

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Extracto acuoso de tabaco masticable Chimó El Tigrito® y la disfunción cardíaca en modelo experimental larvario de pez cebra *Danio rerio*.

Álvarez, M¹., Mujica, S., Perdomo, L., Navarro, E.

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

Resumen

El Tabaco Masticable (TM) Chimó El Tigrito®(TM-ChT®), es una pasta suave de tabaco alcalinizado y aromatizado de fabricación semi-industrial, cuyo consumo está ganando popularidad entre la población de jóvenes de edad escolar y adolescentes. Sin embargo, la investigación sobre los efectos potencialmente tóxicos de este tabaco consumido por vía oral, no ha mantenido el ritmo que lleva el aumento de su alto consumo. Reportes clínicos y experimentales, han ilustrado algunas señales de toxicidad de este producto; particularmente vinculado con la disfunción cardiaca que hasta donde se conoce no ha sido claramente definida. En la presente investigación se identificaron algunos compuestos químicos presentes en dicho extracto y se caracterizó el efecto cardiotóxico del Extracto Acuoso de Tabaco Masticable (EATM-ChT®), en modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*. La cromatografía Gas-masa, permitió identificar en el EATM-ChT®, compuestos como la nicotina, derivados de esteroides, así como cotinina y 2-fluorofenilhidrazina. Como efectos tóxicos predominantes se describieron; una zona apoptótica en el área cardiaca, caracterizada por una reacción positiva a la Naranja de Acridina, una desorganización de la arquitectura del tejido cardiaco, acompañada por una vacuolización del tejido de miocardio y endocardio, una reducción significativa de la frecuencia cardiaca y un incremento de las enzimas Creatinina Quinasa (CK) y su subunidad CK-MB. Estos hallazgos permitieron definir una disfunción cardiaca, al identificar el severo compromiso morfo-funcionalidad, que tendría como posible mecanismo de acción la activación de vías de apoptosis en tejido cardiaco, un blanco por excelencia para la acción toxica de este producto tan consumido en la población venezolana.

Palabras Claves: Chimó El Tigrito®, Pez cebra, Disfunción Cardiaca, Apoptosis, Nicotina

Summary

Aqueous extract of the Chimó El Tigrito® chewing tobacco and the cardiac dysfunction in *Danio rerio* larval zebrafish experimental model

The chewing tobacco (TM) Chimó the Tigrito® (TM-ChT®) is a smooth flavored paste snuff alkalized and semi-industrially manufactured, consumption of which is gaining popularity among the school-aged youth and adolescents. However, research into the potentially toxic effects of this snuff when consumed orally, has not kept the same pace as its highly increasing consumption rates. Clinical and experimental reports have shown some signs of toxicity associated to this product, particularly, linked to heart dysfunctions which have yet to be clearly established. In this research, some chemical compounds present in the extract were identified and the cardiotoxic effect of the aqueous extract of Chewable tobacco (EATM-ChT®) in the *Danio rerio* larval Zebrafish model was characterized. The Gas-mass chromatography, allowed to identify compounds such as nicotine, sterol derivatives, as well as cotinine and 2-fluorophenylhydrazine within the extract of TM-ChT®. Such predominant toxic effects were described; an apoptotic area in the heart area, characterized by a positive reaction to Acridine Orange, disruption of the architecture of cardiac tissue, accompanied by the vacuolation of myocardial tissue and endocardium, a significant heart rate reduction and increased Creatine kinase (CK) enzymes and its subunit CK-MB. These findings allowed to define a cardiac dysfunction frame, by identifying severe morpho-functional compromise, which may have the activation of apoptotic pathways in heart tissue as a possible mechanism of action, a target par excellence for the toxic action of this product, so highly consumed by the Venezuelan population.

Keywords: Chimó The Tigrito®, Zebrafish, Cardiac Dysfunction, Apoptosis, Nicotine

Introducción

El Tabaco Masticable (TM) Chimó El Tigrito® (TM-ChT®), es una pasta suave de tabaco alcalinizado y aromatizado de fabricación semi-industrial, cuyo consumo está ganando popularidad entre la población de jóvenes de edad escolar y adolescentes de nuestro país. Sin embargo, la investigación sobre los efectos potencialmente tóxicos de este tabaco consumido por vía oral no ha mantenido el ritmo que lleva el aumento de su alto consumo. En términos generales, estudios epidemiológicos han revelado que el consumo de TM por vía oral, se vincula con una mayor incidencia de infartos al miocardio y accidentes cerebrovasculares¹. Esto ha sido demostrado en diferentes poblaciones masculinas de edad comprendida entre 35-54 años y 55-64 años, sobre los cuales se ha reportado riesgo de infarto agudo. Sin embargo, en ambos grupos el riesgo de infarto del miocardio no fue significativamente diferente, respecto a los fumadores de cigarrillos. El tamaño limitado del estudio ha disminuido la potencia estadística del mismo, resultando en un análisis con poca fuerza significativa en cuanto a la mortalidad por infarto de miocardio vinculada al consumo del TM. A nivel clínico se ha descrito que el consumo de TM se encuentra relacionado con factores de riesgo cardíaco, como la elevada presión sanguínea² e hiperlipidemias³; así como una alta tasa de mortalidad por alteraciones cardiovasculares⁴. Cabe destacar que dependiendo del tiempo de consumo del TM, el usuario podría estar expuesto a niveles de nicotina en sangre cercanos o superiores a los que presenta un fumador de cigarrillos promedio. Estos niveles de nicotina, podrían ejercer gran impacto en el sistema cardiovascular, alterando la presión sanguínea a través de su propiedad vasoconstrictora. Esto ha sido demostrado en jóvenes consumidores de TM en los cuales han sido registrados valores elevados de presión sanguínea⁵. Además, ha sido reportado que el TM aumenta las concentraciones de catecolaminas en la sangre y tiene efectos simpaticomiméticos inmediatos, por lo cual ha sido posible considerar que tenga un efecto agudo arritmogénico, que pudiera ser causa de muerte súbita⁶. Todos estos resultados reflejan solo efectos generalizados del consumo de TM y un conocimiento incierto sobre los mecanismos de toxicidad vinculados con su acción tóxica. A pesar de esta gran información existente, referida al compromiso cardiovascular vinculado con el consumo de TM, la misma es poca en comparación con la existente respecto al compromiso cardiovascular relacionado con el uso del cigarrillo. Es por ello que en la presente investigación se ha propuesto el desarrollo de un modelo *in vivo* en larvas de pez cebra *Danio rerio*, para evaluar la cardiotoxicidad vinculada con un Extracto Acuoso de Tabaco Masticable denominado "Chimo El Tigrito" (EATM-ChT®), de incrementado consumo en nuestro país. Cabe destacar que este modelo de experimentación animal, surgido en las últimas décadas como un modelo de alta

eficiencia en la experimentación biomédica, podría también contribuir con nuevos conocimientos de los parámetros de disfunción cardíaca asociados a la cardiotoxicidad⁷ del TM y particularmente del TM Chimó El Tigrito[®], hasta el momento poco conocida.

Materiales y métodos

Extracto Acuoso de Tabaco Masticable Chimo El Tigrito[®] (EATM-ChT[®])

El producto utilizado, denominado Chimó El Tigrito[®] fue adquirido en casa comercial que lo expende de manera pública. El EATM-ChT[®], fue preparado a partir de una solución de peso máximo de 40 mg de pasta de chimó, disuelto en 1 ml de agua de pecera filtrada, con agitación constante por un período de 10 minutos, hasta disolución completa. Dicho peso, fue seleccionado en base a información referenciada por otros autores y adaptado a las condiciones del estudio⁸.

Identificación de la composición química del EATM-ChT[®]

Para la estimación de la composición química del EATM-ChT[®], se contó con el análisis por Cromatografía de Gases con detector de masas, realizado en el Laboratorio de análisis Toxicológicos, Físicos-Químicos y Microbiológicos, Sedicomvet C.A., ubicado en la ciudad de Maracay, Edo. Aragua-Venezuela. Este laboratorio, como un centro acreditado, proporcionó resultados confiables y reproducibles del análisis químico de la muestra de TM Chimó El Tigrito[®], a través de equipos de alta tecnología. Se utilizó una columna HP-5; MS Agilent J&W GC, de 30 m de longitud, dimensiones 0,250 mm x 0,25 mm. Horno: next: 70 Hold: 15 °C; °C/min: 20 Next: 200 Hold: 15 °C; °C/min: 20 Next: 250 Hold: 30°C. El volumen de inyección fue de 5 µl. Los cálculos de las concentraciones presentes en la pasta de tabaco, fueron realizados a través del software del equipo.

Acción Cardiotóxica del EATM-ChT[®]

Para la evaluación de la acción cardiotóxica vinculada con el EATM-ChT[®], se realizó un bioensayo de toxicidad aguda sobre poblaciones larvarias de pez cebra *Danio rerio* de 5 dpf, sometiendo a dicha población a una concentración toxica minina (CTm), definida como la menor concentración generadora de alteración de la frecuencia cardíaca en un menor tiempo de exposición. Una CTm de 2,52 mg/ml, seleccionada previamente dentro de un rango de concentraciones subletales entre 2 y 12,6 mg/ml y un tiempo mínimo de tres horas (3h) de exposición a temperatura ambiente, fueron definidos como las condiciones para el bioensayo de experimentación. Un primer grupo de larvas de pez cebra *Danio rerio*, en número de 10 larvas, fueron colocadas en capsulas de 24 pozos y por triplicado fueron tratadas con 1 ml de EATM-ChT[®], de acuerdo a las condiciones definidas para la

experimentación; una CTm de 2,52 mg/ml y un tiempo mínimo de exposición de 3h. Los controles permanecieron en agua de pecera bajo las mismas condiciones. Una vez cumplida la condición de experimentación, se procedió a incubar parte del grupo control y tratados en una solución de Naranja de Acridina (NA) de 10^{-1} M durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo las muestras, controles y tratadas, fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia Olympus IX71 con cámara digital DP71. El marcaje con NA es un ensayo rápido para la evaluación de apoptosis en embriones de pez cebra⁹. Otra parte del grupo de embriones, controles y tratados, fueron procesados para histología convencional y a través de cortes histológicos realizados sobre el área cardíaca contrastada con Guiemsa, fueron descritas alteraciones en la mioarquitectura del tejido cardíaco; miocardio (m) y endocardio (e). Cabe destacar que la frecuencia cardíaca fue determinada por conteo directo de las pulsaciones/minuto (P/min) bajo la lupa estereoscópica. En un segundo grupo de embriones controles y tratados, en iguales condiciones de experimentación, fueron utilizados para la determinación de los niveles de Creatinina Quinasa (CK) y su Isoenzima de subunidad MB, como marcadores bioquímicos del trauma cardíaco. Para ello, se hizo uso del método espectrofotométrico EAGLE¹⁰, con modificación para extracto de tejido homogenizado, proveniente de las larvas de pez cebra (30 larvas/200µl de agua de pecera), tanto controles como tratadas. La reacción enzimático-cinética de transformación de la Creatina-Fosfato, fue registrada a 340 nm y cuantificadas en Unidades Internacionales por Litro (UI/L). También se determinaron las actividades de la Aspartato Amino Transferasa (AST) y Lactato Deshidrogenasa (LDH), como grupo de biomarcadores complementarios de la evaluación del trauma cardíaco.

Resultados

La estimación de la composición química del EATM-ChT[®], que contó con el análisis por Cromatografía de Gases con detector de masas, mostró las características físicas de la muestra de EATM-ChT[®] analizada. Así, se describió el aspecto físico, la concentración y el factor de retención de dichos componentes (Tabla.I). Entre los componentes presentes en la muestra analizada fue posible cuantificar en ppm, fitoesteroles como el colesterol y derivados de esteroides como el Cholest-8(14)-ene-3,15-dione, Stigmastan-3,5-dieno y el D-alfa-tocoferol, alcaloides tipo nicotina y cotinina, además de hidrocarburos aromáticos, como la 2-fluoro fenilhidrazina, el cual está catalogado como un producto químico potencialmente peligroso (Tabla.II). Por su parte, el uso de NA permitió identificar en larvas tratadas con EATM-ChT[®] (Fig.1a), un intenso color naranja en la porción cardíaca (recuadro rojo) y la región cefálica (c). Un esquema de corazón larvario (Fig.1a'), permitió ilustrar las dos principales porciones del corazón; atrium (A) y ventrículo (V). Cortes sagitales representados en la figura, permitieron describir la histología de la porción ventricular (Fi.1a''), en donde se destaca el endocardio (e), el miocardio (m);

ambas estructuras mostrando signos evidentes de vacuolización (*), en contraste con larvas control (Fig.1b, b' b''), en donde los signos de reacción positiva a la NA, así como los signos de daño en la estructura del tejido cardíaco no fueron registrados. El promedio de los valores de frecuencia cardíaca (Fig.2), obtenido para la población larvaria control fue de $189,3 \pm 1,47$ P/min, mientras que para la población tratada fue de $84,1 \pm 1,03$ P/min. Dicha reducción se tradujo en un 57 % menos de P/min, promovido por el EATM-ChT®. Por otra parte, el perfil isquémico transcurridas las 3h de tratamiento con EATM-ChT®, mostró variaciones significativas en el patrón basal de actividad de las enzimas marcadoras de trauma cardíaco. Así, siendo el patrón basal para la CK de 3249 UI/L, la misma alcanzó un valor de 6030 UI/L en las larvas tratadas, representando así un 85,65% de aumento en la actividad de esta enzima. De igual manera, el patrón basal de su Isoenzima CK-MB de 2588 UI/L, alcanzó un nivel de actividad de 4283 UI/L, representando así un 65,49% de incremento. También, los niveles basales de las enzimas AST y LDH, presentaron incrementos significativos del nivel basal de su actividad, partiendo de 430 UI/L a 759 UI/L y de 756 UI/L a 899 UI/L, respectivamente. Lo cual significó un incremento de 76,51% y 18,91%, por encima de la actividad basal de las mismas.

Discusión

Los resultados obtenidos permitieron identificar diversos componentes químicos presentes en el EATM-ChT®. Diversos en cuanto a cantidad y calidad de los mismos. Por otra, fue posible estimar la disfuncionalidad cardíaca; la misma fue caracterizada a través de alteraciones morfo-funcionales. En cuanto a la cantidad de los compuestos presentes en la muestra de EATM-ChT®, cabe destacar el poco contenido de almidón, poli-fenoles y carbohidratos, así como un gran cantidad de azúcares reductores. En cuanto a la calidad, cabe destacar que los mismos, parecieran ser el producto de la transformación de los ingredientes originales que componen la muestra, lo cual ha sido sugerido por las características químicas de los mismos. Ejemplo de ello lo constituye la cotinina, que ha sido reportada como un metabolito de la nicotina y el Stigmastan-3,5-dieno y el D-alfa-tocoferol, que han sido reportados como compuestos derivados de la deshidratación de aceites naturales¹¹. Tanto la cantidad como la calidad de los componentes presentes en la muestra de EATM-ChT® analizada, pareciera ser una característica dependiente de las técnicas empleadas en su manufactura como ha sido planteado por otros autores, quienes lo reportan como una característica dependiente del proceso de fermentación¹². Si el variable origen de los compuestos encontrados es consecuencia o no del proceso de su manufactura, en el presente trabajo no se ha podido identificar, sin embargo, la característica de metabolitos secundarios, así lo sugieren. En cuanto a las alteraciones morfo-funcionales cabe destacar que estructuras como el musculo cardíaco

ventricular, el musculo cardiaco auricular, el endocardio, el epicardio, el pericardio y el tejido de conducción, estarían involucrados como elementos fundamentales en dicha alteración. En ese sentido cabría pensar que la acción cardiotoxica reportada, como efecto del EATM-ChT[®], podría ser el resultado de una acción directa sobre la estructura tisular y celular que conforma el corazón. Otras investigaciones con agentes tóxicos de origen químico, tales como herbicidas y drogas anti arrítmicas¹³, señalan la cardiotoxicidad a través de intensas lesiones en el tejido del Haz de His, asociadas con alteraciones en la conducción de la corriente eléctrica y con mecanismos tales como la muerte celular por apoptosis¹⁴. Si el daño miocárdico reportado en nuestros resultados incluye daño en el tejido de conducción, no fue posible identificarlo, sin embargo la presencia de vacuolas, la alteración de la arquitectura del tejido cardiaco, la intensa reacción positiva a la NA, así como el incremento en las enzimas marcadoras de trauma cardiaco, podrían sugerirlo. Este compendio de alteraciones cardiacas caracterizan por tanto una disfuncionalidad cardiaca asociada a la acción cardiotoxica del EATM-ChT[®], probablemente promovida por los componentes químicos encontrados.

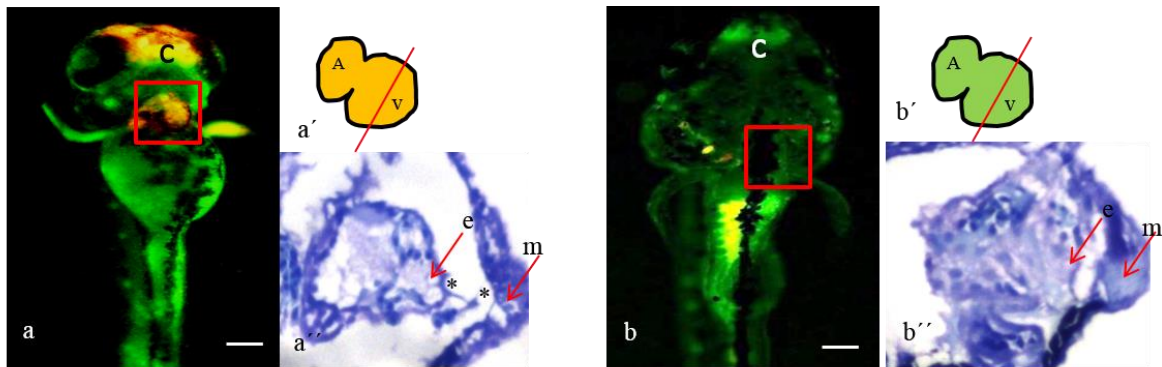


Fig.1. Muestras de larvas de pez cebra *Danio rerio* tratadas con la CTm de EATM=2,52 mg/ml (a), en donde se muestra la tinción positiva a la NA en la porción cardíaca (recuadro) y cefálica (c). Un esquema de corazón (Fig.1a') muestra las dos principales regiones del corazón larvario: atrium (A) y ventrículo (V). Sobre este se indica la orientación de corte histológico sagital, destacando tejido del miocardio (m) y endocardio (e) en donde se evidencia la presencia de vacuolas (*) en estos tejidos. En contraste con la muestra control (Fig.1b), estos cambios morfológicos no fueron observados. Barra=250µm.

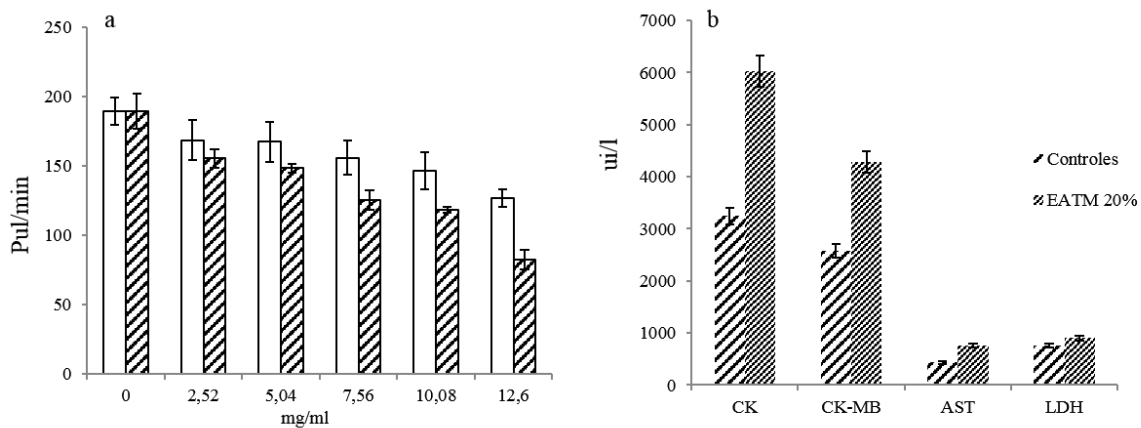


Fig.2. El EATM-ChT® indujo disminución significativa de la frecuencia cardíaca (P/min) en función de la concentración (Fig.1a) así como un incremento del 20% de incremento en la actividad de las enzimas marcadoras del daño muscular cardíaco (Fig.2b), respecto a los controles. Creatinina Quinasa (CK) y su Isoenzima MB (CK-MB), principalmente. Unidades Internacional /litro (UI/L).

Tabla I. Características físicas de la muestra de EATM-ChT®

Muestra	COLOR	OLOR	TEXTURA	SOLUBILIDAD
Chimó El Tigrito®	Negro	Tabaco	Crema	Agua (s) Alcohol (i) Cloroformo (i)

(s) Soluble (i) Insoluble.

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

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

(a), (b) Alcaloides del Tabaco.

Bibliografía

1. Eliasson M, Lundblad D y Hagg E. Cardiovascular risk factors in young snuff-users and cigarette smokers. *J Intern Med* 1991; 230:17-22.
2. Levi F, Lucchini F, Negri E y La Vecchia C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* 2002; 88:119-24.
3. Wolk R, Shamsuzzaman A, Svatikova A, Huyber CM, Huck C y Narkiewicz K. Hemodynamic and autonomic effects of smokeless tobacco in healthy young men. *J Amer Coll Cardiol* 2005; 45:910-4.
4. Tucker L. Use of smokeless tobacco, cigarette smoking, and hypercholesterolemia. *Am. J. Public Health.* 1989; 79:1048-1050.
5. Bolinder G, Alfredsson L, Englund A y De Faire U. Smokeless tobacco use and increased cardiovascular mortality among Swedish construction workers. *Am J Pub Health* 1994; 84:399-404.
6. Willis D y Popovech M. Toxicology of smokeless tobacco: implications for immune, reproductive, and cardiovascular systems. *Journal of toxicology and environmental health, part B: critical reviews* 2012; 15(5):317-331.
7. [Folkesson M](#), [Sadowska N](#), [Vikingsson S](#)¹, [Karlsson M](#)³, [Carlhäll CJ](#), [Länne T](#), [Wågsäter D](#), [Jensen L](#). [Differences in cardiovascular toxicities associated with cigarette smoking and snuff use revealed using novel Zebrafish models.](#)2016. <http://bio.biologists.org/content/bioloopen/early/2016/06/15/bio.018812.full.pdf>.
Revisado el 13-07-2016.
8. Granero R y Jarpa P. Uso de chimó entre adolescentes en Venezuela. Encuesta mundial sobre tabaquismo en jóvenes 1999-2008. *Acta Odontológica Venezolana* 2011; 49(3)1-9.
9. Tucker B and Lardelli M. A Rapid Apoptosis Assay Measuring Relative Acridine Orange Fluorescence in Zebrafish Embryos. *Zebrafish* 2007; 4(2): 113-6.
10. Burtis C, Ashwood E y Bruns D. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4ta. ed. USA: Elsevier Saunders. 2006. p. 2448.
11. Bush L, Cui M, Shi H, Burton H, Fannin F, Lei L y col. Formation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured tobacco. *Recent Adv Tob Sci* 2001; 27:23-46.
12. Jarpa P. Medición del pH de 12 preparaciones distintas de pasta de Tabaco de mascar, relacionándolas con la adicción a la nicotina. *Revista de la Facultad de Farmacia.* 2003; 45(2):7-11.

- 13.** Álvarez M, Perdomo L y Hernández C. Fruta planta 'Meizitac' como factor de riesgo cardíaco: una aproximación experimental en larvas de pez cebra Danio rerio. Retel 2014; 1-16.
- 14.** Bagchi M, Balmoori J, Bagchi D, Ray S, Kuszynski C y Stohs S. Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes. Free Radic Biol Med 1999; 26(7-8):992-1000.

Recibido: 15/07/16

Aceptado: 18/07/16