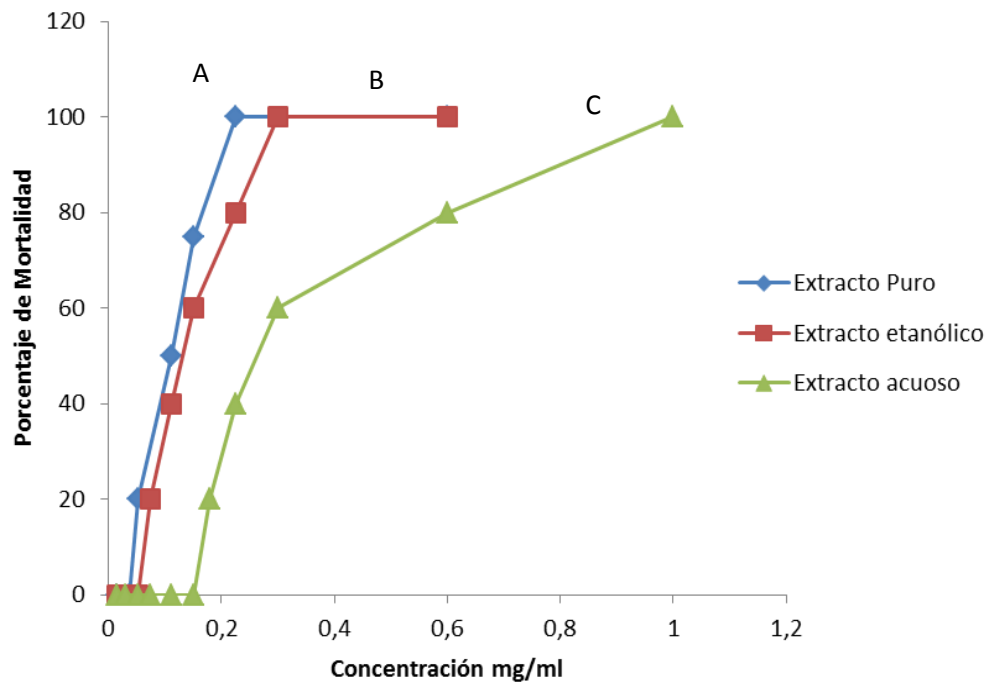


Fig. 17. Porcentaje de mortalidad de *Passiflora edulis f. flavicarpa* en EP (A), EE (B) y EA (C) en larvas de Pez Cebra 72 hpf bajo distintas concentraciones. Individuos por/concentración n=4, replicas n=3

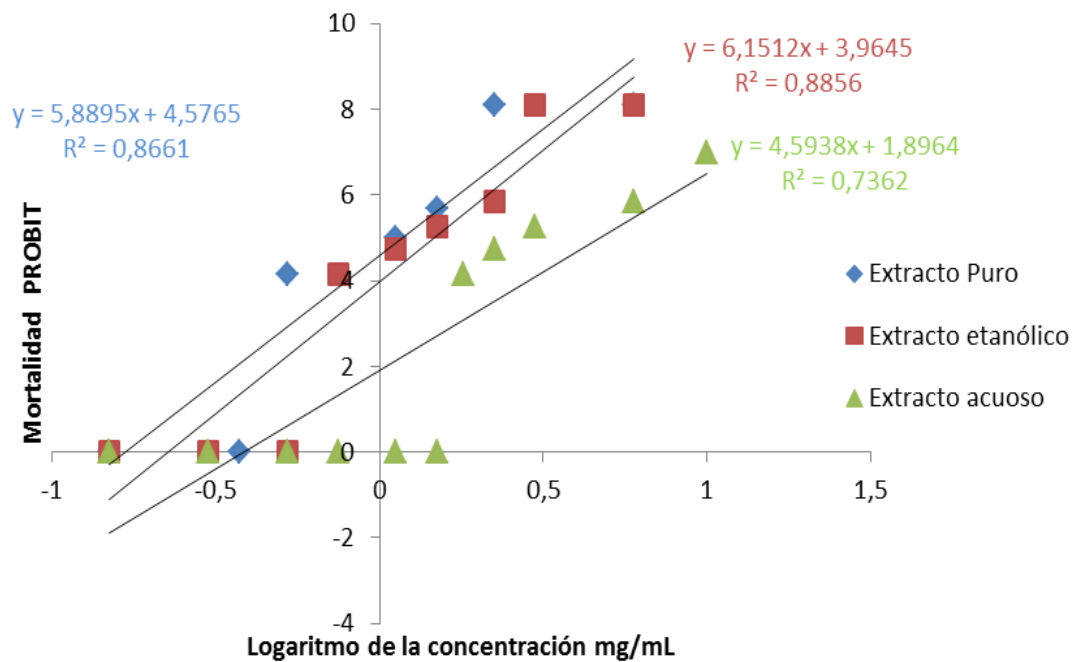


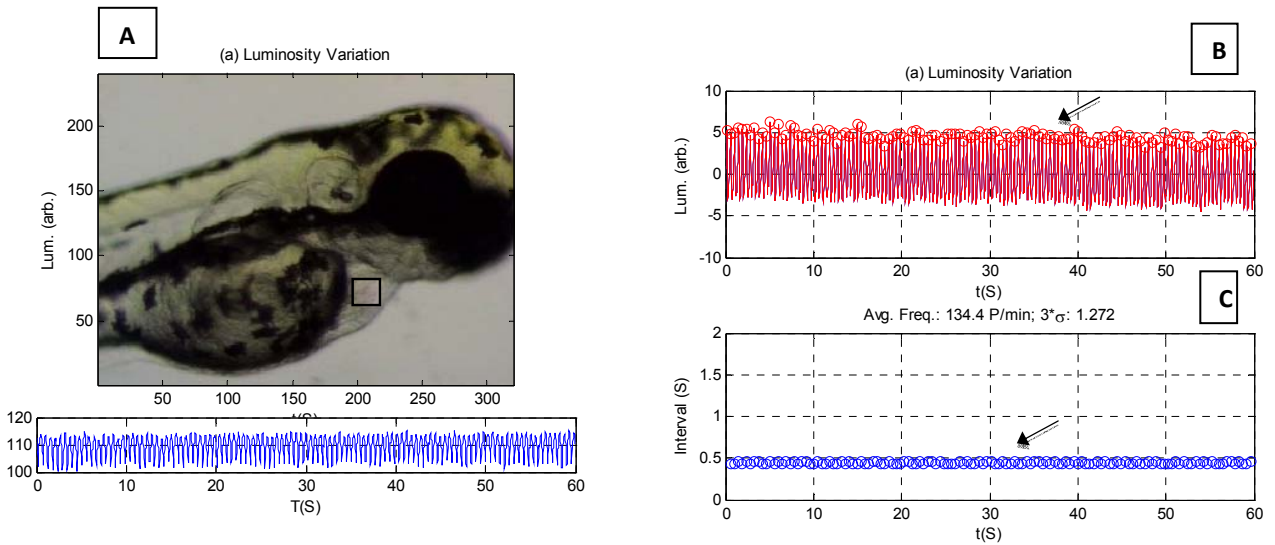
Fig. 18. Función lineal que relaciona el valor Probit de la mortalidad en larvas de Pez cebra 72 hpf contra los logaritmos de las concentraciones del Extracto puro, Extracto etanólico y extracto acuoso de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.

6.4 Determinación de la disfunción cardíaca de las larvas inducidas por los diferentes extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.

6.4.1 Cambios Funcionales. Análisis de la frecuencia cardíaca mediante VCG.

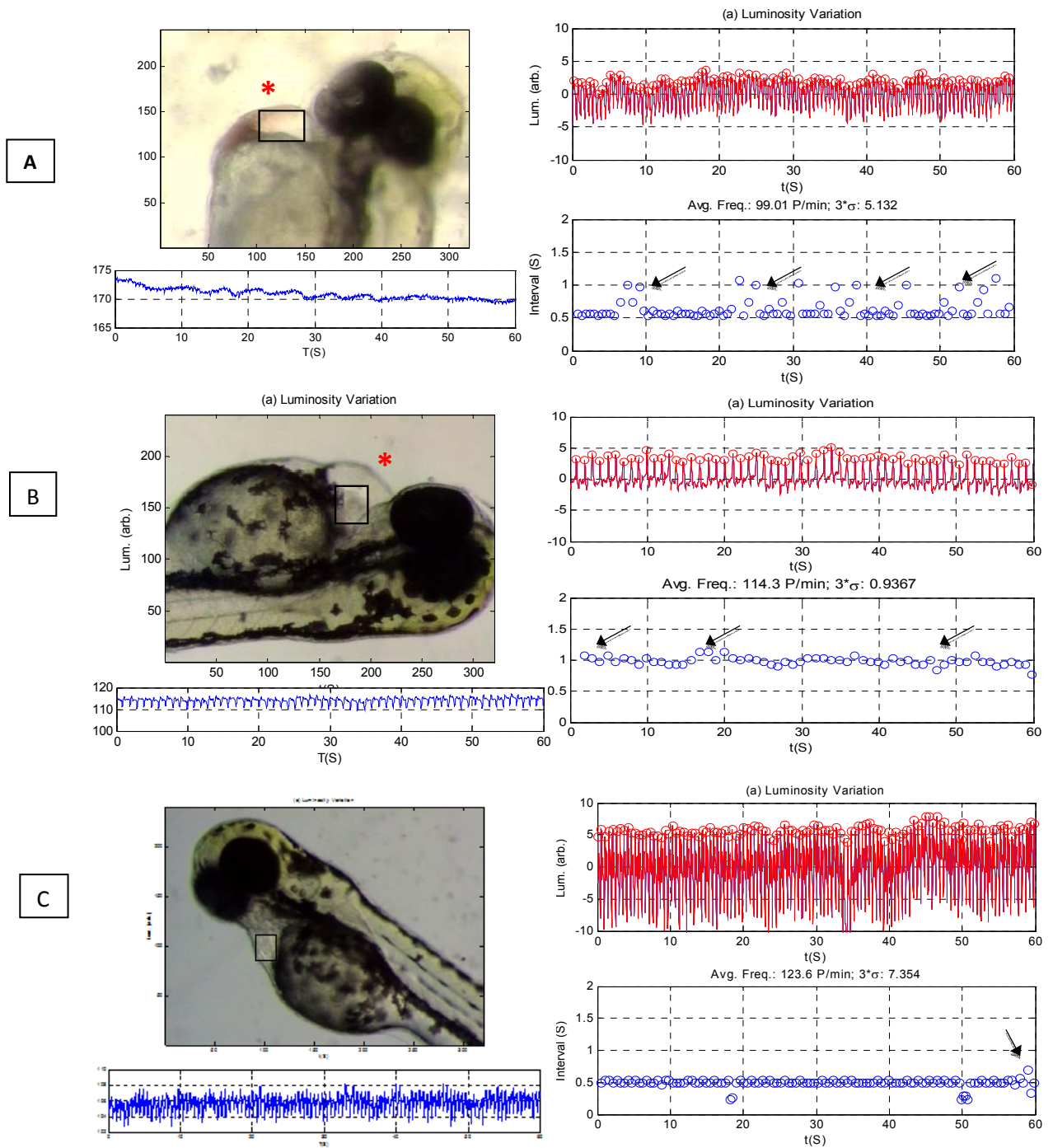
Para la determinación de los cambios funcionales se utilizó la CL_{50} estimada en los bioensayos para cada extracto. El uso del videocardiograma (VCG) nos permitió obtener cambios de frecuencias cardíaca, a través de la representación gráfica de variaciones de luminosidad en función del tiempo. Cabe destacar que la secuencia de puntos en rojo (flecha) (Fig.19B) corresponde a la variabilidad de luminosidad registrada que, a través del ajuste de luminosidad, nos permite estimar el valor de frecuencia cardíaca, representada en la línea azul de la gráfica (Fig.19C). En cuanto al control, se representa como una línea de puntos uniforme y homogénea, (flecha), cuya frecuencia cardíaca se encontró aproximadamente en 134,4 P/min. Dicha linealidad se perturba con los respectivos extractos EP, EE y EA, siendo este el indicativo de la variabilidad de la frecuencia cardíaca, encontrándose puntos de luminosidad fuera de la línea azul de ajuste (flechas) (Fig.20). La representación gráfica de dicha variabilidad de frecuencia cardíaca, nos indica una reducción de frecuencia cardíaca de 31,34 % para el EP con un valor aproximadamente de $99,01 \pm 5,13$ P/min, una reducción de 12,12% para el EE con un valor aproximadamente de $114,3 \pm 0.9367$ P/min y finalmente una reducción de 5,70 % para el EA con un valor aproximadamente de $123,6 \pm 7.354$ P/min (Fig.21). Se destaca la presencia de puntos hemorrágicos (*) (Fig.20A) en

larvas bajo tratamiento con extracto puro y presencia de edema pericárdico
(*)(Fig.20B) en larvas bajo tratamiento con extracto etanólico.



Antes (T_0)

Fig. 19. Larvas de 72 hpf. Control. **A:** Registro de VCG **B:** Luminosidad vs el tiempo **C:** Ajuste de la linealidad de los puntos obtenidos por el cambio de contraste de luz, obtención de valores promedio de la frecuencia cardiaca. N=60



CL₅₀ (T₆₀)

Fig. 20. Larvas de pez Cebra tratadas con EP (A), EE (B) y EA (C) de hojas *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Registros de luminosidad vs el tiempo, variación de la frecuencia cardiaca (flechas). Cambios morfológicos visibles en EP y EE (*)

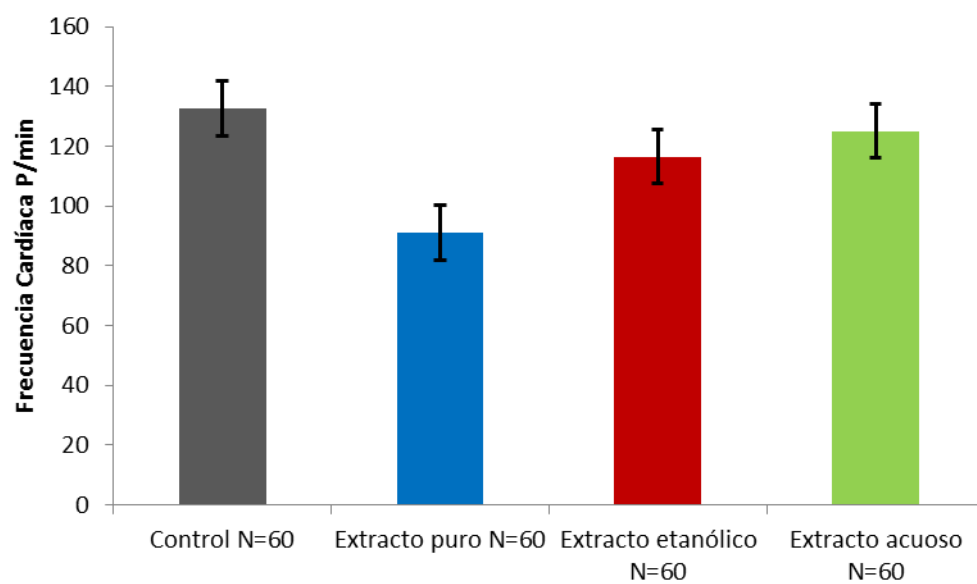


Fig 21. Media aritmética de la Frecuencia Cardíaca (p/min) N=60 obtenido para cada tratamiento con distintos extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.

6.4.2 Cambios estructurales. Análisis histológico

El análisis histológico de cortes seriados de larvas de pez cebra Controles (Fig.22A) y tratados con la CL₅₀ del extracto etanólico (Fig.22B), a 3 niveles de profundidad NI, NII y NIII, nos permitió identificar desde el nivel NI de corte (Fig.22.A1), la presencia del área cardiaca (recuadro), entre otras estructuras, tales como: notocorda, estructuras auditivas, estructuras cefálica (mioencéfalo). Al comparar, particularmente, el nivel NI de las larvas tratadas con la CL₅₀ del extracto etanólico (Fig. 22.B1), con el nivel de corte NI de la larva control, se pudo observar que el espacio de la cavidad pericárdica presentaba un ensanchamiento (*), correspondiente a las características estructurales del edema pericárdico. Dicho ensanchamiento o edema pericárdico, se pone en evidencia tanto en el nivel NII (*) como en el nivel NIII (*) en comparación a su ausencia con el nivel NII y el nivel NIII de las larvas control.

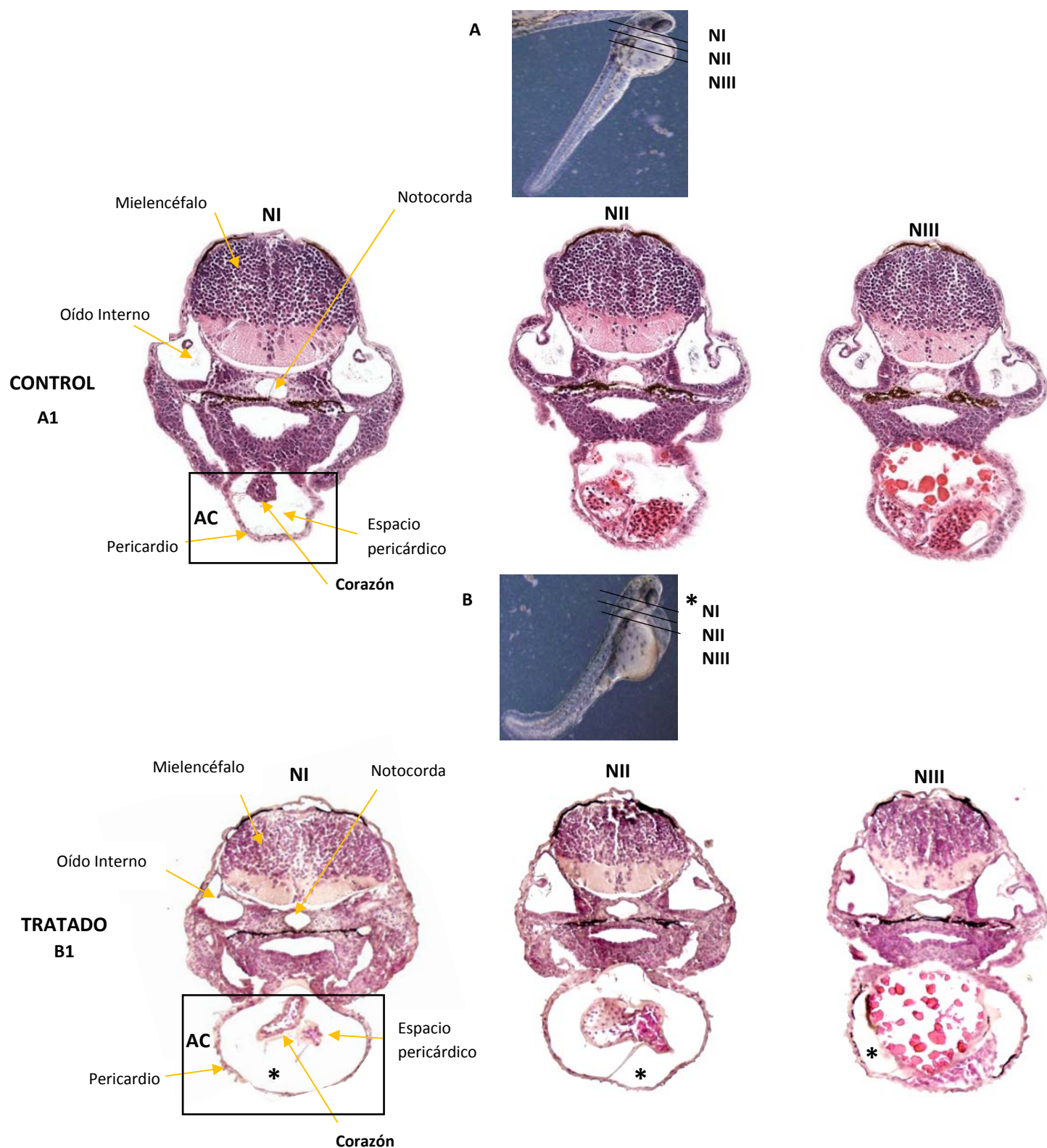


Fig. 22. Secuencia de cortes histológicos de larvas de pez cebra (*Danio rerio*) de 72 hpf. Controles y tratados con la CL₅₀ del extracto etanolico de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.(*) presencia de edema pericárdico 10X.

6.5. Efectos generalizados en larvas de 72 hpf tratados con los diferentes extractos

6.5.1 Cambios morfológicos

Para evidenciar los efectos generalizados inducidos por los respectivos tratamientos, se procedió a comparar poblaciones de larvas control y poblaciones larvarias tratadas luego de 1 hora con los distintos extractos. Dicha comparación, permitió identificar severos cambios a nivel de la estructura anatómica de las larvas, tanto en el extracto puro como en el extracto etanólico. Particularmente, al comparar la morfología corporal recta (flechas), en una población de larvas control (Fig.23A), con una población larvaria tratada con Cl_{50} de los extractos puro (Fig.23B), se observó que, la linealidad de la estructura anatómica adquiere una morfología corporal curva, definida como curvatura troncal (doble flecha). Paralelo a estos cambios, fue posible observar, a mayor aumento (Fig. 23C), la presencia de puntos hemorrágicos (doble flecha). Los cambios morfológicos descritos, pudieron ser semicuantitativamente expresados de manera diferencial respecto a cada extracto utilizado. Cabe destacar por ejemplo, una mayor presencia de los puntos hemorrágicos con los tratados con extracto puro en comparación con una menor presencia de estos, con los tratados con el extracto acuoso y extracto etanólico respectivamente (Tabla IV).

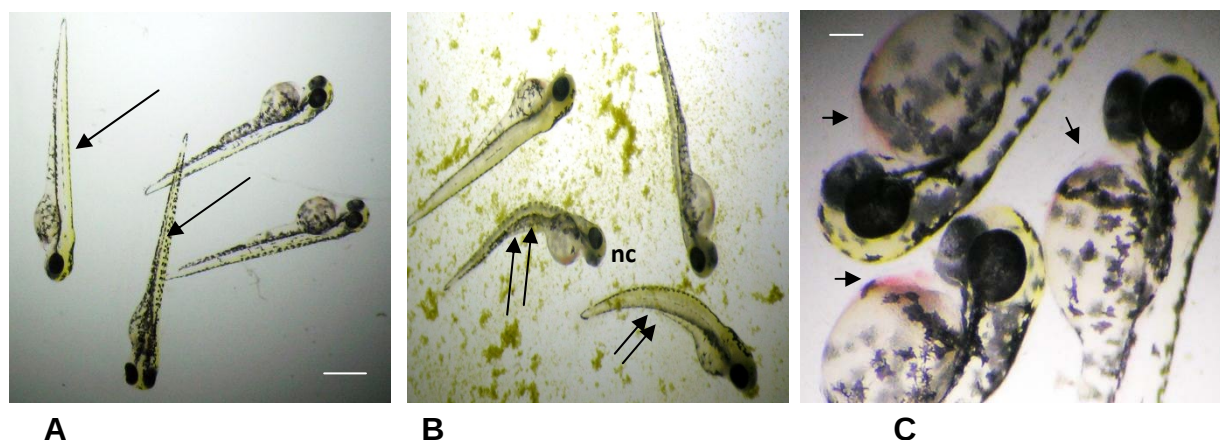


Fig. 23. Imágenes de larvas de 72 hpf. Características morfofuncionales de toxicidad que destacan la curvatura del tronco **B** (doble flecha), en larvas tratadas con extractos Puro de *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Barra de escala 250 μ m.

Puntos hemorrágicos en larvas tratadas con extracto puro **C**. Barra de escala 625 μ m.

ASPECTOS MORFOFUNCIONALES	Control	Extracto Puro (EP)	Extracto Acuoso (EA)	Extracto Etanólico (EE)
Tasa Cardíaca	++	+	+	+
Edema Pericárdico	-	+++++	+++	++++
Curvatura Troncal	-	+++++	+++	++++
Muerte Celular	-	+++++	+++	+++
Puntos hemorrágicos	-	+++++	+	+

Tabla IV. Representación semicuantitativa de los aspectos morfofuncionales de las poblaciones larvares controles y tratados bajo distintos extractos.

+: BAJA O ESCASA ++: NORMAL +++: MEDIA ++++: MEDIA ALTA +++++: MUY ALTA
N= 60 larvas por grupo tratado y control. Tomado de SPITSBERGEN, 2003.

5.5.2 Viabilidad Celular con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio: Microscopia de fluorescencia

El uso de marcadores fluorescentes como la naranja de acridina (NA) y el bromuro de etidio (BE), nos permitió poner en evidencia posibles indicadores del origen de algunos de los efectos generalizados descritos. Particularmente, las larvas controles incubadas con la solución NA/BE permitieron evidenciar, a nivel del extremo caudal de la larva, una mayor intensidad de fluorescencia verde (inset), indicativo de una mayor población de células vivas (Fig. 26A). A diferencia de larvas tratadas con la Cl_{50} del extracto etanólico, en donde se observa que la curvatura troncal del extremo caudal (flecha), esta acompañada por una reducción en la emisión de fluorescencia verde y un incremento en la emisión de la fluorescencia naranja indicativo de la población celular muerta (inset) (Fig. 26B).

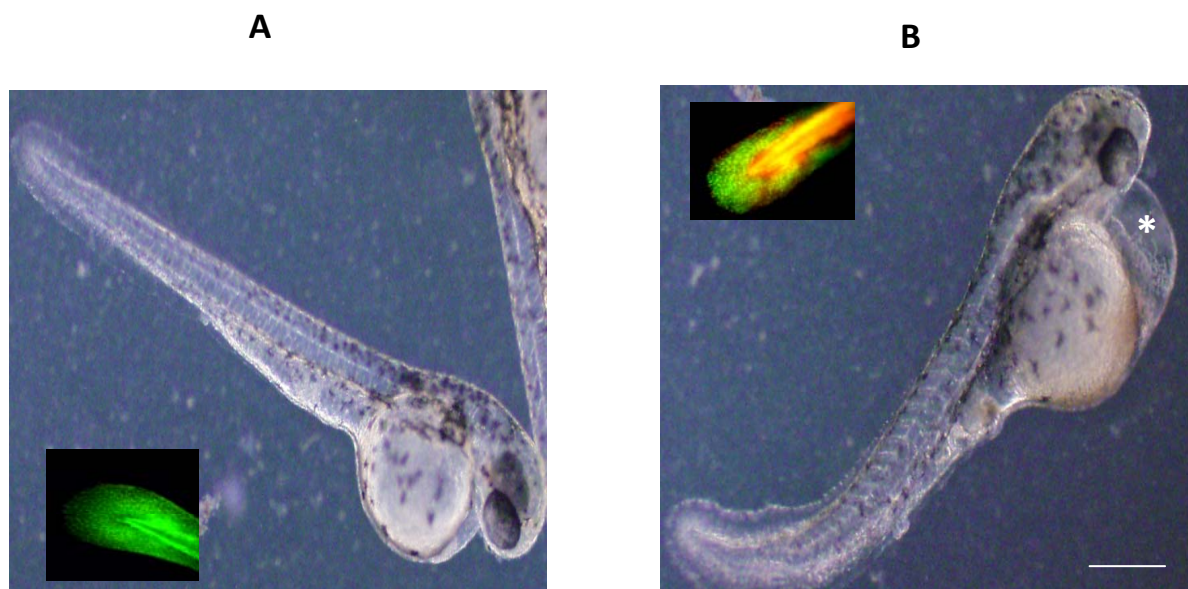


Fig. 24. Detección de muerte celular Naranja de acridina (NA) Bromuro de etidio (BE) en larvas controles (A) y tratadas con CL₅₀ del EE (B). Fluorescencia verde células vivas (inset), fluorescencia naranja células muertas (inset). (*) Edema pericárdico. Barra de escala 625 μ m, 40X.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, en la presente investigación, permitieron demostrar el efecto cardiotóxico, acompañado de cambios morfológicos generalizados, inducido por los distintos extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, en el modelo experimental larvario de Pez cebra (*Danio rerio*). El efecto cardiotóxico, fue caracterizado a través de la reducción de la frecuencia cardíaca ó efecto inotrópico negativo y a través de la presencia del edema de la cavidad pericárdica; ambos efectos evaluados, a través del monitoreo cardíaco y el análisis histológico respectivamente. Entre los cambios morfológicos generalizados, que acompañaron el efecto cardiotóxico, fueron descritos: la torsión troncal, la presencia de puntos hemorrágicos y la inducción de muerte celular; todos ellos determinados a través de las observaciones macroscópicas. Los resultados muestran también, la efectividad en el uso del estadio larvario de Pez cebra (*Danio rerio*), como modelo experimental para la caracterización de propiedades de toxicidad de fitoquímicos naturales con potencial terapéutico.

7.1.Obtención de extractos

En términos generales, la partición de los distintos componentes de las plantas, como sus hojas, sus frutos, su semilla entre otras, a objeto de identificar la naturaleza fitoquímica de las mismas, a través de métodos convencionales, ha permitido por años, obtener distintos extractos con características y acciones diferentes. Esto hace a los extractos estar disponibles para la investigación de

propiedades beneficiosas o no, en la búsqueda de fuentes terapéuticas en el reino vegetal.

Al respecto cabe destacar, que han sido varios los criterios, cualitativos y cuantitativos, que han permitido la caracterización y el establecimiento de diferencias, entre los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas de plantas con potenciales terapéuticos. Desde el punto de vista cualitativo, un gradiente de coloración, obtenido luego de la aplicación de técnicas convencionales de extracción, hace posible esta diferenciación. La misma, a través de inferir que los contenidos fitoquímicos, en las distintas fracciones obtenidas, podrían ser proporcional a la respectiva tonalidad; ya que como es sabido, el objetivo fundamental de los procedimientos estandarizados para la obtención de extractos, es alcanzar las proporciones adecuadas de los elementos activos con solventes selectivos (Sukhed y col, 2008). Desde el punto de vista cuantitativo, la aplicación de procedimientos de análisis químicos, particularmente procedimientos cromatograficos de alta y baja resolución, tales como la cromatografía de Gas-Masa, espectrofotometría de UV-visible, Fotocolorimetria, HPLC, entre otros, han permitido la identificación del tipo de elemento presente en las distintas fuentes de los extractos procesados. (Wohlmuth y col, 2010)

Particularmente, los extractos obtenidos en la presente investigación han sido ubicados dentro de un análisis cualitativo. Esto ha permitido, a través del gradiente de coloración verde obtenido, inferir sobre las diferencias en cuanto a contenido de elementos activos o no, presentes en los respectivos extractos procesados. El

extracto acuoso (EA) en nuestra investigación, presento un color verde claro. Al respecto, cabría destacar que dicha tonalidad pudiera ser la consecuencia de la ebullición a alta temperatura; en donde una fuga o pérdida de componentes activos, pudiera estar llevándose a cabo, rigiendo así las características fitoquímicas del producto final. En este caso, un producto final con deficiente contenido de elementos activos, debido a pérdida, destrucción o transformación, durante el proceso de extracción, lo cual permitiría interpretar el poco efecto sobre la frecuencia cardíaca expresado por el extracto acuoso. Por otra parte, el extracto etanólico (EE), presento un color verde intenso, probablemente como consecuencia de la concentración de elementos activos; acumulados en el solvente por un proceso de transferencia. Durante este proceso, los compuestos activos, provenientes de las hojas, se van incorporando al solvente con una escasa pérdida de los mismos (Handa y col, 2008). Esto permitiría interpretar el intenso color verde del extracto etanólico (EE) como un producto de alto contenido de principios activos, comparable a la tonalidad verde oscuro presentado en el extracto puro (EP), esto permitiría entender el mayor efecto inducido por estos extractos sobre la frecuencia cardíaca.

A pesar de no haber abordado, en nuestra experimentación aspectos cuantitativos, cabe destacar algunas investigaciones de los últimos años, las cuales han reportando la caracterización y el establecimiento de diferencias entre los extractos provenientes de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Deng y col, 2010). Particularmente, diferencias significativas entre los extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, en cuanto a la composición de compuestos flavonoides ha sido

descrita. Así, el extracto etanolico (EE) ha sido caracterizado por la presencia, en mayor abundancia, del compuesto flavonoide, Isoorientina (Fig.25), un flavonoide con un residuo β -D-glucosyl, en la posición del carbono 6. A diferencia del extracto acuoso (EA), en donde predomina el compuesto Lutiolina (Fig.26), un flavonoide carente del residuo β -D-glucosyl. La Lutiolina, no ha sido detectado en el EE (Coleta y col, 2006).

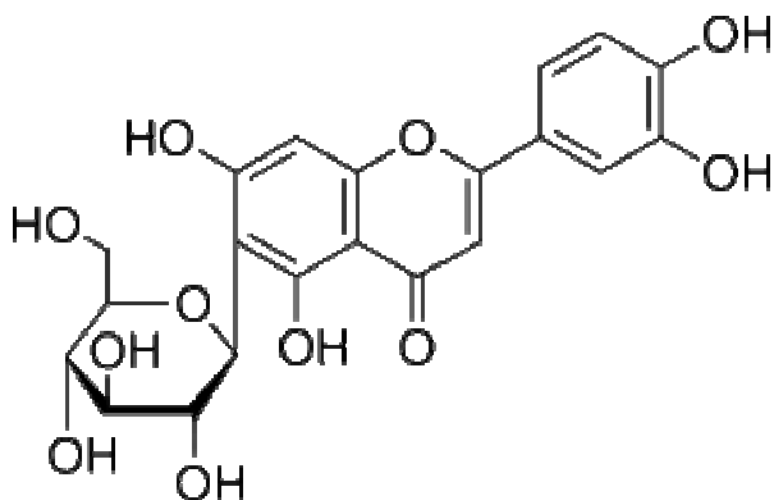


Fig. 25. Estructura química del Isoorientina

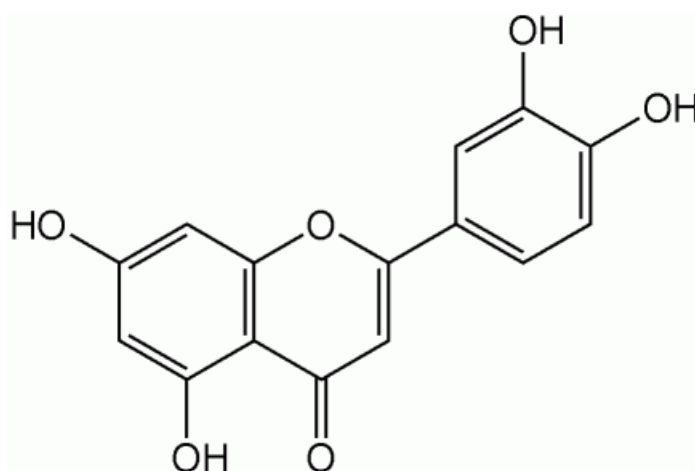


Fig. 26. Estructura química de Luteolina

En general, estudios fitoquímicos sobre la *Passiflora edulis*, han demostrado la presencia de glucósidos, entre ellos passiflorina, glucósidos flavonoides: luteolina-6-C-chinovoside, glucósidos cianógenicos; alcaloides: harmano y harmol; triterpenos y saponinas; fenoles, carotenoides antocianinas, ácido L-ascórbico, Y-lactonas, ésteres, aceites volátiles, eugenol, aminoácidos, carbohidratos y minerales entre otros compuestos (Dhawan y col, 2004). Respecto al EP, se ha sugerido además, la presencia de otros componentes tales como las saponinas, que le confieren un aspecto espumoso ha dicho extracto. Esta condición, pudiera estar contribuyendo, junto con otros componentes, a la alta mortalidad inducida como consecuencia del tratamiento con el extracto puro. Estas moléculas, han sido reportadas como responsable de efectos generalizados en larvas tratadas con dicho extracto (Deng y col, 2010)

De lo anteriormente expuesto, resulta evidente que los efectos observados sobre el modelo larvario de Pez cebra (*Danio rerio*), podrían ser interpretados como una consecuencia de la distinta composición de los diferentes extractos ensayados. Indudablemente como una consecuencia de la acción, de manera individual o en combinación, de los componentes fitoquímicos presentes en los respectivos extractos. A partir de aquí, nos surge la duda de especificar cual de todos estos constituyentes fitoquímicos, presente en los extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* pudieran ser los responsables de los efectos observados, ya que nuestra investigación no aportó datos suficientes para dilucidarlo.

7.2. Manejo de modelo larvario de Pez cebra (*Danio rerio*).

La descripción de métodos para reproducción del pez cebra (*Danio rerio*), ha involucrado procedimientos a grandes escalas, haciendo uso de espacios para gran cantidad de acuarios con distintas capacidades. Entre ellos acuarios 2, 30 y 100 litros de capacidad. Todos estos métodos requieren de mano de obra extensiva para su mantenimiento (Hill, 2001). En nuestra investigación, la aplicación de un método de baja escala, particularmente un solo acuario de 30 litros de capacidad, conteniendo de 15 a 20 peces machos y hembras adultos reproductores, nos permitió contar con una eficiente población de al menos 100 huevos fértiles/cada 20 peces cebra/3 veces por semana y una sobrevivencia mayor al 70%.

La alta producción de huevos fértiles, obtenida en las condiciones estudiadas, permitió sincronizar la puesta y recogida de los huevos embrionados, haciendo posible obtener y clasificar distintos estadios de desarrollo. Particularmente, fue posible identificar la presencia de estadios cigoto, estadios de clivaje celular, estadios de organogénesis (Kimmel y col, 1985; Gilbert, 2008). La dedicación de 2 horas/hombre, controlando la alimentación, la aplicación de estrictos ciclos de luz/oscuridad y sincronización, así como la limpieza del acuario para evitar la contaminación, garantizó la alta producción del número de huevos fertilizados obtenidos. Dichos resultados son similares a los reportados por otros autores (Rocha y col, 2002).

Con lo descrito hasta el momento, respecto a: 1) la identificación cualitativa de los extractos obtenidos y 2) el manejo eficiente en el modelo larvario de *Pez Cebra*, hemos podido dirigirnos hacia la determinación de la actividad biológica cardiotóxica y el conocimientos de los efectos generales producidos por los respectivos extractos. Así, la determinación de las concentraciones letales 50, el análisis de la disfuncionalidad cardiaca y los aspectos morfológicos de la misma lo han demostrado.

7.3. Determinación de la CL₅₀ de los extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.

La determinación de la CL₅₀ a través de la relación, mortalidad vs log de la concentración de los distintos extractos, así como de la transformación lineal de la misma, nos permitió predecir la toxicidad vinculada con las hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Cabe destacar, que la CL₅₀ para los extractos puro y etanólico, se ubico en un rango de concentraciones muy estrechas y similares para ambos extractos. A diferencia del extracto acuoso en donde se necesito una mayor concentración para desarrollar el efecto. Las pendientes correspondientes a la transformación lineal nos permite entonces, predecir la toxicidad de las hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa* en función de un gradiente de toxicidad presente en sus hojas, así queda demostrado que la toxicidad del extracto puro es mayor o igual a la toxicidad del extracto etanólico, y esta mayor a la toxicidad del extracto acuoso (EP≥EE>EA). Esta diferencia, en la potencialidad tóxica de cada una de

las fracciones, nos revela la distinta naturaleza fitoquímica de cada extracto utilizado.

7. 4. Disfunción cardíaca y efectos generalizados inducidos por los diferentes extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.

7.4.1 Disfunción Cardíaca

En cuanto a la disfuncionalidad cardíaca reportada en la presente investigación, la misma debe ser interpretada como un cambio en la función de la actividad del corazón. Dicho cambio, ha sido caracterizado por la reducción de la frecuencia cardíaca o fenómeno inotrópico negativo, acompañado por cambios morfológicos, tal como la generación del edema pericárdico. Cabe destacar, que la actividad del corazón, se encuentra sometido a la regulación por factores extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos, como es sabido, ejercen su función de regulación a través de vías de señalización, definidas por la división simpática y parasimpática del sistema nervioso central. Esto, a través de moléculas químicas tales como las hormonas. Mientras que los factores reguladores intrínsecos como la actividad de marcapaso, se encuentran regulados por la modificación de las estructuras tisulares y celulares que conforman el corazón, entre ellos el músculo cardíaco ventricular, músculo cardíaco auricular, endocardio, epicardio, pericardio, entre otros. Es de hacer notar, que el estadio de desarrollo seleccionado en nuestra investigación no cumple con la estructura anatomofuncional de las vías estimuladoras extrínsecas, es decir, la comunicación entre el corazón y el SNC, a través de las vías simpáticas y parasimpáticas, no se

encuentran aun establecidas (Schwerte y col, 2006) . Esta característica del modelo de pez Cebra utilizado, encontrado también en otros modelos experimentales, tales como el embrión de pollo en estadios tempranos de desarrollo, nos permite pensar que el efecto observado de la disminución de la frecuencia cardiaca inducido por los distintos extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* no sea una consecuencia de las vías de regulación del Sistema Nervioso, sino una acción directa sobre la estructura tisular o celular que conforma el corazón.

Este planteamiento, se encuentra apoyado por el fenómeno anatómico registrado, interpretado como el edema pericárdico, en el cual se visualiza un aumento de la cavidad pericárdica que rodea al corazón. Dicho fenómeno nos recuerda el proceso de vasodilatación, en el cual la capacidad de dilatación de las arterias y venas, puede estar mediada a través de diversos estímulos tanto extrínsecos como intrínsecos. La vasodilatación, es un fenómeno mayormente independiente del endotelio. Sin embargo, algunos estímulos mediados a través sustancias externas como agentes químicos, lo convierten a un proceso dependiente del endotelio (Huang y col, 1999). Dentro de estas sustancias químicas que hacen del proceso de vasodilatación un evento dependiente del endotelio, se encuentra los denominados polifenoles, especialmente los flavonoides (Duffy y col, 2001; Álvares y Orallo, 2003; Mladenka y col, 2010). Algunos flavonoides, presentes en extractos y en zumos relacionados con el vino, tienen un efecto dilatador, dependiente del endotelio *In vivo* (Tenorio y col 2006). A pesar de la reconocida acción vasodilatadora de los flavonoides el o los posibles

mecanismos vinculados con dicho fenómeno, no se encuentran claramente establecido. Sin embargo, cabe destacar, que la ruta del óxido nítrico (ON), por estimulación de la síntesis de este, o por reducción de la degradación del mismo, ha hecho pensar que sea esta vía, un mecanismo probable en la vasodilatación dependiente del endotelio. En modelos experimentales, como aorta de rata (Benito y col, 2002) y la arteria coronaria porcina (Tauber y col, 2002), ha sido comunicado que el incremento de la luteolina, promueve la Oxidativa Nítrica Sintetasa (ONS) endotelial, así como la expresión del ARNm de esta enzima, con un consecuente incremento del ON y por tanto un efecto vasodilatador dependiente del endotelio. En cuanto a la actividad vascular del ON, en el modelo experimental de Pez cebra (Fig.27). , ha sido demostrado, a través de la inmunoreactividad de la (ONS) en las células endoteliales de la vena dorsal y en el corazón, que la vasculatura arterial y la vasculatura venosa, son influenciados por la producción endógena de ON en larvas entre los 5 y 6 días del desarrollo embrionario (Fritsche y col, 2000). La presencia de dicho mecanismo en nuestro modelo experimental, nos conlleva a interpretar nuestros resultados de cardiotoxicidad a través de eventos de regulación llevado a cabo como consecuencia de esta vía, en donde los componentes fitoquímicos presentes en cada uno de los extractos utilizados, pudieran estar siendo reconocidos por las diferentes proteínas hasta ahora no identificadas, presentes en el tejido endotelial de las larvas de pez cebra. El reconocimiento activaría rutas bioquímicas para la producción endógena del ON en el tejido endotelial, promoviendo de esta manera , la disminución de frecuencia cardíaca observada, posiblemente por el bloqueo de los canales de Ca^{2+} vinculada

a la posible acción de los flavonoides presentes (Nolf y col, 2003), sin embargo, habría que tomar en cuenta que un exceso en la producción de ON, pudiera permitir un shock circulatorio, debido a una anormal vasodilatación de la vasculatura sistémica (Fritsche y col, 2000), la presencia de puntos de cuagulación y hemorrágicos, reportados en el presente trabajo, nos sugiere un tipo Shock circulatorio, que pudiera estar explicando una vasodilatación anormal y así la acción tóxica conducente a la muerte de población larvaria (Fig.28). Futuras investigaciones tratados con los distintos extractos de *Pasiflora edulis f. flavicarpa* serán necesaria para corroborar la acción de la vía del ON u otros posibles mecanismos responsables de la acción tóxica vinculadas con el consumo de esta planta.

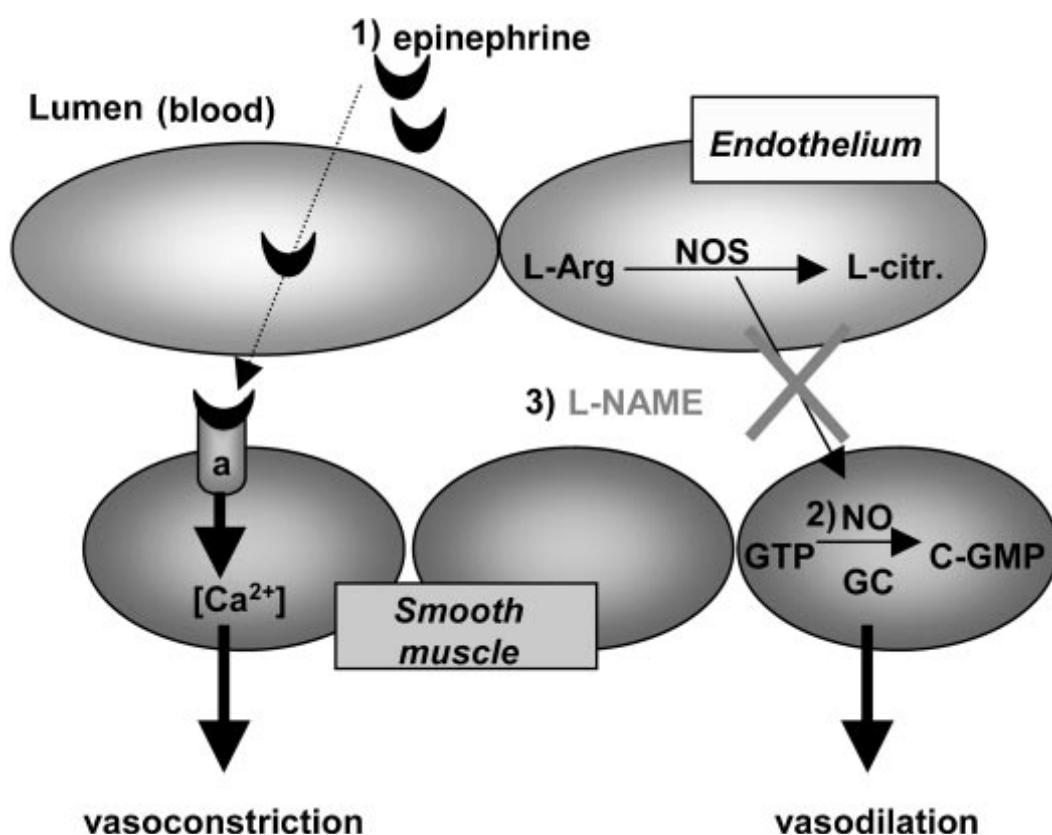


Fig. 27. Esquema que muestra el posible mecanismo de acción de ON y epinefrina sobre el tejido endotelial de las larvas de pez cebra 72 hpf, antes de la inervación funcional del sistema vascular periférico. Tomado de Fritsche y col, 2000.

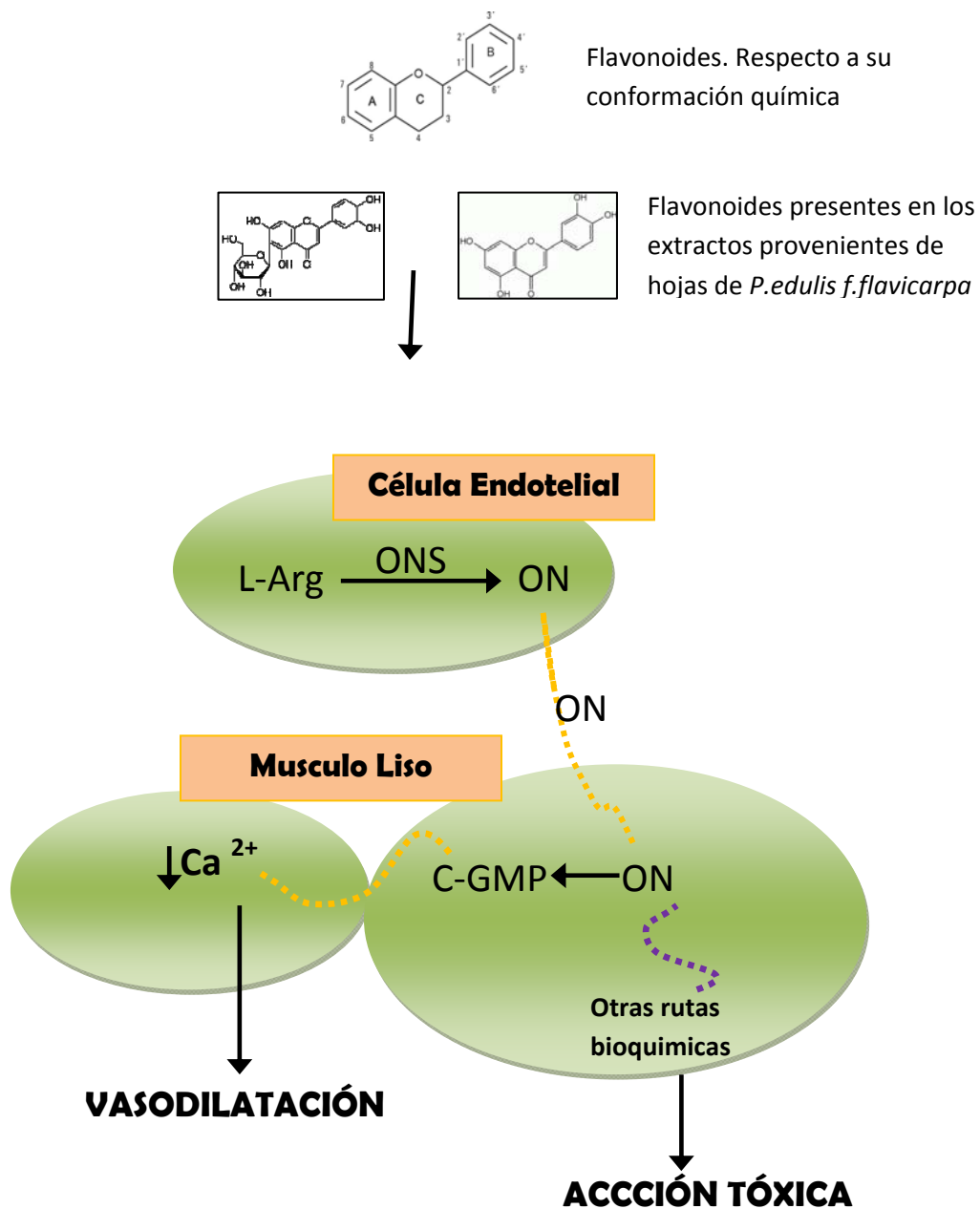


Fig. 28. Esquema propuesto que muestra la posible vía de acción de los extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, dependiente de los fitocompuestos, sobre el musculo cardiaco de larvas de pez cebrá. Formación de ON y Vasodilatación - - - - . Formación en exceso de ON y acción tóxica. - - - - (Cornejo, M, 2012).

8 CONCLUSIONES

- En análisis cuantitativo, en base al gradiente de coloración, sobre los extractos obtenidos de hojas frescas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, permitió inferir sobre las diferencias en cuanto al contenido en mayor o menor grado, de compuestos activos presentes o no de los extractos procesados.
- La aplicación de un modelo de baja escala, para la reproducción de pez cebrá, permitió contar con una eficiente población para la realización de los diferentes bioensayos.
- Los extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa*, promueven una acción cardiotóxica, vinculada con un efecto inotrópico negativo y alteración morfológica como la producción de edema pericárdico.
- La cardiotoxicidad inducida por extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* pudiera estar mediada por la capacidad vasodilatadora presentes en los extractos utilizados.

- Los extractos utilizados inducen además cambios generalizados vinculados posiblemente, con la activación de muerte celular tipo apoptosis-

9 RECOMEDACIONES

- Se recomienda profundizar, de manera experimental en el pez cebra, sobre los mecanismos de cardiotoxicidad, posiblemente promovidos por la ruta de Oxido Nítrico y estimulados por los fitoquímicos, presente en los distintos extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* a ser utilizados.
- Se recomienda profundizar sobre los mecanismos de muerte celular tipo apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica, entre otros, que puedan ser promovidos por la naturaleza fitoquímica de los distintos extractos de hojas de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.
- Se recomienda el uso del Pez Cebra (*Danio rerio*), como modelo experimental para cualquier ámbito de la investigación actual, debido a todas las ventajas que posee este nuevo modelo experimental.
- Se recomienda abrir espacios de divulgación, respecto al uso indiscriminado de la Medicina herbaria, respetando el principio ancestral del uso de las plantas como control individual y grupal de la salud.

10 BIBLIOGRAFIA

1. Achike F., Kwan C. 2003. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signally pathway. *Clinic.Exp. Pharmac.Physiol.* **30**: 605-615.
2. Alfaro J., Prades A., Ramos C., Peris E., Ripoll-Gómez J., Poyatos M., Burgos J. 2010. Biomedical Properties of a Series of Ruthenium-N-Heterocyclic Carbene Complexes base don Oxidant Activity *In Vitro* and assessment *In Vivo* of Biosafety in zebrafish Embryos. *ZEBRAFISH* **7**: 13-21.
3. Álvarez E. y Orallo F. 2003. Actividad Biológica de los flavonoides (II) Acción cardiovascular y sanguínea. *Bioquímica.* **22** 11:102-110
4. Andersen L., Holbeach H., Gessbo A., Norrgren L. and Petersen G. 2003. Effects of exposure to 17alpha-ethinylestradiol during early development (*Danio rerio*). *Comp. biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **134**: 365-374.

5. Antkiewicz D., Geoffrey C., Carney S., Peterson R., Heideman W. 2005. Heart Malformation Is an Early Response to TCDD in Embryonic Zebrafish. *Toxicol. Scien.* **84**: 368-377.
6. Barrett J. 2005. A Center of a Different Stripe. *Environmental Health Perspectives.* **113**:160-162
7. Barros, T.P. , Alderton W., Reynolds H., Roach A., Berghmans S. 2008. Zebrafish: an emerging technology for *in vivo* pharmacological assessment to identify potencial safety liabilities in early drug discovery. *Br J Pharmacol* **154**: 1400-1413.
8. Benito S., Lopez D., Saiz M., Buxaderas S., Sanchez J., PuigParellada P. 2002. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Brit J Pharmacology.* **135**:910-916.
9. Blader P., Strahlu U. 1998. Ethanol impairs migration of the prechordial plate in the zebrafish embryo. *Dev. Biol* **201**: 185-201.
10. Boeira J., Fenner R., Betti A., Provensi G., Lacerda L., Barbosa P., Gonzáles F. y col. 2010. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). *J ethnopharmacol.* **128**: 526-532.
11. Brant M., Heisenberg CP, Warga RM. 1996. Mutations affecting developmental of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development.* **123**:129-142

12. Carballo M., Cortada C., Gadano A. 2005. Riesgos y Beneficiosos en el consumo de plantas medicinales. *Theoria*. **14**: 95-108.
13. Castro I., Alvarado S., Alvarez M. 2011. Efectos de la infusión de higuera (*Ficus carica*) sobre la depresión neonatal en ratas. *Vitae* **46**: 1-4
14. Chang, P.K. y Cheng, S.H 2003. Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos. *Arch. Toxicol.* **77**: 69-79.
15. Cheng J., Carney S., Peterson R., Heldeman W. 2008. Comparative genomic identifies genes mediating cardiotoxicity in the embryonic zebrafish Herat. *Physiol.Genomics*. **33**: 148-158.
16. Cole L., Ross L. 2002. Apoptosis in the Developing Zebrafish Embryo. *Developmental Biology*. **240**: 123-142.
17. Coleta, M., Batista, M., Campos, M., Carvalho, R., Cotrim, M., De Lima, T., Cunha, A. 2006. Neuropharmacological Evaluation of the Putative Anxiolytic Effects of *Passiflora edulis Sims*, its sub-fractions and Flavonoid Constituents. *Phyto. Resear.* **20**:1069-1073.
18. Deng Jun, Zhou Y, Bai M, Li H, Li li. 2010. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*. **128**: 148-153
19. Desmarchelier C., Witting F., 2000. Setenta Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana. *Gráfica Bellido* **1** 187-190.

20. Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou M.M. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**:491-496.
21. Dhawan, K., Dhawan, S., Sharma, A. 2004. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*. **94**:1-23.
22. Drapeau C y Drapeau P. Zebrafish make it to Hollywood 2012. *Zebrafish* **9**: 149.
23. Duffy, S.J., Keaney, JF., Holbrook, M.m Gokce, N., Swerdloff, PL, Frei, B., Vita, JA. 2001. Short-and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery. *Dis Circulation*. **104**: 151-156.
24. D'Amico L., Seng W., Yang Y., Suter W., McGrath P. 2006. Assessment of Drug-Induced Cardiotoxicity in Zebrafish. *Neuro toxicol Teratol* **28**:509-516.
25. Fisher A., Purcell P., Le Couteur D. 2000. Toxicity of *Passiflora incarnate* L. *J Toxicol Clin Toxicol* **38**: 63-66.
26. Fritsche R., Schwerte T., Pelster B. 2000. Nitric oxide and vascular reactivity in developing zebrafish, *Danio rerio*. *Am J Physiol Regul Inter Comp* **279**: 2200-2207.
27. García C., Martínez A., Ortega J., Castro F. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva* **2**: 1-8

- 28.** García Peña C., Kim Bich N., BichThu N., Tillan J., Romero J., López D., Moreno V. 2009. Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passifloraincaranata* L., *Matricaria recutita* L. y *Morindacitrifolia* L. *Cub. Plant. Medic.* **14** : 1-7.
- 29.** Gil-Criado A., Muñiz M. 1978. Nuevas transformaciones en experimentos biológicos basados en la respuesta cuantitativa. *Bol. Ser. Plagas* **4**: 89-229.
- 30.** Gilbert S. 2008. *Biología del Desarrollo*. Editorial Medica Panamericana, 7ma. Montevideo, Uruguay.
- 31.** Ham T., Mapes J., Kokel D., Petterson R. 2010. Live imaging of apoptotic cells in zebrafish. *The FASEB Journal*. **24**: 4336-4342.
- 32.** Handa S., Khanuja S., Longo G., Rakesh D. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. ICS-Unido. 1ra. Italia.
- 33.** Henry Tr., Spitsvergen J., Hornung M., Abnet C. 1997. Early life stage toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**: 56-68
- 34.** Hill A., Howars C., Cossins A. 2001. Efficient embedding technique for preparing small specimens for stereological volume estimation: zebrafish larvae. *Journal of Microscopy* **206**: 179-181.
- 35.** Hill A., Teraoka H., Heideman W., Peterson R. 2005. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicology. *Logic. Scienc* **86**:6-19.

36. Hu N., Sedmera D., Yost H., Clark E. 2000. Structure and Function of the Developing Zebrafish Heart. *THE ANATOMICAL RECORD* **260**: 148-157.
37. Huang, Y., Chan, NW., Lau, CW., Yao, XQ., Chang, FL., Chen, ZY. 1999. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-) epicatechin. *Biochim Biophys* **1427**: 322-328.
38. Kang J. 2001. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiotoxicity. *Environmental Health Perspectives* **109**: 27-34.
39. Kari G., Rodeck U., Dicher AP. 2007. Zebrafish: An emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. *CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* **82** : 70-80.
40. Katzung B. 1987. Farmacología Básica y Clínica. Editorial el manual moderno **12**: 143-156.
41. Kikuchi K., Holdway J., Werdich A., Anderson R., Fang Y., Egnaczyk G., Evans T., MacRae C., Stainier D. 2010. Primary contribution to zebrafish regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* **464**:601-606
42. Kimmel C., Ballard W., Kimmel S., Ullmann B. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Develop. Dynami.* **203**:253-310
43. Leong U., Skinner J., Shelling A., Love D. 2010. Zebrafish as a model for long QT syndrome: the evidence and the means of manipulating zebrafish gene expression. *Acta Physiol.* **199**: 257-276.

44. Litter M. 1985. Farmacologia Experimental y Clinica. 7ma edición Editorial El Ateneo.
45. Mladenka P., Zatloukalová L., Filipšková T., Hrdina R. 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology* **49**: 963-975
46. Matute Mirtha. 2006. Aislamiento y caracterización de los flavonoides presentes en el extracto etanólico de la especie *Parinari sprucei*. Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela.
47. Maldonado E. 2003. Experimentación en el pez-cebra, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje Bioquímico*. **XXVII**:147-156.
48. Major R., Poss K. 2007. Zebrafish Heart Regeneration as a Model for Cardiac Tissue Repair. *Drug. Discov. Today Dis. Models*. **4**: 219-225.
49. McKinley Et., Baranowski Tc. Blavo Do, Cato C., Doan TN. 2005. Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Brain Res. Mol Brain Res*. **141**: 128-137.
50. Milan DJ, Petersen TA, Ruskin JN, Peterson RT, Macrae CA 2003. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation* **107**:1355-1358.
51. Muñoz Járegui A., Ramos-Escudero F., Alvarado-Ortiz C., Castañeda B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de

compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *RevsocQuím Perú*. **73**: 142-149.

- 52.**Nolf C, Venturini L, Valentim D. 2003. Vasorelaxant effects of eugenol on thoracic aorta. *Vascular Pharmacol.* **40**:59-66
- 53.** Nüsstein-Volhard C, Dahm R. 2002. Zebrafish: A Practical Approach. Oxford University Press. Primera Edición. Londres, Inglaterra.
- 54.**Parng C., Anderson N., Ton C., McGratha P. 2004. Zebrafish Apoptosis Assays for Drug Discovery. *Methods in cell biology* **76**: 75-85.
- 55.**Parng C., Seng WL., Semino C and McGrath P. 2002. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and Drug Development Technologies* **1**: 41-48.
- 56.**Peterson R., Link B., Dowling J., Schreiber S. 2000. Small molecules developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **97**:12965-12969.
- 57.**Peterson R. Mabley J., Chen J., Fishman M. 2001. Convergence of distinct pathways to heart patterning revealed by the small molecule concentramide and the mutation heart-and-soul. *Curr. Biol.* **11**: 1481-1491.
- 58.**Rana N., Moond M., Martini A., Bapatla S., Savepalli T., Chatti K. and Challa A. 2010. Caffeine-Induced Effects on Hearts Rate in Zebrafish Embryos and Possible Mechanisms of Action: An Effective System for Experiments in Chemical Biology. *ZEBRAFISH* **7**: 69-75

- 59.** Rocha A., Ruiz S., J.M. Coll. 2002. Método sencillo para producir huevos embrionarios de pez cebra. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* **17**:1-2
- 60.** Rojas Juan. 2009 Estudio preclínico y clínico de la seguridad y actividad antihipertensiva de *Passiflora edulis* Sims (maracuyá). Tesis Doctoral. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú
- 61.** Rojas-Muñoz, A., BernadMiana A., Izpisúa Belmonte J. 2007. El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y Ciencia*. 62-69.
- 62.** Rojas J., Ronceros S., Palomino R., Tomás G., Chenguayen J. 2006. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y el extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), en ratas. *AnFac Med Lima*. **67**: 206-213.
- 63.** Rodríguez-Fragoso L., Reyes- Esparza J., Scott B., Herrera D., Torres E. 2008. Risk and Benefis of Commonly used Herbal Medicines In México. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **227**:125-135
- 64.** Romero A., Doval M., Sturla M., Judis M. 2003. Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. *Comunic. Científ. Tecno. Universidad Nacional del Nordeste*.
- 65.** Rubistein A. 2006. Zebrafish assay for drug toxicity screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**: 231-240.

66. Santosh P., Venugopl R., Nilakash A., Kunjbihari S., Mangala Dr. 2011. Antidepressant activity of methanolic extrac of *Passiflora Foetida* leaves in mice. *Interna. Jour. Pharmacy Pharmace. Scien.* **3**: 112-115.
67. Schwerte T., Prem., Mairosi A., Pelster B. (2006). 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* **209**: 1093-1100
68. Seigler D., Pauli G., Nahrstedt A., Leen R. 2002. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry* **60**: 873-882.
69. Sequera D., Ercolino J., Álvarez M. 2010. Embrión de Pollo: Un modelo con cardiovideograma para el estudio de la toxicidad experimental inducida por *Thevetia peruviana*. *Revis. Toxicolo. en línea.* 37-48
70. Sena L., Zucolotto S., Reginatto F., Schenkel E., Monteiro T. 2009. Neuropharmacological Activity of the Pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: Putative Involvement of C-Glycosylflavonoids. *Experi. Biology Medic.* **234**:967-975
71. Sisma T. 2010. Dichlorvos-induced developmental toxicity in Zebrafish. *Toxicol. Indust. I Health.* **26**: 567-573.

72. Spitsbergen J., Kent M., 2003. The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research- Advantages and Current Limitations. *Toxicol. Patholo.* **31**: 62-87.
73. Solbakken A.M., Rorbakken G., Gundersen T. 1997. Nature medicine as intoxicant. *TidsskrNor Laegeforen.* **117**:1140-1141.
74. Sukhdev H., Suman K., Gennaro L., Dev Dutt R. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for science and high technology. 1ra edición. Italia.
75. Sullivan J., Bisher M., Burdine R. 2011. Embedding, serial sectioning and staining of zebrafish embryos using JB-4 resin. *Nature Protocols* **6**: 46-55.
76. Sunitha M., Devaki K., 2009. Antioxidant Activity of *Passiflora edulis Sims* Leaves. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* **71**: 307-310
77. Taubert D., Berkels R., Klaus W., Roesen R. 2002. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: Essential structural features. *J Cardiovascular Pharmacology.* **40**:701-713.
78. Tenorio F., Mondragón L., Pastelín G. 2006. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica?. *Arch Cardiol Mex.* **76**: 33-45
79. Usenko C., Harper S., Tanguay R. 2008. *In vivo* evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon N Y.* **45**: 1891-1898

80. Weinstein B., Fishman M. 1996. Cardiovascular morphogenesis in zebrafish. *Cardiovascular Research* **31**:17-24.
81. Wixon Jo. 2000. Daniorerio, the zebrafish. *Yeast*. **17**: 225-231.
82. Wohlmuth H., Penman K., Pearson T., Lehmann R. 2010. Pharmacognosy and Chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnate* L). *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 1015-1018.
83. Yuldasheva L., Carvalho E., Catanho M., Krasilnikov O. 2005. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangulares* leaves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**: 1061-1070.
84. Yu F., Huang J., Adlerz K., Jadvar H., Hamdan M., Chi N., Chen Jau., Hsiai T. 2010. Evolving Cardiac Conduction Phenotypes in Developing Zebrafish Larvae: Implications to Drug Sensitivity. *Zebrafish*. **7**:325-331.
85. Zeraik M.L., Yariwake J.H. 2010. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp. *Microchemical Journal* **96**: 86-91

Recurso electrónico sin autor:

<http://www.escuelaavicena.com.ar/pdf/maracuya-alternativa-fitomedicamento.pdf> [Consulta: 10 de diciembre de 2011]

<http://www.fbioyf.unr.edu.ar/ricifa/Resumenes2010/Farmacognosia/COMUNELLO.pdf>.
[Consulta: 10 de enero de 2012].

9. APÉNDICES

9.1. Tabla Probit. Equivalencia entre el % de Mortalidad y las unidades Probit.

Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%
0	0	3,72	10	4,16	20	4,48	30	4,75	40	5,00	50	5,25	60	5,52	70	5,84	80	6,28	90	7,33	99,0
2,67	1	3,77	11	4,19	21	4,50	31	4,77	41	5,03	51	5,28	61	5,55	71	5,88	81	6,34	91	7,37	99,1
2,95	2	3,82	12	4,23	22	4,53	32	4,80	42	5,05	52	5,31	62	5,58	72	5,92	82	6,41	92	7,41	99,2
3,12	3	3,87	13	4,26	23	4,56	33	4,82	43	5,08	53	5,33	63	5,61	73	5,96	83	6,48	93	7,46	99,3
3,25	4	3,92	14	4,29	24	4,59	34	4,85	44	5,10	54	5,36	64	5,64	74	5,99	84	6,55	94	7,51	99,4
3,36	5	3,96	15	4,33	25	4,61	35	4,87	45	5,13	55	5,39	65	5,67	75	6,04	85	6,64	95	7,58	99,5
3,45	6	4,01	16	4,36	26	4,64	36	4,90	46	5,15	56	5,41	66	5,71	76	6,08	86	6,75	96	7,65	99,6
3,52	7	4,05	17	4,39	27	4,67	37	4,92	47	5,18	57	5,44	67	5,74	77	6,13	87	6,88	97	7,75	99,7
3,59	8	4,08	18	4,42	28	4,69	38	4,95	48	5,20	58	5,47	68	5,77	78	6,18	88	7,05	98	7,88	99,8
3,66	9	4,12	19	4,45	29	4,72	39	4,97	49	5,23	59	5,50	69	5,81	79	6,23	89	7,33	99	8,09	99,9

9.2. Cálculo de la Concentración letal 50, según el método Probit (CL₅₀)

- 1) Transformación de la dosis a logaritmos y el porcentaje de mortalidad a valores probit según tablas de transformación (Apendice 9.1). Si los valores del logaritmo son negativos, se recomienda sumar una unidad (1) a todos los valores, sean positivos o negativos, de modo de trabajar solamente con valores positivos.
- 2) Realizar la transformación lineal ($Y=a+bx$) entre el logaritmo de la dosis (x) y los valores probit (y)

Ejemplo: $Y = 1,77 + 2,54X$

- 3) Se estima con el modelo calculado el valor para un 50% de mortalidad. En unidades probit 50% corresponde a 5.

$$5 = 1,77 + 2,54X$$

$$X = \frac{5 - 1,77}{2,54}$$

$$X = 1,27$$

4) Se resta la unidad sumada

$$X = (1,27 - 1)$$

$$X = 0,27$$

5) Se aplica antilogaritmo

$$X = 0,27 / \text{antilog}$$

$$X = 1,86$$

6) En consecuencia

$$CI50 = 1,86$$