

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Efecto cardiotoxico de la Fracción de Hexano de las hojas de higuera en el modelo larvario del pez cebra, *Danio rerio*

Sonia Alvarado-Rico^{1*}, Milagro León¹, Marco Álvarez², Dilsia J. Canelón³, Lourdes Perdomo² y Manuel Meléndez⁴

1 Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela

2 Sección de Microscopía Electrónica, Instituto Anatómico "José Izquierdo", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

3 Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

4 Pregrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central, Maracay, Venezuela.

*e-mail: alvaradorico8@gmail.com (S. Alvarado-Rico)

Resumen

La planta de higuera *Ficus carica*, es un árbol frutal de la familia de las Moráceas, utilizada en Venezuela como medicina natural para mejorar el trabajo de parto. Sin embargo, la mayoría de las pacientes que así la consumen, han reportado adelanto de la fecha de parto y nacimiento de niños con signos de depresión neonatal, sin que hasta el momento se conozca el posible compromiso cardiovascular vinculado con dicho signo. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto cardiotóxico de una Fracción de Hexano (FH), de la hoja de higuera en el modelo larvario del pez cebra, *Danio rerio*. Dicha fracción fue obtenida siguiendo la técnica de extracción y fraccionamiento a presión reducida. El efecto cardiotóxico fue evaluado *in vivo*, a través de bioensayos de la Concentración Tóxica Subletal (CTSL), de 2,83 mg/mL, sobre larvas de 72 horas de post-fertilización (hpf). Los parámetros de Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP) e Índice atrio/ventricular (A/V) fueron registrados a la 1 y 3 horas, mediante un cardiograma. (CVG). El área cardíaca fue analizada histológicamente. Los valores de FCP, en la población larvaria tratada durante una hora, mostraron una disminución significativa ($P < 0,05$) con relación a los controles, mientras que a las 3 horas de incubación, este grupo de larvas mostró una tendencia a alcanzar la normalidad. El índice A/V de las larvas tratadas no mostró variaciones significativas en la primera hora de incubación, transcurridas las 3 horas de incubación, se observó una ligera disminución de 5% del índice A/V. La histología del área cardíaca mostró distensión de las paredes del músculo cardíaco y edema moderado en el espacio pericárdico. Los resultados ponen en evidencia el compromiso cardiovascular promovido por la FH obtenida de las hojas de *Ficus carica*; un compromiso dependiente del tiempo de exposición y muy probablemente asociado a una actividad arritmogénica de la FH.

Palabras clave: *Planta de higuera, fracción de hexano, larva de pez cebra.*

Abstract

Cardiotoxic effect of the Hexane Fraction of fig leaves in the Zebrafish (*Danio rerio*) larval model

The fig tree plant (*Ficus carica*) is a fruit belonging to the *Moraceae* family, which has been used in Venezuela as a natural medicine to improve labor. It is noteworthy that most of the patients who consume it have reported advancement of the delivery date and the birth of babies with signs of neonatal depression; nevertheless, the possible cardiovascular implication associated with this sign has not yet been known. The purpose of this investigation was to evaluate the cardiotoxic effect of a hexane fraction (HF) of the fig leaf on the zebrafish (*Danio rerio*) larval model. The HF was obtained following the extraction and fractionation technique under reduced pressure. The cardiotoxic effect was evaluated *in vivo* on larvae of 72 hours post-fertilization (hpf), through bioassays with a sublethal toxic concentration, equivalent to 2.83 mg/mL. The parameters mean heart rate (MHR) and atrioventricular (A/V) index were recorded at 1 and 3 hours, by means of a cardiogram. The cardiac area was subjected to histological analysis. When compared to controls, the MHR values in the larval population treated for one hour showed a significant decrease ($P \leq 0.05$), whereas at 3 hours of incubation, this group of larvae showed a tendency to attain normalcy. The A/V index of the treated larvae did not show significant variations in the first hour of incubation. After 3 hours of incubation, a slight decrease of 5% in the A/V index was observed. The histology of the cardiac area showed distension of the walls of the cardiac muscle and moderate edema in the pericardial space. The results of this investigation evidence the cardiovascular involvement promoted by the HF obtained from *Ficus carica* leaves, which is time-dependent and most likely associated with an arrhythmogenic activity of the HF.

Key words: fig tree plant, hexane fraction, zebrafish larvae.

Introducción

La planta de higo o higuera, *Ficus carica*, es un árbol frutal de la familia de las Moráceas, con amplia distribución en Asia Occidental y en la región del Mediterráneo Figura1. En los países en vías de desarrollo, esta planta es de uso común, considerado en el saber popular como una fuente importante de alimento y salud¹; es conocido que el fruto es un alimento altamente energético y tanto las hojas como las raíces de la planta han sido utilizadas en la medicina tradicional para mejorar diversas patologías². Investigaciones farmacológicas han demostrado que la planta exhibe, actividad hipertriglicéridémica de la decocción de sus hojas³ e hipoglicémica⁴, así como también se ha estudiado la actividad antiespasmódica y antiplaquetaria⁵; además, se describe una acción anticancerígena vinculada a diez estructuras terpenoides presentes en el látex del *Ficus carica*⁶. En Venezuela, se ha reportado el uso de la hoja de higuera como potencial producto farmacológico con propiedades beneficiosas para mejorar el trabajo de parto². Se ha vinculado su uso como inductor del aborto, en un estudio en el que se realizó una encuesta etnobotánica de plantas medicinales comercializadas en los mercados de La Paz y El Alto, Bolivia.⁷ En tal sentido, se hace referencia a la automedicación con infusiones de hojas de higuera en una población de mujeres embarazadas del Hospital Central de Maracay, con el propósito de mejorar las labores de parto. Como consecuencia, las pacientes dieron muestras de adelanto de la fecha de parto y además, el aumento de la frecuencia y de la fuerza de contracción uterina así como también el tiempo de duración de la misma. En el caso de los recién nacidos, éstos presentaron signos de depresión neonatal⁸. Experimentalmente, ha sido posible evidenciar tales signos en ratas gestantes tratadas con una infusión de hojas de higuera administrada *ad libitum*, las mismas mostraron adelanto de la fecha de parto y sus crías presentaron signos de depresión neonatal y muerte tres días posteriores al parto⁹. Resulta evidente que tanto a nivel clínico como experimental, el consumo indiscriminado de infusiones de las hojas de higuera pudiera producir riesgos tanto para la madre como para el neonato; particularmente, en la depresión de los neonatos en los hijos de las gestantes quienes reportaron haber ingerido esta infusión, pudiese estar involucrado un compromiso cardiovascular, con una probable generación de alteraciones de tejidos y células cardíacas. En vista de, que los efectos tóxicos ocasionados por la planta se orientan hacia una posible acción en el área cardíaca, la presente investigación se centró en evaluar el efecto cardiotóxico relacionado con la fracción de hexano de la hoja de higuera en el modelo experimental larvario del pez cebra, *Danio rerio*.

Materiales y métodos

Obtención y recolección del material vegetal, hojas de *Ficus carica*

La presente investigación se realizó en el Centro de Bioquímica Nutricional, Cátedra de Bioquímica del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Anatómico "José Izquierdo", Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. El material vegetal utilizado para la realización de esta investigación fue adquirido en el Mercado Principal de Maracay, estado Aragua, Venezuela, en Noviembre de 2009. Una muestra de la colección fue identificada por el Profesor Luis Hernández Cheng, Curador Herbario, con el número de certificación MY. N°035-HB/2009, en el Instituto de Botánica Agrícola, Herbario "Víctor M. Badillo" de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, para la identificación y autenticación de la misma.

Fraccionamiento de las hojas de la planta de higo

Las fracciones fueron obtenidas siguiendo la técnica de extracción y fraccionamiento a presión reducida¹⁰, modificada para esta investigación. Para ello, fueron utilizados 100 g de hojas secas de la planta de higo, desprovistas de tallos pequeños y partes gruesas. Las mismas, fueron troceadas manualmente y maceradas en 800 mL de metanol por 20 días. Luego de la filtración del macerado, el mismo fue concentrado a presión reducida a con un rotavapor Buchi RE121 y con un baño de agua Buchi a 30°C. El extracto metanólico obtenido fue redissuelto en 200 mL de una mezcla agua-metanol 1:1, la solución hidrometanólica resultante se sometió a tres particiones sucesivas con iguales volúmenes con solventes en orden creciente de polaridad, primero hexano y posteriormente cloroformo. Cada una de estas fracciones fue tratada con MgSO₄ anhidro, filtradas y concentradas al vacío hasta sequedad. La fracción acuosa residual derivada fue liofilizada Figura 2.

Evaluación del efecto cardiotoxico de la fracción de hexano (FH) de la hoja de higuera

A fin de evaluar el efecto cardiotoxico de la FH de la hoja de higuera en el modelo experimental larvario de pez cebra, *Danio rerio* se realizaron bioensayos para describir el efecto tóxico subletal de la mencionada fracción en el área cardiaca de larvas de 72 horas de postfertilización (hpf) *in vivo* mediante cardiograma (CVG). Para ello, fueron incubadas las larvas a una concentración tóxica subletal (CTSL), la cual se situó en el rango de concentraciones inferiores a la CL₅₀ (3horas) de 3,90 +/- 1,08 mg/mL, determinada previamente con base a las investigaciones iniciales realizadas con extractos de plantas medicinales y en estudios preliminares realizados con una infusión de hojas de

Ficus carica, en el que se reportó el uso de una concentración de 2 mg/mL¹¹. La CTSL permitió observar efectos tóxicos visibles y cuantificables sin la presencia de mortalidad en la población larvaria^{12,13}. Se utilizó una concentración de 2,83 mg/mL como CTSL con un tiempo de incubación de 1 y 3 horas. Se incubaron por triplicado nueve larvas, se distribuyeron en 4 pozos en los ejes horizontales de una placa de 24, cada pozo contenía un volumen final de 1000 µL de agua de pecera con la correspondiente CTSL de la FH. Este bioensayo contó con los controles negativos respectivos y controles positivos utilizando una concentración de 2 mg/mL de sulfato de epinefrina Figura 3. Todos los bioensayos se realizaron en condiciones de laboratorio, con iluminación artificial, de 21-24°C de temperatura¹⁴. Durante el período de incubación, las placas se cubrieron con papel secante para proteger las larvas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, 1 hora y 3 horas, la observación y registro de los eventos del músculo cardíaco, se llevó a cabo de la siguiente manera: se colocó cada larva en un portaobjetos y se inmovilizó con una solución de agar al 2%¹⁵. El área cardíaca se ubicó en el campo de observación y se obtuvieron cardiogramas (CVG) de las imágenes captadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX71 con una cámara digital DP71, el cual registró los eventos mecánicos del corazón de la larva del pez cebrá de 72 hpf, en un período de 60 segundos. Se evaluaron los siguientes parámetros:

Frecuencia cardíaca promedio (FCP). Una vez inmovilizada la larva y enfocado el corazón bajo el microscopio Olympus, a 10x, se realizaron grabaciones de videos durante 60 segundos de cada larva. Posteriormente, se realizó un conteo manual con un contador de 04 dígitos, Thermo Scientific contando el número de latidos por minuto (L/min)¹⁶.

Índice atrio/ventricular (A/V). Se define como la relación entre la tasa de latidos del atrio y del ventrículo en 60 segundos. Para lo cual se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito. Se capturaron las imágenes del área cardíaca bajo el microscopio Olympus a 40x. Los latidos tanto del atrio como del ventrículo fueron contados con un contador manual de 04 dígitos Thermo Scientific por 60 segundos¹⁶. Seguidamente, se obtuvo la relación atrio/ventricular (A/V); Este procedimiento se realizó igualmente para el grupo control. Luego de la realización de los registros, las larvas, tanto tratadas como del grupo control fueron sometidas a eutanasia, colocándolas en cápsulas de Petri con agua de acuario a temperaturas de 0 a 3 °C por 5 minutos¹⁷. Todos los procedimientos fueron realizados tomando en cuenta las normas éticas que rigen el empleo de animales de investigación¹⁸. Posteriormente, las larvas fueron fijadas en formol bufferado al 10% (v/v), para su procesamiento histológico, se realizaron cortes seriados hasta obtener un campo satisfactorio para la visualización del área cardíaca. Los cortes fueron teñidos con

la tinción de Hematoxilina & Eosina para la observación histológica de las posibles modificaciones o alteraciones morfoestructurales del tejido cardíaco².

Resultados

Del fraccionamiento de la hoja de higuera se obtuvieron tres fracciones: fracción de hexano (FH), aquí se concentran los compuestos de naturaleza no polar o insolubles en agua, fracción de cloroformo (FC), en la que se agrupan los compuestos no polares y medianamente polares y la fracción acuosa (FA) en la que se encuentran los compuestos polares. El promedio de los valores de frecuencia cardíaca en la población larvaria incubadas con la CTSL de FH durante una hora, mostró una disminución significativa ($P < 0,05$) con relación a ambos controles, mientras que a las 3 horas de incubación, el grupo de larvas tratadas mostró una tendencia a alcanzar la normalidad Figura 4. Con respecto al índice A/V de las larvas tratadas con la CTSL de FH no mostró variaciones significativas en la primera hora de incubación, transcurridas las 3 horas de incubación, se observó una ligera disminución de 5% con relación al índice A/V del grupo control. La histología del músculo cardíaco de las larvas incubadas con la CTSL de FH, mostró dilatación cardíaca manifiesta a través de la distensión de las paredes del músculo cardíaco, además se observó cambio en la arquitectura del músculo cardíaco y edema moderado en el espacio pericárdico Figura 5.

Discusión

Las fracciones de hexano y cloroformo contienen sustancias activas de naturaleza no polar, donde fueron identificados y cuantificados por CG/MS, con la librería: C/Database/NIST5aL los compuestos cumarínicos: angelicina y bergapteno, en un estudio en el que se evaluó la acción cardiotóxica de los extractos orgánicos de la hoja de *Ficus carica* en el modelo experimental larvario de pez cebra *Danio rerio*².

Otros investigadores han reportado a los compuestos cumarínicos como fotoactivos, presentes en cantidades apreciables en la hoja y el retoño o brote y no detectables en el fruto y la savia de la planta de higo¹⁹. Lo anteriormente expuesto permite interpretar que las variaciones de frecuencia cardíaca y ritmo cardíaco registrados para la FH podrían estar vinculadas con la diversidad de compuestos con propiedades cardioactivas, seleccionados estos, en función de los procesos de extracción. Estos resultados coinciden con la reducción de la frecuencia cardíaca promedio en un 24% en una investigación en la que se evaluó la acción de la infusión de *Ficus carica* (20 μ L/larva de una solución de 30 g de hojas en 250 mL de agua) en el modelo larvario, bajo irradiación con una fuente de diodo emisor de luz roja¹¹. Durante los procesos de extracción y fraccionamiento, se agruparon en la FH compuestos no polares y medianamente polares, lo cual permitió

establecer en este trabajo de investigación, que el mismo pudiera estar constituido por sustancias con ciertas propiedades arritmogénicas. En este mismo orden de ideas, la cardioactividad de esta fracción, estaría modulada tanto por la concentración como por el tiempo de exposición. La validación de la actividad cardiotoxica adjudicada a la FH fue corroborada con las variaciones de los parámetros registrados con la utilización de compuestos de cardioactividad verificada como el sulfato de epinefrina, el cual ya a la primera hora de tratamiento demostró una acción cardiotónica positiva. La histología del músculo cardiaco mostró dilatación y cambio en la arquitectura del músculo cardíaco, resultados estos, comparables por lo reportado con relación a la CL₅₀ 2 mg/mL de las cumarinas las cuales producen cardiotoxicidad y hepatotoxicidad en embriones de pez cebra expuestos a estos compuestos desde la etapa de blastocisto²⁰. Igualmente, en otros estudios realizados pero en ratas Sprague-Dawley sometidas al consumo *per os*, de una infusión de hojas de higuera, resultó en una moderada congestión en todas las zonas del parénquima, hepático, colapso de los sinusoides e hiperplasia celular²¹ y en melanóforos, en el mismo modelo de pez cebra, ha sido reportado alteración en la citoarquitectura de estas células, como efecto de la infusión de la planta de higo y sometidos adicionalmente a irradiación con una fuente de diodo emisor de luz roja¹¹.

Al analizar y relacionar los resultados de los parámetros de funcionalidad cardíaca, tales como frecuencia cardíaca y ritmo cardiaco con los resultados de la morfología cardíaca de las larvas de pez cebra incubadas con las CTSL de FH, se observó que en estos hubo mayores variaciones en cuanto a la funcionalidad y consecuentemente mostraron alteraciones evidentes sobre los tejidos, lo que sugiere que en esta fracción se encuentren evidentemente compuestos con actividad cardíaca. En este contexto, los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la hoja de *Ficus carica* posee compuestos con posibles propiedades arritmogénicas. Estos resultados aportan aproximaciones sobre la probable influencia del consumo indiscriminado de las infusiones de *Ficus carica*, utilizadas para mejorar el trabajo de parto, podría estar vinculado en la depresión neonatal con el compromiso cardiovascular, por alteración morfofuncional de las células y tejidos cardiacos. En cuanto a la producción de los efectos cardiotoxicos en las larvas de 72 hpf, de la FH por el método de extracción y fraccionamiento a partir de la hoja de *Ficus carica*, permitieron confirmar que la larva del pez cebra como modelo biológico resultó un modelo ideal para tal evaluación. Lo cual coincide con otros autores, quienes lo han descrito como un excelente modelo, por presentar un amplio número de ventajas experimentales que han permitido evaluar productos organotóxicos²². Este modelo biológico, dentro del marco de esta investigación demostró una clara respuesta al ser desafiado con la FH obtenida a partir de la hoja de la planta de higo y particularmente sobre tejido cardiaco ya que ha sido demostrado ser un importante indicador de toxicidad de fármacos, al producir efectos fácilmente observables, como lo

son, la alteración en la frecuencia cardíaca, el ritmo cardíaco, la morfología cardíaca, entre otros, cuyos resultados aportan información rápida, reproducible y cuantificable¹¹.

Figura 1. Planta de higo o higuera, *Ficus carica*



Figura 2. Fraccionamiento de la hoja de la planta de higo

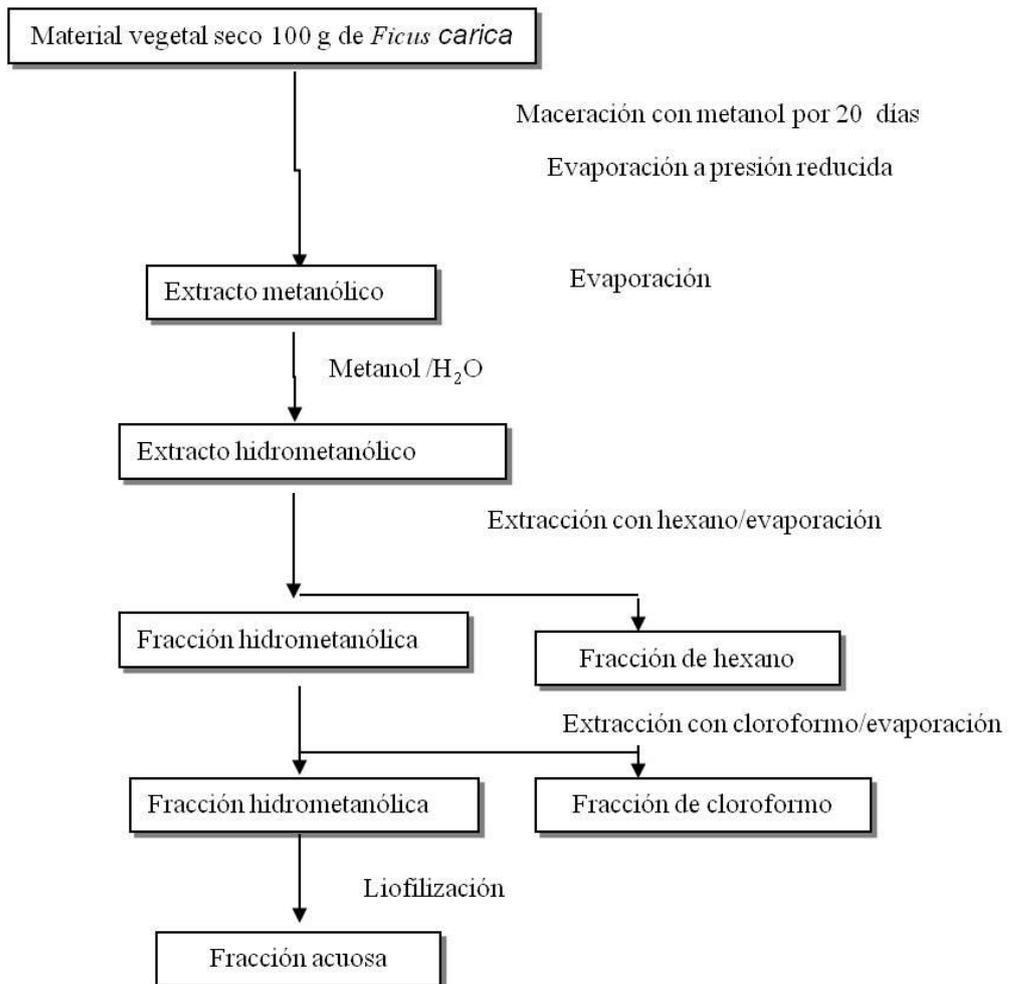


Figura 3. Esquema de la placa de 24 pozos, en la cual se disponen de seis a diez larvas por pozo, las concentraciones de cada uno de los tratamientos se disponen en el eje horizontal lo cual conformará una unidad experimental

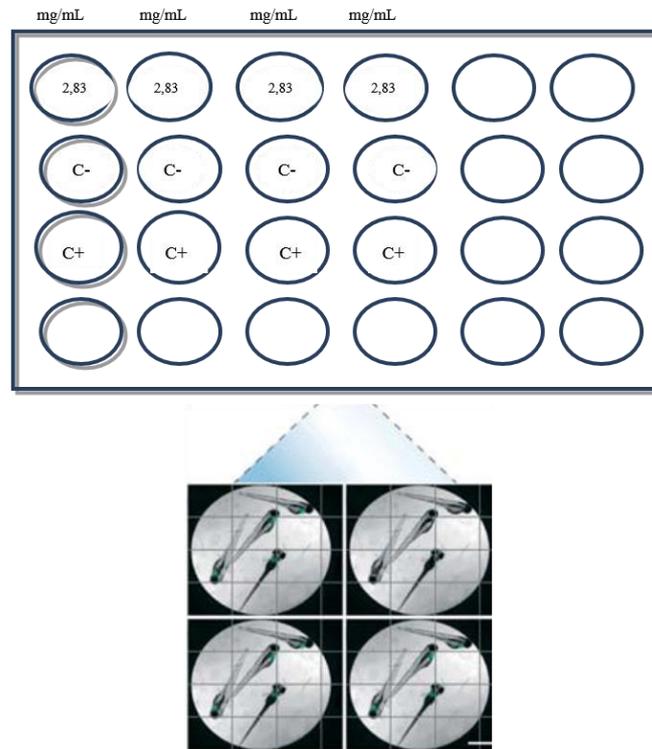
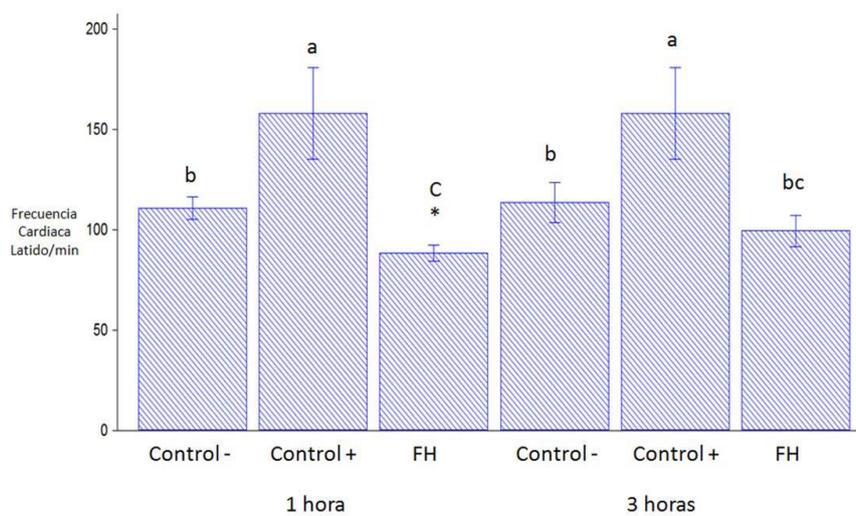
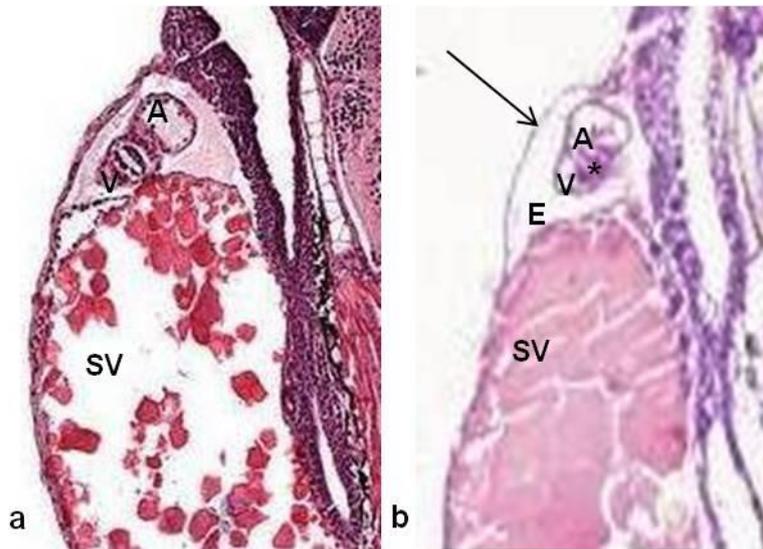


Figura 4. Frecuencia cardiaca promedio de las larvas de pez cebra incubadas con la CTSL de la FH durante 1 y 3 horas.



Control -: Agua de pecera
Control +: Sulfato de Epinefrina
FH: Fracción Hexanólica

Figura 5. Larva de pez cebra de 72 hpf, Control negativo (a), larva de pez cebra de 72 hpf incubada con la CTSL de FH (b), flecha: área cardíaca, SV: saco vitelino, A atrio, V: ventrículo, E: edema, * distensión de las paredes del músculo cardíaco.



Referencias bibliográficas

1. Barolo M, Ruiz Mostacero N, López S. *Ficus carica* L. (Moraceae): An ancient source of food and health. *Food Chem* 2014; 164: 119-127.
2. Alvarado-Rico S. Efectos cardiacos de extractos orgánicos de la hoja de la planta de higo (*Ficus carica*) en el embrión de pez cebra *Danio rerio*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela 2016; 85 p.
3. Pérez C, Canal JR, Campillo J, Romero A, Torres MD. Hypotriglyceridaemic activity of *Ficus carica* leaves in experimental hypertriglyceridaemic rats. *Phytotherapy Res* 1999; 13(3): 188-191.
4. Canal JR, Torres MD, Romero A, Pérez C. A chloroform extract obtained from decoction of *Ficus carica* leaves improves the cholesterolaemic status of rats with streptozotocin- induced diabetes. *Acta Physiol Hung* 2000; 87(1):71-76.
5. Gilani A-H, Mehmood MH, Janbaz KH, Khan A-U, Saeed SA. Ethnopharmacological studies on antispasmodic and antiplatelet activities of *Ficus carica*. *J Ethnopharmacol* 2008; 119 (1):1-5.
6. Rubnov S, Kashman Y, Rabinowitz R, Schlesinger M, Mechoulam R. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. *J Nat Products* 2001; 64 (7): 993-996.
7. Macía MJ, García E, Vidaurre PJ. An ethnobotanical survey of medicinal plants comercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *J. Ethnopharmacol* 2005; 97(2): 337-350.
8. Olivares A. Consumo de infusión de hoja de *Ficus carica* (Planta de higo) y sus implicaciones en el parto y neonatos de gestantes asistidas en la emergencia obstétrica del Hospital Central de Maracay, agosto-diciembre 2011. Tesis de Maestría Postgrado en Ginecología y Obstetricia. Facultad de Ciencias de la Salud. Dirección de Educación Avanzada. Sede Aragua, Universidad de Carabobo, Maracay, Aragua, Venezuela 2012; 58p.
9. Castro L, Alvarado-Rico S, Álvarez M. Efectos de la infusión de hojas de higuera (*Ficus carica*) sobre la depresión neonatal en ratas. *Vitae. Academia Biomédica digital*. Facultad de Medicina – Universidad Central de Venezuela 2011; 46: 1-5.
10. Canelón DJ, Suárez AI, Compagnone RS, Trejo E. Actividad antialimentaria de *Senefelderopsis chiribiquetensis* sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Ciencia* 2009; 17(3): 197-204.
11. Álvarez M, Alvarado-Rico S, Ercolino J, Perdomo L. La infusión de hojas de higo (*Ficus carica*) y su acción sobre melanóforos de pez cebra (*Danio rerio*) bajo irradiación y monitoreo "in vivo". *Retel* 2011; 37:1-13.

12. López, M. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del cloro en el efluente de una industria tipo mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando *Daphnia pulex*. Tesis de Grado. Programa de Ingeniería ambiental y Sanitaria, Universidad de la Salle, Bogotá D.C., Colombia 2009; 231p.
13. Teixidó E, Piqué E, Boix N, Llobet JM, Gómez- Catalán J. Zebrafish as a model for developmental toxicity assessment. En: Muñoz-Torrero D, Vinardell MP, Palazón J, editores. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences V. Kerala, India: Res Signpost, 2015: 65-83 .
14. D'Amico L, Seng WL, Yang Y, Suter W. Assessment of Drug-Induced Cardiotoxicity in Zebrafish. En: McGrath P, editor. Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012; 45-54.
15. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullman B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the Zebrafish. Dev Dyn 1995; 203(3):253-310.
16. Steele SL, Yang X, Debais-Thibaud M, Schwerte T, Pelster B, Ekker M, Tiberi M, Perry SF. In vivo and in vitro assessment of cardiac β -adrenergic receptors in larval zebrafish (*Danio rerio*). J Exp Biol 2011; 214: 1445-1457.
17. Wilson JM, Bunte R, Carty A. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of Euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). J Am Assoc Lab Anim Sci 2009; 48 (6): 785-789.
18. Asociación Venezolana para la Ciencia de los Animales de Laboratorio. Manual para la producción y uso ético de los animales de laboratorio. Caracas: Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología, 2008. p. 93.
19. Zaynoun ST, Aftimos BG, Abi Ali L, Tenekjian KK, Khalide U, Kurban AK. *Ficus carica*; isolation and quantification of the photoactive components. Contact Dermatitis 1984; 11(1):21-25.
20. Mc Grath, P. Use of emerging models for developmental toxicity testing. En: McGrath P, editor. Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012; 27 - 44.
21. Alvarado-Rico S, Castro L. Histología del hígado de ratas tratadas con una Infusión de hojas de higuera (*Ficus carica*). Reporte de caso. Rev. Fac.Cs. Vets UCV 2010; 51 (2):99-103.
22. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol Sci 2005; 86 (1): 6-19

Recibido: 05/10/17

Aceptado: 12/10/17