

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



RIESGO CARDIOTÓXICO DE LA INFUSIÓN DE HOJAS FRESCAS DE
***Plectranthus neochilus* EN EL MODELO LARVARIO DE PEZ CEBRA *Danio rerio*.**

Tutor:

Dr. Marco Álvarez

Asesor Académico:

Dr. Fernando González

*Trabajo Especial de Grado presentado
por la Br. Marjorie Yoselin Arias Bailey
ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela para optar a la Licenciatura
en Biología.*

Caracas, Mayo 2017.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Bachiller Marjorie Yoselin Arias Bailey, C.I., V-20.185.173., titulado “Riesgo cardiotoxico de la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus* en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*”, nos hemos reunido hoy, 19 de Mayo del 2017, en la sala de usos multiples del Instituto de Biología Experimental (I.B.E), para atender a la defensa pública de su trabajo, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de veinte (20) puntos. Certificamos así que este Trabajo Especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.

Para dar fe ello se levanta la presente acta en caracas, a los 19 dias del mes de Mayo de 2017.

Dra. Guillermina Alonso

Jurado

Dra. Elizabeth Merentes

Jurado

Dr. Marco Álvarez

Tutor

Dr. Fernando González

Asesor

Dedicado con todo mi amor

A mi madre, una mujer maravillosa y trabajadora que me ha cuidado desde que nací hasta después de su partida hacia el cielo.

A mi padre, la primera persona que siempre me ha apoyado incondicionalmente en mi vida, sobre todo en mi carrera profesional.

A mi mejor compañero de vida y amigo, mi novio Luis Díaz.

Al mejor tutor del mundo, el Dr. Marco A. Álvarez O.

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

Quisiera agradecer primeramente a ti Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio, por bendecirme para llegar a donde he llegado, por hacer realidad este sueño anhelado.

A mi madre (QEPD), por darme la vida, por amarme inmensamente, por darme tanto en el corto tiempo que estuviste a mi lado, todo lo que soy ahora es gracias a ti.

A mi padre José Arias, quien es la inspiración para formarme profesionalmente desde pequeña. Gracias por creer en mí y por apoyarme desde el principio de mi carrera bien sea económicamente o mentalmente, gracias a ti tuve fuerzas para continuar y llegar a este punto, la culminación de mi Licenciatura. Papá gracias por darme una carrera para mi futuro, por no dejarme sola cuando más te necesitaba, todo esto es gracias a ti.

Quisiera dar gracias de corazón a mi querido tutor Dr. Marco Álvarez, por abrirme las puertas a su laboratorio y permitirme trabajar con él. Gracias por su paciencia, dedicación, por su mente prodigiosa que podía entender mis ideas, por su buen criterio, esfuerzo y motivación, que me han permitido crecer a nivel profesional y personal. Infinitas gracias por creer en mí y hacerme ver mi propio potencial. Ha sido un privilegio contar con su guía

y ayuda. Ha sido todo un placer disfrutar de su simpatía y compartir muchos momentos alegres a su lado en estos últimos años.

A Licda. Lourdes Perdomo y Licda Eliana Navarro, miembros del grupo de trabajo del laboratorio de microscopia del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, con los que he compartido durante los últimos años mis ilusiones, trabajo y esfuerzo. Gracias por enseñarme y hacer que me divierta mientras descubría las alegrías y también los sinsabores de investigar.

A mis jurados Dra. Guillermina Alonso y Dra. Elizabeth Merentes, por el tiempo dedicado en las correcciones y por la participación en la evaluación de este Trabajo Especial de Grado.

A Luis Díaz, por todo el apoyo que me brindaste desde que te conocí, por creer en mí, por quererme y amarme tanto, por todos esos días en que me tuviste que esperar por terminar de trabajar en el laboratorio. Gracias por ser mi gran compañero y mi mejor amigo con el que puedo contar en cualquier tipo de circunstancia. Que Dios te retribuya con miles de bendiciones todo lo que has hecho por mí. Infinitas gracias por todo mi querido y amado novio.

A mi querida amiga Joselin Skotiuk, que me demostró que las verdaderas amistades perduran a pesar de la distancias, gracias Joselincin por todo tu apoyo y ayuda en lo que fue la culminación de este trabajo.

A mí querida y apreciada Luiselle Manosalva a quien conocí desde el principio de mi carrera y cuya amistad ha perdurado por muchos años. Gracias por brindarme una amistad que me ha permitido vivir grandiosos y valiosos momentos que hicieron mi vida

universitaria una experiencia única. A ti mi Berry querida me gustaría agradecerte por enseñarme lo que es una verdadera y perdurable amistad.

A mi muy querido y cercano amigo Manaure Lara quien hizo de mis días en la universidad mucho más felices e inolvidables, te agradezco por tomarte la molestia de gastar un poco de tu tiempo para darme ánimos cuando más lo necesitas y por siempre hacer tu mayor esfuerzo por estar presente en varios momentos importantes de mi vida y en la culminación de este trabajo. Mi querido Manu te has convertido una persona muy especial e importante para mí y quisiera agradecer todas tus palabras de aliento para salir adelante, palabras que me dieron fuerzas para no dejarme vencer por las circunstancias, gracias por tus ocurrencias que siempre me hicieron reír desde te conocí y espero que nuestra amistad perdure a través de los años.

A Dubelys Nieves por compartir este proceso culminación de la carrera. Gracias dubys por todos esos buenos momentos buenos y malos que hemos vivimos en las materias que cursamos juntas, por escucharme cuando necesitaba desahorgarme por el estrés, por las largas conversaciones que nos permitían drenar mutuamente las dificultades y situaciones difíciles, por ser mi prima de otra sangre.

A Anna Sanchez por brindarme su buena y cariñosa amistad. Gracias Anibiris por todo tu apoyo por toda tu comprensión, por todos los ánimos que me brindaste para culminar este proceso tan importante y sobre todo gracias por tus buenas energías y tus sonrisas.

A todas aquellas personas de alguna forma me dieron su apoyo y estuvieron pendientes en el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

El riesgo cardiotoxico puede ser entendido como el compromiso al que se enfrenta el sistema cardiovascular cuando ha sido sometido a la acción de diversos estímulos, de naturaleza endógena o exógena, que alteran la homeostasis de su morfo-funcionalidad. Uno de estos estímulos es la constante ingesta de productos químicos, sintéticos o naturales, sin el conocimiento por parte del consumidor de las características tóxicas de muchos de sus componentes. Es el caso del consumo de *Plectranthus neochilus*, una planta utilizada como agente terapéutico debido a las numerosas propiedades beneficiosas que le han sido atribuidas. Sin embargo, la información científica sobre la relación riesgo/beneficio de esta planta es relativamente escasa. Esta situación ha incentivado la búsqueda de modelos experimentales que permitan contribuir a mejorar dicha relación. En los últimos años el pez cebra, *Danio rerio*, ha sido empleado como un modelo biológico eficiente en la obtención de nuevos conocimientos sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, ya que los mecanismos de desarrollo cardíaco han sido descritos como altamente conservados en este vertebrado. En el presente trabajo se hizo uso del modelo larvario de pez cebra *Danio rerio* de 5 días post fertilización (dpf) para determinar el posible riesgo cardiotoxico vinculado con distintas concentraciones de una infusión de *P. neochilus*; 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 mg/mL, en un tratamiento agudo de 24 h. *P. neochilus* fue caracterizada en el herbario de la Facultad de Farmacia de la UCV. Las distintas concentraciones fueron obtenidas a partir de una infusión madre de *P. neochilus*, preparada a partir de 5 g de hojas frescas y colocadas en 100 mL de agua recién hervida durante 5 min. Trascurrido el tratamiento, se estimó la CL_{50} en función del porcentaje de mortalidad larvaria a distintas concentraciones aplicadas. La CL_{50} obtenida permitió definir el rango de concentraciones para la estimación del riesgo cardíaco, evaluado a través de parámetros como la frecuencia cardíaca, ritmo en términos

de la relación Atrio/Ventrículo, velocidad y flujo sanguíneo, además del volumen sistólico y gasto cardíaco. A nivel morfológico se determinaron cambios en el porcentaje del área de contracción, área de los vasos sanguíneos, la presencia de edema pericárdico y trombosis así como cambios en la arquitectura tisular del área cardíaca, evaluada a través de preparaciones obtenidas por la metodología estándar de histología convencional. Se realizaron comparaciones cuantitativas y evaluaciones estadísticas de los datos obtenidos con los controles para comprobar su significancia con un $p < 0.05$. La CL_{50} de *P. neochilus* arrojó un valor de $8,73 \pm 1,03$ mg/mL y el rango de concentraciones subletales quedó definida en 2.5, 5 y 7.5 mg/mL. Bajo estas concentraciones se registraron cambios generalizados, vinculados con curvatura troncal y de cola, así como efectos conductuales de espasmos y orientación anormal del cuerpo. Particularmente, se determinó una disminución estadísticamente significativa de la frecuencia cardíaca, de la velocidad y flujo sanguíneo, ritmo cardíaco, volumen sistólico y gasto cardíaco. Se registró una disminución en el porcentaje del área de contracción, un aumento en el área de vasos sanguíneos, la presencia de edema pericárdico y trombos. Estos hallazgos permitieron establecer que existe un compromiso cardíaco vinculado con la infusión de hojas frescas de *P. neochilus*, hasta el momento poco conocido. Dicho compromiso podría estar regido a través de un proceso de regulación o desregulación de receptores específicos a determinados componentes químicos presentes en la infusión, aún por dilucidar, que estarían conduciendo la cascada de señalizadores vinculados con el control morfo-fisiológico de la estructura cardíaca.

Palabras clave: *Plectranthus neochilus*, Pez cebrá, *Danio rerio*, CL_{50} , Cardiotoxicidad.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Planteamiento del problema.	1
I.2. <i>Plectranthus neochilus</i>	2
I.3. Toxicología.	4
I.4. Modelo <i>in vivo</i> pez cebra <i>Danio rerio</i>	5
I.5. Sistema cardiovascular de pez cebra.	6
I.6. Cardiotoxicidad.	8
II. ANTECEDENTES	10
II.1. Fitoterapia en Venezuela.....	10
II.2. <i>Plectranthus neochilus</i>	11
II.2.1. Fitoquímica	11
II.2.2. Actividad tóxica.	13
II.3. El pez cebra <i>Danio rerio</i> en bioensayos de toxicidad aguda.	15
II.4. Cardiotoxicidad en pez cebra <i>Danio rerio</i>	17
III. HIPOTESIS	20
IV. OBJETIVOS.....	20
IV.1. Objetivo general.	20
IV.2. Objetivos específicos.....	20

V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
V.1. Material vegetal.....	21
V.1.1. Identificación de la planta.....	21
V.1.2. Preparación de la infusión de hojas frescas de <i>Plectranthus neochilus</i>	21
V.2. Manejo del Modelo biológico de pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	22
V.2.1. Mantenimiento de individuos adultos de Pez cebra <i>Danio rerio</i> bajo condiciones de laboratorio.....	22
V.2.2. Puesta, obtención y desinfección de huevos fertilizados.....	23
V.2.3. Selección de los embriones.....	23
V.3. Toxicidad de la infusión de hojas frescas de <i>Plectranthus neochilus</i>	24
V.3.1. Concentración letal cincuenta (CL ₅₀).....	25
V.3.2. Concentración tóxica cincuenta (CT ₅₀).....	25
V.3.3. Registro de señales tóxicas.....	26
V.4. Análisis estadístico.....	36
V.5. Bioética.....	37
VI. RESULTADOS.....	38
VI.1. Identificación de la planta.....	38
VI.2. Preparación de la infusión de hojas frescas de <i>Plectranthus neochilus</i>	39
VI.3. Obtención de huevos y larvas de pez cebra <i>Danio rerio</i>	39
VI.4. Bioensayo de toxicidad.....	41
VI.4.2. CL ₅₀	42
VI.4.3. Toxicidad.....	44
VI.4.4. Efectos generales.....	44
VI.6. Cardiotoxicidad.....	47
VI.6.1. Frecuencia cardíaca.....	47
VI.6.2. Ritmo cardíaco.....	48
VI.6.3. Función ventricular.....	49
VI.6.4. Circulación.....	51
VI.6.5. Morfología cardíaca.....	54
VII.DISCUSIÓN.....	56

VII.1. Identificación de la planta y rango de seguridad experimental.....	56
VII.1.1. Identificación.....	56
VII.1.2. Rango de seguridad experimental.....	58
VII.3.1. Rango de letalidad.....	59
VII.3.2. Señales de toxicidad generalizada.....	60
VII.3.5.Caracterización del riesgo cardiotoxico.....	63
VII.3.5.a.Ritmicidad cardíaca.....	65
VII.3.5.c. Disfuncionalidad ventricular y arquitectura tisular.....	66
VII.3.5.d.Circulación.....	68
VII.3.5.e. Edema pericárdico.....	72
VII.3.5.f. Trombos.....	74
VIII. CONCLUSIONES.....	76
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados.	hpf: Horas post fertilización.
µg/mL: Microgramos por mililitro.	INIA: Instituto nacional de investigaciones agrícolas.
µL: Microlitros.	Kg: Kilogramos.
A: Atrio.	mg/mL: Miligramos por mililitros.
ADF: Área de diástole final.	mg: Miligramos.
AR: Ácido rosmarínico	min: Minutos.
ASF: Área de sístole final.	mL: Mililitros.
AT: Área transversal.	mm: Milímetros
AV: Atrio-ventricular.	nm: Nanómetros.
CI₅₀: Concentración inhibitoria cincuenta.	OMS: Organización mundial para la salud.
CL₅₀: Concentración Letal cincuenta	ON: Óxido nítrico.
cm: Centímetros	P/min: Pulsaciones por minuto.
cs: Capa sincitial vitelina	pa: Polo animal.
CT₅₀: Concentración tóxica cincuenta.	PAC: Porcentaje del área de contracción.
DF: Diástole final.	pv: Polo vegetal.
dpf: Días post fertilización.	RC: Ritmo cardíaco.
FC: Frecuencia cardíaca.	s: Segundos.
g: Gramos.	SF: Sistóle final.
GC: Gasto cardíaco.	SN: Sistema nervioso.
H/E: Hematoxilina-Eosina.	

SNC: Sistema nervioso central.

TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxina

V: Ventrículo.

VDF: Volumen diastólico final.

VE: Velocidad eritrocitaria

VF: Volumen final.

VS: Volumen sistólico.

VSF: Volumen sistólico final.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Plectranthus neochilus</i>	2
Figura 2. Pez cebra <i>Danio rerio</i> . Pez cebra adulto.....	5
Figura 3. Embrión y larva de pez cebra <i>Danio rerio</i>	6
Figura 4. Corazón de larva de pez cebra <i>Danio rerio</i>	7
Figura 5. Sistema de mantenimiento y reproducción de pez cebra <i>Danio rerio</i>	22
Figura 6. Esquema para la determinación del rango de concentraciones para la estimación de la CL ₅₀ . M= mortalidad. Fuente propia.	24
Figura 7. Análisis morfo-métrico del ventrículo para evaluar las funciones ventriculares del pez cebra <i>Danio rerio</i>	29
Figura 8. Pasos del procesamiento histológico.....	32
Figura 9. Pasos para la coloración con H/E muestras histológicas	33
Figura 10. Análisis para determinar la velocidad eritrocitaria	35
Figura 11. Partes aéreas de <i>P. neochilus</i> Schltr., cultivadas en los jardines del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina de la UCV	38
Figura 12. Extracto acuoso de <i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.....	39
Figura 13. Producción mensual de huevos fertilizados en el período 2015-2016.....	40
Figura 14. Registro fotográfico de distintos estadios larvarios de pez cebra <i>Danio rerio</i> según la clasificación de Kimmel y col, 1995.....	41
Figura 15. Curva piloto de la infusión de hojas frescas de <i>P. neochilus</i>	42
Figura 16. Curva dosis-respuesta para la determinación de CL ₅₀	43
Figura 17. Valor probit vs logaritmo de la concentración	43
Figura 18. Porcentaje de larvas que manifestaron cada uno de los efectos tóxicos generales a las 24 horas de tratamiento con la infusión de hojas frescas de <i>P. neochilus</i>	45
Figura 19. Registro de los efectos tóxicos generales de la infusión de hojas frescas de <i>P. neochilus</i>	45
Figura 20. Corte longitudinal teñido con H/E de la musculatura esquelética en la región caudal.....	46

Figura 21. Frecuencia cardíaca vs concentración.....	47
Figura 22. Ritmo cardíaco vs concentración.	48
Figura 23. Frecuencia atrial y ventricular vs concentración.....	49
Figura 24 Porcentaje del área de contracción vs concentración.....	50
Figura 25. Volumen sistólico vs concentración	50
Figura 26. Gasto cardíaco vs concentración.....	51
Figura 27. Concentración vs velocidad sanguínea evaluada en la arteria y vena cardinal ...	52
Figura 28. Área transversal vs concentración evaluada en la arteria y vena cardinal	53
Figura 29. Flujo sanguíneo vs concentración en la arteria dorsal y vena cardinal	54
Figura 30. Alteraciones morfológicas de la región cardíaca	54
Figura 31. Corte trasversal de la región cardíaca controles y tratados, teñido con H/E.....	55
Figura 33. Mecanismo de acción del óxido nítrico en el organismo.....	71
Figura 35. Mecanismo de formación trombos oclusivo	75

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Planteamiento del problema.

Como es sabido, el uso de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de enfermedades de diversas etiologías ha sido una práctica milenaria, sobre todo en la atención de la salud rural por su fácil acceso y disponibilidad (York y col., 2012). Esta práctica medicinal, muy a menudo, simboliza la única opción terapéutica para muchas comunidades y grupos étnicos, y es aplicada por los propios indígenas o los denominados curadores de la población, los cuales poseen conocimientos empíricos de los componentes y propiedades de determinadas especies (Viana, 2011).

A pesar del beneficio fitoterapéutico que se le atribuye a esta práctica medicinal, no se descarta que su consumo indiscriminado pueda causar serios problemas en la salud, debido en parte a componentes químicos, generalmente desconocidos, que se ocultan entre los numerosos elementos beneficiosos que sintetizan estas plantas (Campos y col., 2010; Glej y col., 2003). Lo mencionado anteriormente tiene gran importancia a nivel de salud, ya que es fundamental establecer una validación sobre su consumo debido a que dicha práctica se ha extendido hacia la mayoría de la población citadina, sin ninguna base científica (Arcanjo y col., 2012).

El presente anteproyecto se encuentra enmarcado en la línea de investigación que se desarrolla en la sección de Microscopia del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, de la Facultad de Medicina de la UCV, cuyo objetivo principal es contribuir, haciendo uso de modelos de experimentación, con el conocimiento de los posibles riesgos de toxicidad vinculados con el consumo indiscriminado de plantas con potencial terapéutico,

particularmente en este trabajo la planta de *Plectranthus neochilus* conocida por sus numerosas y reconocidas propiedades fitoterapéuticas.

I.2. *Plectranthus neochilus*.

Plectranthus neochilus (Figura 1) es una de las numerosas plantas medicinales que forma parte del género *Plectranthus* y que pertenece a la familia *Lamiaceae*, originaria de África, Asia y Australia. *P. neochilus* es considerada como una de las especies más citadas en la literatura en relación al uso de plantas medicinales; su género comprende alrededor de 300 especies, caracterizadas como arbustos o como cubiertas vegetales de tallos y hojas suculentos, con distribución geográfica variable en sabanas y bosques de las regiones tropicales y subtropicales del hemisferio sur (Mota y col., 2014; Khan y col., 2016). Actualmente, cerca de 62 especies del género *Plectranthus* tienen en todo el mundo una rica diversidad de usos etnobotánicos, entre los cuales se incluyen; su uso dentro de la gastronomía como plantas culinarias para sazonar alimentos, su uso en la jardinería por sus hojas y flores ornamentales y el 85% de su aplicación se enmarca en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades en todo el mundo por las diversas actividades biológicas que presentan (Lukhoba y col., 2006).



Figura 1. *Plectranthus neochilus*. Hojas simples alternadas y flores de tipo inflorescencia de la planta *P. neochilus*. Tomada de Bocardi y col., 2008.

Con respecto a la descripción botánica de *P. neochilus*, se tiene que es una planta perenne o algunas veces anual, su altura se encuentra limitada al suelo como una hierba sumamente ramificada que puede alcanzar los 12 a 50 cm de altura. En relación a sus flores, presenta inflorescencia terminal de tipo espiga de 7-15 mm de largo, son de color verde con punta de color púrpura, lo que permite diferenciarla de otras especies con características taxonómicas similares (Campos y col., 2010). Generalmente su follaje es jugoso, tiene hojas pecioladas, pubescentes, de margen poco dentado. La forma de las mismas está entre obovadas a ovaladas, tienden a doblarse a lo largo del nervio central, presentan ápice obtuso y sus dimensiones alcanzan 20-50 x 15-35 mm. Sus hojas frescas presentan un olor distintivo, y la manera más común y directa en que son consumidas es como un extracto acuoso en forma de infusión. Estas infusiones se caracterizan por ser un tónico amargo que ha ayudado a tratar los problemas de digestión, insuficiencia hepática y dispepsia (Campos y col., 2010; Bandeira y col., 2011). Además, son consideradas como bebidas funcionales debido a que sus componentes activos constan de ácidos fenólicos, micronutrientes de la dieta animal, antioxidantes como los flavonoides, entre otros, que definen funciones biológicas bajo esta forma (Rijo y col., 2014). Además, los diversos usos de esta bebida pueden estar relacionados con la actividad bioquímica que resulta de su metabolismo dentro del sistema digestivo una vez que se ingieren (Falé, 2011). Por otra parte, se ha evaluado la actividad esquistosomicida, insecticida, y antimicrobial de sus componentes (Crevelin y col., 2015), que pueden estar relacionadas con las altas concentraciones de aceites esenciales, los cuales son ricos en metabolitos tales como diterpenoides y polifenoles. Sin embargo en la actualidad, el conocimiento de la toxicología vinculada con esta planta ha sido poco reconocida (Bocardi, 2008).

I.3. Toxicología.

Cabe destacar que una, entre las numerosas definiciones de toxicología (Fukushima y de Azevedo, 2008), permite entenderla como una ciencia que estudia y valora los xenobióticos, sustancias químicas y/o físicas, en su grado de toxicidad a través de la capacidad que tienen estos de producir alteraciones patológicas en los seres vivos; también ser entendida como una ciencia que estudia y desarrolla procedimientos para la detección, identificación y determinación de los mecanismos que generan tales alteraciones.

En este contexto los riesgos tóxicos de los componentes xenobióticos, bien sea de plantas medicinales o productos farmacéuticos, por lo general se fundamentan en el conocimiento de la denominada concentración letal cincuenta (CL_{50}), calculada a partir de bioensayos toxicológicos (Uc y Delgado, 2012). La CL_{50} es una forma de medir el envenenamiento potencial y se define como la concentración de una sustancia que provoca la muerte del 50% o la mitad de la población evaluada durante un periodo de exposición determinado, que puede ser a corto o largo plazo, también conocidos como ensayos de toxicidad aguda o crónica respectivamente (Jiménez y Kuhn, 2009). El valor de la CL_{50} generalmente se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen, por ejemplo miligramos por mililitro (mg/mL), sin embargo también puede ser expresada en otras unidades de concentración como molaridad (GUIAR, 1998; Haldi y col., 2012). La mayoría de los bioensayos toxicológicos son evaluados basándose en el efecto que se genera sobre poblaciones de organismos o diversos modelos de experimentación *in vivo* o *in vitro*, con diferentes especies de animales y cultivos celulares respectivamente.

I.4. Modelo *in vivo* pez cebra *Danio rerio*.

Para el conocimiento de las distintas actividades biológicas de los componentes activos de las plantas medicinales es fundamental utilizar sistemas reduccionistas y modelos animales que permitan imitar y estudiar los procesos básicos que regulan la biología celular, la función del órgano y la homeostasis de los sistemas. La mayoría de estos trabajos se han realizado y siguen siendo llevados a cabo en los sistemas de mamíferos superiores, tales como ratas, ratones, conejos entre otros (Goldsmith y Jobin, 2012). Sin embargo, en las últimas décadas, se ha hecho importante el uso de sistemas vertebrados como el pez cebra *Danio rerio* (Figura 2). Éste es un pez teleósteo tropical de agua dulce, que pertenece a la familia de los *Ciprínidos*, proveniente del sudeste asiático y es muy común en acuarios de tiendas comerciales. En su tamaño adulto no sobrepasa los 5 centímetros, presenta dimorfismo sexual y posee un patrón de pigmentación con cinco bandas horizontales en ambos lados del cuerpo que se extienden hasta la aleta caudal, lo que le da nombre a la especie al recordar el patrón de una cebra (Maldonado, 2003).

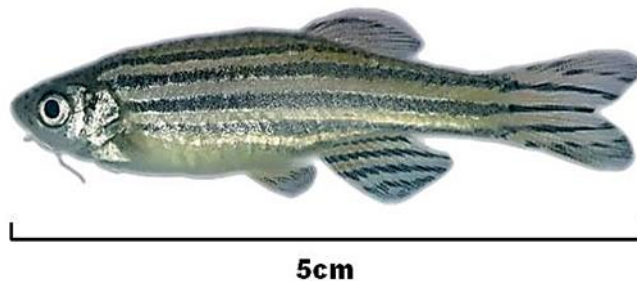


Figura 2. Pez cebra *Danio rerio*. Pez cebra adulto. Tomado y modificado de Moreno 2013.

Este modelo experimental ha incrementado el interés de estudiar las enfermedades humanas, ya que presenta ventajas ante otros modelos clásicos de investigación. El pez cebra, tanto a nivel adulto como embrionario, es un organismo vertebrado con

características fisiológicas y anatómicas homólogas a un organismo superior, pero con la simplicidad de organismos inferiores. Entre estas ventajas se destacan: su tamaño reducido, con lo cual se disminuye el volumen requerido para evaluar las sustancias químicas o naturales; su corto tiempo de desarrollo, lo que hace posible que las larvas (Figura 3) puedan ser utilizadas para experimentos a etapas tempranas del desarrollo, a pocos días después de la fertilización (dpf); y la transparencia a nivel larvario, con lo cual se hace posible realizar observaciones detalladas, pero no invasivas, de los sistemas y órganos que lo conforman, en comparación a otros vertebrados (Spitsbenger y Kent, 2003; Brönnimann y col., 2016), particularmente el sistema cardiovascular, entre otros (Glickman y Yelon, 2002; Bakkers, 2011).

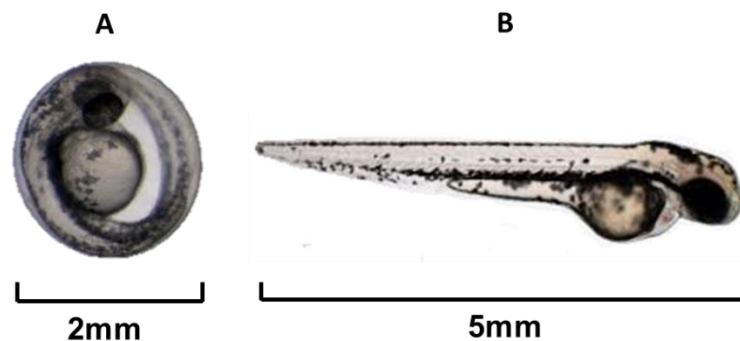


Figura 3. Embrión y larva de pez cebra *Danio rerio*. A. Embrión de pez cebra con 3 dpf. Tomado y modificado de <http://www.agenciasinc.es/Noticias/La-cocaina-produce-alteraciones-geneticas-en-embriones-de-pez-cebra>. B. Larva eclosionada de pez cebra con 5 dpf. Tomado y modificado de http://www.genetics-gsa.org/news/templates/template_publications.aspx?articleid=210&zoneid=4.

I.5. Sistema cardiovascular de pez cebra.

En los últimos treinta años el pez cebra *Danio rerio* se ha convertido en uno de los modelos biológicos más importantes en el campo del desarrollo cardiovascular y la electrofisiología cardíaca (Crowcombe y col., 2016). La organogénesis en el pez cebra es un proceso rápido, el cual permite apreciar los procesos de segmentación, formación de los primordios y precursores de estructuras a las 24 horas post-fecundación (hpf). Al alcanzar

los 5 dpf es posible apreciar otros órganos y sistemas completamente desarrollados perfectamente funcionales (Kimmel y col., 1995). Durante la organogénesis cardíaca se hace posible visualizar de manera directa la morfología y frecuencia cardíaca así como la circulación sanguínea. En cuanto a la morfología, cabe destacar que el corazón se presenta en forma de tubo durante las primeras etapas del desarrollo. A partir de las 24 hpf comienza esta estructura a latir de manera coordinada e independiente del sistema cardiovascular. Aproximadamente a las 36 hpf ocurre un movimiento de rotación con el cual alcanza una posición ventro-anterior y durante este período se define el arreglo cardíaco en dos cámaras principales, aurícula y ventrículo (Figura 4A') (Bakkers, 2011).

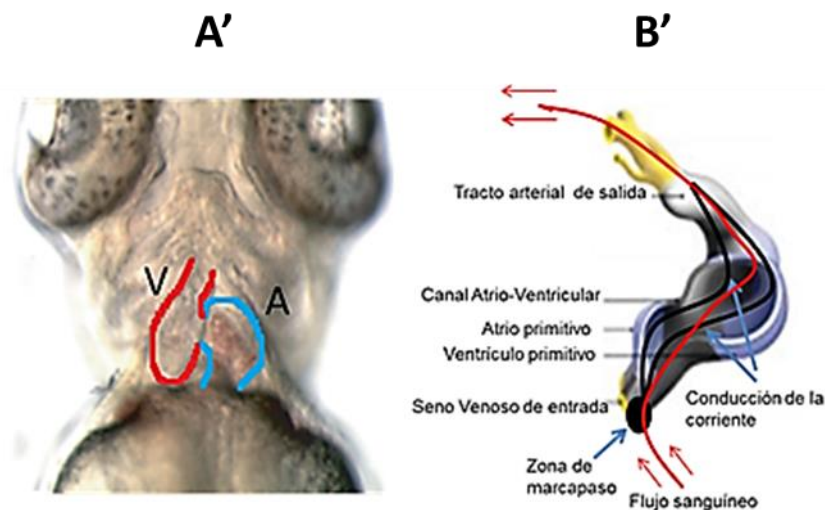


Figura 4. Corazón de larva de pez cebra *Danio rerio*. A'. Vista ventral de embrión de pez cebra de 72 hpf que muestra el atrio (A) y el ventrículo (V) del corazón. Tomado y modificado de Barret, 2005. B'. Representación esquemática de corazón de larva de pez cebra. Áreas cardíacas en el corazón de larva de pez cebra. Circulación sanguínea (trazado rojo). Relación morfo-funcional de la plataforma de conducción eléctrica (trazado negro). Tomado de Mujica, 2015.

En cuanto a la circulación, esta se visualiza con la entrada sanguínea a través del seno venoso que fluye en serie a través del atrio, ventrículo y bulbo arterioso antes de salir hacia la aorta ventral. La plataforma anatómica de conducción eléctrica y su recorrido desde la zona de marcapaso a lo largo de la zona atrial y ventricular del corazón tubular en

larvas de pez cebra (Figura 4B'), así como la despolarización y repolarización, resultan similares a la de mamíferos (Liu y col., 2015; Genge y col., 2016). Otra característica importante es que sus canales de sodio, potasio y calcio, así como factores miocárdiales que regulan la conducción cardíaca tales como Nkx2,5 y Tbx5 tienen homología con los de los humanos (Chi y col., 2008; Verkerk y Remme, 2012; Knight y Yelon, 2016), por lo que se le añade al conjunto de características que fortalecen aún más el uso del pez cebra como modelo de experimentación, particularmente en el estudio de la cardiotoxicidad promovida por agentes químicos.

I.6. Cardiotoxicidad.

Además de todas las características que presenta el pez cebra, se observa una similitud con el humano en cuanto a morfo-funcionalidad de sistemas, como el cardiovascular, lo cual ha promovido su uso para investigar funciones fisiológicas en procesos de intoxicación, particularmente en casos de cardiotoxicidad. Así, en numerosos artículos de la literatura ha sido reportado el uso de las larvas de pez cebra como organismos modelo en los bioensayos de toxicidad de productos botánicos y toxinas naturales, que incluyen extractos de plantas medicinales (Álvarez y col., 2012; Arcanjo y col., 2012). Por otra parte, el fácil acceso a la estructura cardíaca, a través de la clara visibilidad durante el periodo larvario, hace posible emplear numerosas herramientas para investigar la función fisiológica y morfológica de este órgano en condiciones normales y en eventos de intoxicación cardíaca. Al respecto cabe destacar que la cardiotoxicidad es uno de los mayores problemas que aparece en la aplicación de agentes farmacéuticos, químicos industriales y productos de origen natural. En ese mismo orden de ideas se ha considerado el corazón de pez cebra *Danio rerio* como un importante blanco para evaluar parámetros de

cardiotoxicidad vinculada con agentes farmacológicos que producen efectos fácilmente observables como lo son la variación en la tasa cardíaca o frecuencia cardíaca, el ritmo cardíaco, la circulación del flujo sanguíneo, la morfología cardíaca, entre otros, cuyos resultados aportan información rápida, reproducible y cuantificable (D'Amico y col., 2012). Esta relación morfo-funcional a nivel cardíaco ha permitido desarrollar bioensayos para el estudio de, por ejemplo, las arritmias cardíacas generadas en humanos, observando en tiempo real la disfunción cardíaca en el corazón de pez cebra (Chi y col., 2008). En este sentido, varios compuestos de naturaleza farmacológica han mostrado inducir repolarización cardíaca, alargamiento de los intervalos QT y muerte súbita entre otras complicaciones (Milan y col., 2003; Chaudhari y col., 2013). Esto ha permitido considerar a la frecuencia cardíaca, el ritmo cardíaco, la circulación y la morfología cardíaca como elementos importantes en la homeostasis de la morfo-fisiología de este órgano sometido a la acción de agentes cardiotóxicos de naturaleza diversa. Ahora bien, sí *P. neochilus* interviene alterando esta relación morfo-funcional, hasta el momento no se encuentra claramente definido.

II. ANTECEDENTES

II.1. Fitoterapia en Venezuela

El uso de las plantas medicinales como agentes terapéuticos ha sido una cultura empleada a nivel mundial y transmitida de generación en generación. Según los datos estimados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1985, se ha demostrado que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso de algún tipo de hierba buscando aliviar algunos síntomas de dolor, así como también menciona la importancia de investigaciones científicas para aceptar a una planta en el uso medicinal (Farnsworth y col., 1985; Tillburt y Kaptchuk, 2008; Borges y col., 2011). Cabe destacar que en muchas de nuestras comunidades han sido identificadas numerosas especies, pertenecientes a múltiples géneros y familias, que son usados como agentes terapéuticos a partir del suministro por vía oral de la bebida resultante de la decocción de partes aéreas de muchas de esas plantas cultivadas. Por su parte el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) ha reportado un artículo sobre las plantas medicinales en Cañaveral, estado Yaracuy (Venezuela), que hace referencia al interés creciente por consumir productos menos contaminados y más naturales. Toda esta información pone en evidencia la variedad de especies utilizadas por diferentes comunidades, lo que permite inferir por una parte que la medicina natural podría constituir una de las alternativas, más frecuente y relevante, en la atención primaria de los problemas de salud y por otra parte permite establecer que la relación riesgo/beneficio debería inclinarse más hacia el beneficio que hacia el riesgo, favoreciendo así el disfrute de una vida sana y de calidad, mediante el rescate de las creencias y costumbres nativas que emplearon nuestras culturas originarias (León y col., 2013). Sin embargo, varios factores restringen dichas inferencias; entre ellos el que hemos reiterado durante todo el planteamiento del presente trabajo, como lo es la poca

información sobre el riesgo tóxico vinculado con las plantas medicinales. Esta poca información incluye el escaso conocimiento sobre su caracterización, la poca información sobre la adecuada dosificación y el desconocimiento de sus principios tóxicos; factores importantes en el logro de los efectos terapéuticos deseados y que han impedido poder entender la relación riesgo/beneficio en el uso de estas plantas como medicamentos; carencia a su vez que resulta evidente en el caso de *P. neochilus* (Uauy, 2002; Carrillo y Bermúdez, 2012).

II.2. *Plectranthus neochilus*.

II.2.1. Fitoquímica

La fitoquímica del género *Plectranthus* ha sido estudiada durante muchas décadas, lo cual ha permitido reunir una amplia colección de este tipo de información sobre dicho género. Hasta la fecha han sido identificados más de 200 compuestos principales aislados de varias especies que lo componen, así como metabolitos secundarios del tipo diterpenoides. Estos compuestos han sido considerados como fuentes de antifúngicos, antibacterianos e insecticidas. Además han sido descritos estas especies ricas en aceites volátiles que contienen numerosos sesqui y monoterpenos, que muestran efectos tóxicos frente a diferentes organismos por numerosas vías de acción (Bocardi, 2008). Los productos fenólicos, como el ácido rosmarínico (AR), ácido cafeico, neptoidina así como los flavonoides, han sido reportados en la literatura como los principales componentes de los extractos polares del género *Plectranthus*; siendo el AR el constituyente más común en este género (Gomes, 2014). Se ha determinado que la concentración de AR presente en los extractos acuosos de la especie *Plectranthus barbatus* se correlaciona con la inhibición de acetilcolinesterasa, además los beneficios de su consumo pueden atribuirse a su presencia y

a la de otros componentes activos, sobre todo a concentraciones de $1,68 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$, equivalente a la CI_{50} de los mencionados extractos (Alasbahi y Melzig, 2010; Falé, 2011). Particularmente en el extracto acuoso de *P. amboinicus* se ha encontrado la presencia de sustancias químicas activas denominadas fitoquímicos los cuales se dividen en dos grupos, un grupo principal y uno secundario; el primero, se encuentra comprendido por azúcares, aminoácidos, proteínas y clorofila; el segundo, está conformado por alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos (Devi, 2013), no obstante, se hace evidente que la proporción de estos fitoquímicos secundarios varía según la especie en particular, los factores ambientales y las condiciones de crecimiento a las que se encuentra expuesta la planta (Crevelin y col., 2015; Arumugam, 2016; Zhang y col., 2017).

Investigaciones sobre la fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos de *P. neochilus* demuestran la presencia de un diterpeno (1α , 6β , 7β -triacetoxi- 8α , 13R -epoxi- 14 -labden- 11 -ona) similar al forskolin, un diterpeno labdano (Farias y col., 2014). Por otra parte, cabe destacar que algunas investigaciones han reportado la caracterización fitoquímica de los extractos polares de las hojas frescas de esta especie, en particular estableciendo como componentes principales a los flavonoides, antocianinas, catequinas y alcaloides (Viana, 2011). Respecto a la fitoquímica de *P. neochilus*, en Venezuela se ha definido el perfil químico del extracto acuoso liofilizado de sus hojas frescas y secas, encontrando una composición fitoquímica similar a la mostrada por los mencionados extractos polares de otros estudios, así como la presencia de compuestos reportados por primera vez para esta especie (Caro, 2016; Matuzalen, 2016).

II.2.2. Actividad tóxica.

La OMS hace referencia a que el aumento de la popularidad del uso de plantas medicinales se debe a la idea de que los productos naturales son más seguros que los fármacos, omitiendo el hecho de que la naturalidad del producto no significa que sea seguro (Aschwanden, 2001). Un ejemplo de esto es el género *Plectranthus* con el cual se han realizado más estudios, a nivel de la actividad biológica, de los efectos beneficiosos que estudios referidos a la actividad tóxica de dicho género (Viana, 2011). Particularmente, la evaluación de la actividad tóxica del extracto acuoso de *P. ambonicus* en larvas de *Artemia salina*, ha demostrado la toxicidad de dicho extracto a concentraciones por encima de la CL_{50} igual a 53, 29 $\mu\text{g/ml}$ (Parra y col., 2001). Con esta misma especie se han realizado pruebas citotóxicas haciendo uso de células tumorales de tejido pulmonar V79, de hámster macho joven, que han indicado citotoxicidad a dosis por encima de 200 mg/ml . (Borges y col., 2016). Respecto a *Plectranthus neochilus*, la actividad farmacológica de sus componentes lo hacen una especie importante para el desarrollo a nivel medicinal, cobrando relevancia los estudio de su posible toxicidad (Rice y col., 2011) ya que al respecto es poco lo se ha estudiado en esta especie. Sin embargo dentro de la poca información reportada sobre la toxicidad de *P. neochilus* se encuentra la evaluación del extracto acuoso liofilizado de sus hojas secas y frescas en ratas, en el cual se demostró un efecto de sedación entre los 5-30 minutos, luego de la administración por vía oral de un volumen máximo de 0,1 mL de dicho extracto acuoso por cada 10 g de peso del animal. Dicho efecto fue superado transcurrido las 24 horas de tratamiento. Además se observó piloerección a bajas dosis y citotoxicidad en concentraciones elevadas (Caro, 2016; Matuzalen, 2016).

Respecto a la toxicidad en función de sus principales componentes hidrosolubles tipo polifenoles, tales como: los flavonoides, catequinas, antocianinas y saponinas, se han realizado algunos experimentos toxicológicos para ensayar el riesgo de su consumo (Nijveldt y col., 2001). En el caso de los flavonoides, se ha obtenido como resultado necrosis hepática, cambios en la morfología de los hepatocitos y eventualmente la muerte de ratas, a las cuales les fueron suministradas concentraciones extremadamente altas de flavonoides, lo cual define su toxicidad a altas concentraciones sobre todo en áreas tropicales (Havsteen, 2002). Por otra parte, hay estudios que demuestran que los polifenoles producen radicales libres, que actúan de forma tóxica y son pro-oxidativos (Glei y col., 2003).

Respecto a la toxicidad vinculada con componentes glicosilados, como las saponinas encontradas usualmente en raíces, hojas y semillas de plantas superiores (Man y col., 2010; Viana, 2011) e identificadas en los extractos polares de la especie *P. neochilus* siendo estables en soluciones acuosas (Francis y col., 2002), ha sido demostrado que las mismas junto a sus propiedades antitumorales significativas, también son moléculas responsables de efectos generalizados vinculados con actividad hemolítica en células rojas del sistema hematopoyético, tanto en humanos como en animales de experimentación (Tong y col., 2017).

También los alcaloides identificados en extractos polares de *P. neochilus*, clasificados por sus grupos reactivos sustituyentes (Knöler, 2016), han sido involucrados en la toxicidad de esta especie siendo identificada a través de la generación de convulsiones en ratones sometidos a dosis equivalentes a 2,5 mg/Kg (Rujjanawate y col., 2003). Esta toxicidad no sólo se correlaciona con la cantidad y duración de captación del alcaloide sino

también de la naturaleza del mismo. Particularmente, se ha demostrado que los alcaloides tipo pirrolizidínicos son hepatotóxicos, genotóxicos, cardiotoxicos y en algunos casos neumotóxicos en condiciones agudas y crónicas (Wiedefeld, 2011).

De lo que hasta el momento se ha expuesto, resulta evidente que dentro del poco conocimiento sobre la toxicidad de la especie *P. neochilus*, el riesgo cardiotoxico sigue siendo un aspecto poco conocido, lo que conduce por tanto a la búsqueda de modelos experimentales que nos permitan contribuir con dicho conocimiento. En tal sentido el presente trabajo ha propuesto el uso del modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*.

II.3. El pez cebra *Danio rerio* en bioensayos de toxicidad aguda.

El primer trabajo que hizo uso del pez cebra *Danio rerio* como modelo experimental fue publicado en 1984 y posteriormente numerosos artículos en el área de la toxicología han utilizado este modelo en la determinación de la CL_{50} de numerosos compuestos, incluyendo extractos de plantas, para brindar un perfil de seguridad en su consumo (Ma y col., 2003; Álvarez y col., 2017a; Álvarez y col., 2017b). El pez cebra ha ganado rápidamente la aceptación como un modelo animal prometedor para la toxicología, gracias a que ha sido considerado como un modelo alternativo que se enmarca dentro el concepto de reducir, refinar y reemplazar (3R), en la evaluación del potencial terapéutico y tóxico de compuestos sintéticos o naturales (Guerra y col., 2016). Esta popularidad en los análisis toxicológicos ha sido generada, en parte, gracias a la relativamente fácil forma de administración de los compuestos. Los mismos en este modelo pueden difundirse directamente en el medio en el cual se encuentran los embriones o estadíos larvarios. Las moléculas pequeñas son absorbidas, a través de la piel, el intestino y las branquias, permitiendo así, al igual que en otros modelos, definir una cinética de distribución,

metabolismo y excreción. Para los estadíos larvarios son requeridas pocas cantidades de compuestos en comparación a otros modelos animales. Adicionalmente, esta característica permite realizar pruebas paralelas y reproducibles de varios compuestos químicos y dosis en placas de múltiples pozos (He y col., 2012), permitiendo obtener respuestas extrapolables al humano, gracias a que su sistema inmune adaptativo es muy similar al de los mamíferos (Kanter y col., 2011). Por otra parte, se ha demostrado que la sensibilidad del pez cebra ante productos químicos y sustancias tóxicas también es similar a la de los mamíferos, debido a que muchos de los genes o moléculas que participan en el desarrollo de los procesos y respuestas toxicológicas han sido reconocidos en este modelo. Particularmente procesos como la inducción de enzimas y eventos como el estrés oxidativo han sido evaluados. Por consiguiente, el pez cebra también es susceptible a patologías inducidas químicamente como se ha observado en los mamíferos (Lam y col., 2011).

Bioensayos para evaluar el efecto de fármacos como la clozapina, quinidina, eritromicina, lidocaína y verapamil, entre otros, realizados con el pez cebra *Danio rerio*, han permitido determinar los rangos de concentración tóxica y letal de estos compuestos, además de cambios en la morfo-funcionalidad cardíaca asociada a dichas concentraciones (D'Amico y col., 2012). Estos resultados han permitido ilustrar la alta eficiencia de este modelo animal y han demostrado que el pez cebra puede cerrar la brecha entre los modelos invertebrados y mamíferos como una opción más amplia de organismos vertebrados que pueden ser utilizados en las investigaciones de toxicidad y particularmente de cardiotoxicidad (Dai y col., 2014).

II.4. Cardiotoxicidad en pez cebra *Danio rerio*.

Como es sabido, la acción sobre el sistema cardiovascular de la mayoría de los productos químicos, agentes farmacéuticos y particularmente productos naturales, ha sido uno de los grandes temas en la investigación toxicológica. Estudios recientes, han centrado su atención sobre la valoración de criterios morfológicos de la cardiotoxicidad, que se hacen fácilmente evaluables mediante métodos no invasivos como las observaciones a través de microscopios estereoscópicos y microscopia convencional. Dichos métodos, hacen posible, de manera relativamente sencilla, la observación directa de los cambios en la morfología y funcionalidad del corazón, gracias a la transparencia que, como otra ventaja, presenta el estadio larvario del pez cebra (Lockwood y col., 2004). Muchos estudios han confirmado que los perfiles de toxicidad en este organismo son sorprendentemente similares al de los mamíferos, especialmente para moléculas pequeñas que pueden causar cardiotoxicidad (Milan y col., 2003; He y col., 2012; Lian y col., 2016). Otro ejemplo de cardiotoxicidad en este modelo ha sido dado a través de estudios con mezclas complejas de hidrocarburos aromáticos policíclicos provenientes de derrames de petróleo crudo. Con estos productos, ha sido reportado la aparición de numerosas señales de cardiotoxicidad en larvas de pez cebra entre estas se incluyen la presencia de edema pericárdico, defectos en el circuito cardíaco con reducción en la circulación arterio-venosa, además de la presencia de hemorragias (Incardona y col., 2013). Otras sustancias provenientes de diversos procesos industriales de la rama de las dioxinas, como el compuesto orgánico 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxina (TCDD), conocidos como contaminantes ambientales altamente tóxicos, han demostrado anomalías funcionales y morfológicas en el corazón del pez cebra (Henry y col., 1997; Antkiewicz y col., 2005; McGee y col., 2013). Además, la aplicación de compuestos como el carbaril (Lin y col., 2007), fármacos antipsicóticos

atípicos (Lee y col., 2013), inhibidores de quinasa (Cheng y col., 2011) y agentes quimioterapéuticos (Lal y col., 2013) han ilustrado el valor del pez cebra como paradigma de pruebas preclínicas para predecir efectos cardiotoxicos provocados por medicamentos en fase de desarrollo. Por otra parte, también ha sido estudiada la alteración morfo-funcional del corazón generada por el extracto acuoso de especies de tabaco sin humo, del tipo denominado tabaco masticable (Mujica, 2015; Álvarez, 2016a), con lo que se expone al sistema cardíaco larvario a una elevada cantidad de compuesto altamente tóxicos como los alquitranes.

A partir de la información encontrada en la literatura, se ha podido interpretar que este modelo de experimentación no sólo es considerado como un modelo de alta eficiencia en la evaluación de compuestos sintéticos, sino que también contribuye con nuevos conocimientos de los parámetros de cardiotoxicidad asociados al consumo de sustancias naturales con potencial terapéutico, particularmente de la infusión de hojas de diversas plantas medicinales, hasta el momento poco conocidos. Ejemplo de ello, son las investigaciones realizadas por la sección de Microscopia del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, en las cuales se han caracterizado señales tóxicas vinculadas con infusiones de hojas frescas de diferentes plantas utilizando poblaciones larvarias de pez cebra. En estos estudios se ha podido demostrar el riesgo cardiotoxico de extractos acuosos de hojas frescas de plantas como *Melissa officinalis* (Álvarez, 2016b) y *Passiflora edulis flavicarpa* (Cornejo, 2012), dependiente de la concentración y vinculado con las propiedades beneficiosas de estas plantas.

De lo anteriormente expuesto, particularmente sobre las características fitoquímicas de *Plectranthus neochilus* así como la poca información respecto a la posible toxicidad de

dicha planta, asociada a un problema de salud pública como las intoxicaciones por consumo indiscriminado; todo esto aunado a la posibilidad de contar con un modelo experimental como el pez cebra *Danio rerio*, resulta evidente el gran interés por evaluar la posible acción cardiopélica vinculada con una infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus*, haciendo uso de bioensayos toxicológicos y buscando ampliar la información toxicológica de esta planta hasta el momento poco conocida.

III. HIPOTESIS

Si las propiedades terapéuticas vinculadas con el consumo del extracto acuoso de *Plectranthus neochilus* se encuentran asociadas a acciones que comprometen la correcta funcionalidad de los organismos, entonces el riesgo a nivel cardíaco constituye una propiedad de relevancia a ser evaluado.

IV. OBJETIVOS.

IV.1. Objetivo general.

Evaluar la respuesta cardiotoxica en larvas de pez cebra *Danio rerio* tratadas con una infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus*.

IV.2. Objetivos específicos.

1. Identificar el material vegetal a ser utilizado como la planta *Plectranthus neochilus*.
2. Determinar la Concentración Letal Cincuenta (CL₅₀) de la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus*.
3. Caracterizar las respuestas cardiotoxicas a concentraciones subletales de la infusión de *Plectranthus neochilus*.
4. Realizar análisis estadístico de los resultados obtenidos para certificar la relevancia significativa entre larvas control y tratadas en cada una de las evaluaciones.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Material vegetal.

V.1.1. Identificación de la planta.

Plantas cultivadas en los jardines del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina fueron trasladadas al herbario “Dr. Víctor Manuel Ovalles” de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (UCV), las cuales fueron identificadas y certificadas por la Dra. Orsini, responsable de dicha actividad.

V.1.2. Preparación de la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus*.

La infusión para el desarrollo de los bioensayos fue obtenida a partir de hojas frescas de la planta *Plectranthus neochilus* identificada (apartado V.1.1). Para ello, hojas frescas con características morfológicas de 50 ± 2 mm de largo y 31 ± 1 mm de ancho, de una misma rama, fueron recolectadas, lavadas, secadas y pesadas en una cantidad de 5,0 g de peso total, incluidas en 100 mL de agua para la obtención de una solución Stock de 50 mg/mL que corresponde a la cantidad usada por la población en las infusiones que consume. Para ello el peso total de hojas frescas fue colocado, durante 5 minutos, en 100 mL de agua filtrada y recién hervida. Una vez que la infusión obtenida alcanzó la temperatura ambiente, la misma fue distribuida en frascos de vidrio debidamente rotulados, alicuotados, sellados con parafilm y envueltos en papel aluminio, para finalmente ser almacenados a 4° C hasta realizar las posteriores diluciones.

V.2. Manejo del Modelo biológico de pez cebra (*Danio rerio*).

V.2.1. Mantenimiento de individuos adultos de Pez cebra *Danio rerio* bajo condiciones de laboratorio.

En el manejo biológico se utilizaron dos acuarios de vidrio (Figura 5) provistos de filtros con carbón activo en su interior y una salida de aire para la filtración mecánica del agua (Rocha y col., 2002; Avdesh y col., 2012). Ambos acuarios, uno definido para la alimentación (Figura 5A) y el otro para la puesta y recolección de huevos embrionados (Figura 5B), denominado "paridera", contenían un volumen de 120 litros de agua, con pH 6 medido y ajustado semanalmente, así como a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada 15 días las peceras eran sometidas a mantenimiento con limpieza de paredes internas, cambio de filtros y recambio de agua limpia, declorada y descontaminada con anticloro y azul de metileno marca KANTAL S.A.

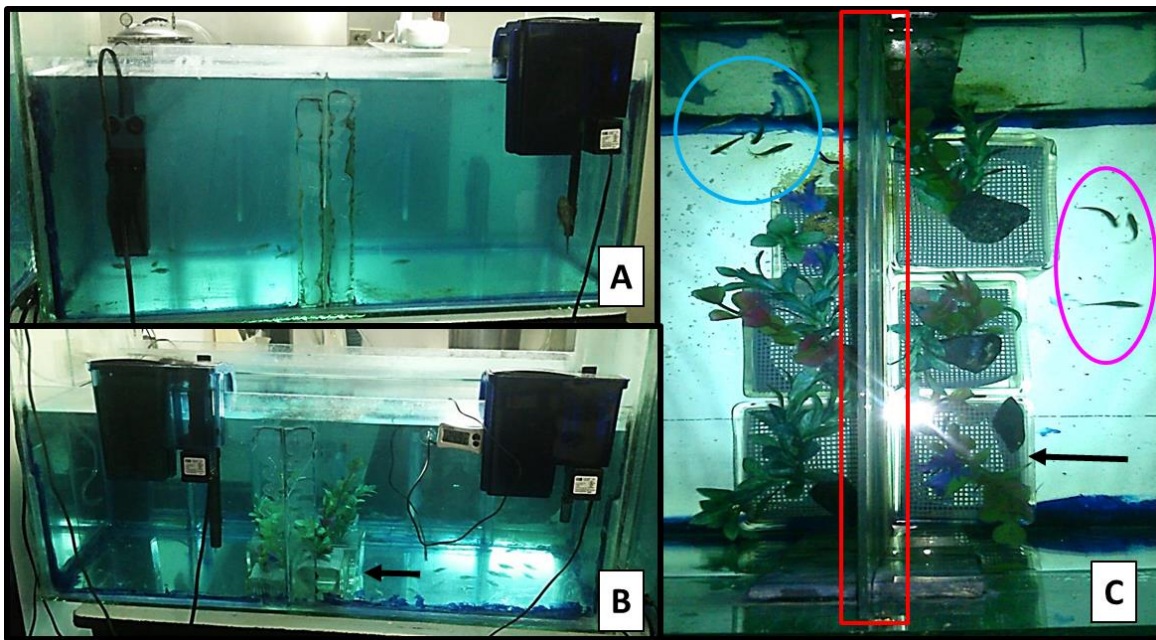


Figura 5. Sistema de mantenimiento y reproducción de pez cebra *Danio rerio*. A. Acuario de alimentación. B. Acuario de puesta y recolección de huevos embrionados. C. Características internas del acuario de puesta y recolección de huevos embrionados, se destaca lámina de plástico para la separación de los peces (rectángulo), grupo de peces machos (círculo) y hembras (óvalo) y los contenedores (flechas).

Para la obtención de huevos fertilizados y larvas, se establecieron dos grupos de peces, cada grupo constó de una proporción 3:1 de individuos hembras y machos respectivamente. Una proporción de ellos, fue colocada en el acuario “paridera” y el otro en el acuario de alimentación. Estos grupos eran intercambiados diariamente, una vez que se realizaba la recolección de los huevos. La alimentación diaria consistió en suministrar, cuatro veces al día, una dieta con alto contenido proteínico a través de comida seca para peces de acuario, en forma de escamas, marca KANTAL S.A.

V.2.2. Puesta, obtención y desinfección de huevos fertilizados.

Las hembras y los machos colocados en el acuario de reproducción (Figura 5B) fueron separados través de una lámina de plástico (Figura 5C, rectángulo), con la finalidad de activar el cortejo cuando era liberada la barrera y se cumpliera el ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Adicionalmente se colocaron 6 contenedores de vidrio provistos de una malla de plástico con plantas artificiales (Figura 5C, flecha) como estimulantes para el desove. Una vez ocurrido el desove, los huevos fertilizados fueron recolectados del fondo de los contenedores de vidrio a través de un proceso de filtración mecánica con un tamiz metálico pequeño. Los huevos obtenidos eran contabilizados y depositados en una cápsula de Petri con agua filtrada y observados bajo el microscopio estereoscópico para su limpieza.

V.2.3. Selección de los embriones.

Los embriones de pez cebra *Danio rerio* obtenidos en el laboratorio fueron incubados a temperatura ambiente hasta alcanzar un periodo de 5 de incubación. En dicho periodo se ubicó la población larvaria generada, luego de la eclosión de los huevos

incubados, y se procedió a realizar la clasificación del correspondiente estadio de desarrollo larvario en términos de días post-fertilización (dpf) (Kimmel y col., 1995). Particularmente fueron seleccionadas larvas de 5 dpf las cuales fueron utilizadas para los respectivos bioensayos toxicológicos.

V.3. Toxicidad de la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus*.

El primer paso para determinar de la toxicidad de la infusión de *P. neochilus* fue la realización de un experimento piloto para establecer el rango de concentraciones causantes del mayor porcentaje de mortalidad larvaria (Haldi y col., 2012). Dicho rango fue seleccionado en un intervalo de siete concentraciones por debajo de la máxima concentración de la infusión (50 mg/mL). Particularmente fue seleccionado el rango de concentraciones de 27.5, 22.5, 17.5, 15, 12.5, 7.5 mg/mL generadas por la dilución de la solución Stock en agua de pecera filtrada. Este primer intervalo permitió definir un segundo rango de concentración definido entre 12.5, 10, 7.5, 5 y 2.5 mg/mL a partir del cual fue estimada la CL_{50} a ser utilizada en los respectivos bioensayos (Figura 6).

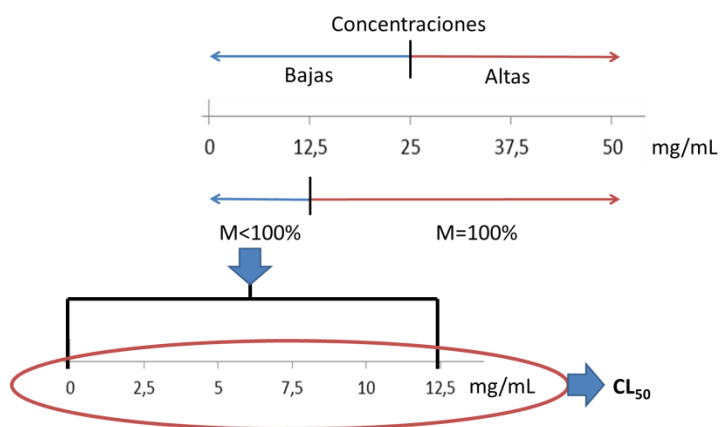


Figura 6. Esquema para la determinación del rango de concentración para la estimación de la CL_{50} . M= mortalidad. Fuente propia.

V.3.1. Concentración letal cincuenta (CL₅₀).

Para la estimación de la CL₅₀ se realizó un bioensayo que consistió en colocar las concentraciones seleccionadas para el segundo intervalo, en placas de 24 pozos en un volumen final de 1000µL de cada concentración de la infusión a ser evaluada. Para cada concentración fueron expuestas un número de 5 larvas de 5 dpf con sus respectivas réplicas y respectivos controles. El tiempo de tratamiento fue de 24 horas y el periodo de incubación se realizó a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se verificó la mortalidad larvaria a través de la ausencia de la actividad cardíaca y se cuantificó el porcentaje de mortalidad larvaria como %M para el cálculo de la CL₅₀. Para la estimación precisa de la CL₅₀ se utilizó el software estadístico GraphPadPrism 6.0. Cabe destacar que este ensayo fue realizado 4 veces para obtener un valor de desviación estándar y generar un mejor ajuste de la función de regresión logística.

V.3.2. Concentración tóxica cincuenta (CT₅₀).

Una vez obtenido el valor de la CL₅₀ y sus respectiva desviación estándar, se procedió a estimar la concentración límite de la infusión de *P. neochilus* que promueve señales de acción tóxica no causante de muerte, también conocida como concentración tóxica media (CT₅₀) (Shityakov y col., 2016); para ello se estimó el valor de concentración sub-letal media realizando la sustracción del valor de la CL₅₀ y su desviación estándar como se muestra en la siguiente expresión

$$CT_{50} = CL_{50} - DE \quad (1)$$

donde CT_{50} es la concentración tóxica media, CL_{50} es la concentración letal media y DE es desviación estándar de la CL_{50} . A partir de la determinación de la CT_{50} se estableció un rango subletal para la evaluación de los efectos cardiotoxicos de la infusión.

V.3.3. Registro de señales tóxicas.

V.3.3.a Generales.

Un primer registro de señales tóxicas fue realizado a través de observaciones directas del comportamiento larvario en las distintas concentraciones ensayadas por un periodo de 24 horas. Para ello se hizo énfasis en la observación sobre la presencia de espasmos, orientación corporal, curvatura troncal y de cola en contraste con los controles, haciendo uso de observaciones bajo el microscopio OLYMPUS IX71. Las imágenes respectivas fueron capturadas y registradas mediante una cámara DP71 con programa de análisis DP controller. Particularmente la curvatura troncal y caudal fueron corroboradas a través de la microscopia electrónica ambiental de bajo vacío. Para ello, larvas controles y tratadas, fijadas en paraformaldehído 4%, fueron deshidratadas con una batería de etanol de 70%, 96% y 100%. Seguidamente fueron montadas y visualizada en el Microscopio Electrónico de Barrido ambiental (MEB) modelo FEI Quanta 250 FEG en condiciones de bajo vacío (2300 Pascal).

Todo los datos fueron considerados como patrones de la manifestaciones generales de la acción tóxica promovida por la infusión de *P. neochilus* después del tiempo de exposición al tratamiento.

V.3.3.b. Caracterización de respuestas cardíacas y vasculares.

Para el registro de las señales a nivel cardiovascular se procedió a la caracterización de respuestas cardíacas y vasculares en población larvaria tratadas con el rango subletal de la infusión de *P. neochilus*. Respecto a las respuestas cardíacas se procedió a la determinación de parámetros morfo-fisiológicos tales como frecuencia cardíaca, ritmo cardíaco, porcentaje del área de contracción, volumen sistólico y gasto cardíaco así como la presencia de edema pericárdico y trombosis. Respecto a la respuesta vascular, se procedió a determinar parámetros morfo-fisiológicos como velocidad y flujo de vasos sanguíneos así como el área transversal de los vasos sanguíneos, los cuales fueron contrastados con los controles respectivos.

V.3.3.b.1. Frecuencia cardíaca.

Para la evaluación cuantitativa de la frecuencia cardíaca se procedió a obtener video-registros de la actividad cardíaca de 30 segundos a temperatura ambiente. Para ello, las larvas expuestas al tratamiento de 24 horas fueron depositadas individualmente en una cápsula y colocadas bajo el microscopio OLYMPUS IX71, dicha actividad fue monitoreada y registrada por una cámara de video DP71 ajustada a una velocidad de 200 cuadros/segundo. Se determinó el número de pulsaciones promedio por minuto (P/min) para caracterizar los cambios en los valores de la frecuencia cardíaca (FC) realizando el conteo del número de contracciones realizadas por el ventrículo durante un minuto. Esto basado en el hecho de que el uso de imágenes provenientes de video-registros, para analizar los procesos fisiológicos, ha sido implementado hace varias décadas, convirtiéndose en una herramienta importante en los últimos años para el análisis del rendimiento cardíaco en

embriones y larvas de peces transparentes por su simplicidad en el procedimiento experimental (Yalcin y col., 2017).

V.3.3.b.2. Ritmo cardíaco.

Para la determinación del ritmo cardíaco se procedió a estimar tanto la frecuencia atrial como la ventricular a través de un conteo manual durante un minuto, los valores obtenidos permitieron estimar el ritmo cardíaco (RC) a través de la relación atrio-ventricular (AV) de la siguiente expresión,

$$RC = \frac{A}{V} \quad (2)$$

donde RC es ritmo cardíaco, A la frecuencia atrial y V la frecuencia ventricular. Una relación AV diferente de 1,00 fue indicativa de irregularidad en el ritmo.

V.3.3.b.3. Porcentaje del área de contracción, volumen sistólico y gasto cardíaco.

Los video-registros del área cardíaca fueron almacenados y procesados mediante el programa ImageJ con la activación de la secuencia de comandos correspondientes para la selección del cuadro o frame del video que representaba el volumen diastólico y sistólico máximo (Teixidó y col., 2015). Las imágenes escogidas permitieron evaluar las funciones ventriculares a través de parámetros como el porcentaje del área de contracción, el volumen sistólico y el gasto cardíaco a través de mediciones morfo-métricas del ventrículo cuando este se encontraba completamente dilatado y contraído, en otras palabras, en su diástole final (DF) y su sístole final (SF) respectivamente, como se muestra en la Figura 7.

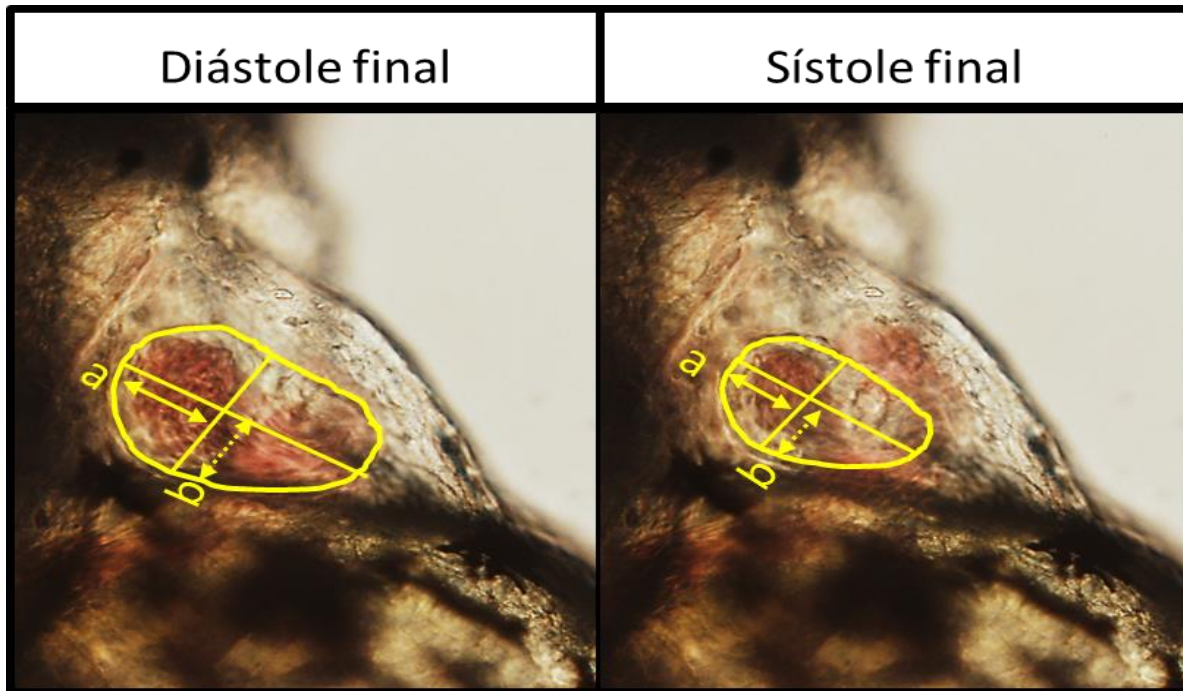


Figura 7. Análisis morfo-métrico del ventrículo para evaluar las funciones ventriculares del pez cebra *Danio rerio*. El área limitada corresponde al ventrículo en ambas fases de contracción, diástole y sístole final, en las cuales se realizan las mediciones del diámetro longitudinal (a) y del diámetro lateral (b). Fuente propia.

El porcentaje del área de contracción (PAC) es un parámetro establecido para la función ventricular y evalúa la contractibilidad del mismo en embriones de pez cebra (Yalcin y col., 2017). Se usaron imágenes del video registrado para medir la distancia del eje longitudinal (a) y la longitud del eje lateral (b) en la diástole final y en la sístole final, respectivamente, para obtener los valores de las áreas mediante la siguiente expresión

$$\text{Área} = \pi \times a \times b \quad (3)$$

donde, a es el diámetro lateral y b es el diámetro longitudinal. Los valores de estas áreas permitieron determinar el PAC que fue calculado a partir de la aplicación de la siguiente expresión

$$PAC = \frac{(ADF-ASF)}{ADF} \times 100 \quad (4)$$

donde, ADF es área diastólica final y ASF área sistólica final. También se evaluaron los volúmenes ventriculares en la diástole final (VDF) y la sístole final (VSF) en las larvas, este se calculó en cada una de las etapas finales de contracción y dilatación a partir de las dimensiones obtenidas de los ejes longitudinal y lateral de las imágenes 2D obtenidas de los registros. Se asumió que la forma del ventrículo es esferoidal alargada para aplicar la siguiente fórmula

$$VF = \frac{4}{3}\pi ab^2 \quad (5)$$

donde, VF es volumen final, a el eje lateral del ventrículo y b es el eje longitudinal del ventrículo.

El volumen sistólico (VS) se define como el volumen sanguíneo bombeado desde el ventrículo en cada latido y es calculado a partir de los volúmenes ventriculares al final de la sístole y de la diástole (Yalcin y col., 2017). Los valores obtenidos de dichos volúmenes fueron introducidos en la siguiente expresión para el cálculo del volumen sistólico

$$VS = VDF - VSF \quad (6)$$

donde, VDF es el volumen diastólico final y VSF el volumen sistólico final.

El gasto cardíaco (GC) se define como la cantidad de sangre bombeada por el ventrículo cada minuto (Borge, 2011) y fue calculado a partir del volumen sistólico y la frecuencia cardíaca, empleando la siguiente expresión

$$GC = VS \times FC \quad (7)$$

donde, VS es volumen sistólico y FC es frecuencia cardíaca.

V.3.3.b.4. Morfología cardíaca.

La presencia de edema pericárdico se identificó como un volumen anormal de fluido en la cavidad que rodea las cámaras del corazón, la presencia de trombos como una acumulación de sangre alojada en las cámaras del corazón de la larva y la morfología cardíaca fue evaluada mediante cortes histológicos teñidos con H/E.

V.3.3.b.5. Procesamiento histológico.

Larvas controles y tratadas fueron sumergidas en 100 μ L de solución de paraformaldehído al 4% bajo condiciones de frío. Posterior a la fijación, las muestras fueron deshidratadas a través de una batería de alcohol isopropílico en forma creciente para luego ser expuestas a Xilol, un líquido desalcoholizante. Una vez procesadas fueron orientadas e incluidas en un molde con parafina para formar un bloque de soporte, el cual fue polimerizado por enfriamiento. Obtenido el bloque, se procedió a realizar las secciones histológicas haciendo uso del micrótopo rotatorio RM2255 y los cortes obtenidos fueron adheridos a láminas porta objeto por calor en una estufa a 60 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo de fijación en calor, se eliminó el exceso de parafina de las láminas obtenidas con tres cambios de xilol de 3 minutos cada uno, luego se procedió a hidratar las muestras con alcoholes en forma decreciente, para finalmente ser lavados con agua corriente y teñidos con Hematoxilina-Eosina. Los pasos detallados del procesamiento se muestra en la Figura 8.

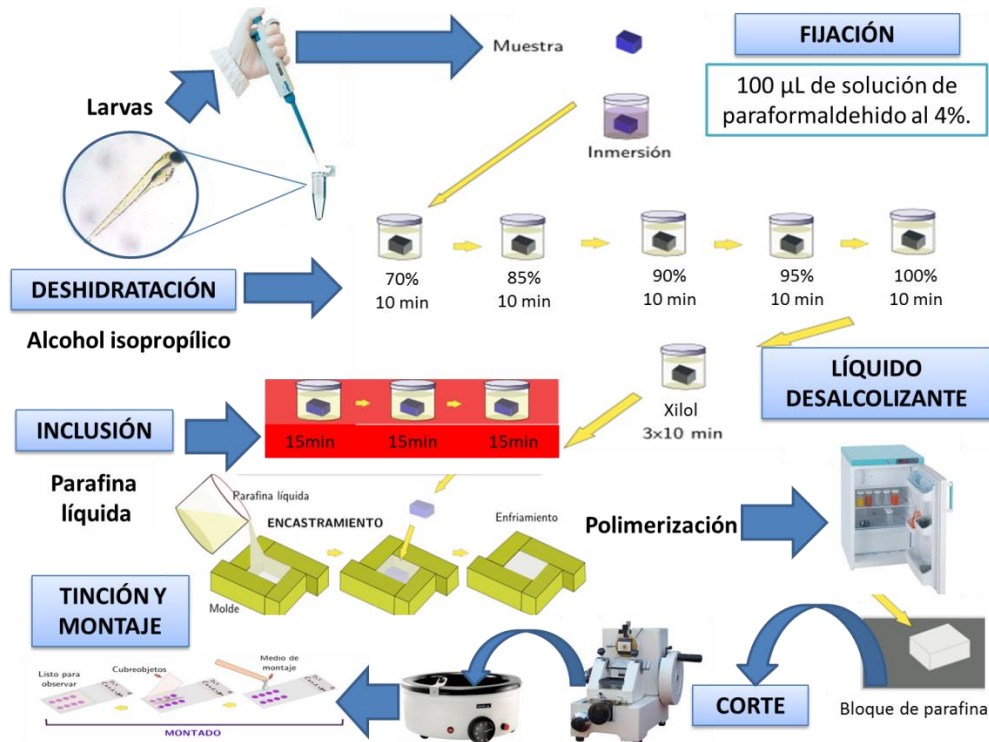


Figura 8. Pasos del procesamiento histológico. Tomada y modificada Megías y col., 2015.

V.3.3.b.6. Coloración Hematoxilina–Eosina (H/E).

El proceso de coloración permite estudiar, a nivel microscópico, las características morfológicas de los tejidos junto con su posible función, utilizando fundamentalmente la microscopía óptica para observar las características deseadas (Acuña 2012). El teñido en microscopía óptica no sólo se utiliza para aumentar el contraste en un tejido a través de la coloración específica de las células con colorantes básicos, ácidos o neutros, sino también para determinar su localización espacial (Megías y col., 2015). En este sentido, la combinación de H/E es el método de tinción más utilizado en los análisis histológicos. Este método implica el uso de dos colorantes que actúan de manera diferencial; la hematoxilina la cual es una base que tiñe de color azul violáceo los componentes ácidos de las células tales como los núcleos, mientras que la eosina es un ácido que tiñe de tonalidades rosadas

los componentes básicos de las células como el citoplasma. Para ello la superficie de las láminas fueron inmersas en una cubeta contentiva con hematoxilina durante 10 minutos, seguidamente fueron lavadas con agua corriente durante 10 minutos y se sumergieron en eosina con unas pocas y rápidas sumergidas. Finalmente, las láminas fueron deshidratadas en una batería con concentraciones crecientes de Xilol para finalmente se observadas al microscopio. El proceso detallado de los pasos realizados se muestra en la Figura 9.

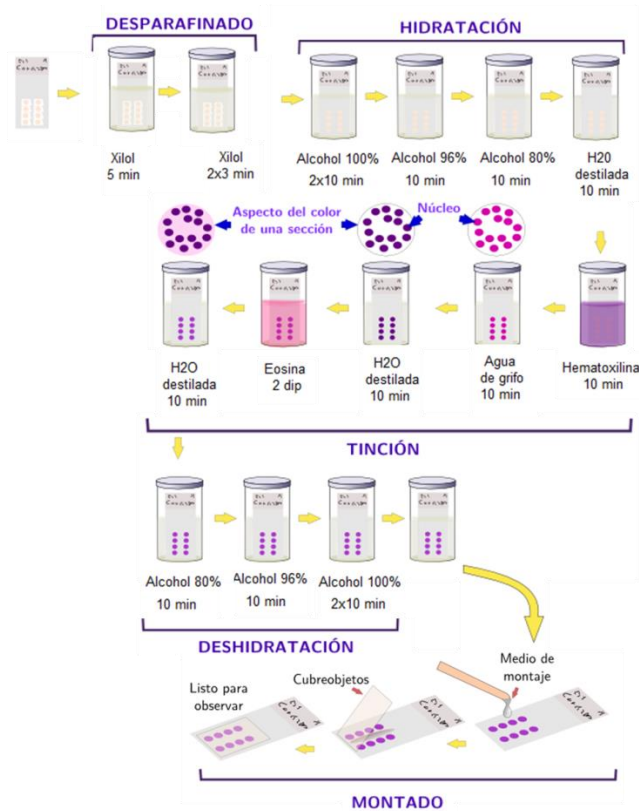


Figura 9. Pasos para la coloración con H/E muestras histológicas. Tomada y modificada de Megías y col., 2016. Dip: Sumergida rápida.

V.3.3.b.7. Velocidad de circulación, flujo sanguíneo y área transversal del vaso sanguíneo.

La velocidad de circulación, flujo sanguíneo y área transversal de los vasos principales en la circulación, como la arteria dorsal y la vena cardinal, son parámetros hemodinámicos que permiten evaluar las condiciones de la circulación (Kania y Klein, 2016). De manera cualitativa se determinaron alteraciones en la circulación, como anomalías o defectos en la velocidad y patrón de circulación, una circulación anormal fue evaluada como ausencia de circulación, circulación más rápida o más lenta. Para cuantificar la variación en la velocidad de circulación se realizaron registros de video de 30 segundos de duración en la región caudal utilizando el programa de captura de video DPController. Posteriormente, se realizó el seguimiento de los movimientos de los eritrocitos en el vaso sanguíneo y se estimó la distancia recorrida por el mismo en un segundo en la arteria dorsal y la vena cardinal; para ello se analizaron los cuadros secuenciales de los videos haciendo uso del programa Video-Tracker el cual permitió obtener el valor de la velocidad del eritrocito en el vaso sanguíneo a partir de las coordenadas de su ubicación en 5 cuadros del video, que equivalían a un tiempo de 1 segundo (Figura 10).

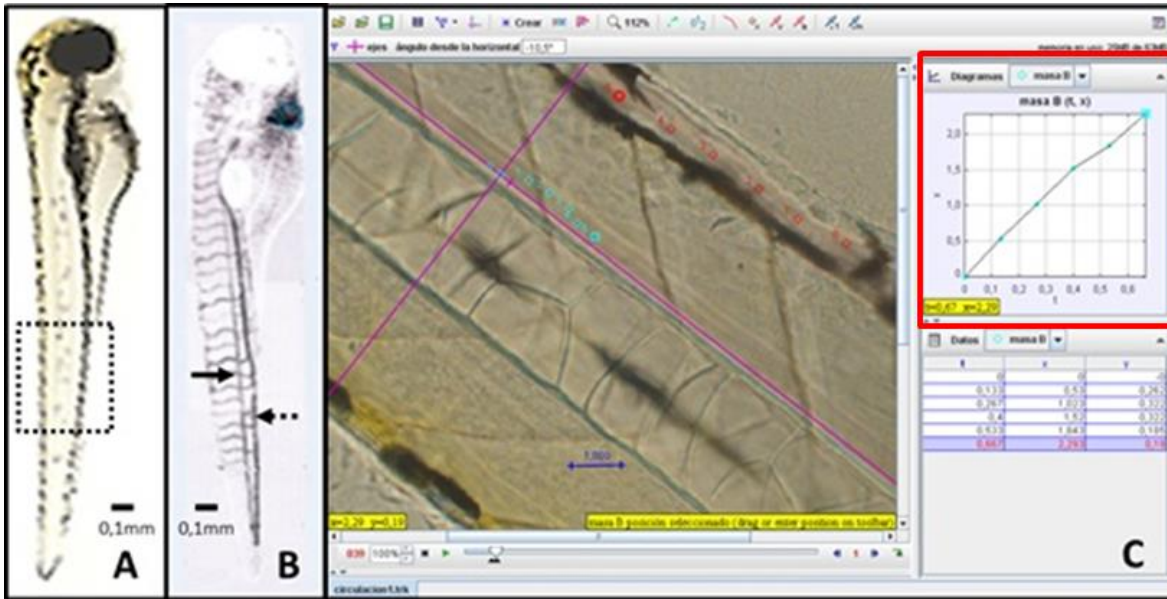


Figura 10. Análisis para determinar la velocidad eritrocitaria. **A.** Se resalta el área de seguimiento eritrocitario en una larva de 5 dpf. Fuente propia. **B.** Se señalan la arteria dorsal (flecha sólida) y la vena cardinal (flecha punteada) en una larva de 5 dpf. Tomado y modificado de Bagatto y Burggren, 2006. **C.** Se muestra la ventana emergente del programa video-tracker que permitió el análisis de la velocidad de los eritrocitos en los distintos vasos sanguíneos del pez cebra. Se muestra la imagen de la región caudal evaluada, el eje de referencia, barra de calibración del programa y el seguimiento celular así como se destaca la curva del desplazamiento vs tiempo (cuadro). Fuente propia.

La velocidad eritrocitaria fue considerada como una aproximación de la velocidad sanguínea y la misma fue representada en este programa como el área bajo la curva generada por la relación distancia y tiempo de desplazamiento realizado por el eritrocito basada en la siguiente expresión

$$VE = \frac{\sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}}{\Delta t} \quad (7)$$

donde, VE es la velocidad sanguínea, x_1 y x_2 es la posición inicial y final del eritrocito en el eje de las coordenadas respectivamente, y_1 y y_2 es la posición inicial y final del eritrocito en el eje de las abscisas respectivamente y Δt es la variación del tiempo.

Por otro lado, el flujo sanguíneo a través de la arteria dorsal y la vena cardinal fueron medidos como el número de eritrocitos que transita por un punto determinado del

vaso sanguíneo en un segundo, los cuales fueron fácilmente identificable gracias a la transparencia del embrión. Finalmente, para el cálculo del área transversal del vaso sanguíneo (AT) se realizaron mediciones del diámetro de la arteria dorsal y de la vena cardinal en las imágenes capturadas, asumiendo una forma circular se pudo aplicar la siguiente expresión

$$AT = \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^2 \quad (8)$$

donde, AT es el área transversal y D es el diámetro del vaso sanguíneo.

V.4. Análisis estadístico.

Los registros de los efectos y la mortalidad, producidos por la infusión de *P. neochilus*, fueron expresados en porcentaje y graficados contra la concentración de la infusión ensayada. Los datos cuantitativos se expresaron en promedio más o menos desviación estándar ($X \pm DE$) y se analizaron mediante pruebas estadísticas adecuadas que permitieron establecer los cambios estadísticamente significativos en todos los parámetros medidos, utilizando un límite de significancia de $p < 0.05$ y planteando las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): Las medias de los datos son iguales.
- Hipótesis alternativa (H_1): Las medias de los datos son diferentes.

Además se emplearon procedimientos estadísticos para el cálculo de la CL_{50} y se hizo uso de softwares estadísticos (Excel 2010, GraphPadPrism 6) para los análisis y gráficas de los resultados.

V.5. Bioética.

Es importante mencionar que todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices éticas de la Comunidad Europea Directiva del Consejo comunidades del 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE).

VI. RESULTADOS

VI.1. Identificación de la planta.

De acuerdo a la metodología utilizada, los resultados obtenidos muestran que las plantas cultivadas en los jardines del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina corresponden con la descripción botánica que define a la especie *Plectranthus neochilus* Schltr. de la familia *Lamiaceae* cuyo ejemplar fue depositado bajo el código MYF 28987 en el herbario “Dr. Víctor Manuel Ovalles” de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

Las características observadas, de forma resumida, fueron de una planta perenne altamente ramificada de 20 cm de alto (Figura 11A), sus hojas suculentas son pubescentes, de forma obovada con ápice redondeado y base cuneada (Figura 11C). La característica más significativa que permitió diferenciarla de otra especie de *Plectranthus*, con follaje similar, fue su inflorescencia de tipo espiga con una altura promedio de 35 mm de largo (Figura 11B) con flores de base verde y punta púrpura (Figura 11D).

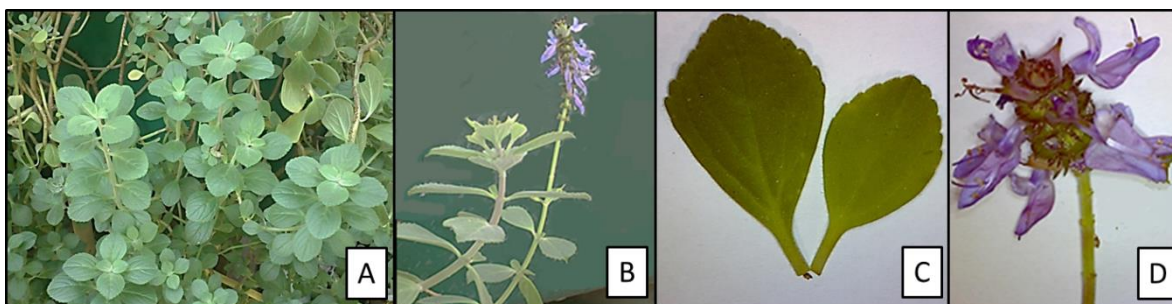


Figura 11. Partes aéreas de *P. neochilus* Schltr., cultivadas en los jardines del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina de la UCV. A. Lugar de cultivo de las plantas. B. Detalle de partes aéreas. C. Vista superior del follaje, aumento 10x. D. Flor de base verde con pétalos violeta de tipo inflorescencia, aumento 10x.

VI.2. Preparación de la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus*.

La infusión de los 5 gramos de hojas frescas de *Plectranthus neochilus* Schltr. en 100 mL de agua permitió obtener una solución de 50 mg/mL considerada como solución Stock del extracto acuoso de tonalidad amarilla clara (Figura 12).



Figura 12. Extracto acuoso de *Plectranthus neochilus* Schltr. Se muestra la imagen fotográfica del extracto acuoso obtenido de la infusión de las hojas frescas de *P. neochilus* envasado en los frascos utilizados.

VI.3. Obtención de huevos y larvas de pez cebra *Danio rerio*.

El protocolo de mantenimiento establecido en el Laboratorio de Microscopía del Instituto Anatómico “José Izquierdo” permitió obtener una producción de huevos fertilizados (Figura 13) correspondiente a una dinámica entre los años 2015-2016, período correspondiente a un año de investigación. Se destaca que el mayor valor de productividad de huevos fertilizados fue en el mes de Junio con una supervivencia del 70%. Además es notable la poca producción en los meses de Mayo, Octubre y Diciembre del 2015, así como en Enero, Septiembre, Octubre, Noviembre del 2016.

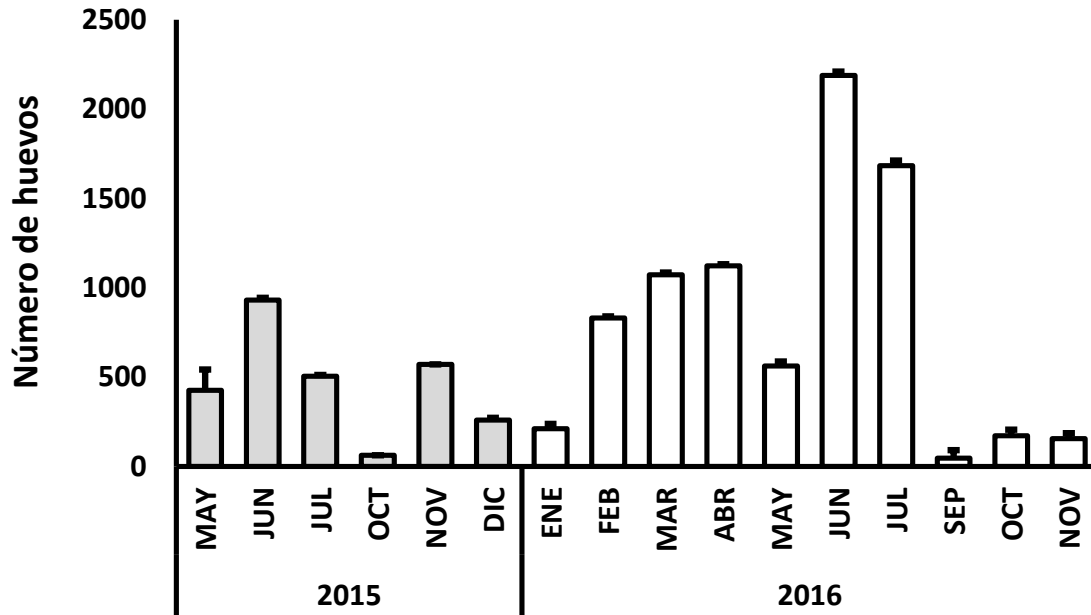


Figura 13. Producción mensual de huevos fertilizados en el período 2015-2016. Las barras representan la desviación estándar de los datos obtenidos. En los meses omitidos no se obtuvo ninguna producción.

Por otra parte el procedimiento utilizado para la obtención de los huevos fertilizados de pez cebra permitió obtener una población de diferentes estadios de desarrollo de pez cebra (Figura 14). Así se pudo describir huevos fertilizados en estadio de cigoto (Figura 14A), caracterizado por ser un huevo telolecítico cuya mayor parte está ocupada por vitelo, con dos regiones bien diferenciadas en un polo animal (pa) y un polo vegetal (pv) rico en vitelo. También se pudo obtener huevos fertilizados en etapa de blástula (Figura 14B) con una capa sincitial vitelina (cs), además de embriones en etapa de segmentación (Figura 14C), caracterizada por la formación de estructuras como las somitas y los primordios de los órganos visibles. Se hacen visible también el brote caudal prominente. Se registró la presencia de embriones en estadios avanzados sin eclosionar (Figura 14D), caracterizados por una organización bilateral, notocordio desarrollado, aletas, boca, mandíbulas y arcos branquiales, así como la observación de latidos cardíacos, circulación sanguínea, además de

células pigmentarias o melanóforos. Por último, se describió la presencia de larvas en estadio temprano de desarrollo (Figura 14E), caracterizada por el desarrollo completo de los primordios de órganos y cambios notorios como el desarrollo de aletas pectorales y aumento de la vejiga natatoria.

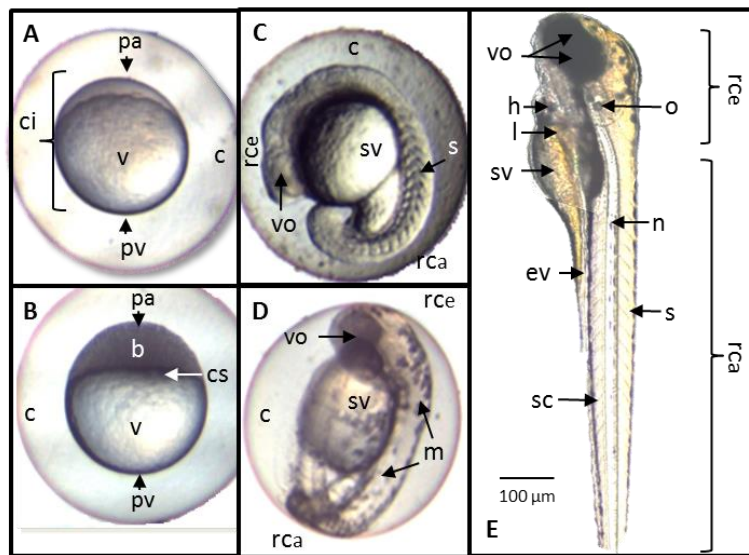


Figura 14. Registro fotográfico de distintos estadios larvarios de pez cebra *Danio rerio* según la clasificación de Kimmel y col, 1995. A. Cigoto (0-3/4 hpf). B. Blástula (4 hpf). C. Etapa de 18 somitas (18 hpf). D. Embrión (48 hpf). E. Larva eclosionada (5 dpf). Corión (c), polo animal (pa), polo vegetal (pv), vitelo (v), cigoto (ci), blastodermo (b), capa sincitial vitelina (cs), región cefálica (rce), región caudal (rca), saco vitelino (sv), somitas (s), vesícula óptica (vo), melanóforos (m), extensión del vitelo (ev), corazón (h), hígado (l), sistema circulatorio (sc), notocordio (n), otolitos (o).

VI.4. Bioensayo de toxicidad.

Mediante los valores de la curva piloto de concentración-respuesta (Figura 15) se pudo determinar que el valor de la dosis mínima a partir de la cual se observó la respuesta de mortalidad total de la población está ubicada entre los 10 mg/mL y los 15 mg/mL, su valor equivalente fue de 12,5 mg/mL con desviación estándar elevada. Este primer ensayo permitió establecer un nuevo rango para la estimación del valor de la CL₅₀.

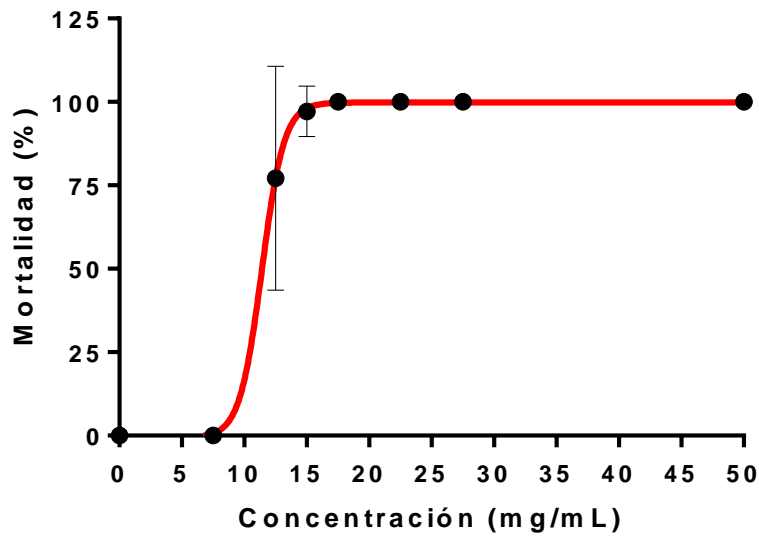


Figura 15. Curva piloto de la infusión de hojas frescas de *P. neochilus*. Se presenta la curva dosis-respuesta del bioensayo piloto obtenida del tratamiento agudo de 24 horas en larvas de *Danio rerio* con 5 dpf. Las líneas sobre los puntos representan la desviación estándar de los datos obtenidos en cada concentración.

VI.4.2. CL₅₀.

En los ensayos posteriores, se obtuvo una curva concentración-respuesta de comportamiento sigmoideo (Figura 16), la misma expresó el porcentaje de mortalidad de la población larvaria en función de las distintas concentraciones evaluadas en un rango entre 0 a 12,5 mg/ml, transcurridas las 24 horas de tratamiento, como un proceso dependiente de la concentración; a mayor concentración mayor mortalidad. A partir de ésta se obtuvo una CL₅₀ con un valor equivalente a $8,73 \pm 1,03$ mg/mL.

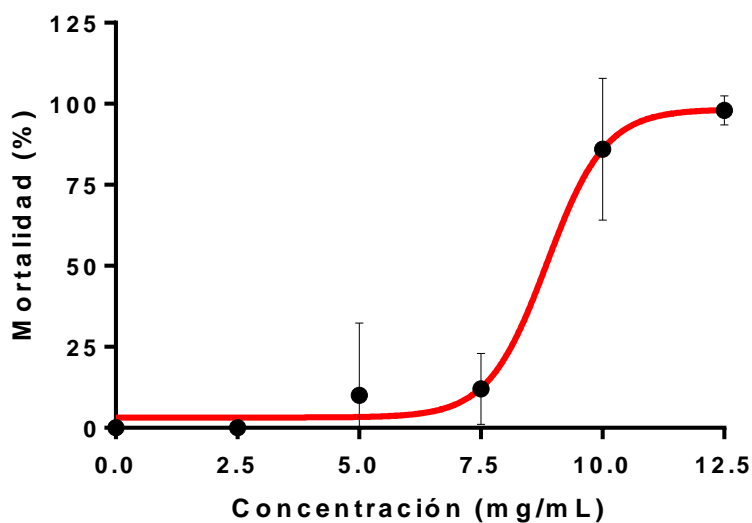


Figura 16. Curva dosis-respuesta para la determinación de CL_{50} . Curva concentración-respuesta del rango ajustado entre 2,5 a 12,5 mg/mL de infusión. Mediante los datos de la curva se obtuvo una CL_{50} de $8,73 \pm 1,03$ mg/mL y una CT_{50} de 7,7 mg/mL. Las barras sobre los puntos representan la desviación estándar. El gráfico representa las cuatro réplicas experimentales de las placas con 60 larvas por experimento, con una población total evaluada de $N=240$.

Al relacionar el logaritmo de cada concentración con los porcentajes de mortalidad, expresadas en unidades probit, se pudo obtener una línea de tendencia con alta correlatividad (r^2) entre estas dos variables (Figura 17).

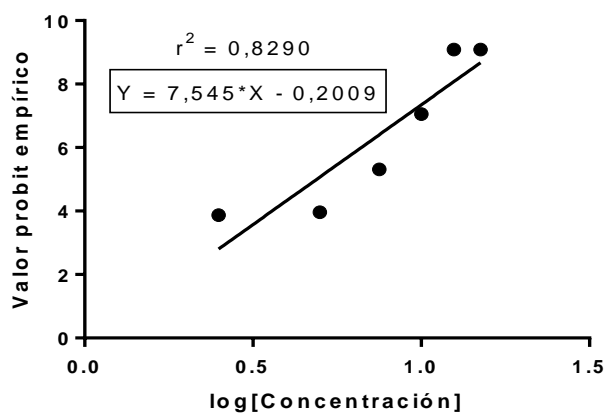


Figura 17. Valor probit vs logaritmo de la concentración. Relación entre el logaritmo de las concentraciones de infusión de hojas frescas de *P. neochilus* y el porcentaje de mortalidad en transformación Probit. Se destaca la correlatividad r^2 de la relación y la ecuación de la recta obtenida.

VI.4.3. Toxicidad.

Una vez obtenida la relación concentración-respuesta y de su significativo valor correlativo, se estimó la CT_{50} equivalente a 7,7 mg/mL, además se establecieron las concentraciones subletales con valores de 7.5, 5 y 2.5 mg/mL las cuales se emplearon para las posteriores evaluaciones de parámetros cardiotóxicos.

VI.4.4. Efectos generales.

En cuanto a los efectos tóxicos generales (Figura 18), se observó presencia de espasmos en 19% de las larvas totales, caracterizados por movimientos repetitivos de las aletas pectorales, movimientos que no se presentaron en las larvas control. También se observó orientación anormal del cuerpo en el 16% de la misma y además se pudo apreciar curvatura troncal en el 11% de la población larvaria y curvatura de cola en el 2% de las larvas tratadas. La orientación anormal del cuerpo (Figura 19) al comparar con el control (Figura 19A) con el tratado (Figura 19B), se apreció la larva en una posición ventral opuesta a la característica del control. En cuanto a la curvatura troncal y caudal respecto al control (Figura 19C), se observa que las tratadas presentan un arqueamiento pronunciado en la región dorsal y caudal respectivamente (Figura 19D y Figura 19E). Ambas curvaturas fueron resaltadas a través de la observación topográfica de las larvas control (Figura 19F) en comparación con las tratadas (Figura 19G), en donde se pone en evidencia la pérdida pronunciada de la linealidad del eje longitudinal.

Cabe destacar que las alteraciones de mayor manifestación aparecieron mayormente en concentraciones de 10 y 12,5 mg/mL, y sus porcentajes fueron obtenidos de la cuantificación de estos efectos sin discriminar por concentración.

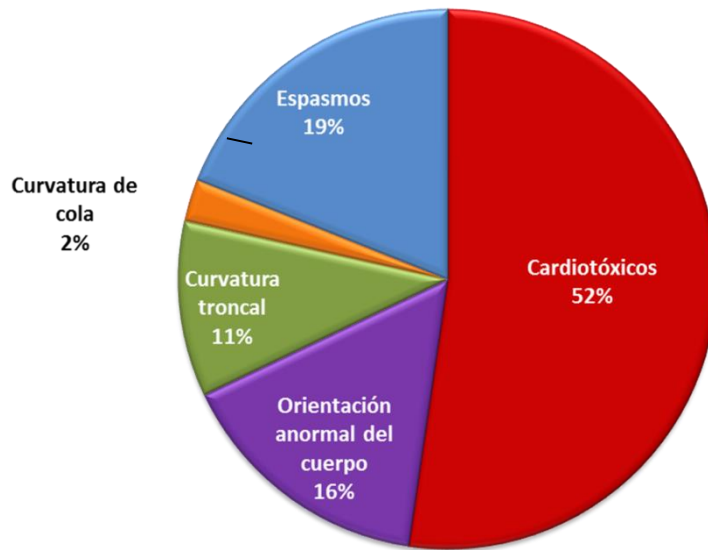


Figura 18. Porcentaje de larvas que manifestaron cada uno de los efectos tóxicos generales a las 24 horas de tratamiento con la infusión de hojas frescas de *P. neochilus*. El gráfico muestra los efectos manifestados en la población y el porcentaje de la población larvaria total que mostró cada efecto tóxico.

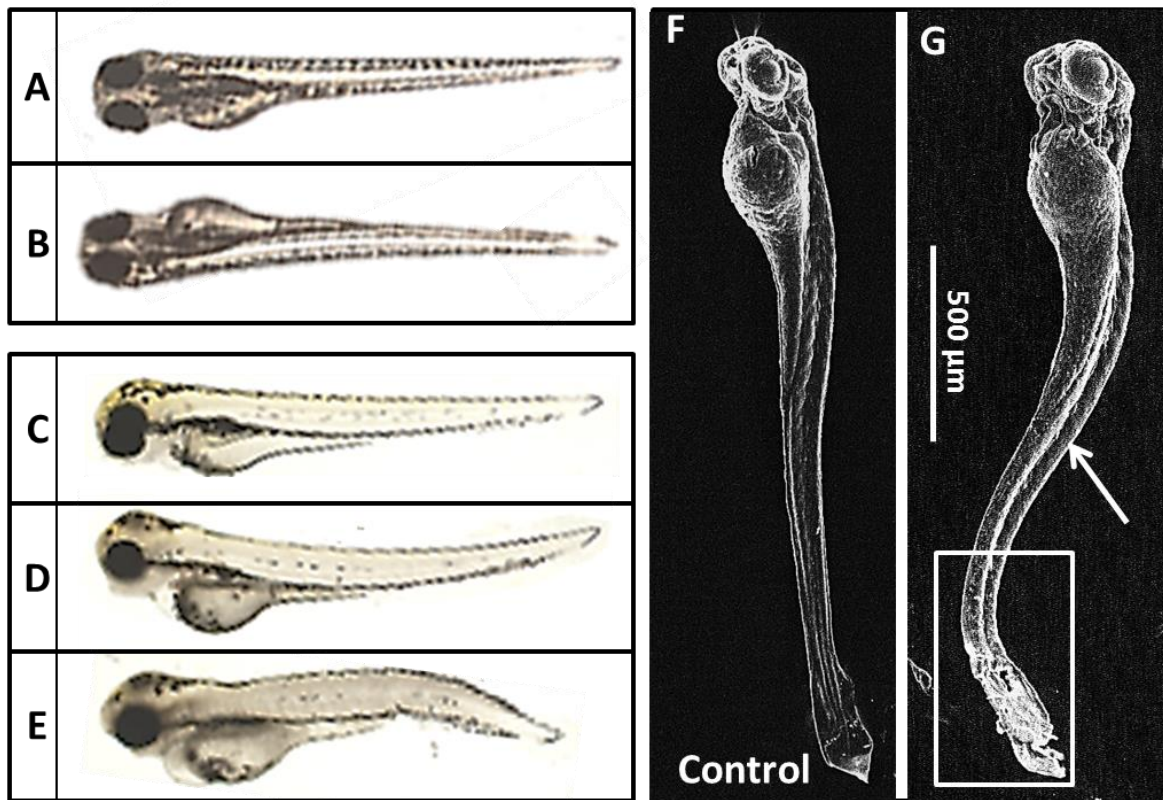


Figura 19. Registro de los efectos tóxicos generales de la infusión de hojas frescas de *P. neochilus*. A. Larva control con orientación normal del cuerpo. B. Larva con orientación anormal del cuerpo. C. Larva Control. D. Larva con curvatura troncal. E. Larva con curvatura caudal. F. Larva control vista en MEB. G. Larva tratada con 7,5 mg/mL que manifestó curvatura troncal y caudal vista en MEB. Aumento 100X.

Por otra parte, la preparación histológica también permitió resaltar los efectos de curvatura troncal y de cola a nivel tisular (Figura 20), así comparando el tejido control de la región de la cola (Figura 20A) con igual región en la larva tratada con 7,5 y 10 mg/mL (Figura 20B y Figura 20C) se pudo observar una pérdida de la arquitectura de la porción tisular dependiente de la concentración; a mayor concentración mayor pérdida de la arquitectura.

A mayor aumento se destacaron los cambios morfológicos de la musculatura esquelética a nivel de la región caudal. Al comparar el control (Figura 20A') con igual región en los tratados a 7,5 y 10 mg/mL (Figura 20B' y Figura 20C') se puso en manifiesto la alteración en la arquitectura tisular de la musculatura esquelética, evidenciada a través de la desorganización en las fibras musculares y de la presencia de mayores espacios interfibrilares a mayor concentración.

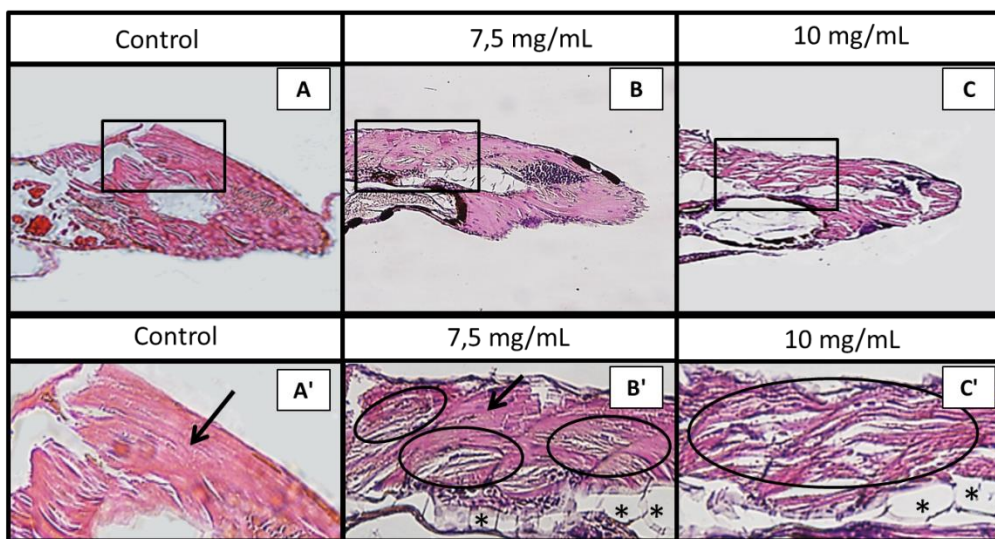


Figura 20. Corte longitudinal teñido con H/E de la musculatura esquelética en la región caudal. A. Región caudal de larva control. Aumento 200x. **B.** Región caudal de larva tratada con 7,5 mg/mL Aumento 200x. **C.** Región caudal de larva tratada con 10 mg/mL. Aumento 200x. Se destaca en **A**, **B** y **C** un recuadro negro limita el área donde se registraron las imágenes en un aumento de 400x. **A'.** Musculatura de larva control, se destaca fibras musculares normales (flecha negra). **B'.** Musculatura larvas tratadas con 7,5 mg/mL se destaca las fibras musculares normales (flecha negra), distrofia de fibras musculares (ovalo) y tejido adiposo (asterisco). **C'.** Musculatura de larvas tratadas con 10 mg/mL se observan las fibras musculares normales (flecha negra), distrofia de fibras musculares (ovalo) y tejido adiposo (asterisco).

VI.6. Cardiotoxicidad.

Cabe destacar que los efectos cardiotóxicos presentaron mayor incidencia en la población con respecto a los efectos visualizados (Figura 18).

VI.6.1. Frecuencia cardíaca.

La representación gráfica de los valores promedio de P/min en relación a las concentraciones evaluadas a las 24 horas de exposición (Figura 21), muestra una disminución de los valores promedio de frecuencia cardíaca en los tres grupos tratados con concentraciones subletales de 2,5; 5 y 7,5 mg/mL. Dicha reducción fue estadísticamente significativa con respecto al control e independiente de la concentración ensayada. Se puede destacar que el menor valor promedio de la frecuencia cardíaca fue mostrada tras la exposición con la concentración de 7,5 mg/mL.

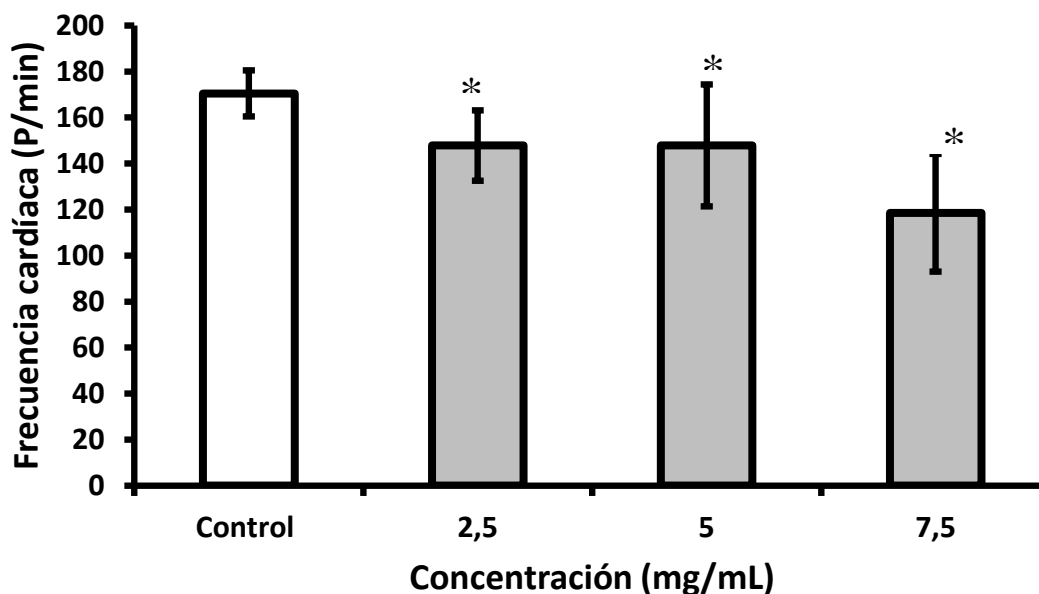


Figura 21. Frecuencia cardíaca vs concentración. Representación gráfica de la media aritmética de la frecuencia cardíaca en el control y las distintas concentraciones subletales de la infusión de *P. neochilus*, a las 24 horas de exposición. Pulsaciones por minuto (P/min). Se muestra la desviación estándar representada como barras de error. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes con respecto al control ($p < 0.05$). N=20.

VI.6.2. Ritmo cardíaco.

La representación gráfica de la relación AV, en términos de P/min en la región atrial y ventricular, mostró una variación del valor promedio del índice AV solo en la concentración de 7,5 mg/mL en un 6,2% (Figura 22). No se observó diferencia estadística de dicho índice AV en concentraciones de 2,5 y 5 mg/mL cuando los valores de ritmo cardíaco fueron comparados con el control. Tampoco se observó diferencia entre el grupo tratado con 2,5 y 5 mg/mL.

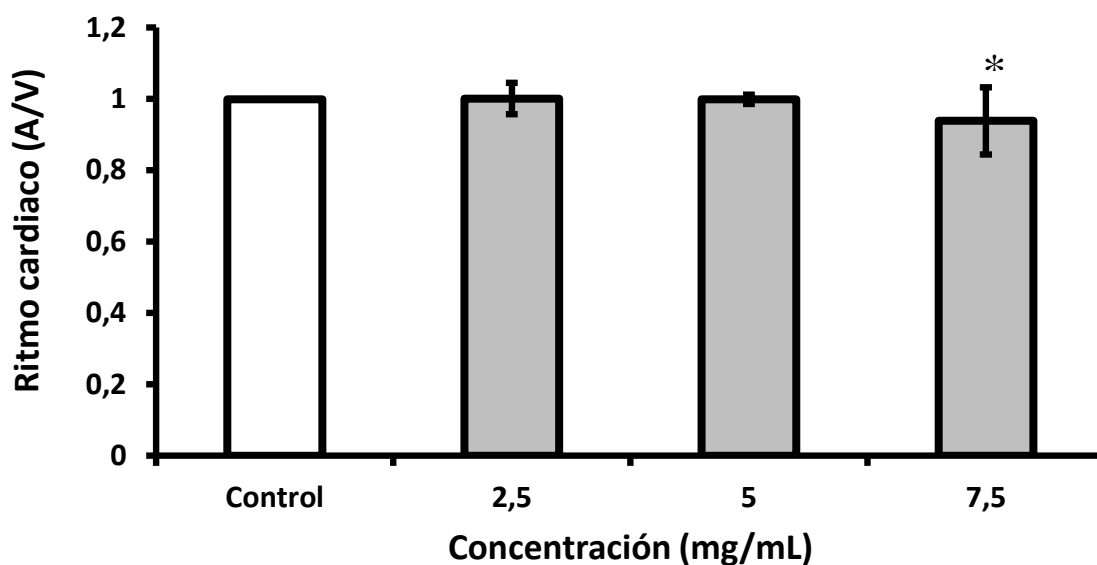


Figura 22. Ritmo cardíaco vs concentración. Representación gráfica de la relación atrio-ventricular en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio* a las 24 horas de exposición con las distintas concentraciones subletales evaluadas. Las barras indican el valor de la desviación estándar de los datos. (*) Estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$). N=20.

Al evaluar individualmente la frecuencia del atrio y el ventrículo comparando controles y tratados con concentraciones subletales de la infusión, se pudo determinar que no se encontró modificación significativa entre la frecuencia en atrio y ventrículo a las concentraciones de 2,5 mg/mL y 5 mg/mL (Figura 23). Por el contrario, al analizar estas frecuencias en la concentración de 7,5 mg/mL se pudo observar una disminución,

estadísticamente significativa de la frecuencia ventricular en comparación al control, mientras que a nivel auricular se mantuvo similar. Esto lo indica las líneas de tendencia que demuestran que hay una mayor pendiente en la linealidad de los resultados a nivel del ventrículo al compararlas con la representada para la aurícula.

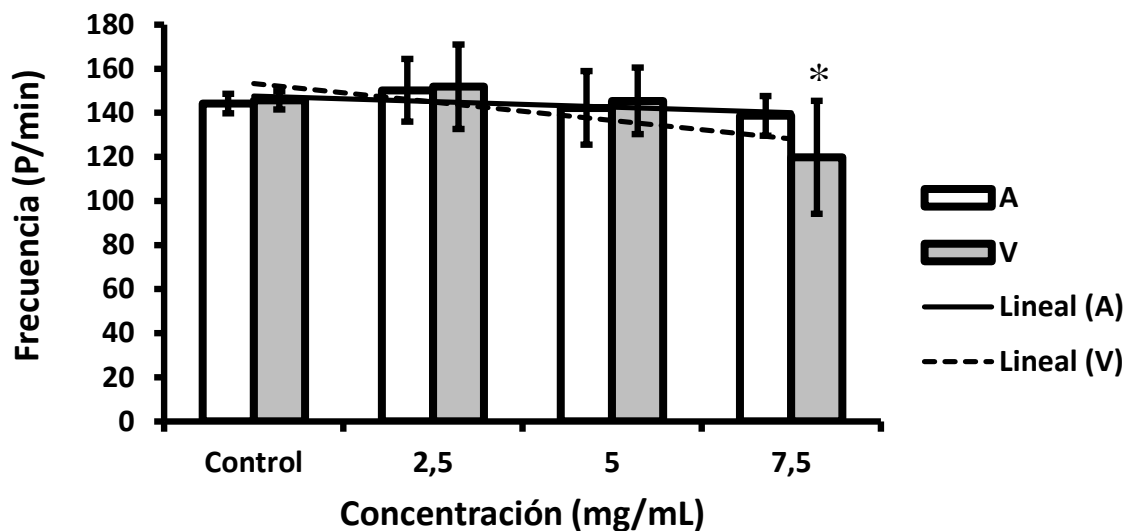


Figura 23. Frecuencia atrial y ventricular vs concentración. Representación gráfica de la frecuencia atrial y ventricular en cada una de las concentraciones subletales evaluadas luego de 24 horas de tratamiento. Atrio (A), ventrículo (V). Las barras indican el valor de la desviación estándar de los datos. (*) Estadísticamente significativo con respecto al control y las líneas con pendiente indican la tendencia de los valores. ($p < 0.05$). N=20.

VI.6.3. Función ventricular

Respecto a la función ventricular cabe destacar que el porcentaje del área de contracción en función de las concentraciones ensayadas mostró diferencias significativas a la concentración de 5 y 7,5 mg/mL (Figura 24), al igual que el volumen sistólico (Figura 25) y gasto cardíaco (Figura 26) en comparación a los valores controles.

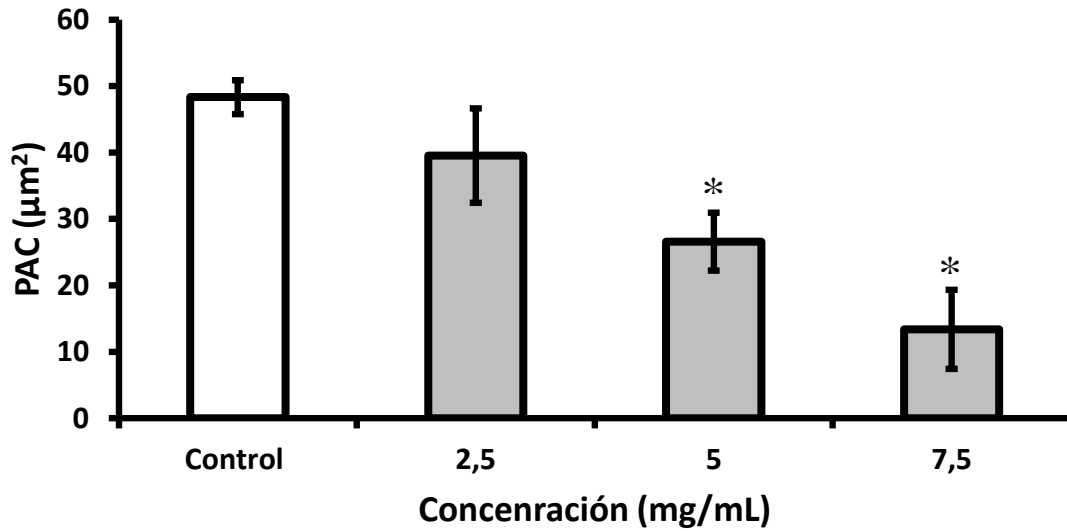


Figura 24. Porcentaje del área de contracción vs concentración. Valores promedios del porcentaje del área de contracción obtenidas tras a las 24 horas de exposición con las concentraciones subletales evaluadas. Se muestra una modificación significativa en las concentraciones de 5 y 7,5 mg/mL. Las barras de error hacen referencia a la desviación estándar. (*) Estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$). N=20.

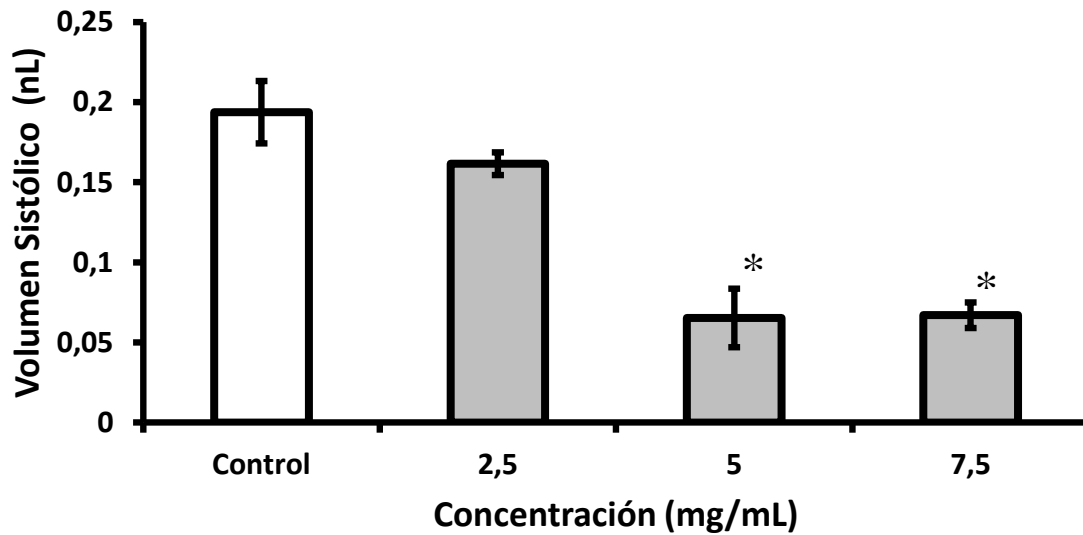


Figura 25. Volumen sistólico vs concentración. Valores promedios del volumen sistólico obtenidos a las 24 horas de exposición en los grupos tratados con concentraciones subletales. Las barras de error hacen referencia a la desviación estándar. (*) Estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$). N=20.

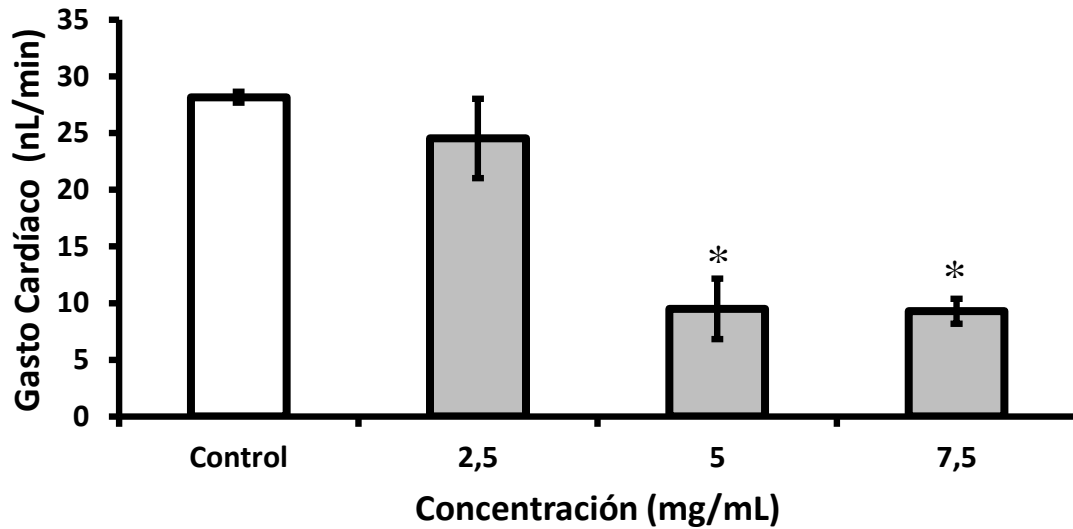


Figura 26. Gasto cardíaco vs concentración. Valores promedio del gasto cardíaco obtenidos a las 24 horas de exposición con las concentraciones subletales evaluadas. Las barras de error hacen referencia a la desviación estándar. (*) Estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$). N=20.

VI.6.4. Circulación.

En la evaluación cualitativa de la circulación en las diferentes concentraciones se observó que en el rango de valores bajo, normal y alto (Tabla 1) se demostró una disminución notoria en la concentración de 7,5 mg/mL < 5 mg/mL = 2,5 mg/mL = Control.

Tabla 1. Evaluación cualitativa de la velocidad sanguínea. Se muestra el valor de la escala semicuantitativa obtenida en el grupo control y los grupos tratados con concentraciones subletales.

Control	2,5 mg/mL	5 mg/mL	7,5 mg/mL
++	++	++	+

Escala semicuantitativa de Spitsbergen: +:BAJA O ESCASA ++:NORMAL +++:ALTA.

Al representar la velocidad de circulación en términos de desplazamiento de los eritrocitos en una sección del vaso sanguíneo ($\mu\text{m/s}$) se pudo observar de forma cuantitativa

que la velocidad de circulación es mayor en la arteria dorsal que la vena cardinal (Figura 27).

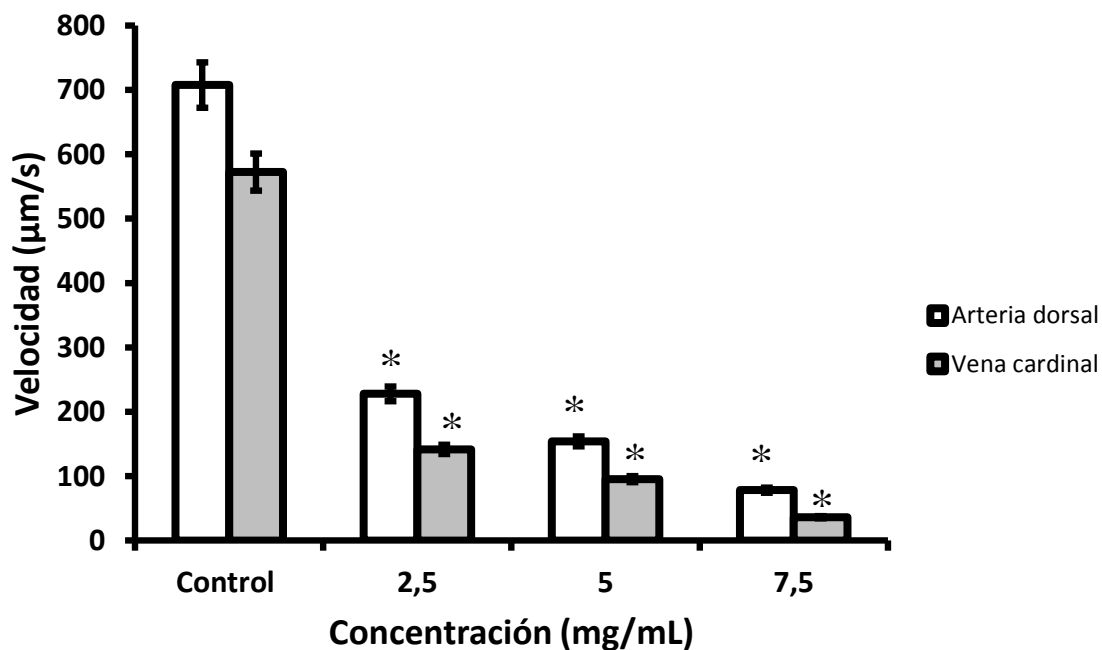


Figura 27. Concentración vs velocidad sanguínea evaluada en la arteria dorsal y la vena cardinal. El gráfico muestra el comportamiento de la velocidad sanguínea en cada una de las concentraciones transcurrida las 24 horas de tratamiento, nótese que los valores de la misma disminuyen en los grupos tratados. Las líneas sobre las barras hacen referencia a la desviación estándar de los valores obtenidos. (*) Estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$). $N=5$.

Por otra parte, los valores de área transversal (μm^2) de la arteria dorsal mostraron una tendencia a aumentar en función de la concentración, no así los valores del área transversal de la vena cardinal, los cuales presentaron respuesta variable independiente de la concentración de *P. neochilus* (Figura 28).

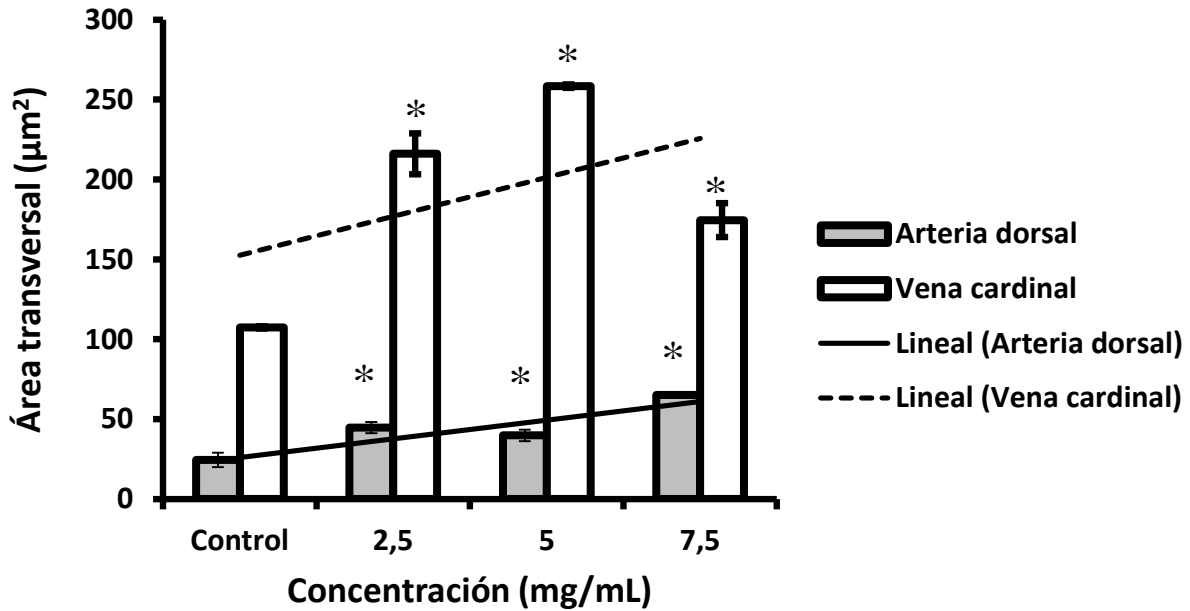


Figura 28. Área transversal vs concentración evaluada en la arteria y vena cardinal. El gráfico muestra el área transversal de cada uno de los vasos sanguíneos cada una de las concentraciones, trascurridas las 24 horas de tratamiento, Se muestra un aumento significativo en los valores. Las líneas sobre las barras hacen referencia a la desviación estándar de los valores obtenidos. (*) Estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$). N=5.

En cuanto al flujo sanguíneo (cel/s) este fue mayor en la arteria dorsal en comparación con los valores de flujo sanguíneo encontrados en la vena cardinal cuando se midió en las concentraciones de 2,5 y 5 mg/mL de *P. neochilus*. Cabe destacar que dicho flujo es mayor en la vena cardinal con respecto a la arteria dorsal en la concentración subletal de 7,5 mg/mL (Figura 29). Se observó una disminución estadísticamente significativa del flujo sanguíneo en las concentraciones evaluadas de 5 y 7,5 mg/mL en la vena cardinal, mientras que para la arteria dorsal la reducción significativa del flujo sanguíneo se vio reflejada en la concentración de 7,5 mg/mL.

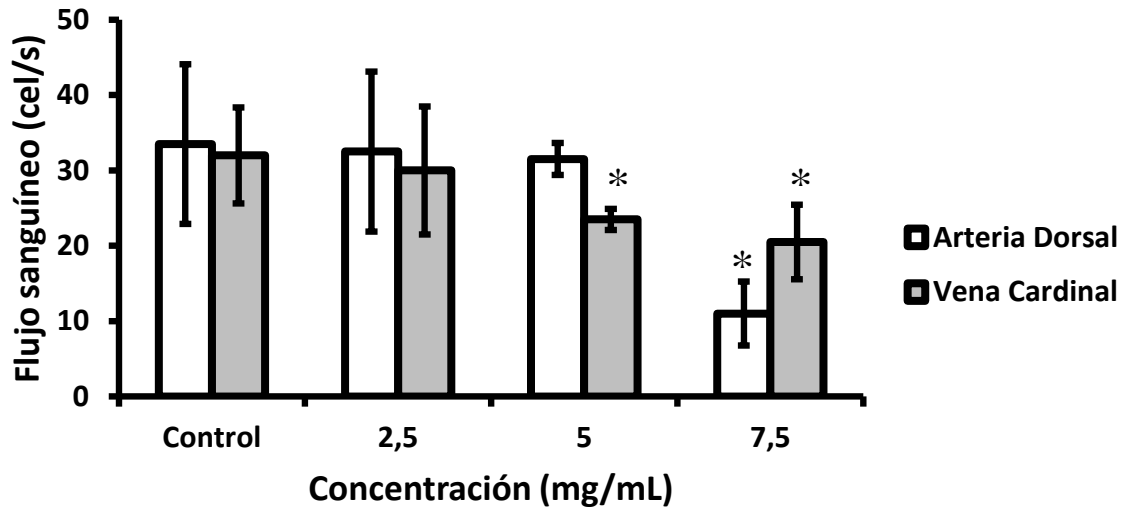


Figura 29. Flujo sanguíneo vs concentración en la arteria dorsal y vena cardinal. Se muestra el comportamiento del número de células por segundos que transita por un punto determinado en cada vaso sanguíneo. Las líneas sobre las barras hacen referencia a la desviación estándar de los valores obtenidos. (*) Estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$). N=5.

VI.6.5. Morfología cardíaca.

A nivel morfológico se pudo observar formación de edema pericárdico (Figura 30C), caracterizado como un aumento de volumen en la cavidad que rodea al corazón, el cual no fue visualizado en el control (Figura 30A). También se observó como acumulación de sangre en las cámaras del corazón, conocido como formación de trombos (Figura 30D), que muestra una clara diferencia a nivel de la transparencia apreciada en la región cardíaca del control (Figura 30B).

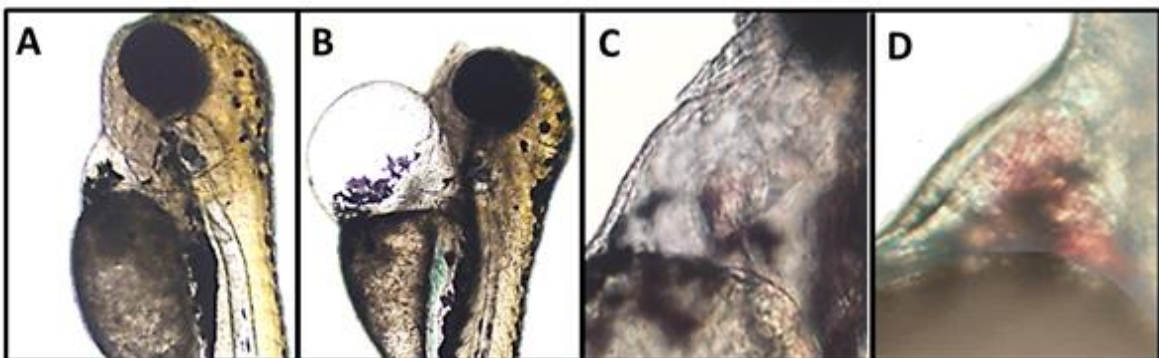


Figura 30. Alteraciones morfológicas de la región cardíaca. A. Larva control. B. Larva con presencia de edema pericárdico. C. Región cardíaca de larva control. D. Región cardíaca de larva con formación de trombos.

Por otra parte, a nivel histológico, en cortes transversales del área cardíaca de los controles (Figura 31A) en comparación con los tratados con 12,5 mg/mL (Figura 31B) se pudo visualizar en ambos cortes la porción ventricular (Figura 31A y 31B, cuadro de línea continua) y atrial (Figura 31A Y 31B, cuadro de línea punteada) de la estructura cardíaca. Sin embargo cabe destacar que cambios en la morfología cardíaca vinculado con alteraciones en la arquitectura tisular, resultaron visibles. Así la organización tisular de apariencia homogénea y lisa vista en el control (Figura 31C, cabeza de flecha) se pierde en el tejido cardíaco de la región auricular del corazón tratado (Figura 31D, óvalos) observándose una apariencia granular. Con respecto al tejido cardíaco de la región ventricular control (Figura 31E, cabeza de flecha), dicha apariencia granular se intensifica en el tejido cardíaco de la región ventricular tratada (Figura 31F, óvalos).

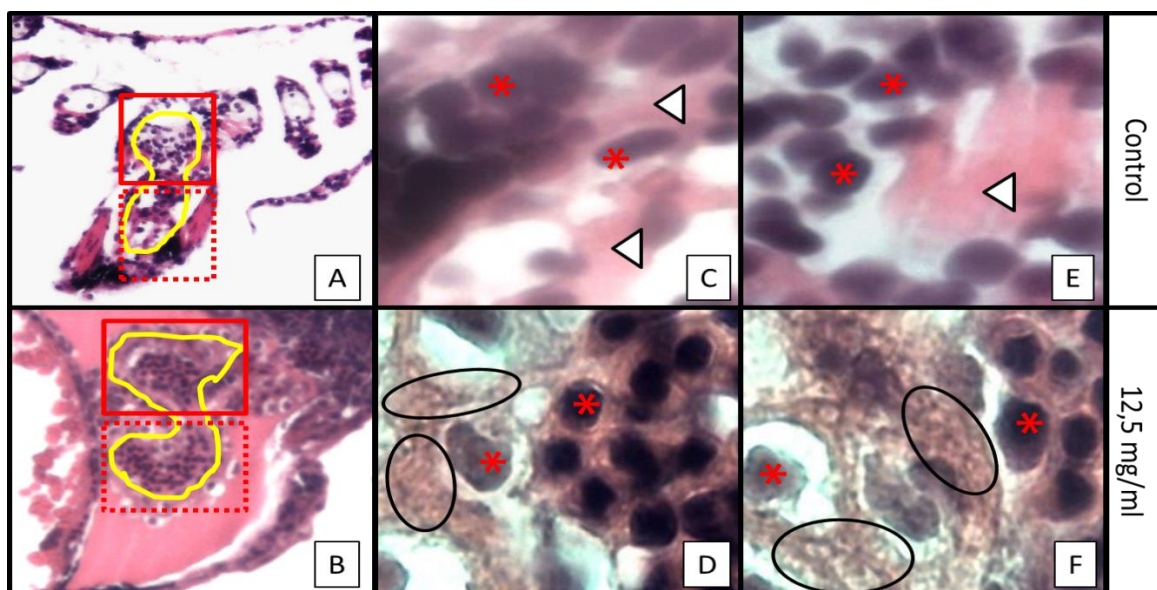


Figura 31. Corte transversal de la región cardíaca controles y tratados, teñido con H/E. A. Región cardíaca de larva control, se destaca el corazón (línea amarilla), atrio (rectángulo de línea continua) y ventrículo (rectángulo de línea punteada). Aumento 100x. **B.** Región cardíaca de larva tratada con 12,5 mg/mL, se destaca el corazón (línea amarilla), atrio (rectángulo de línea continua) y ventrículo (rectángulo de línea punteada). Aumento 100x. **C.** Región atrial de larva control, se señalan eritrocitos (asterisco) y tejido cardíaco (cabezas de flecha). Aumento 1000x. **D.** Región atrial de larva tratada con 12,5 mg/mL, se señalan eritrocitos (asterisco) y tejido cardíaco granular (óvalos). Aumento 1000x. **E.** Región ventricular de larva control, se señalan eritrocitos (asterisco) y tejido cardíaco (cabezas de flecha). Aumento 1000x. **F.** Región ventricular de larva tratada con 12,5 mg/mL, se observa eritrocitos (asterisco) y tejido cardíaco granular (óvalos). Aumento 1000x.

VII.DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permitieron: 1) La identificación de *Plectranthus neochilus* Schltr. como la especie de la planta utilizada en la presente investigación, así como caracterizar un rango de seguridad experimental para una infusión de hojas frescas de la misma. 2) Definir efectos generalizados de la infusión de *P. neochilus*, como aquellas señales de toxicidad registradas en una menor proporción de la población larvaria tratada, caracterizados por; espasmos, orientación anormal del cuerpo, curvatura troncal y de la cola. 3) La caracterización del riesgo cardiotoxico vinculado con la infusión de hojas frescas de *P. neochilus* en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, hasta el momento poco conocido, establecida a través de la alteración de la morfo-funcionalidad de la estructura cardíaca y reflejada en los cambios en la frecuencia y ritmo cardíaco, variaciones en el porcentaje del área de contracción, volumen sistólico y gasto cardíaco, además de alteraciones en los parámetros hemodinámicos como la velocidad de circulación, flujo sanguíneo, área transversal de la arteria dorsal y la vena cardinal en el modelo experimental utilizado.

VII.1. Identificación de la planta y rango de seguridad experimental.

VII.1.1. Identificación.

Un aspecto clave en la identificación de las especies del género *Plectranthus* se establece en la correcta caracterización de su inflorescencia, en donde las diferencias de longitud de la misma, así la define (Codd, 1975; Duarte y Lopes, 2007). En este sentido, los resultados expuestos en el presente trabajo permitieron establecer que la especie utilizada en esta investigación correspondía a *P. neochilus* por la corta longitud de su inflorescencia.

Cabe destacar que la relación riesgo/beneficio dependerá de una correcta identificación de la especie, ya que la composición química entre las diferentes especies del género *Plectranthus* presentan diferencias significativas (Arumugam, 2016; Jordheim, y col 2016; Khan y col., 2016). Con la planta una vez identificada se pudo obtener una infusión certificada como una solución de tonalidad amarilla clara.

En términos generales, la identificación de la naturaleza fitoquímica de hojas, frutos y semillas a través de métodos convencionales, ha permitido por años obtener distintos extractos con características y acciones diferentes a objeto de estudiar las propiedades beneficiosas o no de las plantas medicinales. Desde el punto de vista cuantitativo, los análisis químicos que hacen uso de procedimientos cromatográficos de baja y alta resolución, tales como espectrometría de masa, han permitido la identificación de los elementos presentes en los extractos acuosos de diferentes plantas medicinales (García y col., 2010; Mantovani y col., 2013). A pesar de no haber abordado en esta experimentación aspectos cuantitativos del extracto acuoso de *P. neochilus*, cabe destacar que la definición del perfil químico del liofilizado del extracto acuoso de las hojas frescas de este mismo ejemplar (MYF 28987) (Caro, 2016), han permitido de forma indirecta asumir que la composición química contendría flavonoides, antocianinas, catequinas y alcaloides, como se ha reportado en otro estudio en donde ha sido evaluado la composición de los extractos polares (Viana, 2011). Por lo tanto, los resultados de la composición de la infusión de *P. neochilus* determinados por estos autores, permiten inferir que la tonalidad del extracto acuoso, obtenido en el presente trabajo, pudiera ser la consecuencia de la presencia de componentes polifenólicos como los flavonoides y antocianinas, constituyentes vegetales, liberados a alta temperatura y cuya función se relaciona directamente con la coloración de

las hojas y flores en plantas superiores (Garzón, 2008; Burgos y col., 2016; Jordheim y col., 2016; Vejar y col., 2016). Ambos componentes son solubles en agua, gracias a la presencia de grupos fenoles en su estructura molecular (Aguilera y col., 2011). Particularmente los flavonoides se encuentran presentes en formas glicosiladas, los cuales son más solubles en agua; por el contrario algunos flavonoides no glicosilados también pueden aparecer en este extracto acuoso (Falé, 2011). La solubilidad de estos componentes permite asumir que los mismos pueden ser liberados de la hoja a un medio acuoso con la metodología utilizada. En relación a la extracción acuosa desarrollada, se ha demostrado que la preparación por infusión de las hojas frescas de varias especies de *Plectranthus* tales como *P. barbatus*, *P. madagascarensis* y *P. neochilus* Schltr. permite obtener un mayor peso seco de dicho extracto, así como una elevada actividad antioxidante, en comparación con otros métodos que permiten la extracción de los principios solubles de la planta por el calentamiento del agua utilizada (Rijo y col., 2014), bien sea en microondas o por una plancha plana convencional, tales como la decocción (Celik, 2012). Lo anterior permite asumir que se obtiene mayor cantidad de componentes por la preparación de infusión que por otros métodos de extracción acuosa, sin embargo, se hace necesario realizar un análisis químico que reconozca la posible correlación entre la forma de extracción acuosa, la intensidad de la tonalidad de la infusión y la cantidad de compuestos hidrosolubles presentes en la misma para comprobar esta suposición.

VII.1.2. Rango de seguridad experimental.

Como bien se mencionó anteriormente, la composición química del extracto polar y del liofilizado de las hojas frescas de *P. neochilus* ha sido estudiada, no obstante, la evaluación tóxica de la infusión de sus hojas frescas se encuentra muy limitada

actualmente. En este sentido, la evaluación de sus componentes tóxicos ha ganado importancia, sobre todo en la República Bolivariana de Venezuela, ya que ha sido utilizada como una alternativa a los medicamentos sintéticos como analgésicos y antigripales por sus principios activos particulares (Bandeira y col., 2011; Orsinni, 2015), que dependiendo de la forma de su consumo puede generar o no daños en el organismo. En general, los resultados demuestran que la infusión de las hojas frescas de *P. neochilus* Schltr. a partir de un determinado valor de concentración, es letal. Letalidad acompañada además por ciertos efectos tóxicos generalizados y muy particularmente con efectos cardiotoxicos que permitieron definir el riesgo cardiovascular vinculado con la infusión utilizada.

VII.3.1. Rango de letalidad.

Respecto a la letalidad demostrada cabe destacar que la evaluación de las larvas de pez cebra *Danio rerio* expuestas a distintas concentraciones de la infusión de *P. neochilus* permitió determinar el rango de la misma, hasta el momento no reportada ni demostrada experimentalmente en este modelo. Dicho rango quedó definido a partir de la estimación de la CL_{50} en donde valores por encima de esta concentración, y particularmente valores por encima de 12,5 mg/mL, provocaron la muerte de todos los individuos de la población larvaria. Lo anterior comprueba la eficiencia de la metodología utilizada en el área de la toxicología para evaluar el rango seguro de una sustancia a través de bioensayos que incluyen bajas concentraciones que exhiben pocos o ningún efecto, medianas concentraciones que exhiben la mortalidad del 50% de la población y altas concentraciones que exhiben el 100% de la muerte de los individuos (Haldi y col., 2012). Además, permitió aportar información sobre la exposición del extracto acuoso de *P. neochilus*, lo cual indica que dicha planta no se encuentra desvinculada de generar algún efecto adverso dependiente

de la concentración. Dichos efectos aparentemente pueden conllevar a la muerte de los individuos que se exponen al extracto por un tiempo prolongado y en concentraciones elevadas, muy a pesar de los hallazgos beneficiosos que se han reportado en la literatura. Muchas son las razones que pudieron causar esta mortalidad, sin embargo nuestros resultados demostraron que un efecto cardiotoxico pudiera estar implicado.

VII.3.2. Señales de toxicidad generalizada.

La toxicidad es una propiedad relativa de una sustancia química que se refiere al daño potencial generado por la misma en los organismos vivos, su expresión depende de las características de exposición y del comportamiento en el organismo asociado a los mecanismos de transporte y las interacciones con el sitio de destino en los tejidos. Por lo tanto, la toxicidad sólo se produce si el agente es capaz de alcanzar objetivos específicos a concentraciones suficientes con el fin de inducir algunos efectos (Souza y col., 2016). Por otra parte, se ha demostrado que los diferentes efectos generados por algunas plantas medicinales pueden estar relacionados con sus compuestos (Arcanjo y col., 2012). En este sentido la exposición al extracto acuoso de *P. neochilus* mostró varios efectos tóxicos según los resultados de esta investigación, que posiblemente pudieron manifestarse por la composición fitoquímica de esta planta, en la cual se ha sugerido la presencia de compuestos fenólicos. La condición de toxicidad estudiada de estos compuestos hidrosolubles pudiera estar contribuyendo con la toxicidad inducida por el tratamiento con el extracto acuoso en las larvas de pez cebra. Sin embargo, el nivel de este estudio no puede comprobar la correlación entre estas dos variables. Pese a esto, resulta evidente asumir que los efectos observados sobre el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio* podrían ser interpretados como una consecuencia de la composición del extracto indudablemente como

un resultado de la acción, de manera individual o en combinación, de los componentes fitoquímicos presentes. Es por ello que sería pertinente realizar la evaluación de la concentración de cada fitoquímico secundario presente en el extracto y evaluarla individualmente en este modelo, puesto que surge la duda de especificar cuál de estos constituyentes del extracto pudieron ser responsables de los efectos observados ya que nuestra investigación no aportó datos suficientes para dilucidarlo.

En relación a lo que se ha denominado en esta investigación como efectos tóxicos generalizados, es decir aquellas señales de toxicidad cuantificadas en una menor proporción de la población tratada con la infusión, cabe destacar que todas estas señales de toxicidad han permitido definir la acción del extracto acuoso de las hojas frescas de *P. neochilus* como una acción tóxica sistémica. La misma generó un daño primario expresado en los patrones de comportamiento y locomoción (Selderslaghs y col., 2010; de Esch y col., 2012) que además han sido descritos exhaustivamente en el modelo de pez cebra (Kalueff y col., 2013). Estos se han relacionado con alteraciones en la actividad del sistema neural, la cual exhibe una gran cantidad de información sobre las vías de señalización que controlan el desarrollo de la misma y que pueden implicar la función cerebral (Budick y O'Malley, 2000). La manifestación de espasmos es un claro ejemplo conductual y locomotor que demuestran la modificación de dicha actividad neural, dado que se han evaluado sustancias neurotóxicas quimioconvulsivas en larvas de pez cebra que generan espasmos como una respuesta neurotóxica también observada en mamíferos (Wong y col., 2010). A partir de los diferentes estudios en la alteración de las vías de señalización generados por agentes neurotóxicos, se puede asumir que según el comportamiento observado en los resultados existe un efecto neurotóxico generado por la exposición del extracto de *P. neochilus* (Parnig

y col., 2007; de Esch, y col., 2012). Varios mecanismos han sido propuestos para explicar este efecto neurotóxico, particularmente se ha hecho mención a la inhibición en los receptores de GABA encargados de la contracción muscular (Wyart, 2017) los cuales pueden ser inhibidos principalmente por los alcaloides presentes en la infusión, resultando en el efecto convulsivo observado (Rujjanawate y col., 2003). El planteamiento anterior hace referencia a que los componentes de la infusión posiblemente modificarían la transmisión GABAérgica uniéndose a receptores específicos o podrían modular la unión de los ligandos en este complejo, como ha sido evidenciado con diferentes drogas (Inoue y col., 2016). Por otra parte, se ha determinado que la concentración de AR presente en los extractos acuosos de las especies de *Plectranthus* se correlaciona con la inhibición de acetilcolinesterasa. La inhibición de esta enzima provocaría efectos sobre las células nerviosas y como resultado genera una estimulación continua de los músculos, glándulas y el SNC (Falé, 2011). Con respecto a esto, resulta evidente que la concentración de AR podría estar coordinando la contracción muscular, provocando los movimientos espasmódicos reportados en estos resultados.

En relación a la curvatura troncal y caudal, efectos considerados como generalizados, los mismos podrían ser interpretados como una consecuencia de la disrupción neuronal anteriormente propuesta o como una acción directa de componentes específicos del extracto sobre la estructura muscular esquelética. Al respecto, una acción directa sobre complejos proteicos que mantienen la arquitectura del tejido muscular esquelético tales como el complejo distrofina-glicoproteína (Parsons y col., 2002; Widrick y col., 2016), podría explicar la pérdida de la integridad muscular observada en los cortes

histológicos. Esto permitiría sugerir que el músculo esquelético conformaría un potencial blanco de acción de la infusión de *P. neochilus*.

VII.3.5. Caracterización del riesgo cardiotoxico.

El riesgo cardiotoxico caracterizado en la presente investigación, puede ser entendido como cambios en la función y en la morfología del corazón, ejercidos por la infusión de *P. neochilus*. Funcionalmente, estaría directamente vinculada con modificaciones de la frecuencia cardíaca y estructuralmente a través de modificaciones directas sobre la estructura tisular o celular que conforma el corazón.

Funcionalmente se sabe que la FC se encuentra regulada por factores extrínsecos e intrínsecos (White y Fernhall, 2015). Los factores extrínsecos ejercen su función reguladora a través de vías de señalización definidas por la división simpática y parasimpática del sistema nervioso central (SNC), en donde dichas señales son controladas por el hipotálamo e influenciados por estímulos nerviosos procedentes de centros superiores del cerebro que involucran la secreción de hormonas que actúan directamente sobre tejidos no endocrinos como el tejido cardíaco. Por otra parte, los factores reguladores intrínsecos como la actividad del marcapaso, se encuentran regulados por la modificación de estructuras tisulares y celulares que conforman el corazón, como el músculo cardíaco ventricular y auricular así como el endocardio, epicardio, pericardio entre otros (Young y col., 2014). Es de hacer notar, que el estadio de desarrollo seleccionado en nuestra investigación no cumple con la estructura anátomo-funcional 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 totalmente estructuradas en esta etapa (Schwerte y col., 2006; Cornejo, 2012). La mencionada característica se presenta en estadios tempranos de desarrollo de

modelos experimentales como el embrión de pollo y ha sido comprobada su existencia en el modelo de pez cebra a través de la manifestación limitada de respuesta en la evaluación de compuestos moduladores de la FC a nivel del SNC, particularmente en la exposición con atropina, neostigmina y efedrina (Haring y col., 1970; Mujica, 2015). Pese a ello, nuestros resultados son indicadores de una bradicardia (118 P/min a la concentración de 7,5 mg/mL), al ser comparados con valores de FC en especies mutantes *breackdance (bre)*, caracterizados por presentar bradicardia congénita (Kopp y col, 2005; Kopp y col., 2010). Cabe destacar que los valores control de FC del modelo larvario de pez ha sido reportado entre los 140-180 P/min (Dhillon y col., 2013; Huttner y col., 2013; Crowcombe y col., 2016). Ante esta situación, cabría pensar que el efecto observado de la disminución de la FC, inducida por la infusión de *P. neochilus*, no sea consecuencia de una alteración de las vías de regulación del SN, sino una consecuencia de la acción directa sobre la estructura tisular o celular que conforma el corazón.

Anatómicamente cobra relevancia el argumento de que una alteración del tejido muscular, y particularmente del tejido muscular del sistema de conducción, sea el posible origen de la reducción de la FC ya que la pérdida de la estructura compacta del miocardio, reflejado en los cortes histológicos del área cardíaca, así lo sugieren.

En cuanto a la acción directa de elementos particulares sobre la estructura tisular del corazón, se ha demostrado que las sustancias xenobióticas tienen como principal blanco de acción a este órgano (Cichocki y col., 2016), debido a la sensibilidad que presenta el mismo ante el estrés oxidativo generado por dichas sustancias (Choi y col., 2007, Kurian y col., 2016). Este mismo blanco de acción ha sido demostrado en el modelo larvario de pez cebra (Crowcombe y col., 2016; Genge y col., 2016) y estudios recientes confirman que la

disminución de la FC en este modelo involucra una alteración de los canales iónicos, que como consecuencia puede generar limitaciones en la adaptación para mantener la homeóstasis celular del tejido cardíaco (Vargas, 2017). En este sentido cabría pensar que la disminución de la FC podría ser promovida por la exposición a los componentes presentes en la infusión, en donde la solubilidad de estos permitiría su difusión hacia los diferentes compartimientos celulares en los cardiomiocitos, generando así un gasto energético implicado en la desintoxicación celular, lo cual conllevaría a un posible desbalance en la homeostasis iónica (Rodríguez y col., 2015). A pesar de que en la presente investigación no fueron puestos en evidencia los posibles cambios en el proceso de liberación/captación de los iones implicados en la contracción cardíaca, resulta evidente que una disminución de la FC implicaría una alteración en el proceso de contracción. En este sentido un desbalance iónico, generado por los componentes de la infusión, modificaría el proceso de formación y/o conducción de la corriente iónica implicada en las propiedades de contracción del tejido muscular cardíaco, la cual depende a su vez de los canales de sodio, canales de potasio y de mensajeros secundarios, como el calcio, en las células miocárdicas (Lin y Hwang, 2016). Por otra parte los cambios a nivel de la morfología del corazón, caracterizados por alteraciones en la citoarquitectura del tejido cardíaco también es considerado como un defecto morfológico relacionado con la disfunción cardíaca según otros autores (Chen y col., 2015; Mujica, 2015).

VII.3.5.a.Ritmicidad cardíaca.

Como es sabido, en todos los vertebrados la actividad cardíaca requiere de una adecuada coordinación de los movimientos contráctiles de las respectivas cámaras ventricular y auricular, lo cual garantiza el flujo sanguíneo. Dichas coordinación, se logra

gracias a la actividad ejercida por el marcapaso sobre el sistema de conducción cardíaco (SCC), que permite la eficiente eyección de la sangre desde el ventrículo al resto del cuerpo (Poon y col., 2016).

La fisiología del corazón de pez cebra ha sido ampliamente estudiada en este proceso y se conoce que la sangre oxigenada llega al ventrículo desde la arteria eferente. Para ello, la presión sistólica en la superficie ventral del bulbo arterioso y la presión sistólica desarrollada en el atrio tiene que ser consistentemente mayor que la presión en la diástole ventricular final para poder producir un gradiente de presión a través de la aurícula y del ventrículo. Por consiguiente, la presión atrial tiene que ser menor en el inicio del llenado de esta cámara para coincidir con el inicio de la eyección ventricular (Hu y col., 2001). Este proceso fisiológico se encuentra íntimamente vinculado con el SCC entre la aurícula y el ventrículo y con la estructura muscular, la cual se encuentra acoplada por uniones intercelulares el tipo gap-junction (Ross y Pawlina, 2008). En este sentido se puede establecer la modificación de las fibras musculares cardíacas como uno de los tantos factores intrínsecos que influyen en la arritmia reflejada, debido a que la posible pérdida de estas uniones celulares ha resultado en una predisposición a las arritmias en otras investigaciones (Chi y col., 2008). A partir de esto se puede inferir que existe una correlación entre de la arquitectura tisular y la pérdida de la capacidad de contracción, particularmente a nivel ventricular en la concentración de 7,5 mg/mL.

VII.3.5.c. Disfuncionalidad ventricular y arquitectura tisular

Como es sabido, el músculo cardíaco es el responsable de la contracción, continua, potente y rítmica del corazón, función que es desencadenada por mecanismos intrínsecos que han sido evaluados en larvas de pez cebra *Danio rerio* (Gartner y Hiatt, 2001; Young y

col., 2014). Acompañando a los mecanismos intrínsecos, además de la organización en filamentos contráctiles, observada tanto en células musculares cardíacas embrionarias como en células musculares cardíacas de cultivos de tejidos (Ross y Pawlina, 2008), se encuentran procesos fisiológicos que involucran canales iónicos reguladores de la contracción, particularmente, canales de sodio, potasio y calcio entre otros, similares a los encontrados en los mamíferos y que presentan homología en el modelo larvario de pez cebra. Si estos canales iónicos reguladores de la contracción están rigiendo la disfuncionalidad ventricular, demostrada en nuestros resultados, no está claramente establecido. Sin embargo la disminución del porcentaje del área de contracción, del volumen sistólico y del gasto cardíaco, con valores obtenidos por debajo del rango considerado normal de acuerdo a otros autores (Bagatto y Burggren, 2006; Malone y col., 2007; Fink y col., 2009), así lo sugieren. Por otra parte, cabe destacar que la reducción de estos parámetros ha sido considerada como una consecuencia directa de la disminución en la FC relacionada directamente con la función ventricular según otras investigaciones (Randall y col., 1998; Chen y col., 2015).

En cuanto a la arquitectura tisular, los resultados mostrados indican la posible relación que existe entre la pérdida de la arquitectura del tejido muscular cardíaco y la disfunción ventricular. Dicha relación ha sido ampliamente reconocida (Brown y col., 2016; Knight y Yelon, 2016). La misma, establecida a concentraciones por encima del valor de la CL_{50} de la infusión de *P. neochilus* mostrado en la presente investigación, podría estar vinculada con una pérdida de las proteínas que asisten y mantienen el complejo contráctil de las células musculares cardíacas, permitiendo esto inferir que dicho cambio pudiera ser un factor responsable en la pérdida de la funcionalidad ventricular,

posiblemente vinculado con la exposición a los componentes de la infusión como ha sido sugerido en la literatura con el uso de otros extractos (Berger y col., 2012). Dicha alteración podría ser catalogada como un efecto citotóxico, relacionado por una parte, con la acción de saponinas y por otra parte con la acción de compuestos polifenólicos presentes en la infusión. Las saponinas actuarían sobre las membranas celulares (Francis, 2002), mientras que los compuestos polifenólicos sobre las mitocondrias, pudiendo provocar un potencial colapso de la membrana celular y mitocondrial respectivamente, afectando así la arquitectura muscular y la funcionalidad ventricular como ha sido reportado (Moridani y col., 2002; Galati y O'brien, 2004). En base a esto la infusión de *P. neochilus* pudiera estar comprometiendo la relación estructura-función del ventrículo, así como expresando una potencial toxicidad *in vivo* de estos compuestos, toxicidad a ser corroborada.

VII.3.5.d. Circulación.

En los vertebrados el sistema cardiovascular está constituido por el corazón y una red ramificada de vasos sanguíneos, en donde la funcionalidad de la estructura cardíaca modula los parámetros hemodinámicos de la vasculatura (Brönnimann y col., 2016). Estos vasos transportan los gases, nutrientes, hormonas y metabolitos en todo el cuerpo, así como también actúan como un factor de regulación de la homeostasis de los organismos superiores (Bussmann y col., 2010). Cabe destacar que el origen de esta red ramificada surge a partir de dos estructuras principales como son la arteria dorsal y la vena cardinal (Kania y Klein, 2016), y el incremento de su tamaño puede variar dependiendo de dos procesos antagónicos, el proceso de vasoconstricción y de vasodilatación, definidos como la disminución y el incremento del área transversal de los vasos sanguíneo respectivamente. Estos cambios en la morfología implican cambios en parámetros hemodinámicos tales

como la velocidad y flujo sanguíneo, por una parte la vasoconstricción aumenta dichos parámetros mientras que la vasodilatación disminuye los mismos (Ortiz, 2013; Borge, 2011).

En base a lo anteriormente expuesto, se podría asumir que el incremento del tamaño de los vasos sanguíneos en concentraciones subletales de la infusión de *P. neochilus*, reflejado en un aumento del área transversal, hace referencia a que dicha infusión podría generar un proceso de vasodilatación. Cabe destacar que dichos procesos, al igual que la FC, se encuentran mediados por factores extrínsecos e intrínsecos (Borge, 2011); como bien se mencionó anteriormente los factores extrínsecos ejercen su función reguladora a través de vías de señalización del sistema nervioso central (SNC), las cuales no se encuentran totalmente estructuradas en la etapa larvaria utilizada (Schwerte y col., 2006; Cornejo, 2012). Por otra parte, los factores intrínsecos en el sistema vascular como la estructura de los vasos sanguíneos, se encuentra regulado principalmente por la modificación de la concentración de oxígeno y la producción endógena de óxido nítrico (ON) en el tejido endotelial (Iribarra y col., 2000; Troelsen y col., 2015).

En cuanto a una perturbación a nivel de difusión de oxígeno o condición de hipoxia, esta no generaría los procesos de vasoconstricción o vasodilatación en el pez cebra, ya que la dependencia fisiológica al oxígeno por parte de sus larvas ha sido cuestionada. Al respecto cabe mencionar que reportes experimentales han demostrado una alta tasa de sobrevivencia de las larvas sometidas a intensos periodos de hipoxia (Vargas, 2017), a diferencia de los mamíferos (Ellertsdóttir y col., 2010). Esta sobrevivencia ha sido interpretada en base a que la difusión del oxígeno en este modelo experimental es realizada a través de la superficie del cuerpo y la cantidad de oxígeno difundida satisface las

necesidades metabólicas. Este planteamiento demuestra que el acoplamiento entre el metabolismo y el transporte de oxígeno todavía no está establecido en las etapas larvarias tempranas, sugiriendo que las funciones iónicas y osmorreguladoras están interviniendo en el flujo sanguíneo mucho antes de que se desarrolle su actividad metabólica característica (Schwerte y col., 2003).

La argumentación antes asumida permitiría por tanto suponer que el proceso de vasodilatación no se encuentra vinculado con fallas del equilibrio metabólico del oxígeno, sugiriendo que sería la producción endógena de ON la que estuviera rigiendo el origen de esta vasodilatación. Dicho mecanismo, en los vertebrados, es llevado a cabo en el tejido endotelial y el músculo liso que conforman al vaso sanguíneo, además se encuentra estrechamente vinculado con el proceso de transformación de la L-arginina a citrulina, un proceso dependiente de la producción de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS) la cual a su vez es dependiente de calcio. El ON es difundido hacia el músculo liso vascular activando el sistema guanilato ciclasa y provocando un aumento los niveles de GMPc promoviendo la relajación del tejido muscular liso y por consiguiente a un aumento en el diámetro del mismo. Dicho mecanismo ha sido descrito para el modelo larvario de pez cebra, en el cual ha sido revelado la participación del ON sobre la actividad del endotelio vascular (Pelster y col., 2005; Schwerte y col., 2003). La presencia de este mecanismo en nuestro modelo experimental, nos conlleva a interpretar el aumento del área transversal de los vasos es llevado a cabo por esta vía, en donde los componentes fitoquímicos presentes en la infusión pudieran estar activando receptores específicos IP_3 que modulen la producción de ON en el tejido muscular liso de la arteria y la vena dorsal (Figura 33).

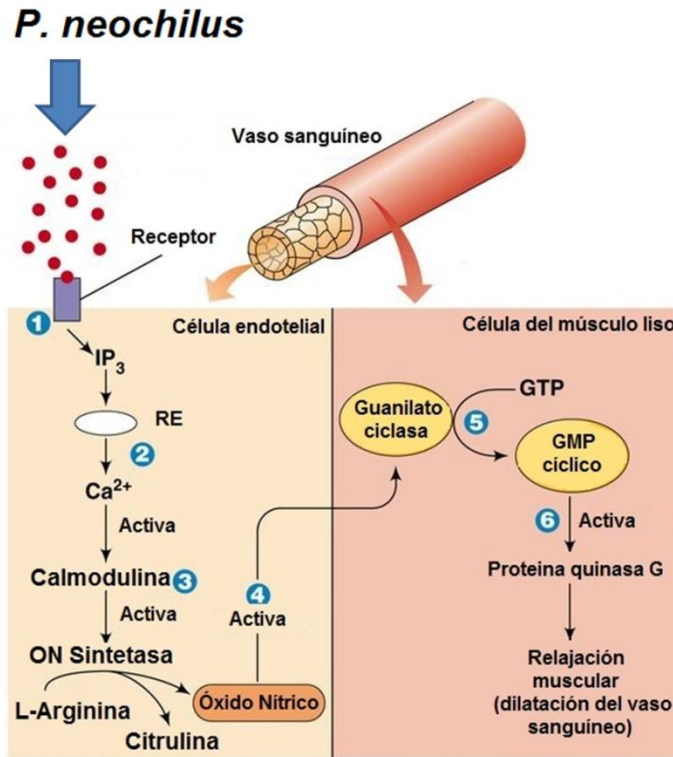


Figura 32. Posible mecanismo de acción del óxido nítrico en el organismo por la infusión de *P. neochilus*. Se muestra un esquema del mecanismo de la vasodilatación endógena generada por el mecanismo de acción del óxido nítrico (ON). Tomado y modificado de <https://www.pinterest.com/pin/415386765606619297/> [Consulta: 12 de abril de 2017]

Con respecto a los parámetros hemodinámicos de la circulación, la velocidad sanguínea estimada en el área caudal mostró valores ubicados por debajo del rango de las velocidades mínimas reportadas para la etapa larvaria seleccionada, específicamente 300 $\mu\text{m/s}$ en comparación con los valores de la velocidad control para la misma etapa, reportada por otros autores entre 580-766 $\mu\text{m/s}$ (Schwerte y Pelster, 2000; Bagatto y Burggren, 2006; Yalcin y col., 2017), demostrando una evidente disminución en la velocidad a concentraciones subletales. Por otra parte los valores de flujo sanguíneo también se vieron disminuidos y los valores obtenidos de área transversal mostraron un aumento con mayor magnitud de estos parámetros en la arteria. Este aspecto fisiológico en donde la velocidad y flujo sanguíneo es inversamente proporcional al área transversal de los vasos es común

observarlo en la fisiología circulatoria de vertebrados (Randall y col., 1998; Ortiz, 2013). Respecto a estos resultados hemodinámicos cabe destacar que los mismos implicaron una relación inversamente proporcional al área transversal de los vasos sanguíneos, característica de un proceso de vasodilatación, por tanto permiten sugerir que *P. neochilus* compromete el proceso normal de circulación sanguínea a través de la modificación de los parámetros hemodinámicos y de parámetros estructurales como el área transversal de los vasos. Por otra parte los resultados expuestos, en la evaluación a nivel caudal de la velocidad y flujo sanguíneo así como la evaluación de la funcionalidad de la estructura cardíaca, demuestran el vínculo entre la funcionalidad del corazón y la circulación demostrada por otros autores (Brönnimann y col., 2016), ya que ambas variables disminuyen. Además, demuestra que estas alteraciones son dependientes de la concentración de la infusión de *P. neochilus*. Por tanto las perturbaciones demostradas en la funcionalidad de la estructura cardíaca, posiblemente generadas por los componentes de la infusión, podrían relacionarse con estos cambios en la velocidad y el flujo sanguíneo.

VII.3.5.e. Edema pericárdico.

Los peces de agua dulce, como el pez cebra, están constantemente en un medio de muy baja osmolaridad y la capacidad de excluir el agua se hace esencial para mantener los niveles adecuados en el volumen interno y la osmolaridad. Dichos procesos dependen de la piel, los riñones y las branquias; por un lado la piel forma una barrera relativamente permeable a la entrada de agua, por otra parte las cantidades de agua que logran permeabilizarse en esta barrera son constantemente excretadas por los riñones, mientras que las branquias desempeñan un papel en la osmorregulación de estos individuos (Guh y col.,

2015). En este sentido una primera explicación para la formación de edema pericárdico podría ser la manifestación de fallas en la barrera de permeabilidad al agua (Usenko y col., 2007) que podrían generarse por la permeabilización de los componentes de la infusión aumentando significativamente su absorción, conllevando a una respuesta osmótica por una posible inhibición de la actividad renal. Esta disfuncionalidad renal, podría ser atribuida a defectos en el sistema de filtración sanguínea, la cual comienza en el glomérulo y finaliza en los pronefros, estructuras renales implicadas en la reabsorción de electrolitos y solutos (Drummond, 2005; McKee y Wingert, 2015). Esto generaría una perturbación del equilibrio osmótico de las larvas de pez cebra, como ha sido reportado por la exposición a concentraciones de TCDD (Antkiewicz y col., 2005).

Es importante mencionar que la función branquial y cardiovascular también son esenciales para el desarrollo de la mencionada actividad renal (Serluca y col., 2002; Miceli y col., 2014). Sin embargo, a pesar de que las branquias también desempeñan un papel en el mantenimiento del equilibrio osmótico su capacidad osmorreguladora se presenta después de los 7 pdf (Rombough, 2002), por lo que no se podría relacionar la formación de edema pericárdico con modificaciones en la actividad branquial en la etapa larvaria utilizada. Sin embargo se ha reportado la relación entre la presencia de esta alteración morfológica con la disminución de la correcta función cardiovascular (Hill y col., 2004), por consiguiente, la presencia de edema pericárdico también se podría relacionar con la disminución de los parámetros cardíacos y hemodinámicos reportados en los resultados.

A pesar de no estar muy claro la cuál de todas estas alteraciones se encuentran realmente implicadas en la respuesta ante la exposición con la infusión de *P. neochilus* los resultados obtenidos sugieren que existe una alteración en la fisiología necesaria para la

correcta gestión osmótica a través de diferentes vías de acción, particularmente la cardiovascular, reflejada en la formación de edema pericárdico (Figura 34).

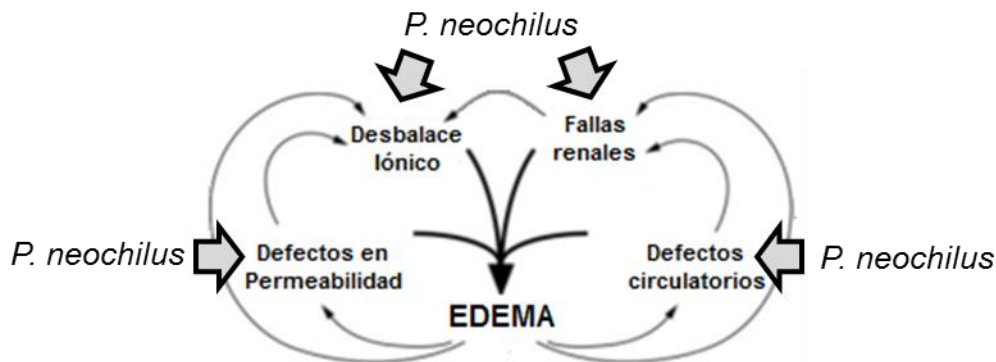


Figura 33. Modelo del circuito de retroalimentación positiva en la formación de edema pericárdico en el pez cebra generado por la infusión de *P. neochilus*. Se muestra el esquema del modelo de retroalimentación positiva a través del cual el deterioro de la permeabilidad al agua, la función cardiovascular o la función renal, posiblemente generada por *P. neochilus*, puede conducir a la formación de un edema irreversible. El edema a su vez altera la función del riñón, la circulación y la capacidad de mantener el equilibrio iónico. Tomado y modificado de Hill y col., 2004.

VII.3.5.f. Trombos.

La hemostasia; es un proceso fisiológico de defensa diseñado para proteger al organismo de la pérdida de la sangre circulante durante una lesión, esta implica la formación de un coágulo en el sitio donde ocurre el daño. Cabe destacar que dichos coágulos contienen plaquetas y fibrina reticulada como principales componentes celulares y proteicos respectivamente (Jagadeeswaran, 2005). Por el contrario, la trombosis es un proceso patológico donde se forman coágulos trombóticos que obstruyen el flujo de la sangre en el sistema circulatorio, mecanismo que puede causar graves riesgos de muerte (FMH, 2014). A pesar de que el proceso de trombosis no se ha caracterizado bien en peces, se ha demostrado que el pez cebra tiene ortólogos en la mayoría de los genes que codifican proteínas con funciones en la coagulación y en las vías de señalización plaquetaria que se presentan en humanos. También se ha demostrado que varios receptores de superficie

plaquetaria así como los factores extrínsecos e intrínsecos de coagulación están presentes en la sangre de este modelo, por lo tanto, la maquinaria responsable de la hemostasia y la formación de trombos se encuentra bien conservada (Jagadeeswaran y col., 2016). En este sentido podría asumirse que la exposición a elevadas concentraciones como 10 y 12,5 mg/mL, desencadenaría la cascada de coagulación en el lugar de la lesión tisular en la estructura cardíaca y formaría el trombos mostrado en los resultados (Figura 35).

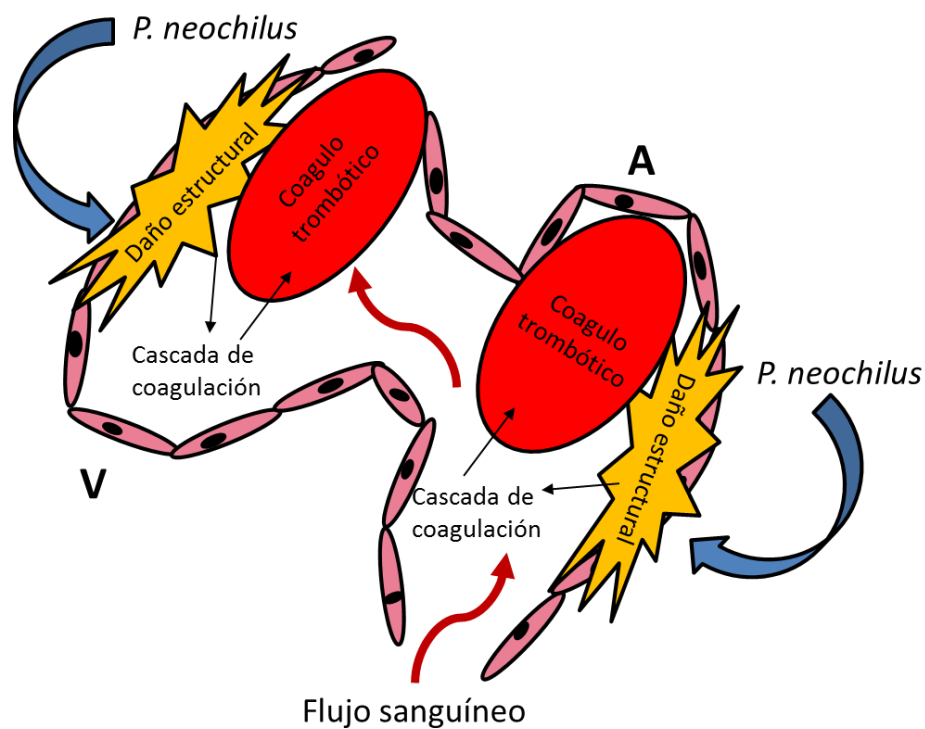


Figura 34. Modelo de mecanismo de formación trombos oclusivo en región cardíaca por la exposición de la infusión de *P. neochilus*. Atrio (A), ventrículo (V). Fuente propia.

VIII. CONCLUSIONES

La descripción botánica del follaje y particularmente de la inflorescencia permite la identificación de las planta cultivadas en los jardines del instituto Anatómico “José Izquierdo” como la especie *Plectranthus neochilus* Schltr.

La metodología desarrollada en protocolos para la evaluación del rango seguro de sustancias permite determinar el valor de la concentración letal cincuenta (CL₅₀) y una Concentración Tóxica Cincuenta (CT₅₀) de la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus* Schltr.

Las curvas concentración-respuesta permitieron determinar el patrón de mortalidad y los efectos tóxicos generales generados por la exposición a distintas concentraciones de la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus* Schltr. en las larvas de pez cebra.

El extracto acuoso en forma de infusión de *Plectranthus neochilus* Schltr. posee una acción tóxica sistémica, con un daño primario localizado sobre la musculatura y órganos específicos como el cerebro y el corazón.

Las respuestas cardiotóxicas se pueden caracterizar a través de la evaluación de parámetros cardíacos como frecuencia y ritmo cardíaco, así como por parámetros que permiten evaluar la morfo-funcionalidad ventricular y circulatoria en las concentraciones subletales. La evaluación de esta respuesta cardiotóxica proporciona información sobre modificaciones de parámetros cardíacos y la morfo-funcionalidad ventricular y circulatoria.

La infusión de *Plectranthus neochilus* Schltr. induce a nivel morfo-funcional la disminución de la frecuencia cardíaca, ritmo cardíaco, gasto cardíaco, volumen sistólico,

porcentaje del área de contracción, velocidad de circulación, y flujo sanguíneo así como el aumento del área transversal de los vasos sanguíneos.

La cardiotoxicidad inducida por la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus* Schltr. podría estar mediada por cierta capacidad vasodilatadora inherente a la infusión.

La alteración de la arquitectura del tejido muscular cardíaco implica una pérdida en la funcionalidad de la estructura cardíaca que conduce a una cardiotoxicidad.

Los análisis estadístico certifican la relevancia significativa del aumento o disminución de los parámetros cardiotóxicos evaluados en larvas control y grupos tratados con la infusión de hojas frescas de *Plectranthus neochilus* Schltr.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, A. 2012. Histoquímica. *Anales de Química*. **108(2)**.

Aguilera, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R., Meza-Velázquez, J. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia*. **13(2)**: 16-22.

Alasbahi, R., Melzig, M. 2010. *Plectranthus barbatus*: a review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology—part 1. *Planta Med.* **76(07)**: 653-661.

Álvarez, M., Alvarado, S., Ercolino, J. Perdomo, L. 2012. La infusión de hojas de planta de higo (*Ficus carica*) y su acción sobre melanoforos de pez cebrá (*Danio rerio*) bajo irradiación y monitoreo cardíaco “In vivo”. *Retel.* **37**: 1-13. <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=835> [Consulta 27 de febrero de 2017].

Álvarez, M., García, V., Arias, M., Perdomo, L., Navarro, E. 2017a. Acrilamida y *Amaranthus dubius* L en células sanguíneas de pez cebrá *Danio rerio*. *Retel.* **49**: 28-37. <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=960> [Consulta 27 de febrero de 2017]

Álvarez, M., Guadarrama, R., Arias, M., Perdomo, L., Navarro, E. 2017b. Interacción fluoruro de sodio con *Moringa oleifera* en sangre periférica de pez cebrá *Danio rerio*. *Retel.* **49**: 38-49. <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=961> [Consulta 27 de febrero de 2017].

Álvarez, M., Mujica, S., Perdomo, L., Navarro, E. 2016a. Extracto acuoso de tabaco masticable Chimó El Tigrito® y la disfunción cardíaca en modelo experimental larvario de pez cebra *Danio rerio*. *Retel.* **47**: 15-26. <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=951>. [Consulta 30 de julio de 2016].

Álvarez, M., Navarro, E., Perdomo, L., Arias, M. 2016b. Señales tóxicas inducidas por una infusión de hojas frescas de *Melissa officinalis* en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*. *Retel.* **45**: 1-12. <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=942>. [Consulta 30 de julio de 2016].

Antkiewicz, D., Burns, C., Carney, S., Peterson, R., Heideman, W. 2005. Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. *Toxicol. Sci.* **84(2)**: 1-10.

Arcanjo, D., Albuquerque, A., Melo-Neto, B., Santana, L., Medeiros, M., Citó, A. 2012. Bioactivity evaluation against *Artemiasalina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz. J. Biol.* **72(3)**: 505-509.

Arumugam, G., Swamy, M. K., Sinniah, U. 2016. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. *Molecules.* **21(4)**: 369.

Aschwanden, C. 2001. Herbs for health, but how safe are they?. *B. World Health Organ.* **79(7)**: 691-692.

Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K. y colaboradores. 2012. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *J. Vis. Exp.* **69**.

Bagatto B., Burggren W. 2006. A three-dimensional functional assessment of heart and vessel development in the larva of the zebrafish (*Danio rerio*). *Physiol. Biochem. Zool.* **79**:194-201.

Bakkers, J. 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* **91(2)**: 279-288.

Bandeira, J., Barbosa, F., Barbosa, L., Rodrigues, I., Bacarin, M., Peters, J., Braga, E. 2011. Composição do óleoessencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. *Bras. Planta Med.* **13(2)**: 157-164.

Barret, J. 2005. A center of a different stripe. *Environ. Health Persp.* **113(3)**: 160-162.

Benito, S., Lopez, D., 2002. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Brit. J. Pharmacol.* **135**: 910-916.

Berger, J., Sztal, T., Currie, P. 2012. Quantification of birefringence readily measures the level of muscle damage in zebrafish. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **423(4)**: 785-788.

Bocardi, J. 2008. Etnofarmacologia das plantas medicinais de céu azul e composição química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr. Tesis de Maestría, Universidade Estadual de PontaGrossa, Brasil.

Borge, M. 2011. Tema 9. Regulación del aparato circulatorio [en línea]. OCW Universidad de Cantabria. <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-humana-2011->

g367/material-de-clase/bloque-tematico-1.-fisiologia-del-aparato/tema-9.-regulacion-del-aparato-circulatorio/tema-9.-regulacion-del-aparato-circulatorio/skinless_view. [Consulta 14 de abril de 2017].

Borges, A., Almeida, C., Lopes, C., Heck, R. Barbieri, R. 2011. Plantas medicinais no campo educacional: saberes relacionados ao boldo-gambá. *Enferm. Comun.* **7(2)**: <http://www.index-f.com/comunitaria/v7n2/ec7522.php>. [Consulta 28 de febrero de 2017].

Borges, G., Ferreira, J., Elias, S., Guerra, E., Silveira, D., Simeoni, L. 2016. Cytotoxic effect of *Plectranthus neochilus* extracts in head and neck carcinoma cell lines. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **10(10)**: 157-163.

Bracci, L. 2015. “Sembrar” acetaminofén: ¿Pueden unirse ciencia y saber popular contra la guerra económica?. <https://www.aporrea.org/actualidad/a208939.html>. [Consulta 22 de febrero de 2017].

Brönnimann, D., Djukic, T., Triet, R., Dellenbach, C., Saveljic, I., Rieger, M., Rohr, S. y colaboradores. 2016. Pharmacological modulation of hemodynamics in adult zebrafish *in vivo*. *Plos one.* **11(3)**.

Brown, D., Samsa, L., Qian, L., Liu, J. 2016. Advances in the study of heart development and disease using Zebrafish. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **3(2)**: 13.

Budick, S., O'Malley, D. 2000. Locomotor repertoire of the larval zebrafish: swimming, turning and prey capture. *J. Exp. Biol.* **203(17)**: 2565-2579.

Burgos, K., Reyes, S., Yupanqui, M. 2016. Antocianinas totales y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* “Arándano”. *UCV-Scientia*. **8(1)**: 44-48.

Bussmann, J., Bos, F., Urasaki, A., Kawakami, K., Duckers, H., Schulte-Merker, S. 2010. Arteries provide essential guidance cues for lymphatic endothelial cells in the zebrafish trunk. *Development*. **137(16)**: 2653-2657.

Campos, N., Azevedo, A., Sant’Anna Santos, B. F. 2010. Acúmulo e efeitos fitotóxicos do flúor em folhas de boldo gambá e capim-cidreira utilizadas para chás. *Pesq. Agropec. Bras.* **45(7)**: 646-653.

Caro, J. 2016. Estudio fitoquímico de los compuestos mayoritarios de las hojas frescas de *Plectranthus neochilus* Schlechter y evaluación de su toxicidad aguda y actividad analgésica. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Carrillo, T., Bermúdez, A. 2012. Utilización de plantas medicinales en una comunidad urbana del estado Trujillo, Venezuela: usos tradicionales, importancia relativa y patrón de distribución del conocimiento tradicional. *Academia*. **11(22)**: 139-151.

Celik, T., 2012. Potencial genotoxic and cytotoxic effects of plant extracts. Págs. 211-228 en: A. Bhattacharya (ed.), *A Compendium of Essays on Alternative Therapy*. <https://www.intechopen.com/books/a-compendium-of-essays-on-alternative-therapy/potential-genotoxic-and-cytotoxic-effects-of-plant-extracts>. [Consulta 2 de febrero de 2017].

Chaudhari, G., Chennubhotla, K., Chatti, K., Kulkarni, P. 2013. Optimization of the adult zebrafish ECG method for assessment of drug-induced QTc prolongation. *J. pharmacol. Toxicol.* **67(2)**: 115-120.

Chen, H., Chan, J., Yang, X., Wyman, I., Bardelang, D., Macartney, D., Lee, S. 2015. Developmental and organ-specific toxicity of cucurbit [7] uril: in vivo study on zebrafish models. *RSC Adv.* **5(38)**: 30067-30074.

Cheng, H., Gabor, K., Dicker, A., Rodeck, U., Koch, W., Force, T. 2011. A novel preclinical strategy for identifying cardiotoxic kinase inhibitors and mechanisms of cardiotoxicity. *Circ. Res.* **109(12)**: 1401-1409.

Chi, N., Shaw, R., Jungblut, B., Huisken, J., Ferrer, T., Arnaout, R., Scott, I. y colaboradores. 2008. Genetic and physiologic dissection of the vertebrate cardiac conduction system. *Plos Biol.* **6(5)**.

Choi, E., Chang, H., Cho, J., Chun, H. 2007. Cytoprotective effect of anthocyanins against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes in relation to their antioxidant activities. *Food Chem. Toxicol.* **45(10)**: 1873-1881.

Cichocki, J., Guyton, K., Guha, N., Chiu, W., Rusyn, I., Lash, L. 2016. Target organ metabolism, toxicity, and mechanisms of trichloroethylene and perchloroethylene: key similarities, differences, and data gaps. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **359**: 110-123.

Codd, L. 1975. *Plectranthus* (Labiatae) and allied genera in Southern Africa. *Bothalia.* **11(4)**; 371-442.

Colwill, R., Creton, R. 2011. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. *Rev. Neuroscience*. **22(1)**: 63-73.

Cornejo, M. 2012. *Passiflora edulis f. flavicarpa* (parchita) y su acción cardiopatóxica en modelo experimental de pez cebrá (*Danio rerio*): evaluación morfofuncional. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Crevelin, E., Caixeta, S., Dias, H., Groppo, M., Cunha, W., Martins, C., Crotti, A. 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria. *Evid-Based. Compl.Alt.*

Crowcombe, J., Dhillon, S., Hurst, R., Egginton, S., Müller, F., Sík, A., Tarte, E. 2016. 3D finite element electrical model of larval zebrafish ECG signals. *Plos One*. **11(11)**.

Dai, Y., Jia, Y., Chen, N., Bian, W., Li, Q., Ma, Y., Pei, D. 2014. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* **33(1)**: 11-17.

Daio, E., de Souza, A., de Fatima, M., Coelho, B., Amorim, A. 2017. Use of medicinal plants in piroás and barra nova, redenção, ceará, brazil. *J. Global Biosci.* **6(2)**: 4758-4762.

D'Amico, L., Ling, W., Yang, Y., Suter, W. 2012. Assessment of drug-induced cardiotoxicity in zebrafish. Págs. 45-54 en: P. McGrath (ed.), *Zebrafish Methods for assessing drug safety and toxicity*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, E.U.A.

de Esch, C., Sliker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., de Groot, D. 2012. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. *Neurotoxicol. Teratol.* **34(6)**: 545-553.

- Devi, N. 2013. Pharmacognostic profile and phytochemical screening of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) young leaves *World J. Pharm. Sci.* **3(1)**: 597-606.
- Dhillon, S., Dóró, É., Magyary, I., Egginton, S., Sík, A., Müller, F. 2013. Optimisation of embryonic and larval ECG measurement in zebrafish for quantifying the effect of QT prolonging drugs. *Plos one.* **8(4)**: e60552.
- Drummond, I. 2005. Kidney development and disease in the zebrafish. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16(2)**: 299-304.
- Duarte, M., Lopes, J. 2007. Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., *Lamiaceae*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **17(4)**: 549-556.
- Ellertsdóttir, E., Lenard, A., Blum, Y., Krudewig, A., Herwig, L., Affolter, M., Belting, H. 2010. Vascular morphogenesis in the zebrafish embryo. *Dev. Biol.* **341(1)**: 56-65.
- Falé, P. 2011. Biological activities of *Plectranthus barbatus* aqueous extracts: *in vitro* and *in vivo* studies of activity, bioavailability and metabolism. Tesis Doctoral, Universidad de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Faria, D., De Barros, A., Alves, N., Miranda, G., Viana, A., Silva, R., De Oliveira, P. 2014. Isolamento do diterpeno 1, 6-di-O-acetil-9-deoxiforscolina das partes aéreas de *Plectranthus neochilus*. http://www.unifal-mg.edu.br/ersbq2014/system/files/imce/Livro_ERSBQ2014.pdf. [Consulta: 21 julio 2016].
- Farnsworth, N., Akerele, O., Bingel, A., Soejarto, D., Guo, Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *B. World Health Organ.* **63(6)**: 1965.

Feng, J., Ip, H., Cheng, S., Chan, P. 2004. A relational-tubular (ReTu) deformable model for vasculature quantification of zebrafish embryo from microangiography image series. *Comput. Med. Imag. Grap.* **28(6)**: 333-344.

Fink, M., Callol-Massot, C., Chu, A., Ruiz-Lozano, P. Belmonte, J., Giles, W., Bodmer, R. y colaboradores. 2009. A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in *Drosophila*, zebrafish, and embryonic mouse hearts. *Biotechniques.* **46(2)**: 101-113.

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H., Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.* **88(6)**: 587-605.

Fritsche, R. 2000. Nitric oxide and vascular activity in development zebrafish, *Danio rerio*. *Am. J. Physiolregul. Inter. Comp.* **279**: 2200-2207.

Fukushima, A., de Azevedo, F. 2008. História da Toxicologia. Parte I—breve panorama brasileiro. *Revinter.* **1(1)**.

Galati, G., O'brien, P. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Bio. Med.* **37(3)**: 287-303.

García, C., Kim, N., Bich, N., Tillan, J., Romero, J., López O., Fuste, V. 2009. Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata L.*, *Matricaria recutita L.* y *Morinda citrifolia L.* *Rev. Cubana. Plant. Med.* **14 (2)**:1-7.

Gartner, L., Hiatt, J. 2001. Atlas en color y texto de histología. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México D.F, México.

Garzón, G. 2008. Las antocianina como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Actabiol. Colomb.* **13(3)**: 27-36.

Genge, C., Lin, E., Lee, L., Sheng, X., Rayani, K., Gunawan, M., Stevensn, C. y colaboradores. 2016. The Zebrafish Heart as a Model of Mammalian Cardiac Function. *Rev. Physiol. Bioch. P.* **171**: 99-136.

Gilbert, S. 2008. Biología del desarrollo. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. Montevideo, Uruguay.

Glei, M., Matuschek, M., Steiner, C., Böhm, V., Persin, C., Pool, B. 2003. Initial *in vitro* toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicol. in vitro.* **17(5)**: 723-729.

Glickman, N., Yelon, D. 2002. Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **13(6)**: 507-513.

Goldsmith, J., Jobin, C. 2012. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. *Bio. Med. Research Int.*

Gomes, E. 2014. Phenolic compounds and diterpenoids with activity in aqueous extracts of *Plectranthus*. Tesis de Maestría. Universidad de Lisboa. Lisboa, Portugal.

Guerra, J., Cabezas, P., Yebra, E., Gutiérrez, C., Cedrón, V., Otero, M., Sánchez, L. 2016. “A Zebra in the Water”: Inspiring Science in Spain. *Zebrafish.* **13(4)**: 241-247.

Guh, Y., Lin, C., Hwang, P. 2015. Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation. *EXCLI J.* **14**: 627.

Haldi, M., Harden, M., D'Amico, L. DeLise, A., Lin, W. 2012. Assessment of drug-induced cardiotoxicity in zebrafish. Págs. 15-25 en: P. McGrath (ed.), *Zebrafish Methods for assessing drug safety and toxicity*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, E.U.A.

Haring, O., Patterson J., Sarche, M. 1970. Prenatal development of the cardiovascular system in the chicken. *Arch. Pathol.* **89**: 537-47.

Havsteen, B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* **96(2)**: 67-202.

He, J., Guo, S., Zhu, F., Zhu, J., Chen, Y., Huang, C., Li, C. 2013. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol.Toxicol.Method.* **67(1)**: 25-32.

Henry, T., Spitsbergen, J., Hornung, M., Abnet, C., Peterson, R. 1997. Early life stage toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharm.* **142(1)**: 56-68.

Hill, A., Bello, S., Prasch, A., Peterson, R., Heideman, W. 2004. Water Permeability and TCDD-Induced Edema in Zebrafish Early-Life Stages. *Toxicol. Sci.* **78(1)**: 78-87.

Hu, N., Yost, H., Clark, E. 2001. Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *Anat. Rec.* **264(1)**: 1-12.

Huttner, I., Trivedi, G., Jacoby, A., Mann, S., Vandenberg, J., Fatkin, D. 2013. A transgenic zebrafish model of a human cardiac sodium channel mutation exhibits bradycardia, conduction-system abnormalities and early death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **61**: 123-132.

- Incardona, J., Swarts, T., Edmunds, R., Linbo, T., Aquilina, A., Sloan, C. y colaboradores. 2013. Exxon Valdez to Deepwater Horizon: comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. *Aquat, Toxicol.* **142**: 303-16.
- Inoue, A., Nishimura, Y., Matsumoto, N., Umemoto, N., Shimada, Y., Maruyama, T., Kayasuga, K. y colaboradores. 2016. Comparative study of the zebrafish embryonic toxicity test and mouse embryonic stem cell test to screen developmental toxicity of human pharmaceutical drugs. *Fund. Toxicol. Sci.* **3(2)**: 79-87.
- Iribarra, V., Germain, A., Cuevas, A., Faúndez, L., Valdés, G. 2000. Disfunción endotelial como alteración primaria en las patologías vasculares. *Rev. Med. Chile.* **128(6)**: 659-670.
- Jagadeeswaran, P. 2005. Zebrafish: a tool to study hemostasis and thrombosis. *Curr. Opin. Hematol.* **12(2)**: 149-152.
- Jagadeeswaran, P., Cooley, B., Gross, P., Mackman, N. 2016. Animal models of thrombosis from zebrafish to nonhuman primates. *Circ. Res.* **118(9)**: 1363-1379.
- Jiménez, M., Kuhn, G. 2009. Toxicología fundamental. Cuarta Edición. Editorial Díaz de Santos. Sevilla, España.
- Jordheim, M., Calcott, K., Gould, K., Davies, K., Schwinn, K., Andersen, Ø. 2016. High concentrations of aromatic acylated anthocyanins found in cauline hairs in *Plectranthus ciliatus*. *Phytochemistry.* **128**: 27-34.
- Kalueff, A., Gebhardt, M., Stewart, A., Cachat, J., Brimmer, M., Chawla, J., Caddock, C. y colaboradores. 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish.* **10(1)**: 70-86.

- Kania, A., Klein, R. 2016. Mechanisms of ephrin-Ephsignalling in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **17(4)**: 240-256.
- Kanther, M., Sun, X., Mühlbauer, M., Mackey, L., Flynn, E., Bagnat, M., Rawls, J. 2011. Microbial colonization induces dynamic temporal and spatial patterns of NF- κ B activation in the zebrafish digestive tract. *Gastroenterology.* **141(1)**: 197-207.
- Khan, M., Al-Saleem, M., Alkathlan, H. 2016. A detailed study on chemical characterization of essential oil components of two *Plectranthus* species grown in Saudi Arabia. *J. Saudi Chem. Soc.* **20(6)**: 711-721.
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., Schilling, T. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* **203(3)**: 253-310.
- Knight, H., Yelon, D. 2016. Utilizing zebrafish to understand second heart field development. Págs. 193-199 en T. Nakanishi, R. Markwald, H. Baldwin, B. Keller, D. Srivastava, H. Yamagishi (eds.), Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. Primera Edición, Springer Open, Tokyo, Japón.
- Knöler, H. 2016. The alkaloids. Primera Edición. Editorial Academic Press. Kidlington, Oxford.
- Kopp, R., Schwerte, T., Egg, M., Sandbichler, A., Egger, B., Pelster, B. 2010. Chronic reduction in cardiac output induces hypoxic signaling in larval zebrafish even at a time when convective oxygen transport is not required. *Physiol. Genomics.* **42(1)**: 8-23.
- Kopp, R., Schwerte, T., Pelster, B. 2005. Cardiac performance in the zebrafish breakdance mutant. *J. Exp. Biol.* **208(11)**: 2123-2134.

- Kurian, G., Rajagopal, R., Vedantham, S., Rajesh, M. 2016. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited. *Oxid. Med. Cell. Longev.*
- Lal, H., Kolaja, K., Force, T. 2013. Cancer genetics and the cardiotoxicity of the therapeutics. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61(3)**: 267-74.
- Lam, S., Hlaing, M., Zhang, X., Yan, C., Duan, Z., Zhu, L., Gong, Z. 2011. Toxicogenomic and phenotypic analyses of bisphenol-A early-life exposure toxicity in zebrafish. *Plos one.* **6(12)**: e28273.
- Lawson, N., Weinstein, B. 2002. Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat. Rev. Genet.* **3(9)**: 674-682.
- Lee, S., Kim, H., Han, R., Oqani, R., Jin, D. 2013. Cardiovascular risk assessment of atypical antipsychotic drugs in a zebrafish model. *J. Appl. Toxicol.* **33(6)**: 466-70.
- León, M., Pérez, C., Pacheco, Y., Mendoza, L., Barreto, T. 2013. Saberes populares sobre plantas medicinales de Cañaveral, estado Yaracuy. Primera Edición. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Maracay, Venezuela.
- Liang, J., Jin, W., Li, H., Liu, H., Huang, Y., Shan, X., Li, C. y colaboradores. 2016. *In vivo* cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish Larvae. *Molecules.* **21(3)**: 190.
- Lin, C., Hui M., Cheng, S. 2007. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxicol. Appl. Pharm.* **222(2)**: 159-168.
- Lin, C., Hwang, P. 2016. The control of calcium metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Mol. Sci.* **17(11)**: 1783.

- Liu, C., Li, L., Lam, Y., Siu, C., Cheng, S. 2015. Improvement of surface ECG recording in adult zebrafish reveals that the value of this model exceeds our expectation. *Sci. Rep.* **6**: 25073-25073.
- Lockwood, B., Bjerke, S., Kobayashi, K., Guo, S. 2004. Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **77(3)**: 647-654.
- Lukhoba, C., Simmonds, M., Paton, A. 2006. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *J. ethnopharmacol.* **103(1)**: 1-24.
- Ma, C., Parng, C., Seng, W., Zhang, C., Willett, C., McGrath, P. 2003. Zebrafish: an in vivo model for drug screening. *Innov. Pharm. Technol.* 38-45.
- Maldonado, E. 2003. Experimentación en el pez-cebra, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje Bioquímico.* **XXVII**: 147-156.
- Malone, M., Sciaky, N., Stalheim, L., Hahn, K., Linney, E., Johnson, G. 2007. Laser-scanning velocimetry: a confocal microscopy method for quantitative measurement of cardiovascular performance in zebrafish embryos and larvae. *BMC Biotechnol.* **7(1)**: 40.
- Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., Liu, C. 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia.* **81(7)**: 703-714.
- Mantovani, A., Vieira, G., Cunha, W., Groppo, M., Santos, R., Rodrigues, V., Magalhães, L. y colaboradores. 2013. Chemical composition, antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* grown in Southeastern Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **23(6)**: 877-884.

Matuzalen, J. 2016. Perfil fitoquímico y estudio de la toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso liofilizado de las hojas secas de la especie *Plectranthus neochilus* Schltr. (*Lamiaceae*). Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

McGee, S., Konstantinov, A., Stapleton, H., Volz, D. 2013. Aryl phosphate esters within a major PentaBDE replacement product induce cardiotoxicity in developing zebrafish embryos: potential role of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* **133(1)**: 144-156.

McKee, R., Wingert, R. 2015. Zebrafish renal pathology: emerging models of acute kidney injury. *Curr. Pathobiol. Rep.* **3(2)**: 171-181.

Megías, P., Molist, P., Pombal, M. 2015. Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas. Inclusión [en línea]. <http://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/tecnicas-inclusion.pdf> [Consulta 7 de octubre de 2016].

Megías, P., Molist, P., Pombal, M. 2016. Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas. Tinción. [en línea]. <http://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/tecnicas-tincion.pdf> [Consulta 10 de octubre de 2016].

Miceli, R., Kroeger, P., Wingert, R. 2014. Molecular mechanisms of podocyte development revealed by zebrafish kidney research. *Cell Dev. Biol.* **3**.

Milan, D., Peterson, T., Ruskin, J., Peterson, R., MacRae, C. 2003. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation.* **107(10)**: 1355-1358.

Moreno, M. 2013. Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*). Tesis de Licenciatura, Universidad del País Vasco, Leioa, España.

Moridani, M., Galati, G., O'Brien, P. 2002. Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. *Chem-biol. Interact.* **139(3)**: 251-264.

Mota, L., Figueiredo, A., Pedro, L., Barroso, J., Miguel, M., Faleiro, M., Ascensao, L. 2014. Volatile-oils composition, and bioactivity of the essential oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus*, and *P. ornatus* grown in portugal. *Chem.Biodivers.***11(5)**: 719-732.

Mujica, C. 2015. Tabaco masticable (Chimó el tigrito ®) y la disfunción cardíaca: un estudio experimental en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*. Tesis de Maestría, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Nijveldt, R., Van Nood, E., Van Hoorn, D., Boelens, P., Van Norren, K., Van Leeuwen, P. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **74(4)**: 418-425.

Orsinni, G. 2015. El sonado caso del acetaminofén – El deber llama [en línea] <http://fitoterapiagiovaorsiniv.blogspot.com/2015/06/el-sonado-caso-del-el-deber-llama.html>. [Consulta 2 de marzo de 2017].

Ortiz, M. 2013. El sistema cardiovascular. Tema 3. Vasos sanguíneos y hemodinámica [En línea]. Universidad de Murcia. https://webs.um.es/clara/miwiki/doku.php?id=vasos_sanguineos_y_hemodinamica. [Consulta 15 de abril de 2017].

- Padmavathy, S., Shanthi, T. 2013. Analysis and Identification of Chemical compounds in *Plectranthus wightii* Benth. *Sci. Res. Reporter*. **3(2)**: 164-166.
- Parng, C., Roy, N., Ton, C., Lin, Y., McGrath, P. 2007. Neurotoxicity assessment using zebrafish. *J. pharmacol. Toxicol.* **55(1)**: 103-112.
- Parra, A., Yhebra, R., Sardiñas, I., Buela, L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. **8(5)**: 395-400.
- Parsons, M., Campos, I., Hirst, E., Stemple, D. 2002. Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development*. **129**: 3505-3512.
- Pelster, B., Grillitsch, S., Schwerte, T. 2005. NO as a mediator during the early development of the cardiovascular system in the zebrafish. *Comp. Biochem. Phys. A*. **142(2)**: 215-220.
- Poon, K., Liebling, M., Kondrychyn, I., Brand, T., Korzh, V. 2016. Development of the cardiac conduction system in zebrafish. *Gene Expr. Patterns*. **21(2)**: 89-96.
- Randall, D., Burggren, W., French, K. 1998. Eckert. Fisiología animal: Mecanismos y adaptaciones. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid, España.
- Rice, L., Brits, G., Potgieter, C., Van Staden, J. 2011. *Plectranthus*: A plant for the future?. *S. Afr. J. Bot.* **77(4)**: 947-959.

Rijo, P., Matias, D., Fernandes, A., Simões, M., Nicolai, M., Reis, C. 2014. Antimicrobial plant extracts encapsulated into polymeric beads for potential application on the skin. *Polymers*. **6(2)**: 479-490.

Rocha, A., Ruiz, S., Coll, J. 2002. Método sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* **17(1-2)**: 94-102.

Rodríguez, J., Sobrino, A., Martínez, F. 2015. Acute toxicity and sublethal effects on macromolecules concentration, caloric content, and lipid peroxidation during exogenous-feeding of *Danio rerio* larvae exposed to Cu^{2+} . *Rev. Int. Contam. Ambie.* **31(4)**: 397-404.

Rombough, P. 2002. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O_2 uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. *J. Exp. Biol.* **205(12)**: 1787-1794.

Ross, M., Pawlina, W. 2008. Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Panthong, A. 2003. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. *J. ethnopharmacol.* **89(1)**: 91-95.

Schwerte T., Prem., Mairoso A., Pelster, B. 2006. Development of sympatho-vagal balance in cardiovascular system in zebrafish (*Danio rerio*) characterized by power spectrum and classical signal analysis. *J. Exp. Biol.* **209**: 1093-1100.

Schwerte, T., Pelster, B. 2000. Digital motion analysis as a tool for analysing the shape and performance of the circulatory system in transparent animals. *J. Exp. Biol.* **203(11)**: 1659-1669.

Schwerte, T., Überbacher, D., Pelster, B. 2003. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish *Danio rerio* incubated in hypoxic conditions in vivo. *J. Exp. Biol.* **206(8)**: 1299-1307.

Selderslaghs, I., Hooyberghs, J., De Coen, W., Witters, H. 2010. Locomotor activity in zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* **32(4)**: 460-471.

Serluca, F., Drummond, I., Fishman, M. 2002. Endothelial signaling in kidney morphogenesis: a role for hemodynamic forces. *Curr. Biol.* **12(6)**: 492-497.

Shityakov, S., Salmas, R., Salvador, E., Roewer, N., Broscheit, J., Förster, C. 2016. Evaluation of the potential toxicity of unmodified and modified cyclodextrins on murine blood-brain barrier endothelial cells. *J. toxicol. Sci.* **41(2)**: 175-184.

Souza, G., Duarte, J., Fernandes, C., Moyado, J., Navarrete, A. 2016. Obtainment and Study of the Toxicity of Perillyl Alcohol Nanoemulsion on Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Nanomed. Res.* **4(4)**: 00093.

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.Pathol.* **31**: 62-87.

Taubert, D. 2002. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *J. Cardiovasc. Pharm.* **40**: 701-713.

Teixidó, E., Piqué, E., Boix, N., Llobet, J. 2015. Zebrafish as a model for developmental toxicity assessment. Págs. 65-83 en: D. Muñoz-Torrero, M. Vinardell, J. Palazón (eds.), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Research Singpost, Kerala, India.

Tenorio, F. 2006. Los flavonoides y el sistema cardiovascular ¿pueden ser una alternativa terapeutica? *Arch. Cadiol. Mex.* **76**: 33-45.

Tilburt, J., Kaptchuk, T. 2008. Herbal medicine research and global health: an ethical analysis. *B. World Health Organ.* **86(8)**: 594-599.

Tong, X., Han, L., Duan, H., Cui, Y., Feng, Y., Zhu, Y., Chen, Z. y colaboradores. 2017. The derivatives of Pulsatilla saponin A, a bioactive compound from *Pulsatilla chinensis*: Their synthesis, cytotoxicity, haemolytic toxicity and mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.* **129**: 325-336.

Troelsen, T., Granfeldt, A., Secher, N., Tønnesen, E., Simonsen, U. 2015. Impaired NO-mediated vasodilatation in rat coronary arteries after asphyxial cardiac arrest. *Acta Anaesth. Scand.* **59(5)**: 654-667.

Uauy, R. Boletín N° 8 de nutrición infantil. CANIA. 2002. www.cania.org.ve/html/boletin8.html. [consulta: 21 agosto 2016].

Uc, R., Delgado, V. 2012. Determinación de la concentración letal media (CL50) de cuatro detergentes domésticos biodegradables en *Laeonereis culveri* (Webster 1879) (Polychaeta: Annelida). *Rev. Int. Contam. Ambie.* **28(2)**: 137-144.

Usenko, C., Harper, S., Tanguay, R. 2007. *In vivo* evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon.* **45(9)**: 1891-1898.

- Van den Bulck, K., Hill, A., Mesens, N., Diekman, H., De Schaepdrijver, L., Lammens, L. 2011. Zebrafish developmental toxicity assay: A fishy solution to reproductive toxicity screening, or just a red herring?. *Reprod. Toxicol.* **32(2)**: 213-219.
- Vargas, R. 2017. Effects of GABA, neural regulation, and intrinsic cardiac factors on heart rate variability in zebrafish larvae. *Zebrafish.* **14(2)**: 106-117.
- Vejar, A., Tolosa, B., Parra, J., Ordoñez, D. 2016. Uso de la cáscara de mamón (*Melicoccus bijugatus*) para el teñido de telas. *Avances en Química.* **11(3)**: 123-128.
- Verkerk y Remme, A. 2012. Zebrafish: a novel research tool for cardiac (patho) electrophysiology and ion channel disorders. *Front. Physiol.* **3**: 255.
- Viana, A. 2011. Estudio químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (*Lamiaceae*). Tesis de Maestría, Universidad Federal de los Valles de Jequitinhonha y Mucuri, Minas Gerais, Brasil.
- White, D. Fernhall, B. 2015. Effects of exercise on blood pressure and autonomic function and other hemodynamic regulatory factors. Págs. 203-226 en: L. Pescatello (ed.), Effects of exercise on hypertension: from cells to physiological systems. Humana press, New York, USA.
- Widrick, J., Alexander, M., Sanchez, B., Gibbs, D., Kawahara, G., Beggs, A., Kunkel, L. 2016. Muscle dysfunction in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Physiol. Genomics.* **48(11)**: 850-860.
- Wiedenfeld, H. 2011. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Addit. Contam. A.* **28(3)**: 282-292.

Wong, K., Stewart, A., Gilder, T., Wu, N., Frank, K., Gaikwad, S., Suci, C. y colaboradores. 2010. Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain res.* **1348**: 209-215.

Wyart, C. 2017. Locomotion: Control from the Periphery?. *Curr. Biol.* **27(4)**: R152-R153.

Yalcin, H., Amindari, A., Butcher, J., Althani, A., Yacoub, M. 2017. Heart Function and Hemodynamics Analysis for Zebrafish Embryos. *Dev. Dynam.*

York, T., Van Vuuren, S., De Wet, H. 2012. An antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. *J. ethnopharmacol.* **144(1)**: 118-127.

Young, B., Woodford, P., O'Dowd, G. 2014. Wheater. Histología funcional: Texto y Atlas en color. Sexta Edición. Editorial Churchill Livingstone. Barcelona, España.

Young, D. 2010. Control of cardiac output. Primera Edición. Editorial Morgan y Claypool Life Sciences. California, Estados Unidos.

Zhang, B., Wijesundara, N., Abbey, L., Rupasinghe, V. 2017. Growing medium amendments effect on growth, secondary metabolites and anti-streptococcal activity of two species of *Plectranthus*. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.*

Consultas en línea:

FMH: Federación mundial de hemofilia. Proceso de coagulación. [En línea] 2014. Disponible en <https://www.wfh.org/es/page.aspx?pid=1314>. [Consulta 12 de abril de 2017].

GUIAR: Grupo Universitario de Investigación Analítica de Riesgos. Glosario de términos, concentración letal media (CL₅₀). [En línea]. 1998. <http://www.unizar.es/guiar/1/> [Consulta 28 de febrero de 2017].

<https://www.pinterest.com/pin/415386765606619297/> [Consulta de 12 abril de 2017]

<http://www.agenciasinc.es/Noticias/La-cocaina-produce-alteraciones-geneticas-en-embriones-de-pep-cebra> [Consulta 18 de abril de 2017].

http://www.genetics-gsa.org/news/templates/template_publications.aspx?articleid=210&zoneid=4 [Consulta 18 de abril de 2017].