

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Fruta planta 'meizitac' como factor de riesgo cardíaco: una aproximación experimental en larvas de pez cebra *Danio rerio*.

Marco Alvarez*, Lourdes Perdomo y Claudia Hernández.

Sección de Microscopia, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela.

<http://www.med.ucv.ve/IA/SecMicElec>

*Marco Alvarez, alvarezmenator@gmail.com marco.alvarez@ucv.ve telf. 00582 6053439

Proyecto FONACIT-2013001767

Resumen

La medicina herbal 'Fruta Planta (FP) 'meizitac', ha sido promovida como la "fórmula mágica" para reducir la excesiva acumulación de grasa corporal. Sí su consumo constituye un factor de riesgo cardiaco, hasta donde se conoce, no ha sido claramente establecido. El objetivo del trabajo fue evaluar a nivel morfo-funcional y bioquímico la acción de FP 'meizitac', en larvas de pez cebra *Danio rerio*. Larvas de 5 dpf, fueron sometidas a distintas concentraciones de FP 'meizitac': 0, 13, 26, 52, 78, 100, 260, 300 mg/ml, colocadas en capsulas de 24 pozos, a razón de 10 larvas/pozo/concentración, durante 24 h. La CL₅₀, fue de 52±10 mg/ml, a 24 horas, con un 95% de confianza. La regresión lineal de la relación causa-efecto fue de 0,86746. A nivel morfológico, el edema pericárdico fue evidente, más pronunciado a las 24 h de tratamiento y acompañado por la formación de trombo al interior del corazón tubular. A nivel funcional, la frecuencia cardiaca, presento un incremento significativo a los primeros 10 min de tratamiento, disminuyendo a los 20 min e incrementándose nuevamente a los 40 min. Este incremento, se mantuvo hasta alcanzar 1h de tratamiento. Transcurridas las 24 horas, se registró una significativa reducción. A nivel bioquímico, la CK y la CK-MB, presentaron un incremento significativo respecto al control y del resto de los marcadores. Los resultados son una señal de que FP 'meizitac' 'puede ser considerado como un potencial factor de riesgo cardiaco dependiente de la concentración y el tiempo de consumo.

Palabras claves: 'meizitac', cardiotoxicidad, Zebarfish, *Danio rerio*.

Abstract

PLANT FRUIT 'MEIZITAC' AS RISK FACTOR FOR HEART: AN EXPERIMENTAL APPROACH ON ZEBRA FISH LARVAE *Danio rerio*.

'Meizitac' Plant Fruit (FF)herbal medicine has been considereddamagic formula to reduce the excessive accumulation of body fat. If your consumption is a cardiac risk factor, as far as is known has not been clearly established. The objective was to evaluate morpho-functional and biochemical level the action of 'meizitac' FF in larval Zebrafish*Danio rerio*. Larvae of 5 dpf, were subjected to varying concentrations of FP'meizitac': 0, 13, 26, 52, 78, 100, 260, 300 mg / ml, placed in capsules with 24 wells, at 10 larvae / wells / concentration for 24 h. The LC50 was 52 ± 10 mg / ml andlinear regression of the cause-effect relationship was 0.86. At the morphological level, pericardial edema was evident, more pronounced at 24 hours of treatment and accompanied by the formation of thrombus within the tubular heart. A functional level, heart rate presented a significant increase in the first 10 min of treatment, decreasingto 20 min and increasing again at 40 min. This increase continued until reaching treatment 1h. After 24 hours, significant decrease occurred. At a biochemical level, CK and CK-MB were in higher amount compared to controls, as well as of biomarkers. The results are a sign that 'meizitac' FF can be considered as a potential cardiac risk factor dependent on concentration and time of consumption.

Key words:'meizitac', cardiotoxicity, Zebrafish, *Danio rerio*.

Introducción

La medicina herbal 'Fruta Planta (FP) 'meizitac', capsulas que contienen un liofilizado de especies vegetales con potencial terapéutico, ha sido promovida en los últimos años como la "fórmula mágica" para reducir la excesiva acumulación de grasa corporal [1-2]. Hasta el presente, son pocos los informes referidos a los posibles efectos secundarios inducidos por su consumo. Sin embargo, en algunas de las presentaciones comerciales del producto, además de los componentes "no tóxicos", ha sido reportada la presencia de Sibutramina; una sustancia incorporada como aditivo para potenciar el efecto adelgazante de la "fórmula mágica"[3]. La presencia de esta sustancia, como aditivo potenciador del efecto adelgazante, no solo en la "fórmula mágica" de FP 'meizitac', sino también en una gran cantidad de otras fórmulas anti-obesidad, ha incentivado las investigaciones sobre la posible problemática de toxicidad vinculada con las mismas, ya que la venta, distribución y consumo de Sibutramina, ha sido prohibida desde hace algunos años[4]. La Sibutramina, es una β -fentilamina usada en el manejo de la obesidad. Su efecto reductor del peso corporal, ha sido atribuido a varias razones; entre las que se destaca la inhibición selectiva de la recaptura pre sináptica de neurotransmisores monoaminérgicos del tipo serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y en menor proporción dopamina, a nivel del sistema nervioso central [5]. Sus principales efectos adversos se encuentran relacionados con la estimulación noradrenérgica del circuito hipotalámico del apetito y también con su inherente propiedad simpaticomimético. Resequedad en la boca, cefaleas, insomnio y casos de amnesia, son algunos efectos adversos que han sido reportado [6]. Debido a la inherente modulación que ejerce sobre las vías simpáticas, la Sibutramina podría estar interviniendo parámetros de la hemodinámica cardiaca, tales como la presión sanguínea, sistólica y/o diastólica, así como la frecuencia cardiaca [7]; de manera que su presencia, como constituyente de la fórmula de FP 'meizitac', podría por tanto significar en un factor de riesgo cardiaco que pudiera comprometer la sistémica cardiovascular de las personas que la consumen. Cabe destacar, que la mayoría de los informes sobre la efectividad de las formulas anti-obesidad, incluyendo los vinculados con FP 'meizitac' y que hasta el

momento hemos revisado, carecen de claras evidencias de la posible asociación con factores de riesgo cardiaco [8-9]. Particularmente en Venezuela, se han encendido las alarmas, ya que la venta, distribución y consumo de tal "fórmula mágica", ha sido detectada en nuestra población y la pregunta sobre sí se compromete la funcionalidad cardiaca como consecuencia del consumo de esta "fórmula mágica", no ha sido claramente respondida. Ante toda esta incertidumbre, en la presente investigación, se ha propuesto estudiar el riesgo cardiaco, posiblemente vinculado con la acción de FP 'meizitac', en un modelo eficiente de experimentación como lo es el pez cebra *Danio rerio* [10]. La medición de parámetros morfológicos, funcionales y bioquímicos, han sido evaluados en pez cebra *Danio rerio*, como indicadores de cardiotoxicidad [11-12]. En la presente investigación se estudia la presencia de edema pericárdico, variación de la frecuencia cardiaca y de biomarcadores de daño cardiaco, como indicadores de la acción cardiotoxica de FP'meizitac', sobre modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*.

Materiales y Métodos

Solucion de FP'meizitac'.

El producto FP 'meizitac' utilizado, fue suministrado por una mujer de 45 años de edad, que lo estaba consumiendo por más de tres meses continuos y que se encontraba con severos malestares generalizados en el Hospital de emergencias Clínico Universitario de Caracas–Venezuela. Luego de una revisión del producto, no se observó sello de garantía. El producto suministrado, consistía en un paquete de capsulas en presentación comercial (Kunming Dalí Industria y Comercio, China), contentivas de un liofilizado de color marrón (Fig.1). Con el peso promedio del contenido de 5 capsulas del producto comercial, aproximadamente 300 mg/capsula, se procedió a realizar una solución acuosa en un volumen final de 100 ml, haciendo uso de agua de pecera como vehículo de dilución de la FP 'meizitac'. A partir de dicha solución, se procedió a estimar un rango de concentraciones comprendido entre 0 y 300 mg/ml de FP 'meizitac', para ensayar la respuesta toxica sobre el modelo experimental larvario de pez cebra *Danio rerio*.

Tratamiento con solución acuosa de FP'meizitac'. Obtención de la CL₅₀

Cepas silvestres de larvas de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf, fueron expuestas a distintas soluciones acuosa de FP'meizitac' en un rango de 0, 13, 26, 52, 78, 100, 260, 300 mg/ml, colocadas en capsulas de 24 pozos, a razón de 10 larvas/pozo/concentración, durante 24 h. Cada concentración fue evaluada por triplicado. Transcurrido el tiempo de exposición, se determinó el porcentaje mortalidad (% M), en función de las distintas concentraciones. Estos datos permitieron calcular la concentración letal cincuenta (CL₅₀), a través del método paramétrico Probit [13].

Bioensayo de actividad cardiaca.

Una vez obtenida la concentración letal CL₅₀, se procedió a registrarla presencia o no de edema pericárdico, a través de la observación directa en el microscopio estereoscópico SMZ-800. La actividad cardiaca de las larvas de pez cebra controles y tratadas, fue registrada a través de videos [14], realizados sobre el área cardiaca, a los 10, 20, 30, 40, 50, 60 min y 24 h de tratamiento, con una cámara digital adaptada y ajustada a una velocidad de 200 cuadros/seg. Los registros realizados a los 60 min y 24

h, fueron analizados con el programa ImageJ. La frecuencia cardiaca, fue estimada en términos de las variaciones de luminosidad, ocurrida durante los ciclos de sístole-diástole de la actividad cardiaca. Los controles se mantuvieron en agua de pecera.

Bioensayo de biomarcadores de trauma cardiaco.

A las 24 h de tratamiento con la CL₅₀ de FP 'meizitac', se determinaron los niveles de Creatinina Kinasa (CK) y su isoenzima de subunidad MB, como marcadores bioquímicos del trauma cardiaco. Para ello, se hizo uso del método espectrofotométrico EAGLE [15], con modificación para extracto de tejido homogenizado, proveniente de las larvas de pez cebra 24 h post tratamiento (10 larvas/100µl de agua de pecera), tanto controles como tratadas. La reacción enzimático-cinético de transformación de la Creatina-Fosfato, fue registrada a 340 nm. También se determinaron las actividades de la Aspartato Amino Transferasa (AST), Alanino Amino Transferasa (ALT), Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Fosfatasa Alcalina (ALP), como grupo de biomarcadores complementarios de la evaluación del trauma cardiaco.

Evaluación Estadística.

Para determinar si FP 'meizitac' tiene un efecto significativo sobre la morfo-funcionalidad cardiaca, se hizo uso de ANOVA; $P < 0,05$.

Resultados

La acción de FP 'meizitac', sobre larvas de pez cebra, fue expresada en una curva tipo sigmoidea, (Fig.2a), en donde fue registrado el %M como un evento dependiente de la concentración; a mayor concentración de FP 'meizitac', mayor efecto. La CL_{50} de FP 'meizitac' calculada fue de 52 ± 10 mg/ml, a 24 horas, con un 95% de confianza. El análisis de regresión lineal de la relación causa-efecto, mostro una pendiente de correlatividad pronunciada, con mayor ajuste en el valor de 0,86 (Fig.2b). Por otra parte, la acción de FP 'meizitac', se puso de manifiesto a través de cambios a nivel morfológico, funcional y bioquímico, de una manera dependiente del tiempo de exposición a la concentración subletal de FP 'meizitac' de 40 mg/ml. Particularmente a nivel morfológico (Fig.3), el edema pericárdico (flechas), fue evidente en comparación con el control, más pronunciado a las 24 h de tratamiento y acompañado por la formación de trombo al interior del corazón tubular (*). A nivel funcional (Fig.4), la frecuencia cardiaca promedio de la población larvaria tratada, presento un incremento significativo a los primeros 10 min de tratamiento, disminuyendo a los 20 min e incrementándose nuevamente a los 40 min. Este incremento se mantuvo hasta alcanzar 1h tratamiento, tiempo a partir del cual presento una significativa reducción (*), transcurridas las 24 horas post-tratamiento. A nivel bioquímico (Fig.5), la CK-MB, se presentó en mayor cantidad respecto a los controles, al igual que la CK, con pequeñas diferencias significativas en el resto de los marcadores.

Discusión

El producto FP 'meizitac', utilizado en la presente investigación, nos permitió identificar su acción tóxica sobre la población larvaria de pez cebra *Danio rerio*, a través de una respuesta temporal o una relación dosis-efecto. Esta relación dosis-efecto encontrada experimentalmente, nos recuerda los casos clínicos de mujeres obesas con índice de masa corporal entre 28 y 32 Kg, que comenzaron a incrementarse la dosis de FP 'meizitac', de 1 a 3 capsula al día, durante 6 meses de tratamiento, sin indicativo médico; con lo cual, a las pocas semanas de incrementada la dosis, fueron apareciendo los severos efectos colaterales [16]. En tal sentido, resulta evidente que promover la fórmula FP 'meizitac', como 100% natural y que no hay riesgos en su consumo indiscriminado y sin restricción médica, no es lo correcto, ya que como ha sido demostrado, clínica y experimentalmente, la aplicación de FP 'meizitac', a elevadas concentraciones y por un mayor tiempo de consumo, compromete la homeostasis sistémica de los individuos. Particularmente, la homeostasis cardiaca de la población larvaria de pez cebra *Danio rerio*, resulto comprometida, como lo indican las señales morfo-funcionales y bioquímicas, de naturaleza cardiotoxica, reportadas en nuestros resultados. Así, la variabilidad de la frecuencia cardiaca, la presencia de edema pericárdico y la elevada determinación de CK-MB, nos recuerda la acción de drogas que por su naturaleza cardiotoxica inducen anomalías en el proceso de repolarización y que causan bradicardia en el pez cebra [17], o también aquellas drogas, o agentes contaminantes, que al ser absorbidos en elevadas concentraciones, inducen malformaciones en los estadios larvarios de *Danio rerio* [18]. Si estas señales de acción cardiotoxica, están vinculadas con la presencia de algún componente de naturaleza toxica, tipo Sibutramina u otro agente contaminante, no podemos asegurarlo. Sin embargo, cabe destacar que autores citados en el presente trabajo; como Wiergowski y sus colaboradores, han reportado que a través de distintos métodos analíticos, obtienen 10 mg de Sibutramina como peso cuantificado en numerosos paquetes de FP 'meizitac' que ellos han ensayado. Al nosotros analizar la CL₅₀ obtenida en la presente investigación, hemos podido estimar

que su peso, 52 ± 10 mg, corresponde a un 17% de masa toxica, respecto al peso total del contenido de las capsulas de FP 'meizitac' ensayada. Si el producto FP 'meizitac' ensayado por nosotros, pertenece a un grupo contaminado, o si este 17% de la fracción de Fp 'meizitac' constituye una fracción contaminante, no ha sido posible demostrarlo. A pesar de ello, debemos destacar que la presencia de Sibutramina en presentaciones comerciales de FP 'meizitac', ha sido catalogada como una problemática de contaminación o adulteración de las formulas herbaria para el tratamiento de la obesidad; lo que ha hecho que muchas de estas fórmulas alteradas puedan convertirse en factores de riesgos, entre ellos factor de riesgo cardiaco. En tal sentido, nuestros resultados, todos ellos vinculados con alteración de la actividad cardiaca, particularmente acción cardiotoxica, demuestran que FP 'meizitac' utilizada en la presente investigación, ha sido un factor de riesgo cardiaco para la población larvaria de pez cebra *Danio rerio* ensayada. Como es sabido, la acción de la Sibutramina sobre la sistémica cardiovascular, es uno de los principales riesgos colaterales promovidos por esta sustancia [19]. Por último, debemos expresar que la posible contaminación, no determinada, en el producto de FP 'meizitac' utilizado, nos conduce a reflexionar sobre el riesgo de consumir de manera indiscriminada fórmulas anti-obesidad que no contengan una real certificación de garantía del contenido de todos los componentes.

Fig.1. Presentación comercial de FP 'meizitac' (A), capsulas (B) y liofilizado color marrón de especies vegetales con potencial terapéutico (C).



Fig.2. Relación dosis–respuesta (A) y regresión lineal de FP ‘meizitac’. Cada punto representa el promedio de tres mediciones/punto ± el error porcentual 0,5% de un N=30 larvas/concentración. $CL_{50}=52\pm 10$ mg/ml.

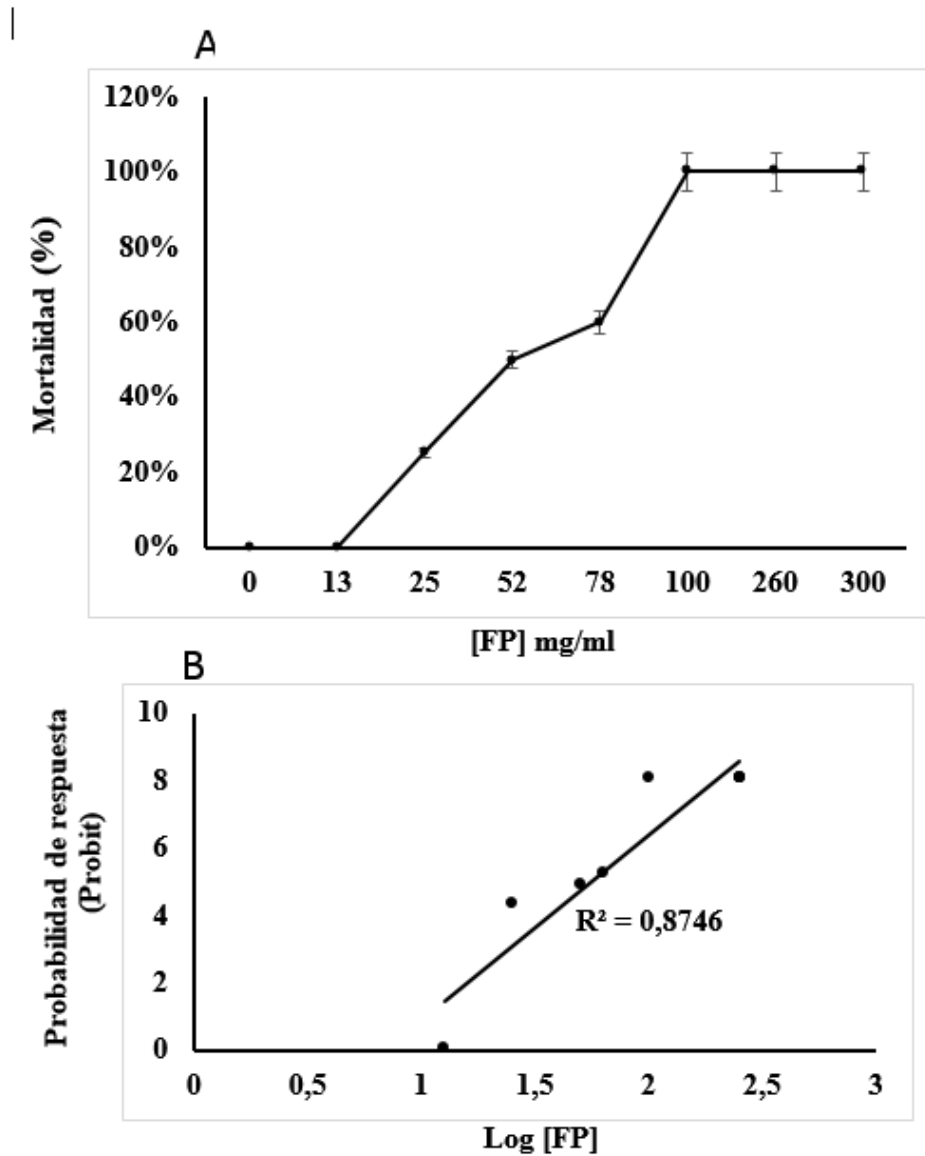


Fig.3. Vista lateral de larvas *Danio rerio*. Efectos morfológicos. FP 'meizitac' concentración 40 mg/ml, 1 y 24 h de tratamiento. Edema pericárdico (flechas), Trombo interno en corazón tubular (*). Barra=100 μ m.

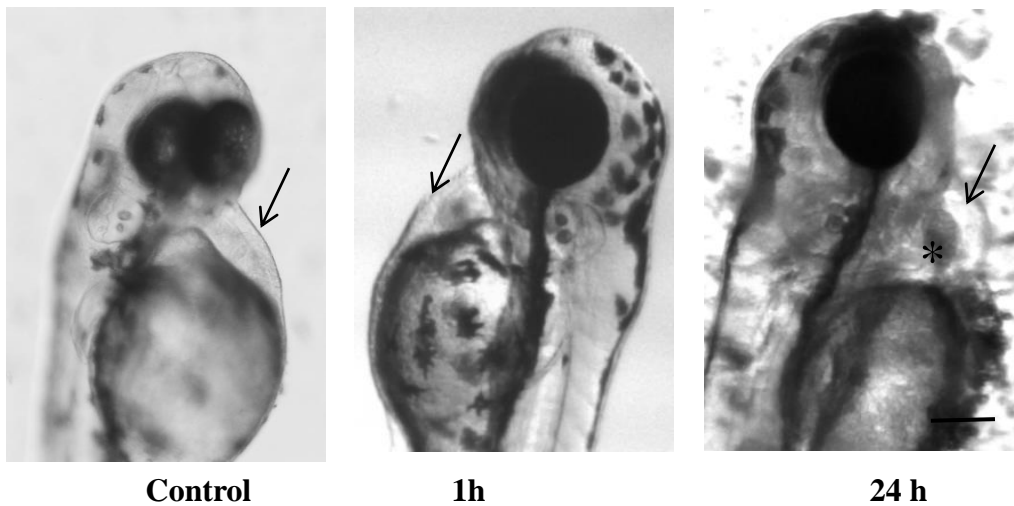


Fig.4. Variabilidad de la frecuencia cardiaca en 1 y 24 h, N° de pulsaciones/min. FP 'meizitac' 40 mg/ml. Los asteriscos representan el incremento significativo ($p < 0,05$) de N=30.

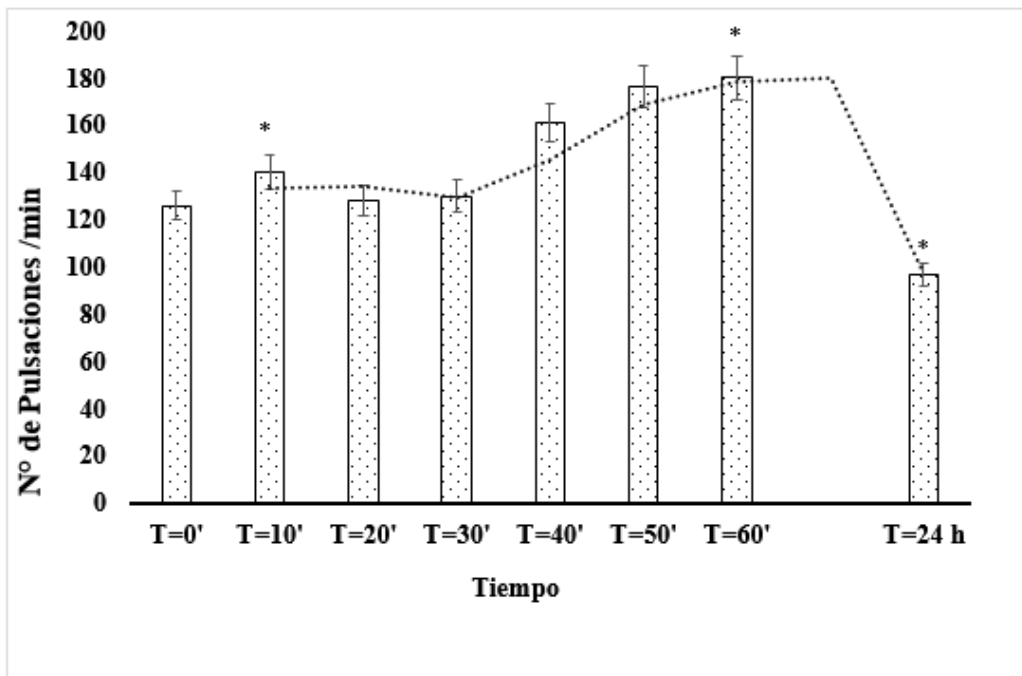
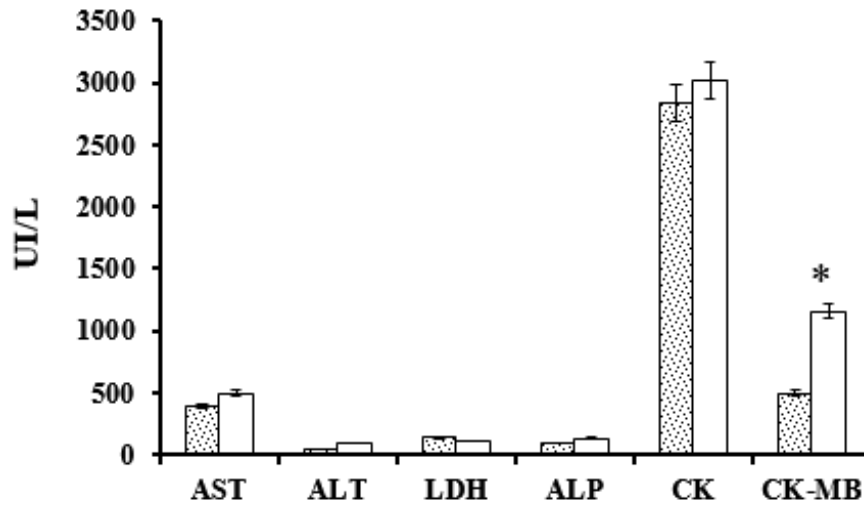


Fig.5. Biomarcadores de trauma cardiaco en homogenato de población larvaria, controles y tratadas FP 'meizitac' 40 mg/ml. Unidad Internacional /volumen (UI/L). (*p<0,05). □-CK-MB. ▣ -Control.



Bibliografía

1. Cayan, E., Dilek, U., Akbay, E., Gen, R., Dilek, S. (2009). Use of Chinese herbal medicine 'meizitac' in pregnancy: report of three cases. *J Obstet Gynaecol Res*: 35(4):801–803.
2. Sánchez, P.M. (2010). Pastilla china: una pildora peligrosa para adelgazar. <http://laverdad.com/detnotic.php?CodNotic=39732>. Revizado. 17/10/2014.
3. Wiergowsk, M., Galer–Tatarowicz, K., Nowak–Banasik, L., Rutkowska, J., Kuculyma, G., Waldman, W., Chodorowski, Z., Jankowski, Z., Sein, A.J. (2007). Hazard for human health and life by unintentional use of synthetic Sibutramina, which was sold as Chinese herbal product 'meizitac'. *Przegl Lek*: 64 (4–5):268–272.
4. Jung, J., Hermanns–Clausen, M., Weinmann, W. (2006). Anorectic Sibutramina detected in a Chinese herbal drug for weight loss. *Epub*: 25:221–222.
5. Padwal, R.S., Majumdar, S.R.(2007). Drug treatments for obesity: Orlistat, sibutramine and rimonabant. *Lancet*: 369(9555):71–77.
6. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D.Jr., Seeley, R.J., Baskin, D.D.(2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*: 404(6778):661–671.
7. João, R.A., Martel, F. (2012). Sibutramine effects on central mechanisms regulating energy homeostasis. *Current neuropharmacology*: 10:49-52.
8. Scheen, J.A.(2011). Sibutramine on cardiovascular outcome. *Diabetes Care*: 34(2):S114–S119.
9. Lavie, C.J., Milani, R.V., Ventura, H.O. (2009). Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol*: 53:1925–1932.
10. McGrath, P. (2012). Zebrafish. *Methods for Assessing drug safety and Toxicity*. Wiley&Son, Inc. pp.326.
11. Henry, T.R., Spitsbergen, J.M., Hornung, M.W., Abnet, C.C., Petwerson, R. E. (1997). Early life stage toxicity of 2, 3, 7, 8–tetrachlorodibenzeno–*p*–dioxin in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol*: 142:56–68.

12. Rubinstein, A.L. (2006). Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert. Opin. Metab. Toxicol.* 2(2):231–240.
13. Diaz Báez, M.C., Bulus Rossine, G.D., Pica, G.Y. (2012). Métodos Estadísticos para Análisis de Resultados de Toxicidad. [Libro electrónico]. Capítulo 5. [Consultado 10 octubre 2012]. Disponible en: http://web.idrc.ca/es/ev-84468-201-1-do_topic.html.
14. Sequera, D., Ercolino, J.M., Alvarez, M.A. (2010). Embrión de pollo: Un modelo con cardiograma para el estudio de la toxicidad experimental inducida por *Thevetia peruviana*. *Revista de Toxicología en Línea (RETEL)*. 28:37–48.
15. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (2006). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th Edition. Elsevier Saunders. Pp-2448.
16. Sein, A.J., Chodorowski, Z. (2007). Side effects after the usage of Chinese dieting product 'meizitac'. *Przeegl Lek.* 64(4-5):346-347.
17. Milan, D.J., Peterson, T.A., Ruskin, J.N., Peterson, R.T., Macrae, C.A. (2003). Drugs that induced repolarization abnormalities cause bradycardia in Zebrafish. *Circulation*:107:1355–1358.
18. Yang, T. S.D., Roden, D.M. (2001). Drug block of I(kr): model systems and relevance to human arrhythmias. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 38:737-744.
19. James, W.P.T. (2005). The SCOUT study: risk-benefit profile of sibutramine in overweight high-risk cardiovascular patients. *Eur Heart J.* 7(Suppl. L): L44-L48.

Recibido: 31/10/14

Aceptado: 11/11/14