

Trabajo Original

Toxicología Experimental

## **Señales tóxicas inducidas por una infusión de hojas frescas de *Melissa officinalis* en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*.**

---

**Álvarez M., Navarro E., Perdomo L., Nicorsin E., Arias M.**

Sección de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo" de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela, 01053.

Email: [alvarezmenator@gmail.com](mailto:alvarezmenator@gmail.com)

Proyecto: FONACIT-2013001767

## Resumen

Pocas han sido las evidencias experimentales que muestran los efectos tóxicos de *Melissa officinalis* o toronjil en comparación con la cantidad de reportes referidos a sus efectos beneficiosos. En el presente trabajo se hizo uso del modelo experimental de larvas de pez cebra *Danio rerio*, con la finalidad de caracterizar las señales tóxicas vinculadas con una infusión de hoja frescas de toronjil. Poblaciones larvarias de 5 días post-fertilización fueron seleccionadas al azar y tratadas de forma aguda con distintas concentraciones de una infusión de toronjil, en un rango entre 0 y 20 mg/ml, obtenidas a partir de una solución stock de 40 mg/ml, preparada con 8 gr de hojas frescas colocadas en 200 ml de agua hervida durante 10 min. Luego de una hora de tratamiento la observación directa bajo el microscopio estereoscópico permitió registrar la mortalidad larvaria con la cual se estimó la  $CL_{50}$  y los cambios morfo-funcionales a nivel del vitelo, del sistema cardiaco y de la anatomía en general. Se obtuvo un valor de  $CL_{50}$  de  $12,35 \pm 4,97$  mg/ml y se registró, en un 10% de la población larvaria tratada, el oscurecimiento del vitelo, así como en un 20% de la misma, la reducción de la frecuencia cardiaca, en un 30% la curvatura troncal, en un 15% la coagulación y en un 25% la presencia de necrosis. Las larvas con curvatura troncal fueron procesadas a nivel histológico, evidenciando un desarreglo en la histoarquitectura muscular. Los resultados expuestos en la presente investigación permitieron demostrar una serie de señales toxicas vinculadas con la infusión de toronjil, hasta los momentos poco exploradas, así como demostrar que su característica de producto natural no lo excluye de ser un posible promotor de severas señales de toxicidad dependiendo de su concentración. Estos hallazgos permiten a su vez incentivar futuras investigaciones en la búsqueda de los posibles mecanismos de acción tóxica de este importante agente natural.

**Palabras claves:** *Melissa officinalis*, toronjil, toxicidad, histoarquitectura muscular.

---

**Abstract**

**Toxic signals induced by a fresh leaves infusion of *Melissa officinalis* in larval model of Zebrafish *Danio rerio***

Few have been experimental evidence showing toxic effects of *Melissa officinalis* or lemon balm, compared with the number of reports relating to its beneficial effects. In this paper, we use the experimental model larval of Zebrafish *Danio rerio* to characterize the toxic signals associated with an infusion of lemon balm freshleaf. Larval populations of 5day post fertilization were selected at random and subjected acutely at different concentrations of an infusion of lemon balm in a range between 0 and 20 mg/ml obtained from a stock solution of 40 mg/ml prepared with 8 g of fresh leaf placed in 200 ml of boiling water for 10 min. After a 1 hour of treatment they were monitored by direct observation in the stereomicroscope, it allowed larval mortality register with which estimate the LC<sub>50</sub> and the morph-functional changes at the level of the yolk, the cardiac system and general anatomy. The results allow to show an LC<sub>50</sub> = 12.35±4.97 mg/ml and the presence of toxicity characterized as a 10% of treated larvae population darkening of the yolk and 20% of it, reduction in heart rate, 30% backbone curvature, 15% coagulation and by 25% the presence of necrosis. The backbone curvature larvae were processed histologically, showing a disorder in muscle histoarchitecture. The results presented in this research allowed showing a series of toxic signs associated with the infusion of lemon balm, until now unexplored and highlight its characteristic natural product does not exclude to promote severe signs of toxicity depending on its concentration. These findings allow in turn stimulate further research for study of possible mechanisms of toxic action of this important natural agent.

**Keywords:** *Melissa officinalis*, lemon balm, toxicity, histoarchitecture muscle.

## Introducción

*Melissa officinalis*, (*M. officinalis*), conocida como bálsamo de limón o toronjil, es una hierba medicinal perteneciente a la familia Lamiaceae, originaria de la región del Mediterráneo Oriental y del Asia Occidental.<sup>1</sup> Desde la antigüedad, esta hierba ha sido utilizada por su efecto antiespasmódico, sedante hipnótico, nutricional, anti-flatulento y antioxidante.<sup>2</sup> Muchas de estas propiedades han sido atribuidas a la presencia de compuestos del tipo quercetina, ácido gálico, flavonoides, aldehídos y taninos, entre otros.<sup>3</sup> Comúnmente es consumida como un extracto preparado a partir de hojas frescas de la planta,<sup>4</sup> para aliviar el estrés, mejorar la memoria y tratar el dolor e infecciones virales.<sup>5</sup> <sup>6</sup> Trabajos recientes han demostrado la eficiencia de *M. officinalis* en el tratamiento para el Alzheimer.<sup>7</sup> Al respecto cabe destacar que en experimentos *in vitro*, realizados sobre líneas celulares de feocromocitoma de rata, el toronjil ha demostrado mejorar la viabilidad de estas células contra la toxicidad de los péptidos  $\alpha\beta$ , proteínas encontradas en personas que padecen la enfermedad de Alzheimer.<sup>8</sup> Paralelo a estas investigaciones sobre los efectos beneficiosos, también han sido estudiados los efectos tóxicos a altas concentraciones, encontrándose que la infusión de toronjil induce somnolencia, bradicardia e hipotensión.<sup>9</sup> En tal sentido, estudios en ratas tratadas con el extracto acuoso de *M. officinalis*, han revelado una significativa alteración del electrocardiograma, sugiriendo un compromiso del sistema cardiaco inducido por el toronjil.<sup>10</sup> Por otra parte, ha sido reportado la dermatitis de contacto, cuando el toronjil es aplicado en formatópica.<sup>11</sup> Tomando en consideración, que hasta donde conocemos es poca la información referida a los posibles mecanismos asociados con la toxicidad de *M. officinalis*, en el presente trabajo se hizo uso del modelo experimental de larvas de pez cebra *Danio rerio*, con la finalidad de caracterizar los efectos tóxicos vinculados con una infusión de hoja frescas de *M. officinalis*.

## Materiales y Métodos

El trabajo consistió en una investigación de tipo exploratoria y experimental empleando larvas de pez cebra *Danio rerio* de 5 días post fertilización (dpf), las cuales fueron sometidas a la acción de distintas concentraciones de una infusión de hojas frescas de toronjil.

### Infusión de *Melissa officinalis*

La infusión de *M. officinalis*, fue obtenida a partir de hojas frescas seleccionadas de una planta de toronjil cultivada en los jardines internos del Instituto Anatómico "José Izquierdo" (IAJI), de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela

(UCV) (Fig.1). La preparación se realizó a partir de 8 gr de hojas frescas, las cuales fueron lavadas y colocadas en 200 ml de agua hervida durante 10 min. Se obtuvo una solución madre de 40 mg/ml, caracterizada por una coloración verde-oscuro, la cual fue envasada en frascos de vidrio debidamente rotulados y conservadas a 4°C. A partir de esta, se realizaron sucesivas diluciones con agua de pecera filtrada, en un rango de concentración creciente de 0,2,4,6,8,10, 12, 14,16,18 y 20 mg/ml.

Larvas de *Danio rerio* de 5dpf.

La población larvaria utilizada fue cultivada en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del IAJI-UCV. Dicha población fue obtenida a partir peces cebra adultos, de cepa silvestre (wt), sobre los cuales se indujo el rito de apareamiento y desove, estimulado a través de un ciclo de 10horasde luz y 14horas de oscuridad. Los huevos fertilizados fueron seleccionados y mantenidos a temperatura ambiente en cápsulas de Petri con agua de pecera filtrada, hasta alcanzar el estadio larvario de 5 días post fertilización (dpf).Las larvas, fueron clasificadas de acuerdo a su estadio de desarrollo<sup>12</sup>y manipuladas de acuerdo a los procedimientos de exposición química en pez cebr.<sup>13</sup>

Bioensayo de toxicidad.

Grupos de 10 larvas de pez cebr *Danio rerio* de 5 dpf, fueron seleccionadas al azar y expuestas, de forma aguda, a 2ml de cada una de las distintas concentraciones. Las mismas, fueron ensayadas por triplicado en cápsulas de 24 pozos. En la investigación, fue evaluada la relación concentración-respuesta así como las señales tóxicas. Para ello, una vez transcurrida la hora (1h) de tratamiento, se realizó el conteo del número de larvas muertas en cada concentración ensayada mediante observación directa al microscopio estereoscópico Nikon SM800. Los datos de mortalidad (%M) registrados, fueron sometidos al análisis Probit haciendo uso del programa IBM SPSS Statistis 23.0, con el cual se obtuvo el valor de la concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>) para la infusión. Paralelamente, se realizaron observaciones de los cambios morfológicos presentados en los distintos individuos de cada población, comparando los grupos controles y tratados. Respuestas como cambios en la porción vitelina, postura corporal, actividad cardiaca, coagulación sanguínea y necrosis, fueron seleccionadas como criterios para definir las señales tóxicas, caracterizadas por; oscurecimiento del vitelo (OV), reducción de la frecuencia cardiaca (RFc), curvaturatroncal (Ct),coagulación (C)y necrosis (N). La población larvaria con el mayor porcentaje de respuesta tóxica, fue seleccionada para ser analizada a nivel histológico. Para ello, las larvas fueron fijadas en una solución de Karnovskya 4°C, deshidratadas, incluidas en parafina, cortadas en secciones longitudinales de 0,4µm en un micrótopo de rotación Leitz 1512 y teñidas con Hematoxilina-Eosina. Las preparaciones histológicas fueron observadas bajo un microscopio Olympus-IX71, acoplado a una cámara digitalOlympus-DP71,con la cual se realizaron los registros fotográficos a ser analizados.

## Resultados

La relación concentración-respuesta quedó representada como una curva de comportamiento sigmoideo que expresó la relación entre el porcentaje de mortalidad (%M) y las distintas concentraciones ensayadas (Fig.2). La representación gráfica permitió describir la mortalidad como un efecto dependiente de la concentración, es decir, a mayor concentración de la infusión de toronjil mayor fue la mortalidad en la población larvaria tratada. La  $CL_{50}$  estimada resultó ser de 12,35 mg/ml, con un rango de desviación estándar de 4,97 en un 90% de confiabilidad, lo que se tradujo en un valor de  $CL_{50}=12,35\pm 4,97$  mg/ml. La transformación lineal de la curva concentración-respuesta, permitió observar una alta correlación entre las variables evaluadas, lo que se evidenció a través de un valor de  $R^2=0,823$ . La observación y el análisis de los cambios morfológicos sobre la población larvaria total, tratada con la  $CL_{50}$ , permitió cuantificar en un 10% de esta, el oscurecimiento del vitelo (OV), así como en un 20% de la misma la reducción de la frecuencia cardiaca (RfC), en un 30% la curvatura troncal (CT), en un 15% la coagulación (C) y en un 25% la presencia de necrosis (N)(Fig.3). Al comparar, a nivel histológico, las larvas controles (Fig. 4a) con las larvas con mayor respuesta tóxica, como fue la curvatura troncal (Fig.4b), fue posible observar una alteración en la histoarquitectura de la musculatura esquelética, evidenciada a través de la desorganización en las fibras musculares (Fig.4a' y 4b').

## Discusión

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron demostrar señales tóxicas vinculadas con la acción de una infusión de hojas frescas de *M. officinalis* sobre larvas de pez cebra *Danio rerio*, destacándose aquellas caracterizadas por su efectos cardiotoxico y miotóxico, hasta el momento poco exploradas. Las mismas, pusieron en evidencia que su característica de producto natural no lo excluye de promover severas señales de toxicidad, dependiendo de su concentración. En cuanto a las señales de cardiotoxicidad registradas, cabe destacar que la acción del toronjil ha sido relacionada con un enlentecimiento del flujo sanguíneo, una disminución de la frecuencia cardiaca, una deficiencia en la oxigenación, un estado de hipoxia sostenida y necrosis celular,<sup>14, 15, 16</sup> así como con un aumento en la biodisponibilidad del neurotransmisor GABA o ácido gamma-amino-butírico, a través de un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima GABA transaminasa (GABA-T), conjuntamente con la acción sobre el receptor GABA<sub>A</sub>.<sup>17, 18, 19, 20</sup> A nivel cardiovascular, el GABA ejerce un efecto regulador, ya sea disminuyendo o

aumentando el flujo sanguíneo y/o la frecuencia cardíaca. <sup>21</sup>De acuerdo a ello, cabría pensar que un posible mecanismo de acción cardiotoxica, como lo sugiere la disminución de frecuencia cardíaca reportada en nuestro modelo experimental, pudiera estar vinculada con la modulación del sistema GABA-érgico por parte del toronjil. Experimentaciones posteriores podrán estar dirigidas a confirmar tal propuesta. Respecto a la miotoxicidad, cabe destacar que cambios inducidos sobre la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo energético muscular, conducen a una modificación de las proteínas contráctiles del complejo actina-miosina y por tanto a la desorganización de las fibras musculares. <sup>22,23</sup>Numerosos agentes xenobioticos de acción miotóxica elevan la producción de radicales libres, generando una inestabilidad iónica en la membrana celular que conduce a un desarreglo de la histoarquitectura muscular. Así mismo, un desequilibrio hormonal, particularmente, la desregulación de la actividad de la hormona tiroidea, se ha vinculado con alteraciones de la histoarquitectura del músculo esquelético.<sup>24, 25</sup>Al respecto cabe destacar que la acción de *M. officinalis* sobre la funcionalidad de la hormona tiroidea, ha sido demostrada por otros autores. <sup>26</sup> De acuerdo a ello, cabría pensar que un posible mecanismo de acción miotóxica, como lo sugiere la presencia de señales de distrofia en la histoarquitectura muscular observada en nuestros resultados, estaría bajo la regulación del estado metabólico controlado a nivel hormonal por la acción tiroidea. De igual manera, experimentaciones posteriores podrán estar dirigidas a confirmar tal propuesta. Si algunos de estos eventos antes descritos han sido activados como consecuencia de una alteración GABA-érgica o por un estado energético desbalanceado producto de una desregulación hormonal, ambos promovidos por el toronjil, no fueron corroborados en la presente investigación. Sin embargo, la reducción de la frecuencia cardíaca, la presencia de señales de coagulación sanguínea así como la necrosis y la curvatura troncal con desarreglo en la arquitectura muscular en la población larvaria tratada, lo estarían sugiriendo. En resumen, todos estos hallazgos reportados en presente investigación, que definen un compromiso y alteración morfo-funcional en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio* sometidos a infusiones de toronjil, representan un aporte significativo para incentivar futuras investigaciones en la búsqueda de posibles mecanismos de acción tóxica de este agente natural.



Fig. 1. Hojas frescas de *M. officinalis* o toronjil

Bioensayo de toxicidad para la infusión de *M. officinalis*

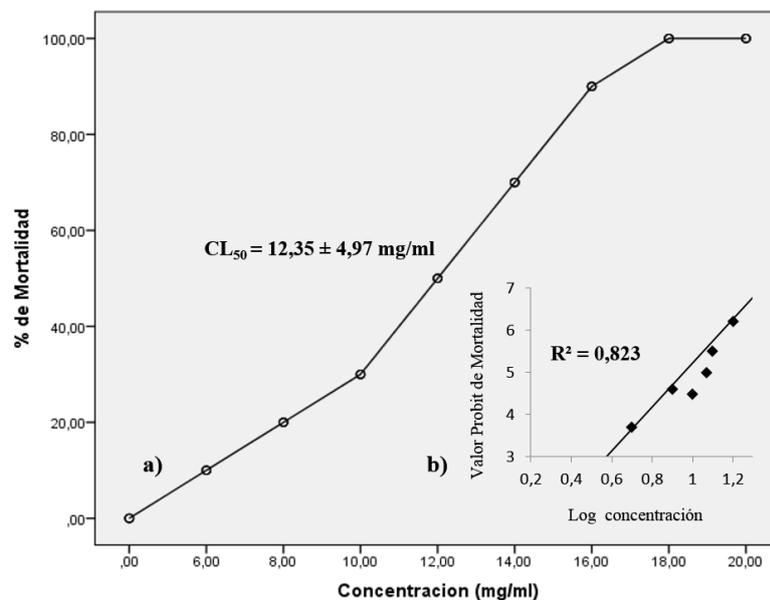


Fig. 2. Bioensayo de toxicidad empleando una infusión de hojas frescas de *M. officinalis* sobre larvas de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf (30 larvas/concentración) a 1 hora de exposición. Curva sigmoidea de la relación concentración–respuesta (a) y su transformación lineal por análisis Probit (b). Se destaca un valor de  $CL_{50} = 12,35 \pm 4,97$  mg/ml y un valor de  $R^2 = 0,823$ , obtenido a través del programa estadístico IBM SPSS 23.0. Abreviaturas: días post-fecundación (dpf), concentración letal cincuenta ( $CL_{50}$ ), coeficiente de relación ( $R^2$ ).

**Efectos tóxicos de la CL<sub>50</sub> de la infusión de hojas frescas de *M. officinalis***

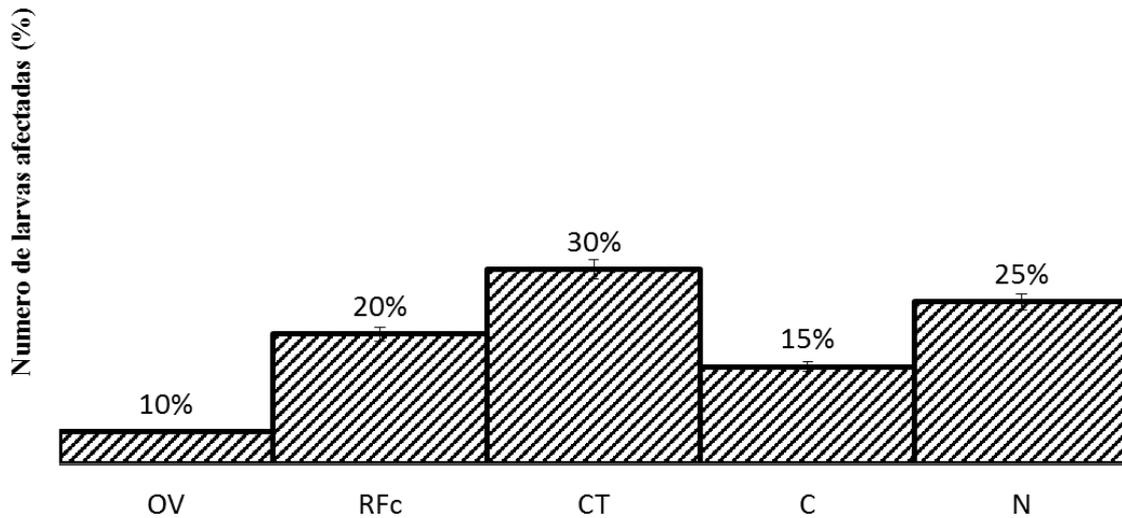


Fig. 3. Efecto tóxicos de la CL<sub>50</sub> de la infusión de hojas frescas de *M. officinalis* sobre larvas de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf luego de 1 hora de exposición. Se destacan: oscurecimiento del vitelo (OV), reducción de la frecuencia cardíaca (RFc), curvatura troncal (Ct), coagulación (C) y necrosis (N), siendo la Ct la de mayor incidencia.

**Histoarquitectura de larvas de pez cebra *Danio rerio* tratadas con la CL<sub>50</sub> de *M. officinalis***

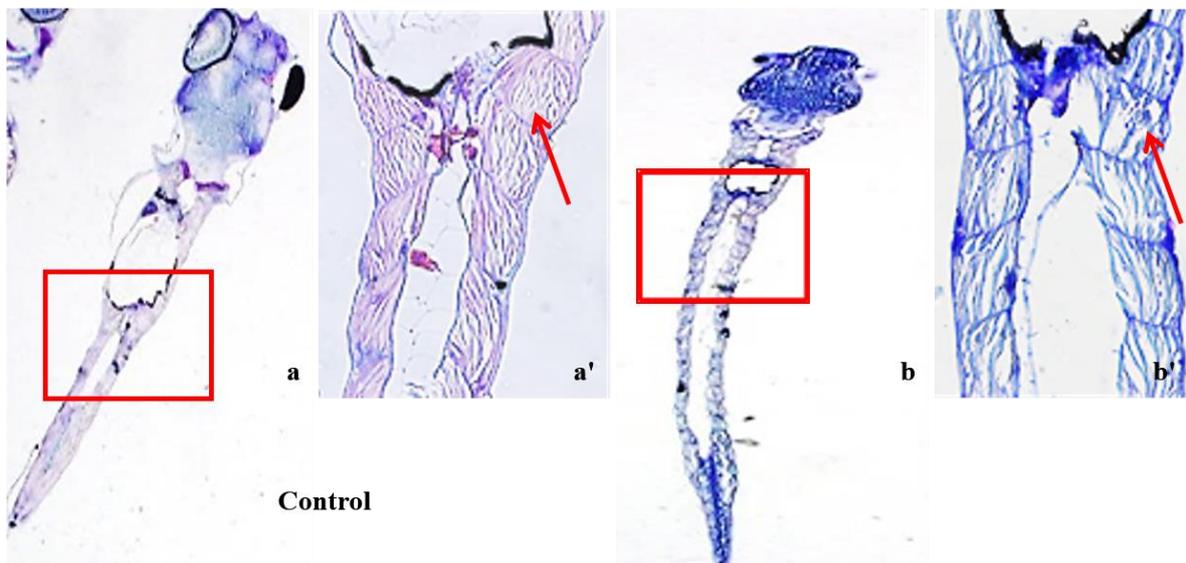


Fig. 4. Cortes longitudinales de larvas (5dpf) controles y tratadas con la CL<sub>50</sub> de *M. officinalis*. Se destaca (recuadro), al comparar con el control (a,a), un desarreglo en la arquitectura del cuerpo muscular de las larvas expuestas a la infusión de toronjil (b.b'), evidenciado por la pérdida en la histoarquitectura de las miofibrillas (flechas). Coloración H&E. Observación con objetivos de 10X y 20X.

## Bibliografía

1. Zarei A, Changizi A, Taheri S, Rasekh F. [Comparison between effects of different doses of \*Melissa officinalis\* and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats](#). *Avicenna J Phytomed*. 2014; 4(1): 15–23.
2. Dastmalchi K, Damien H, Oinonena P, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT-Food Science and Technology*. 2008; 41(3): 391–400.
3. Zarei A, Changizi-Ashtiyani S, Taheri S, Hosseini N. A brief overview of the effects of *Melissa officinalis* L. extract on the function of various body organs. *Zahedan J. Res. Med. Sci*. 2015; 15: 29-34.
4. Aprotosoai A, Raileanu E, Trifan A, Cioanca O. The polyphenolic content of common Lamiaceae species available as herbal tea products in Romanian pharmacies. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat*. 2013; 117(1): 233-237.
5. Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J. Ethnopharmacol*. 2000; 69:105–114.
6. Jalal Z, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2015; 5(6): 458-461.
7. Hassanzadeh G, Pasbakhsh P, Akbari M, Shokri S, Ghahremani M, Amin H. et al. Neuroprotective properties of *Melissa officinalis* L. extract against ecstasy-induced neurotoxicity. *Cell Journal*. 2011; 13(1): 25–30.
8. Sepand M, Soodi M, Hajimehdipoor H, Soleimani M, Sahraei E. Comparison of neuroprotective effects of *Melissa officinalis* total extract and its acidic and non-acidic fraction against a  $\beta$ -induced toxicity. *Iran J. Pharm. Res*. 2013; 12(2): 415-423.
9. Hajhashemi V, Safaei A. Hypnotic effect of *Coriandrum sativum*, *Ziziphus jujuba*, *Lavandula angustifolia* and *Melissa officinalis* extracts in mice. *Res. Pharm. Sci*. 2015; 10(6): 477 – 484.
10. Joukar S, Asadipour H. Evaluation of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) effects on heart electrical system. *Res. Cardiovasc. Med*. 2015; 4(2): 1-6.
11. Rasmussen P. Lemon balm-*Melissa officinalis*; also known as lemon balm, bee balm, garden balm, Melissa, melisengeist. *J. Prim. Healr Care*. 2011; 3(2): 165-166.
12. Kimmel C, Ballard W, Kimmel S, Ullmann B, Schilling T. Stages of embryonic development of zebrafish. *Developmental dynamics*. 1995; 203(3); 253 - 310.
13. Nishimura Y, Inoue A, Sasahawa Sh, Koiwa J, Kawaguchi K, Kawase R. et al. Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenital Anomalies*. 2016; 56: 18 – 27.

14. Gazola R, Machado D, Ruggiero C, Singini G, Alexander M. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbobogoncitratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. *Pharmacological Research*. 2004; 50: 477 – 480.
15. Alijaniha F, Naseri M, Afsharypuor S, Fallahi F, Noorbala A, Mosaddegh M. et al. Heart palpitation relief with *Melissa officinalis* leaf extract: double blind, randomized, placebo controlled trial of efficacy and safety. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 164: 378 - 384.
16. Joukar S, Asadipour H, Sheibani M, Najafipour H, Dabiri S. The effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) pretreatment on the resistance of the heart to myocardial injury. *Pharmaceutical Biology*. 2015; 1 – 9.
17. Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau V, Arnason J. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an *in vitro* measure of GABA Transaminase activity. *Phytotherapy Research*. 2009; 23: 1075 – 1081.
18. Ibarra A, Feuillere N, Roller M, Lesburgere E, Beracochea D. Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity on circadian and exploratory activities in mice. *Phytomedicine*. 2010; doi: 10.1016/j.phymed.2010.01.012
19. Yoo D, Choi J, Kim W, Yoo K, Lee Ch, Yoon Y, et al. Effects of *Melissa officinalis* L. (Lemon Balm) extract on neurogenesis associated with serum corticosterone and GABA in the Mouse Dentate Gyrus. *Neurochem. Res*. 2011; 36: 250 – 257.
20. Shi Y, Dong J, Zhao J, Tang L, Zhang J. Herbal insomnia medications that Target GABAergic systems: a review of the psychopharmacological evidence. *Curr. Neuropharmacol*. 2014; 12(3): 289 – 302.
21. Nishimura M, Yoshida Sh, Haramoto M, Mizuno H, Fukuda T, Kagami-Kaysuyama H. et al. Effects of white rice containing enriched gamma-aminobutyric acid on blood pressure. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2016; (6):66-71.
22. Gutiérrez-Gutiérrez G. Miopatías producidas por tóxicos industriales, animales y vegetales. *Rev. Neurol*. 2010; 51(6): 360 - 366.
23. Avallone B, Agnisola C, Cerciello R, Panzuro R, Simoniello P, Cretí P. et al. Structural and functional changes in the zebrafish (*Danio rerio*) skeletal muscle after cadmium exposure. *Cell Biol. Toxicol*. 2015; 1 - 11.
24. Leal A, Albuquerque J, Matos M, Fortunato R, Carvalho D, Rosenthal D. et al. Thyroid hormones regulate skeletal muscle regeneration after acute injury. *Endocrine*. 2014; doi: 10.1007/s12020-014-0271-5.
25. Soukup T, Smerdu V. Effect of altered innervation and thyroid hormones on myosin heavy chain expression and fiber type transitions: a mini-review. *Histochemistry and Cell Biology*. 2015; 143(2): 123 - 130.

26. Zarei A, Changizi-Ashtiyani S, Sokhandani M, Rezai A, Zaheiri S, Thaeri S. The comparison between the effects of the alcoholic extract of *Melissa officinalis* and atorvastatin on serum levels of thyroid hormones in hypercholesterolemia male rats. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 2013; 15(8): 6-12.

**Recibido: 02/02/16**

**Aceptado: 04/02/16**