

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
ANTIPROLIFERATIVA DE LA FRACCIÓN DE *Zanthoxylum rigidum* EN EL PEZ
CEBRA**

ÁNGELA PATRICIA VARGAS-OROZCO

Directora:

Marleny Salazar Salazar

PhD. Ciencias Biológicas

Codirectores:

Enrique Salas-Vidal

PhD Investigación Biomédica Básica

Andrés Mauricio Rojas-Sepúlveda

PhD Ciencias

Asesor estadístico:

Hernando Hurtado

Msc en Biomatemáticas

Universidad del Quindío

Facultad de Ciencias de la Educación

Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental

Armenia, Quindío

2019

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
ANTIPROLIFERATIVA DE LA FRACCIÓN DE *Zanthoxylum rigidum* EN EL PEZ
CEBRA**

Autora:

Ángela Patricia Vargas-Orozco

Trabajo de grado dirigido por:

Marleny Salazar Salazar

Docente del programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental

Doctora en Ciencias Biológicas

Presentado como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología y
Educación Ambiental

Universidad del Quindío

Facultad de Ciencias de la Educación

Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental

Armenia, Quindío

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Armenia, Quindío, agosto del 2019

Agradecimientos

Este trabajo es fruto de la colaboración y apoyo de muchas personas, motivo por el cual quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Al Dr. Enrique Salas-Vidal, la Dra. Denhi Schnabel Peraza y la Dra. Hilda María Lomelí Buyoli por su amabilidad, enseñanzas y disponibilidad durante mi estancia en México.

A los estudiantes de maestría en Ciencias Bioquímicas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma México por la empatía y afecto con el que me acogieron.

Al magíster Javier Méndez Cruz por su inmensa colaboración y acompañamiento durante el desarrollo experimental de este trabajo.

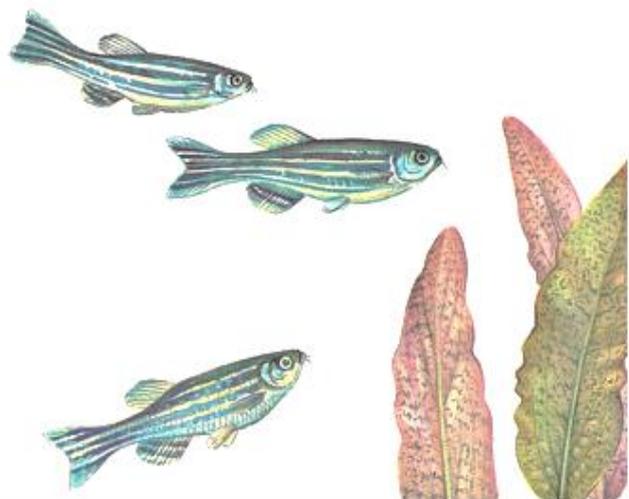
Al señor rector José Fernando Echeverry Murillo, al anterior decano Angelmiro Galindo Martínez, a la Unidad de Relaciones Internacionales e Interinstitucionales y la Vicerrectoría de Extensión por apoyar e impulsar la realización de mi estancia en el exterior.

Al Programa de Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental, especialmente a la directora Ángela María Garzón y los miembros del Consejo Curricular por aprobar y apoyar una experiencia tan importante para mi formación profesional.

Al magíster Álvaro Botero-Botero por su generosa contribución con la elaboración del mapa de la reserva natural “La montaña del ocaso”.

A cada uno de los integrantes del grupo de investigación BIEDUQ, por compartir conmigo los ires y venires ser compañeros de laboratorio y amigos del alma.

Por su tiempo y dedicación ¡Muchas gracias!



Dedicatorias

A mis padres y hermano: por enseñarme a luchar y alcanzar mis sueños.

A la Dra. Marleny Salazar: por su valioso acompañamiento como directora, docente y amiga.

A cada uno de mis profesores de la escuela y la universidad: por formarme en conocimientos y experiencias que llevaré conmigo a la vida profesional.

A mis compañeros y amigos: por su inmenso cariño y permitirme aprender de la vida a su lado.

Todo mi amor y respeto para ustedes.

Tabla de contenido

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS	10
LISTA DE ANEXOS	11
GLOSARIO	12
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
MARCO TEÓRICO	16
<i>Medicina tradicional herbaria</i>	16
<i>Género Zanthoxylum</i>	16
<i>Generalidades sobre la respuesta inflamatoria</i>	20
<i>Generalidades sobre la proliferación celular</i>	21
<i>Descripción del modelo biológico</i>	23
ANTECEDENTES	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVOS	28
<i>Objetivo general</i>	28
<i>Objetivos específicos</i>	28
METODOLOGÍA	28
<i>Colecta del material vegetal</i>	28
<i>Obtención de la fracción</i>	29
<i>Mantenimiento de peces adultos</i>	30
<i>Ensayo de toxicidad en el desarrollo</i>	32
<i>Inmunofluorescencia para la detección de leucocitos</i>	33
<i>Inmunolocalización de la histona H3 fosforilada</i>	35
<i>Análisis estadístico</i>	37
RESULTADOS	38
<i>Toxicidad en el desarrollo</i>	38
<i>Detección de neutrófilos mediante inmunofluorescencia</i>	39
<i>Inmunolocalización de la histona H3 fosforilada</i>	43
DISCUSIÓN	45
<i>Respecto a la seguridad de la fracción</i>	45
<i>Ensayo de la actividad antiinflamatoria</i>	46

<i>Actividad antiproliferativa</i>	47
<i>El pez cebra como modelo para bioensayos</i>	49
CONCLUSIONES	50
OBSERVACIONES FINALES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	59

Lista de figuras

- Figura 1.** Características generales de las especies pertenecientes al género *Zanthoxylum*. A. Árboles u arbustos. B. Hojas. C. Frutos. D. Inflorescencias. Tomada de Prieto (2012). ____ 17
- Figura 2.** Ubicación geográfica del punto de colecta en la reserva natural “La montaña del ocaso” en Quimbaya, Quindío. Elaborado por: Álvaro Botero-Botero _____ 29
- Figura 3.** Extracto y fracciones de *Z. rigidum*. En rojo se encuentra enmarcada la fracción de acetato de etilo obtenida a partir de las hojas. Tomada por: Andrés M. Rojas-Sepúlveda. __ 30
- Figura 4.** Método de reproducción para la obtención de embriones. A. Montaje para la separación de peces: los machos se ubican en la pecera pequeña y las hembras en el espacio restante al interior de la pecera grande y por encima de la malla. B. Hembras y machos juntos en proceso de apareamiento. _____ 32
- Figura 5.** Representación esquemática del ensayo de toxicidad en el desarrollo. Se visualiza una caja de cultivo con 24 pozos cada uno con 5 embriones en etapa de primordio de la cola para dos tratamientos. En gris se encuentran los embriones expuestos a DMSO 1% y en azul los embriones tratados con *Z. rigidum*. _____ 33
- Figura 6.** Representación esquemática del ensayo de inmunofluorescencia para la detección de leucocitos. Se visualiza una larva transgénica Mpx: GFP a 3 días pos fecundación con leucocitos representados en color verde y la región de la aleta caudal. También se observa una caja de cultivo con los tres tratamientos evaluados: DMSO 1%, *Zanthoxylum rigidum* y DPI 1%. _____ 34
- Figura 7.** Técnica de corte de la aleta caudal. Se visualizan larvas de pez cebra de la línea Mpx: GFP a 3dpf sometidas a corte de la aleta caudal para el modelo de migración de leucocitos. La línea roja marca el lugar de incisión en la cola y la región enmarcada en negro representa la región de inflamación. _____ 35
- Figura 8.** Representación esquemática del ensayo de inmunofluorescencia para la detección de la histona H3 fosforilada. Se visualizan larvas de la línea wild type a 3 dpf y la técnica de detección de la histona PH3 mediante la adición del anticuerpo primario y secundario. ____ 36
- Figura 9.** Análisis de las imágenes con el software ImageJ. A. Cuantificación del número de leucocitos en la región altamente inflamada de larvas con 3dpf. B. Cuantificación de los núcleos positivos para la histona H3 fosforilada en larvas de 3dpf. _____ 37
- Figura 10.** Efecto de dos tratamientos en el fenotipo de larvas a 3dpf de pez cebra. Se visualizan larvas del grupo control DMSO 1% y del tratamiento con *Z. rigidum* a 25,5 µg/mL con ausencia de alteraciones morfológicas. _____ 39

Figura 11. Migración de leucocitos GFP en respuesta a una lesión aguda en larvas transgénicas de pez cebra a 3dpf. Los leucocitos migrantes a las regiones altamente inflamadas (dentro de los recuadros blancos) se visualizan de color verde fluorescente. Tanto en el tratamiento con DMSO como en el de <i>Z. rigidum</i> se observa una alta migración leucocitaria, mientras que en el tratamiento con DPI se evidencia una notable disminución.	40
Figura 12. Número medio de neutrófilos que migraron a la zona de lesión por cada tratamiento.	41
Figura 13. Número de neutrófilos en el sitio de lesión para los tres tratamientos.	41
Figura 14. Medida de las unidades relativas de intensidad de los leucocitos por tratamientos.	42
Figura 15. Análisis de la proliferación celular en larvas con 3dpf en tratamientos con DMSO 1% y <i>Z. rigidum</i> . Los núcleos positivos para el marcador de PH3 se visualizan de color verde fluorescente. Se puede observar que el tratamiento con DMSO presenta un mayor número de señales positivas en contraste con el tratamiento de <i>Z. rigidum</i> .	43
Figura 16. Número medio de núcleos positivos para la histona H3 fosforilada por tratamiento.	44
Figura 17. Número de células fluorescentes positivas para la histona H3 fosforilada en los dos tratamientos. Se visualizan diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en ambos tratamientos.	45

Lista de tablas

Tabla 1. Principales usos de algunas especies del género <i>Zanthoxylum</i> _____	18
Tabla 2. Análisis de varianza para el número de leucocitos por los tres tratamientos evaluados. _____	42
Tabla 3. Prueba de Kruskal-Wallis de leucocitos por tratamientos. _____	42
Tabla 4. Análisis de varianza para el número de núcleos mitóticos por tratamiento. _____	44
Tabla 5. Análisis de varianza entre grupos y dentro de grupos. _____	45

Lista de anexos

Anexo 1. Ficha de ingreso de <i>Zanthoxylum rigidum</i> al Herbario de la Universidad del Quindío	59
Anexo 2. Aval ético y bioético de la Universidad del Quindío.	60
Anexo 3. Protocolo de preparación de la tricaina.	61
Anexo 4. Protocolo de preparación de la solución stock de Hank's.	61
Anexo 5. Protocolo de preparación de paraformaldehído (PFA) 4%.	62

Glosario

- **Antiinflamatorio:** medicamento que reduce o combate los síntomas y los signos de la inflamación.
- **Antiproliferativo:** sustancia que impide la reproducción celular.
- **Blenorragia:** enfermedad infecciosa de transmisión sexual que se caracteriza por la inflamación de las vías urinarias y los genitales.
- **CDKI:** es una proteína que inhibe la quinasa dependiente de ciclina que funciona como supresora de tumores.
- **Disentería:** enfermedad infecciosa que se caracteriza por la inflamación y ulceración del intestino grueso.
- **Dispepsia:** malestar en la parte superior del abdomen.
- **Diurético:** sustancia que al ser ingerida provoca una eliminación de agua y electrolitos del organismo, a través de la orina únicamente.
- **DMSO:** dimetilsulfóxido usado como disolvente orgánico industrial.
- **Dpf:** días pos fecundación.
- **Dpt:** días pos tratamiento.
- **Enteritis:** inflamación del intestino, especialmente del delgado.
- **Estomatitis:** inflamación de la mucosa bucal.
- **Etnomedicina:** rama médica de la antropología que estudia la medicina tradicional.
- **Febrífugos:** sustancia, medicamento que sirve para reducir la fiebre.
- **Fitoquímica:** parte de la bioquímica que se ocupa de los procesos químicos de las plantas.
- **Fosforilación:** es la adición de un grupo fosfato a cualquier otra molécula.
- **GFP:** siglas en inglés de green fluorescent protein (proteína verde fluorescente).
- **Hemorroides:** venas hinchadas y también inflamadas en el recto y el ano que provocan incomodidad y sangrado.
- **Hpf:** horas pos fecundación.
- **Hpt:** horas pos tratamiento.
- **IgG:** la inmunoglobulina G es una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo.
- **Metabolito secundario:** compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo.
- **Piscicidas:** agente utilizado para el control de peces no deseados.

- **RB:** es la proteína del retinoblastoma, una proteína supresora de tumores que se encuentra alterada en muchos tipos de cáncer.
- **Reumatismo:** enfermedades que se caracterizan por provocar inflamación, degeneración o alteraciones de los tejidos que forman los músculos y los tendones.
- **Uretritis:** inflamación de la uretra, generalmente debida a una infección por microorganismos.
- **Vermífugos:** adj. Med. Que tiene virtud para matar las lombrices intestinales.

Resumen

Zanthoxylum rigidum es una planta conocida popularmente en la región amazónica como “hualaja” y pertenece al género *Zanthoxylum*, el cual ha sido muy importante en el tratamiento de enfermedades como la inflamación y el cáncer. Actualmente existe poca información sobre esta especie, sin embargo algunos estudios fitoquímicos sugieren su posible actividad antiinflamatoria y antiproliferativa. Por este motivo, se evaluó la actividad antiinflamatoria y antiproliferativa de la fracción de acetato de etilo de *Z. rigidum* en el pez cebra.

Para analizar la seguridad de la fracción a 25,5 µg/mL se determinaron los efectos en el fenotipo en embriones y larvas de pez cebra durante las primeras 72 horas pos fecundación. La actividad antiinflamatoria fue estimada utilizando larvas transgénicas Mpx: GFP que expresan la proteína verde fluorescente y permiten cuantificar el número de leucocitos migrantes a una zona de lesión bajo la influencia del control positivo (DPI), negativo (DMSO) y la fracción. Finalmente la actividad antiproliferativa se evaluó mediante la inmunolocalización de la histona H3 fosforilada.

Estos resultados no se habían reportado previamente y sugieren que *Z. rigidum* no induce a cambios en el fenotipo, efectos letales, subletales o teratogénicos, por lo que brinda posibilidad de continuar estudios con proyección farmacológica. Se evidenció que esta fracción no ejerce un efecto inhibitorio en la migración de macrófagos y neutrófilos, de manera que no regula la migración leucocitaria, al menos en esa concentración. Por último las larvas tratadas mostraron una menor cantidad de células proliferativas con respecto a las larvas sin tratamiento, sugiriendo una actividad antiproliferativa.

Palabras clave: medicina herbaria, toxicidad, inflamación, proliferación.

Abstract

Zanthoxylum rigidum is a popular plant known in the Amazon region as "hualaja" and belongs to the genus *Zanthoxylum*, which has been very important in the treatment of diseases such as inflammation and cancer. There is currently little information on this species, however some phytochemical studies suggest its possible anti-inflammatory and anti-proliferative activity. For this reason the anti-inflammatory and antiproliferative activity of the ethyl acetate fraction of *Z. rigidum* in the zebrafish was evaluated.

To analyze the safety of the fraction at 25.5 µg / mL, the effects on the phenotype on embryos and zebrafish larvae were determined during the first 72 hours after fertilization. The anti-inflammatory activity was estimated using transgenic larvae Mpx: GFP that express the green fluorescent protein and allow quantifying the number of migrant leukocytes to an area of injury under the influence of positive control (DPI), negative (DMSO) and fraction. Finally, the antiproliferative activity was evaluated by immunolocation of the phosphorylated histone H3.

These results had not been previously reported and suggest that *Z. rigidum* does not induce changes in the phenotype, lethal, effects sublethal or teratogenics, so it offers the possibility of continuing studies with pharmacological projection. It was evidenced that this fraction does not exert an inhibitory effect on macrophage and neutrophil migration, so that it does not regulate leukocyte migration, at least at that concentration. Finally, the treated larvae showed a smaller amount of proliferative cells with respect to the untreated larvae, suggesting an antiproliferative activity.

Keywords: herbal medicine, zebrafish, toxicity, inflammation, GFP, proliferation, histone H3.

Marco teórico

Medicina tradicional herbaria

El hombre ha buscado diversas maneras para asegurar su permanencia en el medio ambiente desde tiempos prehistóricos y para ello ha utilizado productos naturales, como plantas, animales, microorganismos y organismos marinos como recursos para mantener su bienestar (Yuan *et al.*, 2016). Bajo este contexto, las plantas ocuparon un lugar muy importante en la vida del hombre, ya que además de ser fuente de alimentación, combustible y vestimenta; constituyeron la base fundamental de la medicina, la cual es considerada una ciencia enriquecida a partir de los conocimientos de los hombres primitivos y que es tan antigua que se remonta a la aparición misma del hombre en la tierra (Esper *et al.*, 2010). Por este motivo, se considera la medicina tradicional natural como un producto de adaptación del hombre al entorno, que con el pasar del tiempo se ha convertido en parte su acervo cultural gracias a la evolución lenta, pero avalada por la experiencia (Pascual *et al.*, 2014).

En este sentido, se concibe la medicina tradicional herbaria como una red compleja entretejida por conocimientos, técnicas y procedimientos basados en teorías, creencias y experiencias de las poblaciones humanas, en donde se utilizan las plantas para el mantenimiento de la salud (Arteaga, 2017; Gallegos, 2016). Como resultado de ello, millones de especies a nivel mundial han salido a relucir por sus valiosas propiedades medicinales y entre ellas se encuentran las especies pertenecientes al género *Zanthoxylum*, al cual se le han atribuido diversas connotaciones etnomédicas (Prieto, 2012).

Género *Zanthoxylum*

Descripción botánica.

El nombre *Zanthoxylum* proviene del término *Xanthoxylum* que significa "xanthon xylon" o "madera amarilla", para hacer referencia a árboles y arbustos caracterizados principalmente por presentar espinas curvas a lo largo del eje del tronco; con variedad de hojas (simples o compuestas), inflorescencias (panículas, umbelas, axiales o terminales), flores hermafroditas, de color blanco o verde y frutos en forma de folículos o esquizocarpos (Prieto, 2012).

Se trata de plantas aromáticas que conforman la familia de las rutáceas y son destacadas por su alta diversidad, pues comprenden cerca de 549 especies en todo el mundo (Chaaib, citado en

Prieto 2012), y que en particular han venido ganando bastante interés en el campo de la investigación etnomédica, fitoquímica y biológica.

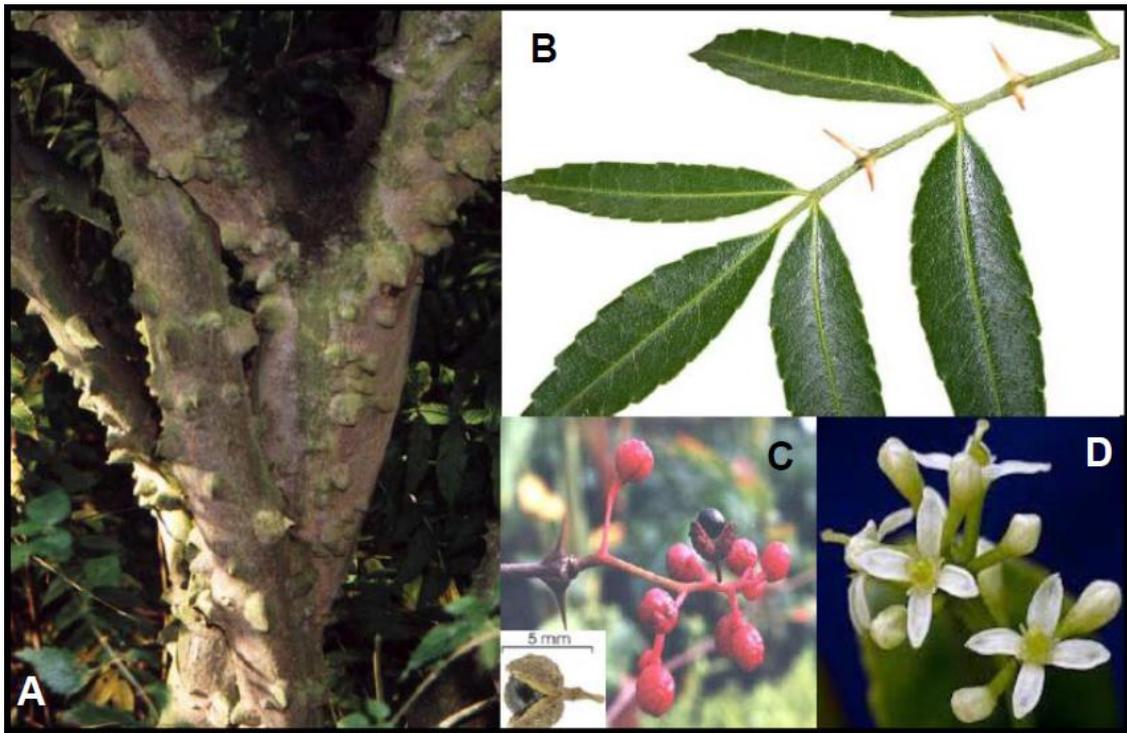


Figura 1. Características generales de las especies pertenecientes al género *Zanthoxylum*. A. Árboles u arbustos. B. Hojas. C. Frutos. D. Inflorescencias. Tomada de Prieto (2012).

Distribución geográfica.

Macías *et al.*, (2007) describe que estas plantas se encuentran distribuidas en gran parte del continente americano, principalmente en países como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Islas del Caribe, Costa Rica, Estados Unidos, Honduras, México, Panamá, Perú, Puerto Rico, Venezuela y Colombia, aunque también están reportadas en África, Asia y Australia (Guendéhou, 2018)

En Colombia este género está representado por cerca de 21 especies, que se distribuyen en 23 departamentos, incluido el departamento del Quindío (Patiño y Cuca 2007). Cabe señalar que se han descrito variedad de usos asociados a las especies del género, y en términos globales Prieto (2012) destaca su importancia como materia prima en la obtención de frutos comestibles, aceites, madera, vermífugos, febrífugos, piscicidas, en la ornamentación, la culinaria y la medicina. Asimismo, la especie *Zanthoxylum rigidum* de nuestro interés, es conocida popularmente en la región amazónica como “hualaja” y su madera es utilizada principalmente en la construcción (Katiuce *et al.*, 2009).

Propiedades etnomédicas.

Se ha reportado el uso tradicional de distintas especies del género *Zanthoxylum* para el alivio de algunas afecciones de la salud, como los problemas dentales, la malaria, trastornos gastrointestinales, blenorragia, reumatismo, enfermedades pulmonares, de la piel, genitourinarias, antidiarreico, febrífugo, antihemorrágico, diurético, antitumoral, anticonvulsivo y antiinflamatorio, entre muchos otros (Tabla 1), (Patiño *et al.*, 2012).

Tabla 1. Principales usos de algunas especies del género *Zanthoxylum*.

Especie	Lugar	Uso medicinal
<i>Zanthoxylum xanthoxyloide</i>	África y Camerún	Contra la tos, fiebre, dolor de muela, mordedura de serpiente, enteritis, disentería, diarrea, uretritis y contra la estomatitis.
<i>Zanthoxylum chalybeum</i>	Kenia	Contra la malaria, resfriados, tos, dolor de muela, heridas, resfriados y neumonía.
<i>Zanthoxylum usambarensis</i>	Kenia	Tratamiento del reumatismo.
<i>Zanthoxylum leprieurii</i>	Camerún	Usado como tratamiento de la blenorragia, esterilidad, ulceraciones, anti bacterial.
<i>Zanthoxylum integrifoliolum</i>	Taiwán	Remedio en la mordedura de serpiente, dispepsia y tónico contra la fiebre.
<i>Zanthoxylum hyemale</i>	Brasil	Antiespasmódico, astringente y agente tónico
<i>Zanthoxylum liebmannianum</i>	México	Dolor de estómago, amibiasis, anestésico local y parásitos de tipo intestinal.
<i>Zanthoxylum budrunga</i>	India	Contra el asma, bronquitis, hemorroides, diarrea, dolor de cabeza, tos y dispepsia.

Espece	Lugar	Uso medicinal
<i>Zanthoxylum fagara</i> , <i>Zanthoxylum elephantiasis</i> y <i>Zanthoxylum martinicense</i>	Cuba	Analgésico, antidiarreico, fiebre, enfermedades orales, enfermedades del pecho.
<i>Zanthoxylum culantrillo</i>	China	Anestésico.
<i>Zanthoxylum coriaceum</i>	Hawái	Diarrea, antihemorrágico, dolor de oído y tratamiento contra la mordedura de serpiente.

Adaptado de Macías *et al.* (2007)

En este sentido, los aportes de la etnomedicina constituyen un típico soporte para encaminar las investigaciones relacionadas con la evaluación de las distintas actividades biológicas de las plantas, siendo de mayor interés actividades como la antimicrobiana, insecticida, antiinflamatoria, antioxidante, antiparasitaria, antitumoral, antihelmíntica y antiviral (Patiño *et al.*, 2012).

Actividad antiinflamatoria.

La diversa actividad biológica del género *Zanthoxylum* y sus usos, están en concordancia con la variedad de metabolitos secundarios presentes principalmente en hojas, tallos y raíces. Dentro de estos compuestos químicos, se destaca principalmente los alcaloides (del tipo benzofenantridínicos, quinolínicos, aporfínicos, bishoderninilterpenos, y canthin-6-ona), lignanos, (especialmente del tipo furofuránicos y diarilbutirolactona), amidas, cumarinas, flavonoides, terpenoides, esteroides, cromonas e indolopiridoquinazolínicos, los cuales han sido aislados a partir de algunos estudios fitoquímicos realizados al género (Macías *et al.* 2007).

Asimismo, Patiño, Prieto y Cuca (2012) describen algunos bioensayos realizados con extractos etanólicos de la corteza de *Z. elephantiasis*, *Z. fagara*, *Z. martinicense* y *Z. coriaceum*, y otros realizados con fracciones de hexano, acetato de etilo y extractos etanólicos de hoja de *Z. chiloperone* que han mostrado resultados prometedores con relación a la actividad antiinflamatoria de estas plantas en el ratón como modelo animal. Estos investigadores también mencionan análisis fitoquímicos en los que se informa el aislamiento de varios metabolitos secundarios que podrían presentar dicha actividad biológica, como el lignano dibencilbutirolactónico extraído a partir de *Z. naranjillo*, los alcaloides de benzofenantridina y

quinolona, y cumarinas aislados de *Z. nitidum*, y los fenilpropenoides, encontrados en *Z. integrifoliolum* y *Z. avicennae*.

De igual modo Cebrián-Torrejón, *et al.* (2010); Ferreira *et al.* (2007); y González-García *et al.* (2008) señalan que el alcaloide canthin-6-ona ha sido aislado de varias especies del género *Zanthoxylum*, y que dada su abundancia en los extractos, se le puede considerar como un marcador taxonómico. Mientras que González-García *et al.* (2008) estableció la idea de que dicho alcaloide podría ser una de las moléculas responsables de la actividad farmacológica antiinflamatoria, pues parece actuar sobre la de granulación mastocítica, la liberación de serotonina y bradiquinina, y la modulación de citoquinas pro inflamatorias como la Interleucina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α).

Por todo lo anterior, se presume que *Z. rigidum* podría conservar propiedades antiinflamatorias, teniendo como soporte la información etnomédica reportada y los análisis fitoquímicos realizados al género.

Actividad antiproliferativa.

Las especies del género *Zanthoxylum* han sido consideradas tradicionalmente como fuentes potenciales para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales, por este motivo, encontrar un tratamiento para el cáncer se ha convertido en un objetivo importante para el hombre, que es una de las principales causas de muerte en el mundo actual (Barrios y Garau, 2017).

Algunas evidencias de la posible actividad antiproliferativa conservadas en el género son los derivados de feofórbidos de la fracción soluble en cloroformo de *Z. ailanthoides*, los derivados de acridona extraídos de raíces y frutos de *Z. leprieurii*, los alcaloides de piranoquinolina citotóxicos (zantosimulina y huajiaosimulina) provenientes de la corteza de la raíz de *Z. simulans*, la berberina aislada de la corteza de *Z. monophyllum*, los alcaloides de la benzofenantridina (fagaronina, nitidina, cloruro de nitidina y 6-metoxi-5,6-dihidronitidina) y los de hexahidrobzofenantridina; los cuales son metabolitos que tras distintos ensayos han mostrado una actividad antitumoral prometedora frente a diferentes líneas de células tumorales (Kuetea *et al.*, 2011; Ngoumfo *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 2011).

Generalidades sobre la respuesta inflamatoria

La inflamación es el proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares que cumplen una finalidad defensiva, principalmente frente a agentes infecciosos como bacterias, virus y parásitos o agentes irritantes como sustancias químicas,

radiaciones térmicas o emanaciones radiactiva (Bordés *et al.*, 2010; Jaimes, 2009). En este sentido, la inflamación constituye un mecanismo a través del cual se destruye, diluye o aísla el agente nocivo permitiendo la recuperación del mismo tipo de células o cicatrización del tejido lesionado (Cotran *et al.*, citado en Jaimes 2009). Por ello, se considera un mecanismo de defensa vital para la salud (Fang *et al.*, 2017).

En el plano del tejido la inflamación aguda se caracteriza por el enrojecimiento, dolor, ardor, rubor, calor, hinchazón y pérdida funcional por incapacidad del órgano alterado (León-Regal *et al.*, 2015), y durante este proceso los eventos principales son: 1) los macrófagos tisulares reconocen determinados patrones moleculares del agente patógeno (PAMP), químicos o lesionales (DAMPs), 2) liberan citocinas (proteínas encargadas de la vasodilatación, exudación de líquidos y expresión de moléculas de adhesión), 3) inducen a la migración y adhesión de los leucocitos en el tejido lesionado para realizar funciones de fagocitosis y apoptosis principalmente (Peñaherrera *et al.*, 2016).

Fang *et al.* (2017) afirman que por lo general en las respuestas inflamatorias agudas, las interacciones celulares y moleculares actúan para minimizar eficientemente la lesión inminente o infección, como mecanismo para la restauración de la homeostasis del tejido. Sin embargo, la inflamación no controlada puede llegar a ser crónica, convirtiéndose en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares y del intestino, diabetes, artritis, cáncer, asma y trastornos neurodegenerativos (León-Regal *et al.*, 2015). Por consiguiente, el desarrollo de alternativas terapéuticas eficaces y seguras es de gran interés para reducir la mortalidad y la morbilidad por estas enfermedades.

Teniendo en cuenta lo anterior, se han desarrollado diferentes medios para evaluar compuestos antiinflamatorios de interés, y uno de ellos consiste en la cuantificación de leucocitos que migran a un sitio de lesión utilizando modelos animales como el pez cebra utilizado en esta investigación.

Generalidades sobre la proliferación celular

La proliferación celular es una característica distintiva del cáncer, debido a que es esencial para su progresión y por lo tanto se le considera como un marcador tumoral importante (Guegués, 2017). Así, López (2003) destaca que la habilidad de las células normales para detener el ciclo celular después de sufrir un daño al ADN, es crucial para el mantenimiento de la integridad genómica, pues el cáncer representa la pérdida del control de la proliferación en un determinado tipo celular como consecuencia de los defectos en cientos o miles de genes que

controlan la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis. López (2003) sugiere que existen dos grupos de genes que pueden ocasionar cáncer: 1) los oncogenes, los cuales son genes mutados y cuya función normal es estimular la proliferación celular y 2) las proteínas supresoras de tumores, que restringen el crecimiento.

La mayoría de las enfermedades malignas muestran defectos en al menos una de las proteínas reguladoras del ciclo celular (Rodríguez *et al.*, 2004), y estas se pueden clasificar en: Clase 1, que incluye los reguladores negativos clásicos del ciclo como la proteína del retinoblastoma (RB) y la ciclina dependiente de quinasa 1 (CDK1); la Clase 2, que incluye los supresores tumorales que no previenen el crecimiento directamente, pero previenen las mutaciones en los genes de la clase 1 y de los proto-oncogenes, tales como la p53 y genes reparadores del ADN; y la Clase 3 incluye los reguladores del desarrollo, como el gen *wtl*, el cual se encuentra mutado en los tumores de Wilms, tumores embrionarios del riñón (López, 2003).

Es por ello, que entre las moléculas más usadas en la investigación para el tratamiento del cáncer se destacan las que pueden inhibir la actividad de las CDK, que estimulan la actividad supresora de tumores de la proteína p53 y en general aquellas capaces de modular moléculas que controlan el ciclo celular. Teniendo en cuenta la importancia de la investigación en este campo, Guegués (2017) describe que se han venido desarrollado diversos métodos para cuantificar la proporción de células proliferantes, como el recuento mitótico tradicional y el uso de los madores inmunohistoquímicos de proliferación entre los que se destaca el antígeno Ki 67 que se expresa en el ciclo celular completo, el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) como marcador de la Fase S, y la histona H3 fosforilada (PHH3) un marcador específico de la fase mitótica.

En términos generales, el fundamento de utilizar la histona H3 fosforilada como marcador mitótico se debe principalmente a su actividad asociada a la condensación o cohesión de los cromosomas, pues según Hans y Dimitrov (2001) cuando estos últimos se encuentran totalmente compactados, exhiben al mismo tiempo patrones uniformes de fosforilación de dicha histona. Por este motivo se considera que la fosforilación de la histona H3 es un proceso importante de señalización para la división celular.

De estas técnicas, la inmunofluorescencia contra la histona fosforilada H3 resulta particularmente adecuada para realizar ensayos con embriones y larvas de pez cebra, pues la

transparencia y tamaño de los embriones los convierte en un modelo idóneo para la inmunotinción (Mendieta-Serrano, *et al.*, 2013).

Descripción del modelo biológico

En los últimos años uno de los modelos biológicos más estudiados y de mayor interés para la investigación básica en la biología genética y molecular, ha sido el pez tropical de agua dulce pez cebra *Danio rerio*, el cual según Armengol (2017) constituye una especie nativa del sureste asiático que habita normalmente pequeños y tranquilos cuerpos de agua con abundante vegetación en condiciones ambientales no muy exigentes.

Lozada *et al.*, (2012) aseguran que estos peces presentan una coloración verde aceitunada o dorada, con tonalidades marrones, y hacia el vientre se intensifica el color blanco; con cuatro líneas de color azul, que van desde los opérculos hasta la aleta caudal y recorren los costados longitudinalmente; con dimorfismo sexual marcado: machos con cuerpo delgado y comprimido de menor tamaño y hembras que exhiben una distintiva papila genital, forma corporal más ancha y vientre abultado y redondeado.

Hay que mencionar además, que seleccionar al pez cebra como modelo biológico trae consigo diversas ventajas, entre las cuales Rocha *et al.* (2002) destacan que los peces adultos presentan un alto potencial reproductivo ya que producen entre 100 y 200 huevos por hembra, asimismo su pequeño tamaño (4-5 cm) permite mantener alrededor de 25 peces en unos 45 litros de agua, y además presentan un corto periodo de tiempo para alcanzar su madurez sexual (de 5-6 meses). Por otro lado, los embriones se destacan principalmente por su fecundación y desarrollo externos, que en conjunto con su translucidez permiten ver al detalle el desarrollo embrionario. Finalmente, Harris y Hansen (2012) y, Spirita y Ahila, (2015) expresan que en general, gracias al rápido desarrollo, bajos costos de mantenimiento y su alta homología anatómica y genética con los seres humanos, el pez cebra es un modelo importante para la investigación en salud humana.

Antecedentes

Yang *et al.* (2018), evaluaron la actividad antiinflamatoria del derivado de curamina bergapten (5-methoxypsoralen) aislado de las raíces de *Ficus hirta*, en un modelo de larvas de pez cebra de la línea transgénica GFP para visualizar los efectos del reclutamiento de neutrófilos y macrófagos en un sitio de lesión. Encontraron que el bergapten suprime significativamente el

reclutamiento de neutrófilos y macrófagos hacia el sitio de la lesión, así como también su posterior eliminación. Además, evaluaron la capacidad de inhibición en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) en el pez cebra, encontrando que el bergapten disminuye eficazmente su producción. Debido a esto, los investigadores plantean que el bergapten puede ser un candidato potencial para la terapia de la inflamación.

Arteaga (2017), estudió la actividad antiinflamatoria de compuestos en la dieta mediterránea usando larvas de pez cebra. Evaluó la actividad inhibitoria sobre la migración de neutrófilos y el efecto protector sobre el estrés oxidativo. Encontró que la mayoría de los compuestos evaluados disminuyeron la migración de neutrófilos de manera estadísticamente significativa, prestando de mayor a menor efecto: fármacos antiinflamatorios como la indometacina y el piroxicam (70%), ácido clorogénico (66,7%), cianidina (62%) y finalmente el sofrito de tomate con una disminución del 40%. Asimismo encontró que todos los compuestos evaluados disminuyen la letalidad provocada por el inductor de estrés y este mismo efecto protector también se presentó frente a anomalías morfológicas.

Peñaherrera *et al.* (2016) emplearon el modelo de pez cebra para valorar la actividad antiinflamatoria de 36 extractos metanólicos de plantas medicinales utilizadas en las provincias de Azuay y Loja en Ecuador. Evaluaron su toxicidad para conocer la máxima concentración tolerada y estudió la actividad antiinflamatoria mediante el ensayo de migración leucocitaria. Obtuvieron que los extractos de *Cestrum aff. Peruvianum*, *Galinsoga parviflora*, *Galium sp.*, *Oenothera tetraptera*, *Peperomia aff. Galioides*, *Passiflora ampullaceae* y *Ambrosia arborescens*, mostró un potencial antiinflamatorio comparable con indometacina y dexametasona; siendo el extracto más relevante el de *Cestrum aff. Peruvianum* (50 g/ml). Finalmente determinaron que las saponinas y terpenoides son los compuestos principales de tales extractos y podrían ser los responsables de dicha respuesta.

Galindo *et al.* (2014) analizaron la bioseguridad *in vitro* e *in vivo* de extractos de huesos de aceituna ricos en polifenoles. Evaluaron la citotoxicidad y también la bioseguridad en pez cebra midiendo los parámetros: a) letales (embriones muertos, huevos coagulados), b) subletales (movimientos espontáneos, pigmentación, edemas) y c) teratogénicos (malformaciones, retraso desarrollo). Encontró que la citotoxicidad está en concentraciones superiores a 50 mg/l de extracto (viabilidad 77,5%), calculando una LD50 superior a 800 mg/l y mostró total viabilidad y ausencia efectos subletales, teratogénicos. Llegando a la apreciación de que el extracto de huesos de olivas es altamente bioseguro hasta concentraciones de 100 mg/l.

Galindo (2013) evaluó el efecto biológico *in vivo* e *in vitro* sobre la neuroprotección (NP) y obesidad de un extracto de huesos de aceituna, dirigido al desarrollo de alimentos funcionales, utilizando el modelo biológico del pez cebra. Realizó ensayos de citotoxicidad, anti inflamación y bioseguridad del extracto. La solución evaluada presentó efectos no tóxicos a concentraciones de 50 y 10 ppm y la mortalidad fue nula para todos los casos. Observó que el extracto reduce la inflamación a dos concentraciones (10 y 50 mg/l), con efecto terapéutico mayor a 50 mg/l llegando a reducir la inflamación en un 35%. Finalmente determinó que la muestra presentó capacidad para inhibir la formación de cuerpos grasos durante la adipogénesis a 50 ppm.

Conrejo (2012) estudió la acción cardiotóxica de extractos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* en el modelo experimental larvario de pez cebra. Para ello utilizó uso del extracto puro (EP), acuoso (EA) y etanólico (EE), provenientes de hojas frescas. Estimó la concentración letal 50 y evaluó la disfuncionalidad por el método semi-invasivo de Videocardiograma (VCG) y del análisis histológico del área cardíaca, haciendo uso además de microscopía de fluorescencia, con la aplicación de sondas fluorescentes, como la naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE). Obtuvo que el EP, indujo a una mayor reducción de la frecuencia cardíaca (31%) respecto al grupo control, EE (12%) y el EA (5%). Concluyó que el extracto de *Passiflora edulis f. flavicarpa* promueve la acción cardiotóxica y esta se refleja en una disminución de la frecuencia cardíaca y en la formación de edemas pericárdicos. Además, recomienda el uso del pez cebra, como modelo experimental en la investigación actual debido a todas las ventajas que posee.

Mendieta-Serrano *et al.* (2013) realizaron un análisis detallado de los patrones espaciales y temporales de la proliferación celular durante el primer día del desarrollo en embriones de pez cebra, utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta contra la histona fosforilada H3 en embriones de 24 horas pos fecundación (hpf). Como resultados relevantes encontraron que la metasincronía de la mitosis entre blastómeros podría comenzar en embriones en etapa de 2 a 4 células y que la sincronía de la mitosis desaparece antes de la transición de la blástula media (MBT) y finalmente encontraron un nuevo patrón de agrupaciones mitóticas que coincidió en el tiempo con las pseudo "ondas" mitóticas que se describen antes del MBT. En conclusión estos investigadores en su trabajo indican que el desarrollo temprano es menos sincrónico de lo previsto y que la sincronía no es un requisito adecuado para el desarrollo del pez cebra.

Planteamiento del problema

En el medio social coexisten varios sistemas de conocimiento e interpretaciones de lo que son los síntomas de dolencias orgánicas, así como significados de lo que es el “malestar”, la “salud” o “bienestar” (Fernández-López *et al.*, 2010). Asimismo han surgido ideas sobre las maneras en que se deben utilizar aquellos medios disponibles para tratar las afecciones de la salud, en muchos de los casos sin tener información clara respecto a la seguridad o efectividad de los mismos, basándose en la replicación de prácticas que otras personas han llevado a cabo.

Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (2013) sugiere la utilización segura y eficaz de la medicina tradicional y complementaria (MTC) a través de la reglamentación y la investigación, de manera que el papel de los investigadores que exploran las plantas como recurso terapéutico es estudiar y validar la relación entre el uso y efecto de las plantas respecto a la enfermedad de contexto, además de evaluar que estas sean seguras.

Colombia no es un caso ajeno a esta problemática, de allí que han surgido diversas alternativas medicinales que involucran el uso de las plantas para tratar las diferentes afecciones a la salud. Es por ello, que conviene citar como ejemplo la creencia generalizada de que en las preparaciones de tallos, hojas y raíces de las especies del género *Zanthoxylum* existen como alternativas contra la inflamación y la formación de tumores. Así que muchas de estas plantas se han venido utilizando de manera indiscriminada en diferentes partes del mundo, sin conocerse si son efectivas y seguras, o si por el contrario no presentan el efecto esperado, generan reacciones adversas y/o efectos secundarios en algún modelo biológico.

A lo anterior se suma que los desórdenes inflamatorios son reportados a nivel mundial como grandes problemas de la salud actual y hacen parte de las principales causas de consulta médica, al estar asociados a enfermedades comunes como la artritis reumatoidea, la gota, el asma, los trastornos neurodegenerativos, traumas físicos y alergias (Jaimes, 2009). Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018) reporta al cáncer como la segunda causa de muerte en el mundo, pues solo en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones y se registra que casi una de cada seis muertes se debe a esta enfermedad. Razón por la cual, la insatisfacción de las necesidades terapéuticas para estas dos alteraciones en la salud, han conducido a la búsqueda de nuevas sustancias con aplicaciones medicinales.

En consecuencia, de no llevarse a cabo estudios de este tipo, continúa el desconocimiento y el posible uso desmesurado de las plantas como recurso terapéutico sin información clara ni evidencias que sustenten los efectos esperados por las comunidades. Es por ello, que teniendo

como base los registros etnomédicos y fitoquímicos del género *Zanthoxylum*, la pregunta que orienta esta investigación gira en torno a: ¿cuál es el efecto de la fracción de *Zanthoxylum rigidum* en la inflamación y la proliferación celular del pez cebra?

Justificación

Según la Organización Mundial de la Salud (2013) cerca del 80% de la población de la población mundial utiliza la medicina natural como atención primaria de la salud, bien sea por tradición cultural o simplemente porque no tienen a su alcance otras opciones. En cualquiera de los casos, estas prácticas gozan de gran aceptación porque se consideran como inocuas, seguras, de fácil de acceso y además permiten la automedicación, pues se comercializa en todo tipo de presentación sin requerir una fórmula médica.

Así, al igual que en todo el mundo la población colombiana se ha caracterizado por hacer uso de la medicina tradicional para curar y tratar enfermedades, con la particularidad de que este país es reconocido por gozar de una posición geográfica privilegiada, con variados climas y ecosistemas que favorecen la riqueza de especies vegetales y el conocimiento sobre su uso. Por este motivo se cree que hay variedad de plantas por explorar y, que aún no se han determinado científicamente como medicinales pero que siguen siendo utilizadas de esta manera, como es el caso del género *Zanthoxylum*, al que se han atribuido varias propiedades etnomédicas que aún no han sido dilucidadas para cada una de las especies. No obstante, no basta que una planta sea empleada con este propósito para considerarse medicinal, sino que es preciso comprobar su eficacia como agente curativo.

Asimismo es importante mencionar que existen muchos vacíos respecto a la información relacionada con la especie *Zanthoxylum rigidum*, lo que significa que los datos de esta planta se encuentran de manera limitada, y por ejemplo, para nuestro país aún no se han registrado usos medicinales asociados, y únicamente los estudios fitoquímicos apoyan la hipótesis de encontrar posibles actividades biológicas relevantes.

No obstante, con la presente investigación se pretenden generar resultados que aporten al conocimiento de esta especie y abran campos al análisis y desarrollo de fármacos naturales. De manera que la información aquí obtenida es de utilidad para otros investigadores de la medicina natural y tradicional, para empresas farmacéuticas interesadas en estudiar nuevas opciones de fármacos y para la comunidad académica en general.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antiproliferativa de la fracción de *Z. rigidum* en el modelo de pez cebra.

Objetivos específicos

- Analizar los efectos en el fenotipo de embriones de pez cebra expuestos a la fracción de acetato de etilo de *Z. rigidum*.
- Cuantificar la migración leucocitaria en larvas transgénicas de la línea transgénica Mpx: GFP de pez cebra expuestas a la fracción.
- Evaluar el efecto de la fracción en la proliferación celular de larvas de pez cebra.

Metodología

Colecta del material vegetal

Se realizaron colectas de hojas, cortezas y raíces de *Z. rigidum* en la hacienda el ocaseo ubicada en la vereda “El Laurel” del municipio de Quimbaya, Quindío en las coordenadas 4°34'08” N y 75° 51' 03” S a 970 msnm, dentro de la reserva natural denominada “La montaña del ocaseo” (Figura 2).

Una vez realizada la colecta, se enviaron ejemplares al herbario de la Universidad del Quindío HUQ y de la Universidad Nacional para su determinación taxonómica, donde se registró el nombre científico, nombre común, familia, código de ingreso y código de barras (Anexo 1).

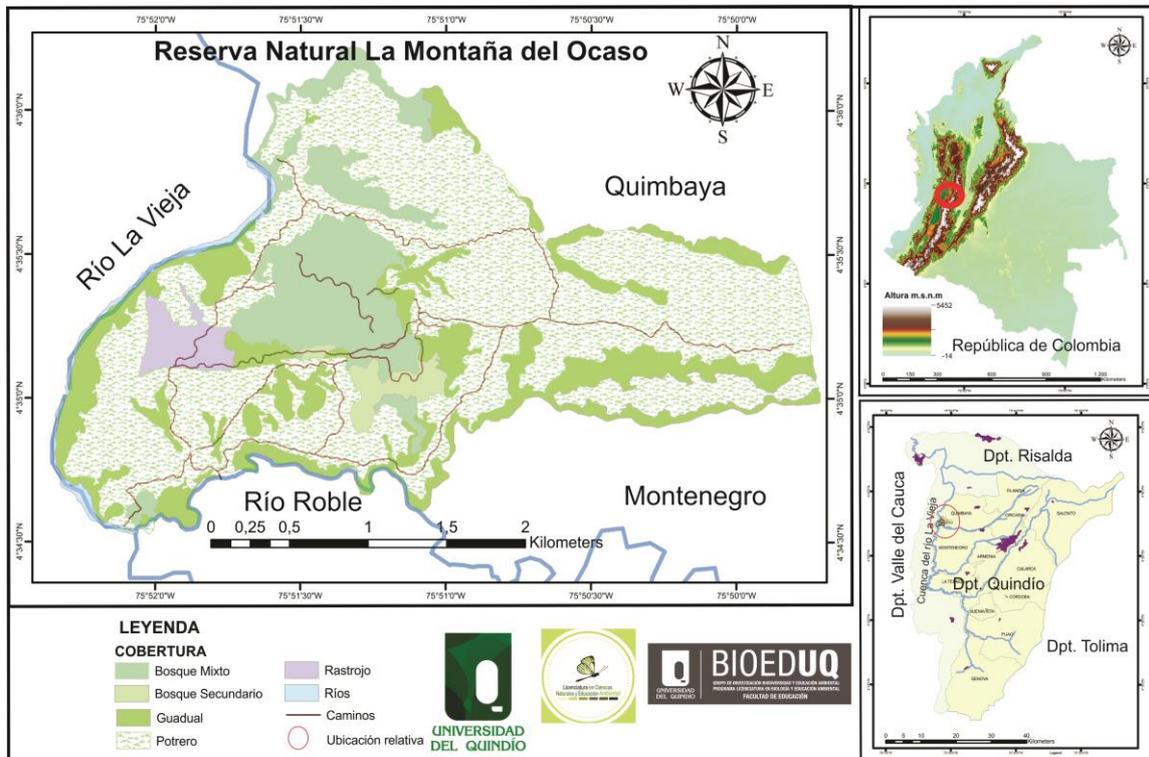


Figura 2. Ubicación geográfica del punto de colecta en la reserva natural “La montaña del ocaso” en Quimbaya, Quindío. Elaborado por: Álvaro Botero-Botero

Obtención de la fracción

Para la obtención de la fracción (Figura 3) se siguió la metodología de Avilés (2008). Se secaron las hojas a la sombra durante 10 días y se realizó la molienda en un molino triturador de martillos (Triturador Siemens), hasta conseguir un polvo fino homogéneo. Posteriormente se depositaron 2000 g de material vegetal en un recipiente para su maceración a temperatura ambiente empleando una mezcla metanol-agua (70:30).

Como procedimiento final se realizó la extracción liquido-líquido para el fraccionamiento, empleando como disolvente acetato de etilo.

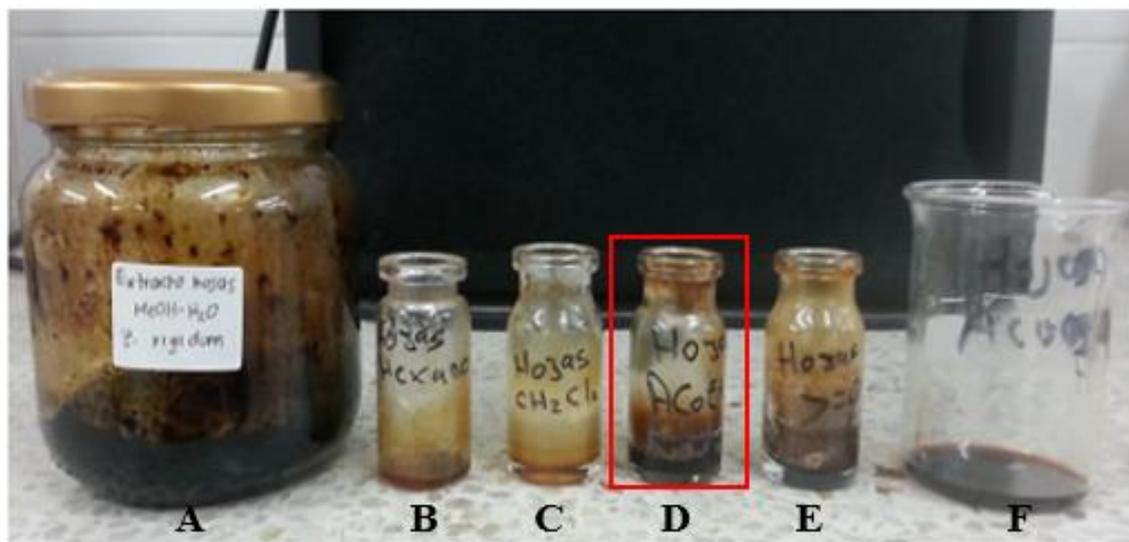


Figura 3. Extracto y fracciones de *Z. rigidum*. **A.** Extracto de hojas en metanol-agua y fracciones de **B.** Hexano **C.** Diclorometano **D.** Acetato de etilo **E.** Acetona y **F.** Metanol. En rojo se encuentra enmarcada la fracción de acetato de etilo utilizada en esta investigación. Tomada por: Andrés M. Rojas-Sepúlveda.

Finalmente se preparó una solución stock partiendo de una concentración madre de 2,55 mg/mL (DMSO 100%) y se diluyó hasta conseguir una solución prueba de 25,5 µg/mL (DMSO 1%).

Mantenimiento de peces adultos

Instalaciones y condiciones del agua.

Los peces se encontraban ubicados en las instalaciones del bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, en un cuarto iluminado con luz artificial y ciclos de 14 horas de luz y 10 de obscuridad; estos individuos estaban distribuidos en animalarios que alimentan de agua las peceras y que además cuentan con un sistema de filtrado UV y mantienen la temperatura del agua dentro de los rangos óptimos.

Cabe mencionar que el agua que circula por el acuario era purificada mediante un sistema de ósmosis inversa, y por cada 80 litros de agua se añadían 3 g de Instan Ocean y 4,2 g de bicarbonato de sodio para mantener un pH ideal entre 7 y 7,8. Asimismo para mantener el control de la calidad del agua se midieron diariamente los parámetros físicos y químicos como la temperatura, la conductividad y el pH (Avdesh *et al.*, 2012; Moreno, 2013).

Alimentación.

Los animales se alimentaron cuatro veces al día, intercalando la dieta viva a base de *Artemia salina* (2mL por cada pez) con alimento procesado Zebra Feed, SPAROS Lda., para adultos.

Reproducción y obtención de embriones.

Se utilizaron dos métodos para producir embriones de pez cebrá:

Un primer método consistió en llenar una pecera grande de agua y colocar una malla de tela de 30 x 30 hilos por pulgada al interior, luego se ubicaron todas las hembras por encima de la malla y se colocó otra pecera pequeña de plástico para depositar a los machos. Una vez separados los grupos de peces, se dejaron toda la noche en oscuridad y al día siguiente se juntaron (Figura 4).

Después de 10 y 15 minutos de apareamiento las hembras habían ovopositado y los machos habían fertilizado los huevos. Posteriormente se recolectaron los embriones y se lavaron con abundante agua para eliminar los desechos.

En el segundo método se utilizó una paridera comercial cuya división permitió separar peces machos y hembras, al mismo tiempo aislar a todos los peces del fondo en donde caían los huevos. Para ello se llenó la pecera de agua y con la lámina de separación puesta, se ubicaron hembras de un lado y machos del otro. Estos peces adultos se dejaron durante toda la noche en oscuridad y al día siguiente se juntaron, se esperó entre 10 y 15 minutos hasta observar embriones en el fondo de la pecera, se lavaron y se depositaron en una caja de Petri de plástico.

Independientemente del método, una vez recolectados los embriones se realizó un protocolo de limpieza que consistió en eliminar desechos, suciedad, embriones muertos, no fecundados, amorfos o retrasados en el desarrollo utilizando una pipeta Pasteur de plástico y un estereoscopio, con el fin de asegurar que los embriones utilizados eran de buena calidad para los experimentos y evitar sesgos en los resultados.

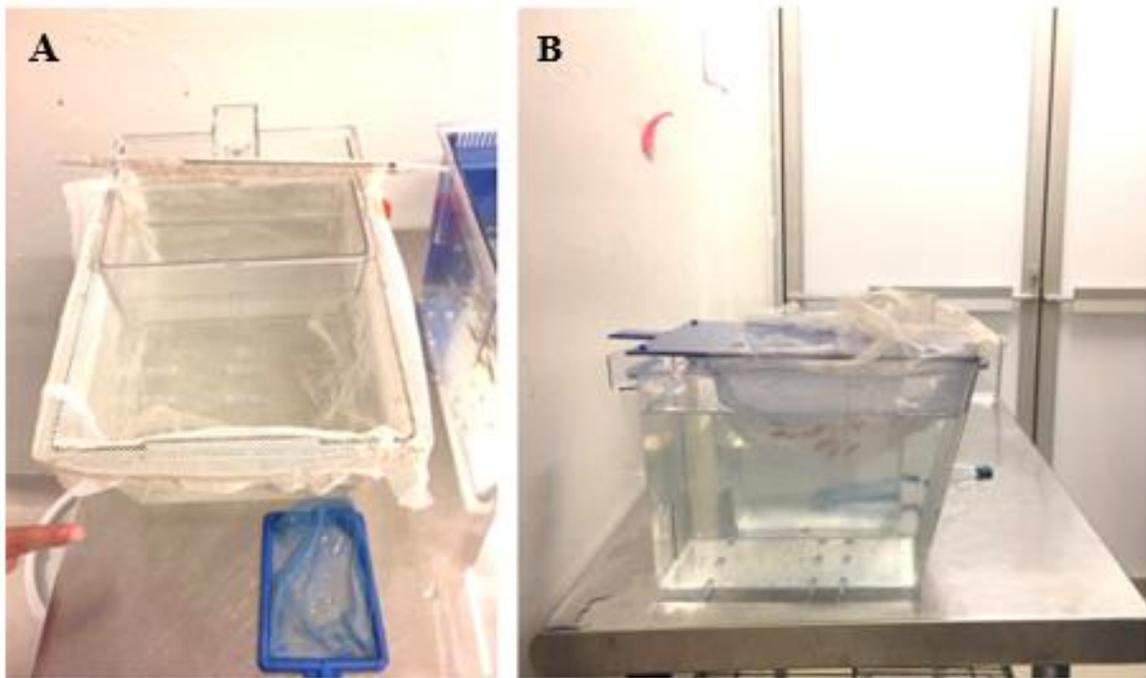


Figura 4. Método de reproducción para la obtención de embriones. **A.** Montaje para la separación de peces: los machos se ubican en la pecera pequeña y las hembras en el espacio restante al interior de la pecera grande y por encima de la malla. **B.** Hembras y machos juntos en proceso de apareamiento.

Ensayo de toxicidad en el desarrollo

Siguiendo la propuesta metodológica de Galindo *et al.* (2014), se realizaron ensayos para determinar la existencia de alteraciones en el fenotipo de los embriones de pez cebra expuestos a la solución de *Z. rigidum* y así estimar la bioseguridad de la fracción. Se seleccionaron 60 embriones en la etapa de primordio de la cola (tail bud) de la línea wild type del pez cebra fecundados y que no presentaron ningún tipo de anomalía externa, y se distribuyeron en 12 pocillos de una caja de cultivo 24 pozos, se distribuyeron los embriones colocando 5 de ellos en cada pozo, con un volumen de 300 μ l de la fracción de *Z. rigidum* en un grupo y 300 μ l de la solución control de DMSO 1% (Figura 5). Las placas se incubaron a 28°C durante las 24, 48 y 72 horas pos tratamiento (hpt).

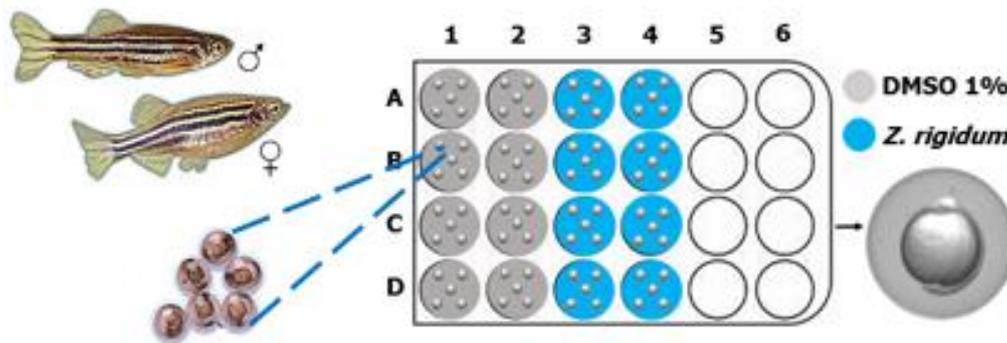


Figura 5. Representación esquemática del ensayo de toxicidad en el desarrollo. Se visualiza una caja de cultivo con 24 pozos cada uno con 5 embriones en etapa de primordio de la cola para dos tratamientos. En gris se encuentran los embriones expuestos a DMSO 1% y en azul los embriones tratados con *Z. rigidum*.

En cada periodo de incubación, se examinaron los huevos, embriones y larvas respectivamente mediante un estereoscopio y se tuvieron en cuenta cambios en el fenotipo, alteraciones letales (coagulación de huevos fertilizados, falta de formación de los somitas, no desprendimiento de la cola del saco vitelino, y ausencia de latidos del corazón), subletales (movimientos espontáneos, cambios en la pigmentación, formación de edemas o coágulos) y teratogénicas (malformaciones en órganos y estructuras, escoliosis, raquitismo o retardo generalizado del desarrollo) durante las primeras 72 horas de desarrollo de los embriones.

Inmunofluorescencia para la detección de leucocitos

Para la actividad antiinflamatoria de la fracción se utilizó como modelo animal al pez cebra Mpx: GFP (green fluorescent protein), los cuales expresan la proteína verde fluorescente en macrófagos y neutrófilos, además, pertenecen a una línea de peces transgénicos destacada por ser un modelo prometedor para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos y tratamientos de enfermedades inflamatorias (Lieschke y Currie 2007; citado en Ye *et al.*, 2017). Estos individuos permiten comprobar la capacidad de regulación en el reclutamiento de leucocitos a una región de inflamación por parte de diversos compuestos naturales o sintéticos de interés (Kadiramanathan *et al.*, 2012).

En este sentido, los ensayos se realizaron teniendo en cuenta las siguientes fases:

Pre-incubación.

Se realizó una exposición inicial de las larvas a las soluciones de interés, para ello se transfirieron 10 individuos de 3 días pos fecundación (dpf) a tres pocillos de una caja de cultivo

de 24 pocillos y se adicionó al primer grupo la fracción de *Z. rigidum*, al segundo se le añadió la solución del control positivo DPI o Difeniliodonio 1% (inhibidor de las enzimas NADPH Oxidasas) y al tercero DMSO al 1% como grupo control (Figura 6). Este procedimiento tuvo una duración total de 1 hora por ensayo.

Corte de aleta caudal e incubación final.

Culminada la pre-incubación, se preparó tricaina al 4,2% (Anexo 3) disuelta en la solución stock de Hank's (Anexo 4) y se depositaron 2 mL en cajas de Petri plásticas pequeñas. Las larvas se trasladaron de los pocillos a las cajas utilizando una pipeta Pasteur plástica y se esperó entre 1 y 3 minutos hasta evidenciar que estaban completamente anestesiadas.

Terminada la anestesia se dispuso la caja en el estéreo-microscopio y utilizando dos agujas nuevas de insulina se realizó el corte de la aleta caudal (Figura 7), evitando generar lesión en tejido que no fuera parte de la aleta. Finalmente se trasladaron las larvas a la caja de pocillos correspondiente, se retiró el medio con tricaina y se expusieron nuevamente a las soluciones mencionadas por un periodo de incubación total de 6 horas a 28°C.

Para realizar los montajes de las larvas, nuevamente se inmovilizaron utilizando tricaina al 4,2% y se dispusieron en vista lateral sobre agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Se llevaron al cuarto de microscopía de fluorescencia y se observaron los leucocitos correspondientes a macrófagos y neutrófilos positivos para la proteína verde fluorescente.

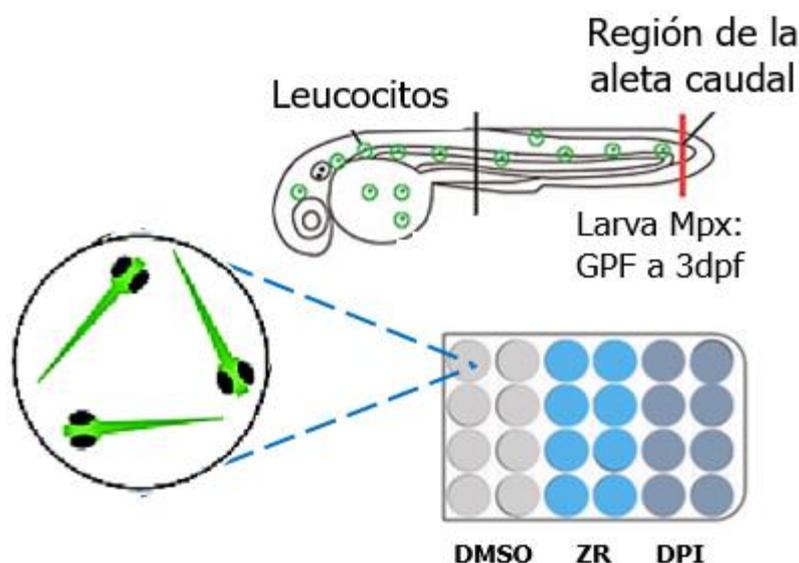


Figura 6. Representación esquemática del ensayo de inmunofluorescencia para la detección de leucocitos. Se visualiza una larva transgénica Mpx: GFP a 3 días pos fecundación con

leucocitos representados en color verde y la región de la aleta caudal. También se observa una caja de cultivo con los tres tratamientos evaluados: DMSO 1%, *Zanthoxylum rigidum* y DPI 1%.

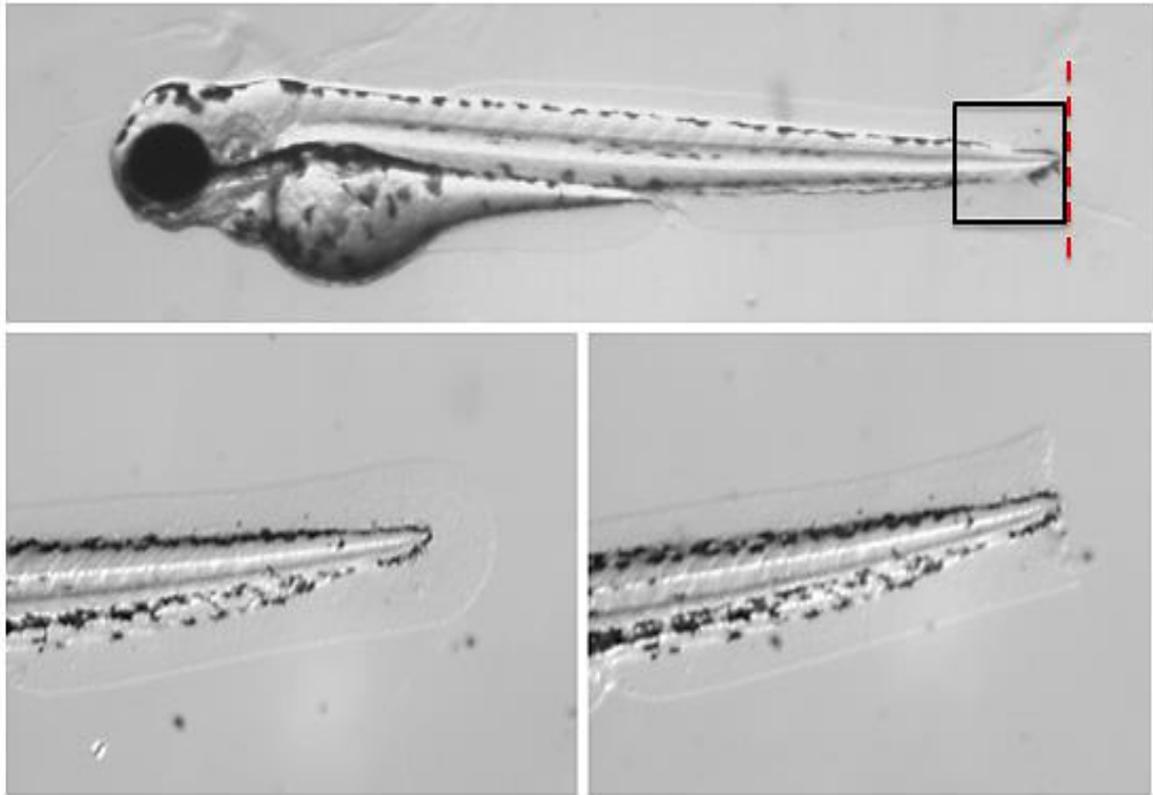


Figura 7. Técnica de corte de la aleta caudal. Se visualizan larvas de pez cebra de la línea Mpx: GFP a 3dpf sometidas a corte de la aleta caudal para el modelo de migración de leucocitos. La línea roja marca el lugar de incisión en la cola y la región enmarcada en negro representa la región de inflamación.

Inmunolocalización de la histona H3 fosforilada

Este ensayo se realizó para conocer el efecto de la fracción de *Z. rigidum* en la proliferación celular, adaptando el protocolo establecido por Mendieta-Serrano *et al.*, (2013). Para este procedimiento se decorionaron 60 embriones de la línea wild type en etapa larvaria (3 dpf) y se realizaron dos ensayos por triplicado con DMSO al 1%, y la fracción de *Z. rigidum* al 25,5 µg/mL.

Inicialmente las larvas se dejaron incubar durante 6 horas y se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% (Anexo 5) durante toda la noche a 4°C y al día siguiente las muestras se lavaron 3 veces con tampón de bloqueo (PBS, BSA 0,1%, TX100 1%) por 10 minutos y se dejaron seis

horas en este mismo buffer con agitación constante a temperatura ambiente. Para la inmunodetección de la PH3 se utilizaron dos anticuerpos (Figura 8). El anticuerpo primario, IgG de conejo, histona H3 antifosforilada (sc-8656-R, Santa Cruz Biotechnology Lot # D1312, se diluyó 1: 100 en tampón de bloqueo y se utilizó para incubar los individuos 4°C sin agitación durante toda la noche. Se lavaron 3 veces en tampón de bloqueo y se incubaron en una solución 1:100 de anti-conejo de cabra Alexa Fluor 647 (A-21244, MolecularProbes) en amortiguador de bloqueo durante 8 horas a 4°C con agitación.

Las larvas se lavaron de nuevo con tampón de bloqueo 3 veces y se realizaron montajes en agarosa de bajo punto de fusión al 1% para visualizar los núcleos positivos de la histona H3 en el microscopio de fluorescencia.

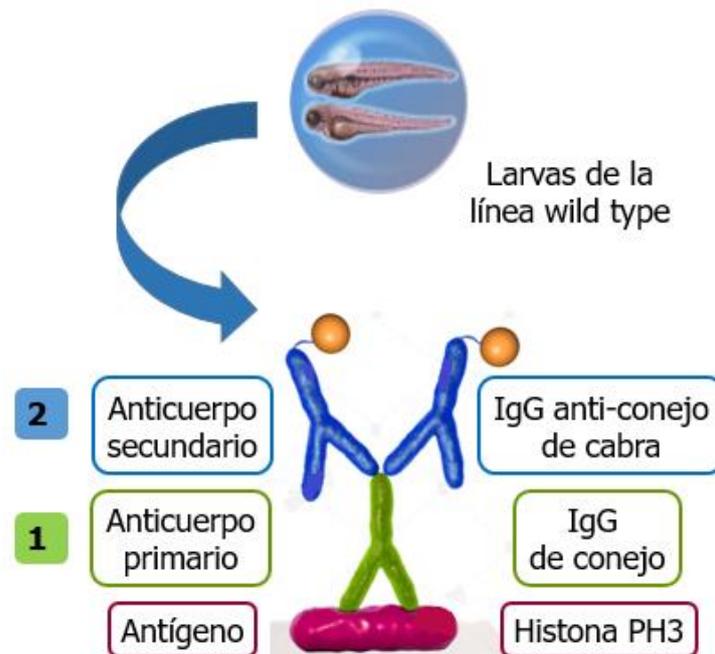


Figura 8. Representación esquemática del ensayo de inmunofluorescencia para la detección de la histona H3 fosforilada. Se visualizan larvas de la línea wild type a 3 dpf y la técnica de detección de la histona PH3 mediante la adición del anticuerpo primario y secundario.

Microscopía de fluorescencia y análisis de las imágenes.

Se utilizó un microscopio ZeissAxioscop objetivo 5X 0.15 N.A., PlanNeofluoar, para tomar de 5 a 10 imágenes por embrión bajo diferentes focos y empalmarlas en una sola imagen utilizando el software ImageJ con el stack focuser plugin.

La cuantificación del número de leucocitos por larva según el tratamiento, se realizó con las fotografías empalmadas y se convirtieron a 8 bits, posteriormente se hizo uso del comando

analyze y el plugin 3D objects counter, para contar el número de señales positivas en la imagen (Figura 9A). Además, se utilizó el comando Analyze y el plugin Measure para calcular y mostrar estadísticas de área o perímetro ocupado por los leucocitos.

Por otro lado, el conteo los núcleos positivos para la histona H3 fosforilada (PH3) de cada larva, se realizó procesando las imágenes empalmadas, convertidas a 8 bits y utilizando el comando analyze en el software de ImageJ, mediante el plugin 3D objects counter (Figura 9B).

A partir de estos procedimientos se obtuvieron los valores numéricos y se ordenaron en dos matrices de Excel.



Figura 9. Análisis de las imágenes con el software ImageJ. **A.** Cuantificación del número de leucocitos en la región altamente inflamada de larvas con 3dpf. **B.** Cuantificación de los núcleos positivos para la histona H3 fosforilada en larvas de 3dpf.

Análisis estadístico

Para la detección de leucocitos realizó el análisis estadístico mediante el software Statgraphics, en donde se diseñó una tabla ANOVA con un nivel de probabilidad para la significación estadística de $p < 0,05$, y un test de comparación múltiple entre tratamientos de Kruskal-Wallis para determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de los tres tratamientos.

Asimismo con la información obtenida del ensayo de la inmunolocalización de la histona H3 fosforilada se realizó una tabla ANOVA, teniendo como nivel de probabilidad para la significación estadística un valor $p < 0,05$. Además, para los dos ensayos se determinaron intervalos con una confianza del 95%.

Por último conviene aclarar que cada ítem de la propuesta metodológica fue revisado y aprobado por el comité de bioética de la Universidad del Quindío (Anexo 2), con lo cual se vela el cumplimiento de las buenas prácticas y el uso adecuado de los animales en condiciones de laboratorio.

Resultados

Toxicidad en el desarrollo

En los resultados obtenidos se observó que la totalidad de los embriones expuestos a la fracción de *Z. rigidum* a una concentración de 25,5 µg/mL (DMSO 1%) a partir de la etapa de primordio de la cola hasta el estado larval a las 72 hpf, presentaron un desarrollo normal y al igual que las larvas control, mostraron formación de aletas y protuberancia bucal, diferenciación de los somitas, pigmentación del cuerpo, circulación sanguínea, desarrollo de la cola y la aparición de la conducta de nado con ausencia de alteraciones visibles o retrasos en el desarrollo (Figura 10).

Es importante anotar que, la fracción de la planta en lo que respecta a esa concentración, no indujo a cambios en el fenotipo, alteraciones letales, subletales o teratogénicas de los individuos y la mortalidad de los embriones fue nula para los dos tratamientos. Demostrando que *Z. rigidum* podría ser utilizada de forma segura a partir de concentraciones bajas como la evaluada en este proyecto.

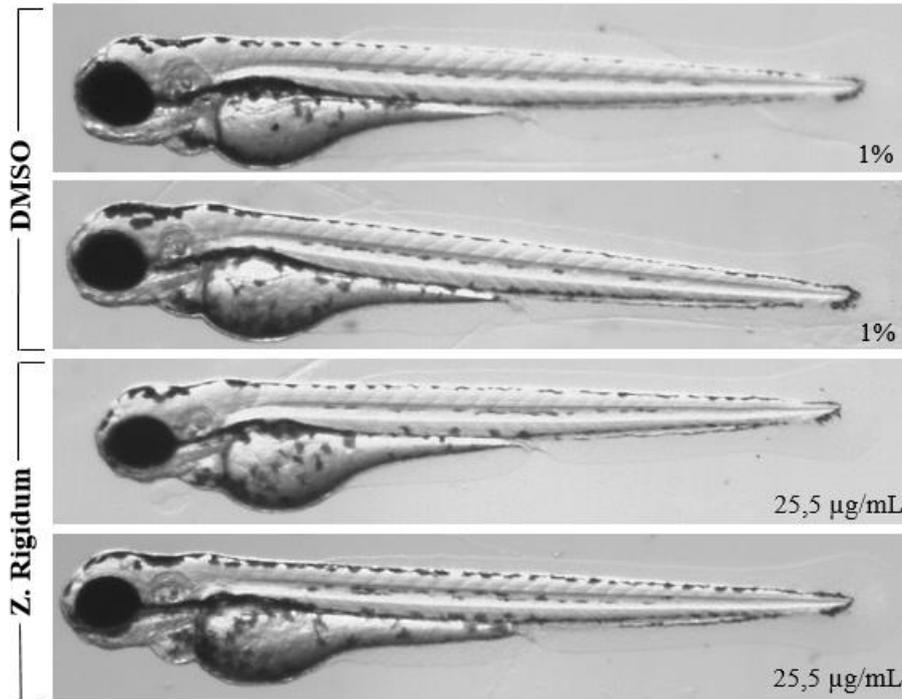


Figura 10. Efecto de dos tratamientos en el fenotipo de larvas a 3dpf de pez cebra. Se visualizan larvas del grupo control DMSO 1% y del tratamiento con *Z. rigidum* a 25,5 µg/mL con ausencia de alteraciones morfológicas.

Detección de neutrófilos mediante inmunofluorescencia

En este ensayo se evaluó el efecto *in vivo* antiinflamatorio de *Z. Rigidum* durante la fase de reclutamiento de leucocitos mediante el uso del corte cola en larvas de 3 dpf. Como se muestra en Figura 11 un número considerable de neutrófilos fueron reclutados hacia el sitio de la herida de las larvas tratadas con DMSO 1% y *Z. rigidum*, mientras que el tratamiento realizado con DPI 1% evidencia una inhibición de la migración de las células fluorescentes al sitio de lesión. El número medio células fluorescentes en las larvas tratadas con DMSO 1% fue de $14,36 \pm 4,02$, mientras que para las larvas tratadas con DPI 1% fue de $1 \pm 1,05$ (Tabla 2). Asimismo, como era de esperar por resultados reportados previamente por Niethammer *et al.* (2009), la solución de DPI 1% redujo significativamente el número de neutrófilos y macrófagos reclutados en el sitio de lesión en comparación con el grupo control (Tabla 3).

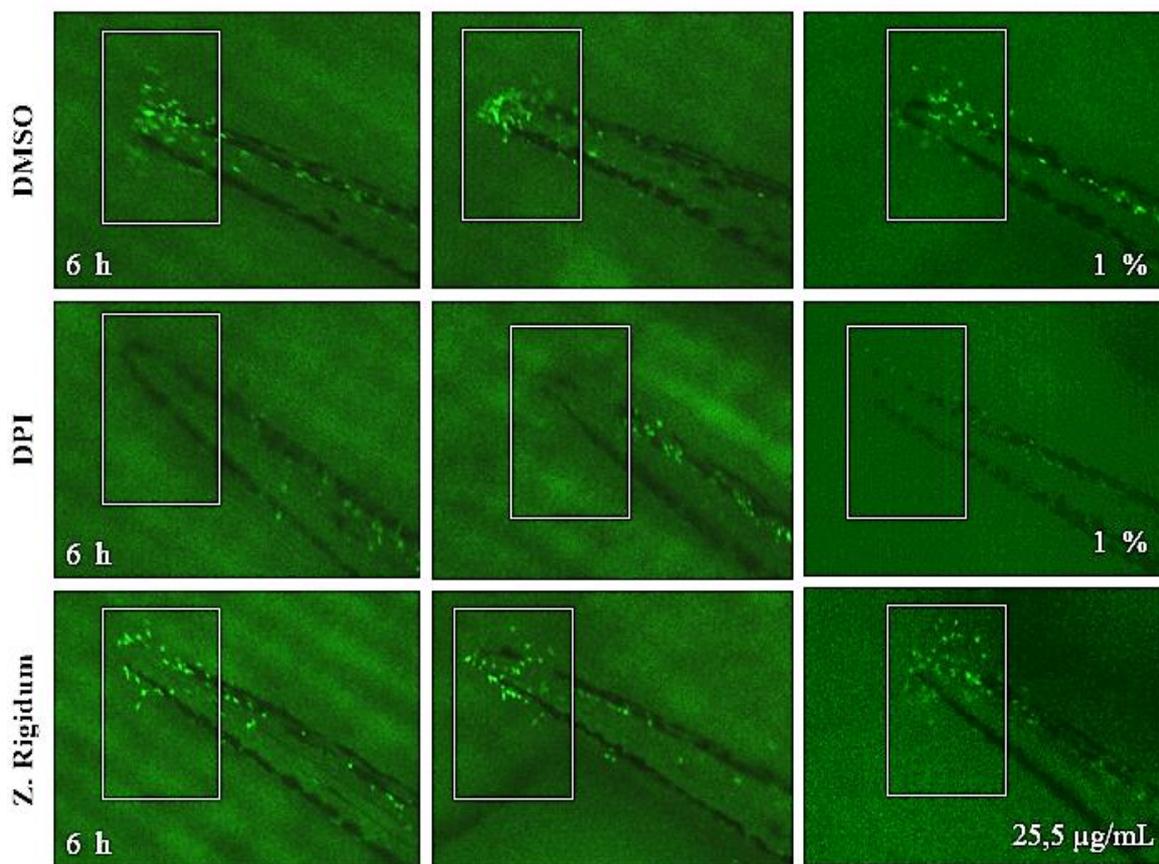


Figura 11. Migración de leucocitos GFP en respuesta a una lesión aguda en larvas transgénicas de pez cebra a 3dpf. Los leucocitos migrantes a las regiones altamente inflamadas (dentro de los recuadros blancos) se visualizan de color verde fluorescente. Tanto en el tratamiento con DMSO como en el de *Z. rigidum* se observa una alta migración leucocitaria, mientras que en el tratamiento con DPI se evidencia una notable disminución.

Ahora bien, para el caso del tratamiento de las larvas con *Z. rigidum* el número medio de células fluorescentes recuadradas fue de $15,9 \pm 7,6$ (Figura 12), poniendo en evidencia que no existe una diferencia significativa con relación al grupo control DMSO 1% (Figura 13). Asimismo se encontró que el área ocupada por los leucocitos en las larvas para cada uno de los tratamientos no presentó diferencias estadísticamente significativas (Figura 14). De manera que estos resultados sugieren que *Z. rigidum* (ZR) a una concentración de $25,5\mu\text{g/mL}$, no ejerce un efecto inhibitorio en la migración de leucocitos al igual que el grupo control; a diferencia del control positivo (DPI) inhibitor. Esto quiere decir que la fracción no afectó significativamente el número de células positivas EFGP que migraron a la herida, por tanto se genera la idea de que la migración de los neutrófilos, que es parte del proceso inflamatorio no puede ser regulada por la fracción de la planta al menos en esta concentración.

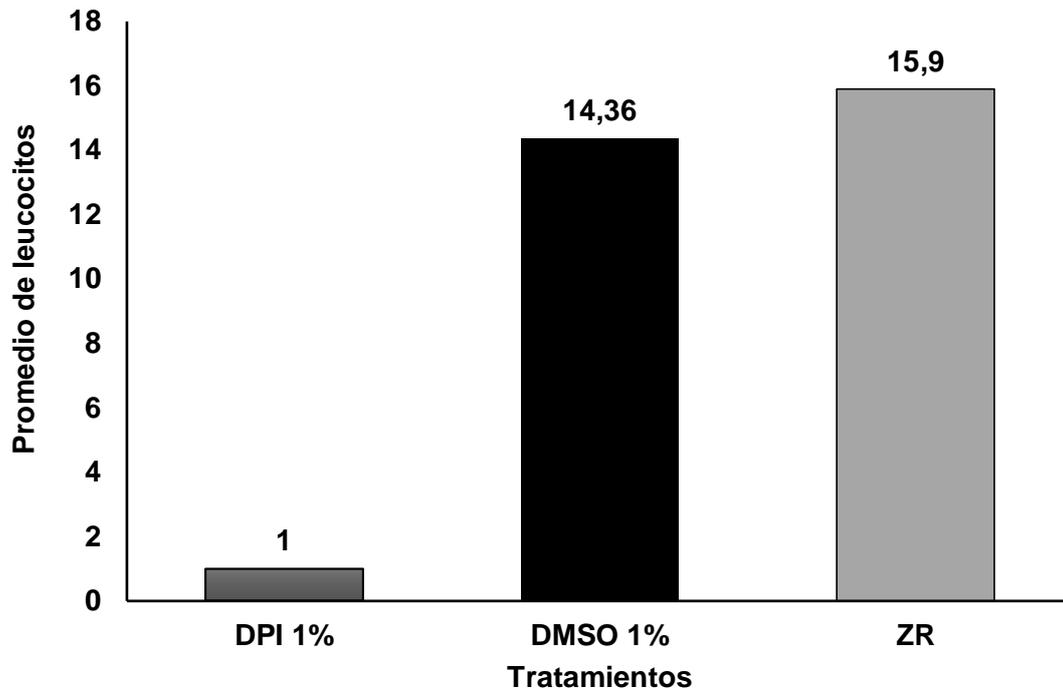


Figura 12. Número medio de neutrófilos que migraron a la zona de lesión por cada tratamiento.

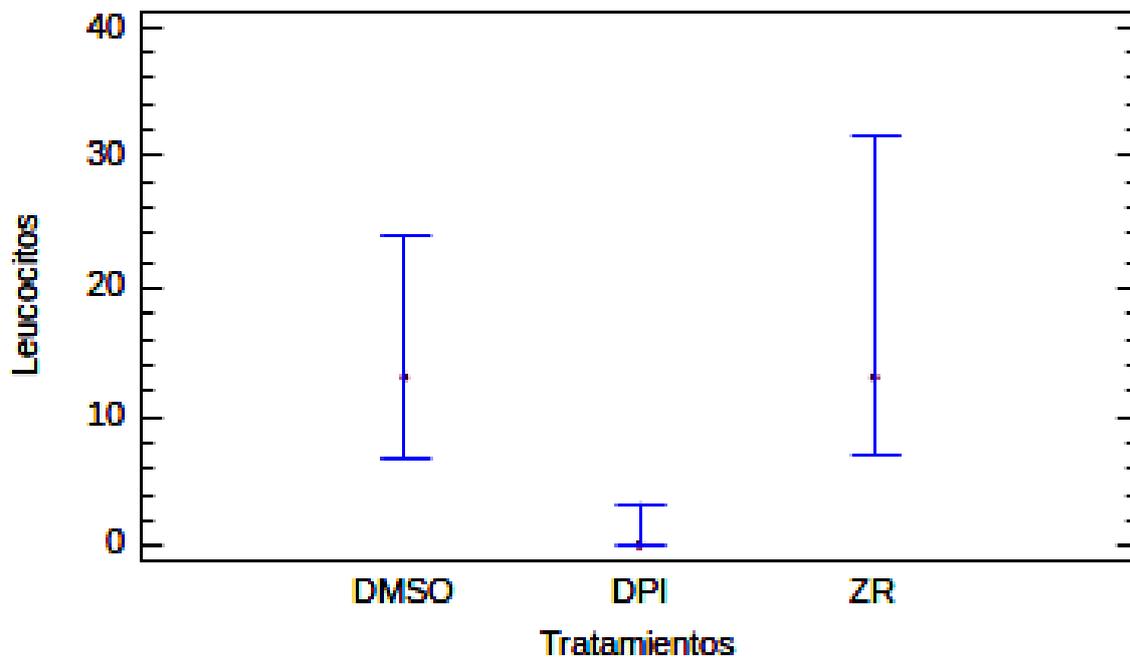


Figura 13. Número de neutrófilos en el sitio de lesión para los tres tratamientos.

Tabla 2. Análisis de varianza para el número de leucocitos por los tres tratamientos evaluados.

Tratamientos	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
DMSO	14,3636	6,81576	47,4515%
DPI	1,0	1,78885	178,885%
ZR	15,9091	12,8332	80,6658%
Total	10,4242	10,6391	102,061%

Tabla 3. Prueba de Kruskal-Wallis de leucocitos por tratamientos.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
DMSO - DPI	*	13,3636	7,36088
DMSO - ZR		-1,54545	7,36088
DPI - ZR	*	-14,9091	7,36088

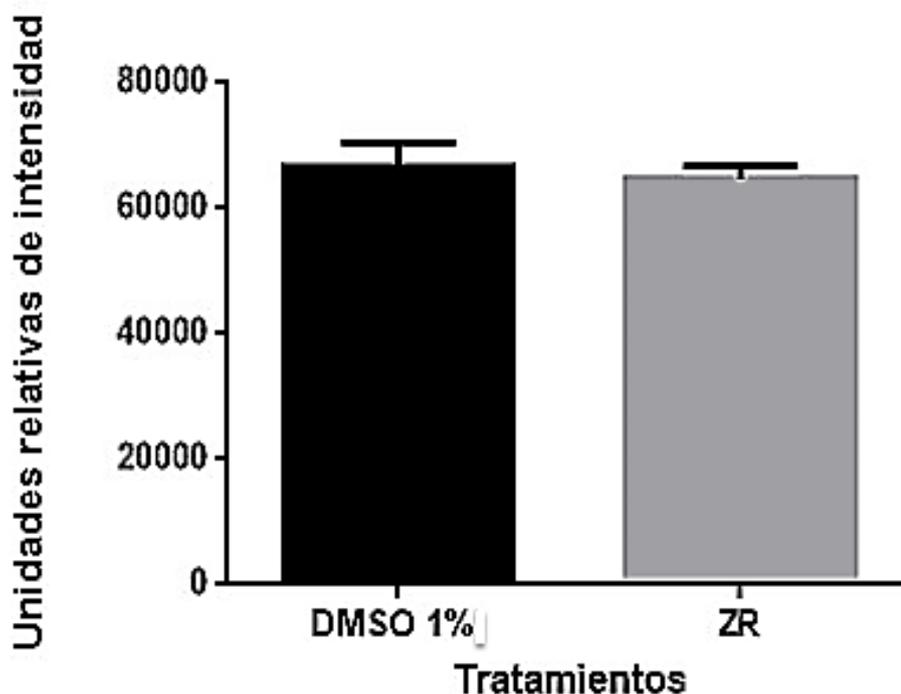


Figura 14. Medida de las unidades relativas de intensidad de los leucocitos por tratamientos.

Inmunolocalización de la histona H3 fosforilada

La observación de los núcleos mitóticos en las larvas enteras de pez cebra por inmunofluorescencia contra la histona H3, reveló que los individuos tratados con *Z. rigidum* mostraron una disminución notable en el número de núcleos mitóticos en contraste con el grupo control de DMSO (Figura 15) (Tabla 4). Así, teniendo como referencia el número medio de núcleos positivos se encontró que para el tratamiento con la fracción este valor fue de $228,2 \pm 30,1$, en contraste con los individuos del grupo control, con $652,8 \pm 87,2$ (Figura 16). De esta manera el análisis de varianza entre grupos y dentro de grupos (Tabla 5) demostró que el valor P de la prueba F es inferior a 0,05, por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre el número medio de núcleos positivos entre los dos tratamientos, con un nivel de confianza del 95%.

En consecuencia, estos resultados sugieren que *Z. rigidum* (ZR) a la concentración evaluada, presenta una acción antiproliferativa en las larvas de pez cebra, pues demuestra una disminución significativa en el número de células que están pasando por una fase mitótica (Figura 17) de manera que se presume que los metabolitos presentes en la fracción pueden detener el ciclo celular, modulando las moléculas que controlan este ciclo.

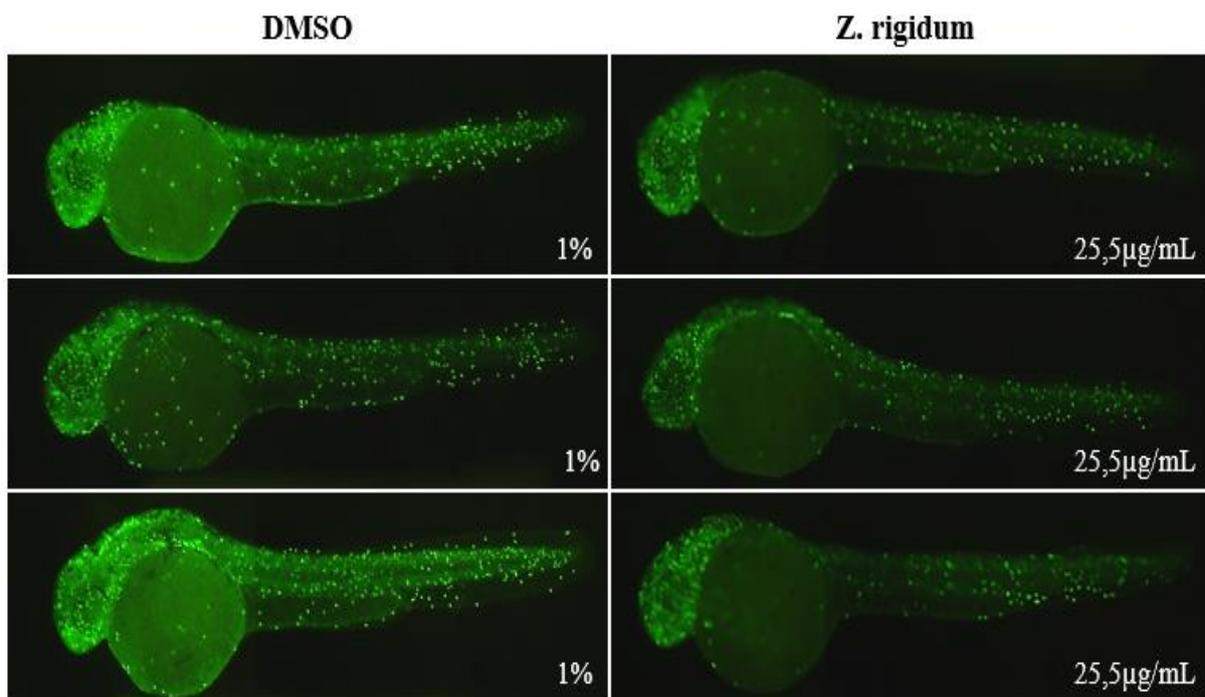


Figura 15. Análisis de la proliferación celular en larvas con 3dpf en tratamientos con DMSO 1% y *Z. rigidum*. Los núcleos positivos para el marcador de PH3 se visualizan de color verde

fluorescente. Se puede observar que el tratamiento con DMSO presenta un mayor número de señales positivas en contraste con el tratamiento de *Z. rigidum*.

Tabla 4. Análisis de varianza para el número de núcleos mitóticos por tratamiento.

Factor	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
DMSO	652,8	147,684	22,6232%
ZR	228,2	67,4366	29,5515%
Total	440,5	248,584	56,4323%

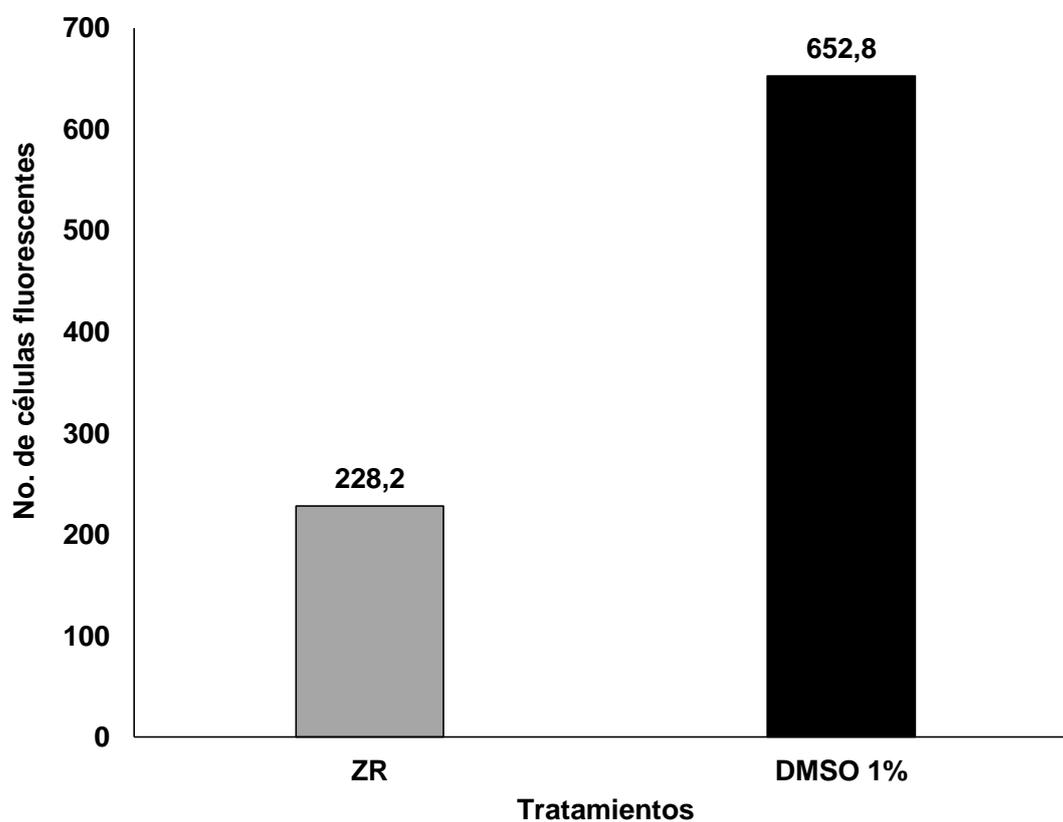


Figura 16. Número medio de núcleos positivos para la histona H3 fosforilada por tratamiento.

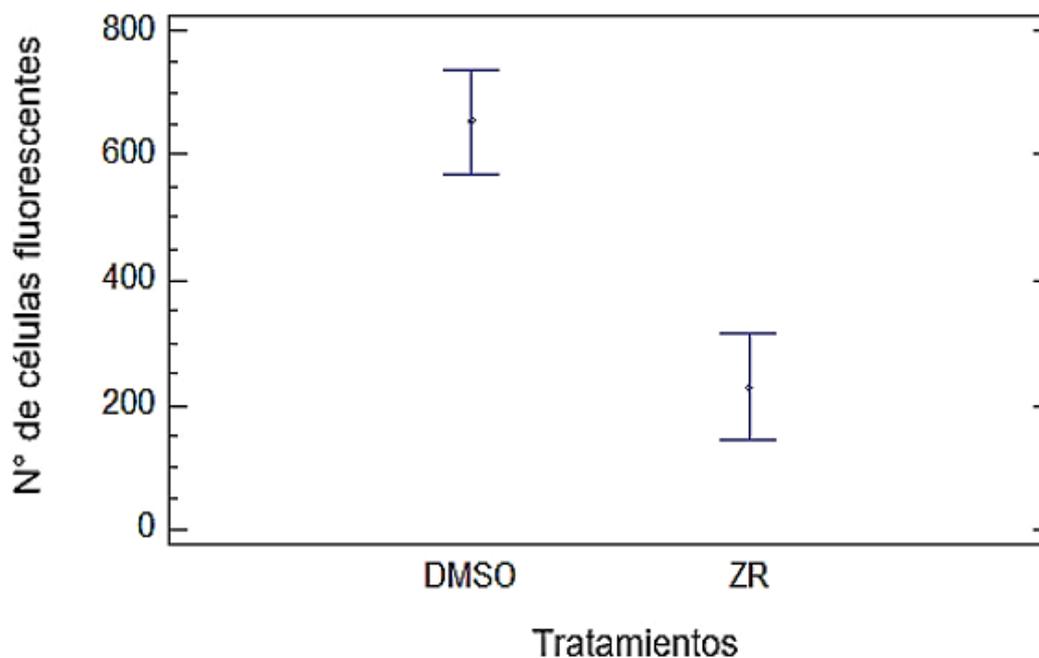


Figura 17. Número de células fluorescentes positivas para la histona H3 fosforilada en los dos tratamientos. Se visualizan diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en ambos tratamientos.

Tabla 5. Análisis de varianza entre grupos y dentro de grupos.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Relación F	Valor P
Entre grupos	450713,	1	450713,	34,20	0,0004
Dentro de grupos	105434,	8	13179,2		
Total (Corr.)	556147,	9			

Discusión

Seguridad de la fracción

Los efectos de los extractos y fracciones de plantas en la salud humana se atribuyen a la presencia de una variedad de compuestos bioactivos que en muchos casos ejercen una acción

beneficiosa en el organismo (Montoya *et al.*, 2011). Dada su importancia en el sector farmacéutico y el de la medicina tradicional herbaria, actualmente existe un gran interés en la identificación de nuevos compuestos bioactivos y/o en la identificación de nuevas propiedades de los mismos, analizando su bioseguridad y efectividad (Galindo *et al.*, 2014).

Pese a ello, existen limitaciones en la búsqueda de estos tratamientos y están relacionadas con la fuerte acción citotóxica *in vivo* de algunos extractos vegetales, que se manifiesta con daños u alteraciones en el fenotipo (Fernández-Calienes, *et al.*, 2009). Así por ejemplo, se han demostrado riesgos de toxicidad asociados al uso de plantas como *Artemisia absinthium L*, *Melaleuca leucadendron L*, *Simarouba glauca DC.*, *Melia azedarach L.*, *Luffa cylindrica* (Mendiola y Monzote, 2009), *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Conrejo, 2012), y *Piper tuberculatum Jacq* (Campos *et al.*, 2016), y han llevado a los investigadores a descartar la posibilidad de continuar estudios farmacológicos en esas especies (Fernández-Calienes, *et al.*, 2009), o en su defecto, a realizar protocolos de extracción mucho más complejos, selectivos y específicos para determinados metabolitos.

En este estudio se demostró la total viabilidad de los embriones y larvas de pez cebra a las 24, 48 y 72 hpf expuestos a la fracción de *Zanthoxylum rigidum*, asimismo se registró la ausencia de mortalidad y el desarrollo de embriones con efectos subletales, teratógenos o retrasos en el desarrollo. Estos resultados parecen demostrar que la fracción no presenta metabolitos secundarios capaces de inducir a alteraciones observables en el modelo animal, de manera que se puede considerar como una solución altamente biosegura, al menos en lo que respecta a la concentración de 25,5 µg/mL.

Por lo anterior, a partir de esta investigación resaltamos la necesidad de realizar estudios toxicológicos a las plantas del territorio colombiano, así como de contribuir a la divulgación sobre los efectos obtenidos, pues de esta manera se disminuye el desconocimiento y consumo indiscriminado de las plantas, y en casos particulares, se ayudará a lograr una reducción en la morbilidad y mortalidad de las personas por ingesta o uso de plantas tóxicas (Macías *et al.*, 2009). De esta manera, comunicar la información sobre la validación del uso seguro de *Z. rigidum* es importante no solo para la industria sino también para las comunidades que posiblemente incluyan esta planta dentro de sus recursos terapéuticos u alimentarios.

Ensayo de la actividad antiinflamatoria

En los últimos años, algunos estudios han sugerido que varias especies del género *Zanthoxylum* poseen un potencial notable en la lucha contra la actividad inflamatoria (Prieto,

2012; Patiño, Prieto y Cuca, 2012; González-García *et al.*, 2008), sin embargo, ninguna investigación había evaluado dicha actividad *in vivo* analizando su efecto sobre el reclutamiento de los neutrófilos y macrófagos. En el presente estudio, se encontró que esta solución no suprimió el reclutamiento leucocitario hacia el sitio de la lesión en las larvas de pez cebra, de manera que los análisis aquí realizados no respaldan el conocimiento etnomédico reportado para el género, ni las ideas planteadas por los análisis fitoquímicos.

A pesar de ello se ha reportado el aislamiento de alcaloides de diversos tipos, lignanos, cumarinas, amidas, flavonoides, esteroides y terpenos, que resultan prometedores para la actividad antiinflamatoria del género (Patiño *et al.*, 2012), y otros de gran interés como la benzofenantridina, quinolona y el lupeol (Lucetti *et al.*, 2010), los cuales han sido fácilmente extraídos de la mayoría de las especies del género *Zanthoxylum*. Sin embargo es posible que estos metabolitos presenten una acción biológica dependiente de la concentración del extracto o la fracción (Patiño *et al.*, 2012), por lo que en este estudio consideramos que si bien estos compuestos pueden estar presentes en la fracción, es posible que se encuentren en muy baja disponibilidad y por lo tanto no generen la respuesta biológica esperada.

Por tanto, se recomiendan concentraciones estándar que van desde los 10 a 300 mg/mL o más, (Cebrián-Torrejón *et al.*, 2011), teniendo como referencia la hipótesis de que un aumento de la concentración podría estar relacionado con el incremento de su actividad biológica (Valdés-Izaguirre *et al.*, 2018). Por todo lo anterior, los resultados aquí presentados no se consideran concluyentes respecto a la actividad antiinflamatoria mencionada, pues continúa abierta la posibilidad de explorar la fracción en concentraciones más altas. No obstante, el conocimiento de la actividad de *Z. rigidum* a 25,5 µg/mL brinda la posibilidad de plantear nuevas alternativas experimentales que aporten una mayor información relacionada con su efecto en los procesos inflamatorios.

Actividad antiproliferativa

En este bioensayo las larvas de pez cebra tratadas con la fracción de *Zanthoxylum rigidum* mostraron una menor cantidad de células proliferativas con respecto a las larvas sin tratamiento y este efecto fue evidente en la concentración de 25,5 µg/mL (Figura 15). De igual modo las larvas tratadas con el extracto conservaron su morfología normal sin mostrar algún daño fenotípico aparente. Por esta razón, las diferencias observadas en el número de células en fase mitótica fueron corroboradas mediante la inmunolocalización de la histona H3 fosforilada como marcador de la proliferación celular, en donde los resultados confirmaron la posible detención

del ciclo celular en las larvas tratadas con *Z. rigidum* y demostraron que este efecto es estadísticamente significativo.

Conviene señalar además, que en el presente estudio se encontró que la fracción de acetato de etilo de la planta afecta la proliferación pero no la viabilidad de las células de los embriones y larvas, pues anteriormente autores como Fernández (2015) han reportado las propiedades anticancerígenas de varios extractos de plantas en diferentes líneas celulares de cáncer principalmente a través de un mecanismo citotóxico. En este sentido nuestro estudio es uno de los primeros reportes para la especie de *Z. rigidum* de una actividad citostática.

De manera simultánea con esta investigación Ocampo (2019) evaluó la actividad biológica de las distintas fracciones de las hojas de *Z. rigidum* en un ensayo con Fibroblastos de Prepuccio Humano (HFF) y células de cáncer de colon humanas (SW480), encontrando que la única fracción que mostro inhibir la proliferación celular en cualquiera de sus concentración fue la fracción de acetato de etilo; además, de esta misma fracción se aislaron metabolitos secundarios como umbeliferona y el cafeato de etilo, los cuales según este autor, han demostrado tener una actividad farmacológica importante sobre células cancerígenas. Estos resultados están en concordancia con lo reportado en el presente estudio donde la fracción de acetato de etilo presentó una disminución en las células proliferativas en fase la mitótica, con la diferencia de que en este proyecto no se realizaron estudios fitoquímicos.

A este respecto Patiño, Prieto y Cuca (2012) han descrito diferentes ensayos que demuestran las propiedades antitumorales de especies del género *Zanthoxylum*, que actúan contra células tumorales en diferentes tejidos y líneas celulares. Por lo que *Z. rigidum* parece preservar dichas propiedades.

Finalmente esta fracción presenta un papel terapéutico relacionado con su capacidad de disminuir el número de células que se encuentran en mitosis, como resultado de la actividad de algunos de estos metabolitos mencionados. Sin embargo, consideramos son necesarios más estudios para determinar el mecanismo molecular por el cual la fracción induce la inhibición del crecimiento en estas células y su posible participación en la regulación de las proteínas implicadas en el control del ciclo celular; además de evaluar su efectividad en otras líneas celulares de cáncer y modelos animales.

El pez cebra como modelo de bioensayos

Los modelos experimentales basados en el uso del pez cebra se caracterizan entre otras cosas, por generar resultados rápidos y reproducibles, lo que hace de ellos organismos de elección para una amplia variedad de pruebas preliminares, como lo son las pruebas de toxicidad (Gasca E., 2015). Convencionalmente las formas embrionarias han sido estandarizadas como una alternativa prometedora para analizar los efectos tóxicos de ciertas soluciones, debido no sólo por la flexibilidad de restricciones legales o a la reducción de costes y residuos (Braunbeck *et al.*, 2005; citado en Yebra-pimentel, 2014) sino también, porque son consideradas como el estado más sensible en el ciclo de vida de un teleósteo, permitiendo llevar a cabo pruebas de sensibilidad respecto a algunas soluciones que despiertan el interés de los científicos, como el realizado en este estudio, donde se utilizaron embriones en la edad del primordio de la cola, para identificar cambios significativos en el fenotipo, hasta la etapa larval.

Así, Saraceni (2017) describe que otra de las características más apreciada del pez cebra es la transparencia de sus embriones y larvas, pues la claridad óptica de las larvas y la disponibilidad de líneas transgénicas que expresan genes fluorescentes útiles para identificar específicamente leucocitos o citoquinas / quimioquinas, permiten el seguimiento, *in vivo* y en tiempo real, de los procesos inflamatorios mediante técnicas de microscopía de fluorescencia, y de este modo, por ejemplo, el uso de patógenos fluorescentes acoplado a las técnicas de imagen de alta resolución permite la observación de todas las interacciones entre el patógeno y el hospedador.

Por otro lado, Gacha-Garay *et al.* (2017) resalta su alta viabilidad para realizar estudios moleculares y genéticos, pues gracias a su fácil manipulación genética, permite manejar/alterar los genes implicados en este procesos importantes como el cáncer, a través de técnicas como recuento mitótico tradicional y el uso de los madores inmunohistoquímicos de proliferación. Por este motivo, se le considera como una buena alternativa para el estudio de cáncer humano, siendo un sistema que simula las condiciones y los aspectos moleculares relacionados con esta patología.

En este estudio consideramos al pez cebra como un modelo experimental adecuado para comprobar la toxicidad, efectos antiinflamatorios y antiproliferativos, dado que cada ensayo en particular permite un acercamiento a la comprensión de los fenómenos biológicos, moleculares y genéticos que ocurren bajo la influencia de ciertas soluciones.

Conclusiones

- La fracción de *Zanthoxylum rigidum* a 25,5 µg/mL no indujo a cambios en el fenotipo, ni generó efectos letales, subletales o teratógenos en las larvas de pez cebra durante las primeras 72 horas del desarrollo, de manera que se determinó como una solución segura y bien tolerada por el modelo biológico.
- *Zanthoxylum rigidum* no ejerce un efecto inhibitorio en la migración de leucocitos en la concentración evaluada, de modo que no reguló los desórdenes inflamatorios.
- Se encontró que la fracción de *Zanthoxylum rigidum* 25,5 µg/mL disminuye significativamente el número de núcleos mitóticos marcados contra la H3 fosforilada en las larvas de pez cebra, por lo que podría modular las moléculas que controlan y regulan el ciclo celular.
- Se exploraron dos actividades biológicas importantes de la planta *Zanthoxylum rigidum*, y se generó información que no había sido reportada antes para esta especie.
- Finalmente, esta investigación constituye un respaldo científico para la medicina herbaria y la industria farmacéutica en la búsqueda de tratamientos alternativos para la inflamación y la proliferación celular.

Observaciones finales

Teniendo en cuenta que no se observó una disminución significativa del número de leucocitos que migraron a la zona de lesión por parte de las larvas expuestas a la fracción de *Zanthoxylum rigidum*, y que la literatura menciona reiteradamente el potencial antiinflamatorio de las especies de este género, resulta interesante conocer el efecto de la fracción aumentando su concentración. Por lo tanto se recomienda realizar ensayos futuros con concentraciones superiores a 25,5 µg/mL.

Con relación a la proliferación celular sugerimos realizar ensayos en otros modelos animales que permitan ampliar el conocimiento de la capacidad de *Z. rigidum* para detener el ciclo celular y así analizar a profundidad su potencial anti proliferativo y antitumoral. Asimismo sugerimos realizar ensayos que permitan dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales la fracción induce la inhibición de la proliferación de las células.

Por último consideramos pertinente determinar la concentración máxima tolerable (CMT) por los embriones y larvas de pez cebra expuestos a la fracción de *Z. rigidum*, con el fin de determinar la concentración más alta en la que no induce a la muerte de los individuos y así generar más información con respecto a la seguridad de esta solución.

Bibliografía

- Armengol, M. (2017). Pez cebra como modelo en investigación biomédica. *ResearchGate*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/322245677_Pez_cebra_como_modelo_en_investigacion_biomedica
- Arteaga, C. (2017). *Evaluación de la actividad anti-inflamatoria mediante modelos experimentales basados en el embrión de pez cebra. Aplicación a compuestos presentes en la alimentación* (Tesis de doctorado). Universidad de Barcelona, España. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10803/457632>
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D., Verdile, G., y Martins, R. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, (69), 4196., doi: 10.3791/4196.
- Avilés, D. (2008). *Efecto antidepresivo y caracterización química de extractos de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de Tilia americana var. Mexicana* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, México. Recuperado de <https://itzamna.bnct.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/3602/EFECTOANTIDEPRESIVO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Barrios, E., y Garau, M. (2017). Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 4(1), 7-161. <https://dx.doi.org/10.25184/anfamed2017.4.1.2>
- Bordés, R., Martínez, M., García, E., y Guisado, R. (2010). *El proceso inflamatorio*. Universidad de Granada. Recuperado de <https://previa.uclm.es/AB/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>
- Campos, D., Omar, C., Saldaña, C., Wilfredo, Á., Espinoza, V., y Arminda, M. (2016). Efecto biocida in vitro de los extractos etanólicos de inflorescencias y plantas de *Piper tuberculatum* sobre larvas del III estadio de *Aedes aegypti* y toxicidad sobre *Artemia salina in vitro*. *Científica Salud y Vida Sipanense*, 3(1), 48–60.

- Cebrián-Torrejón, G., Spelman, K., Leblanc, K., Munoz-Durango, K., Torijano, S., Ferreira, M. E., Rojas, A., Figadere, B., Fournet, A., Maciuk, A., Grellier, P., Cech, N. B. y Poupon E. (2011). The antiplasmodium effects of a traditional South American remedy: *Zanthoxylum chiloperone* var. *Angustifolium* against chloroquine resistant and chloroquine sensitive strains of *Plasmodium falciparum*. *Revista Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(4), 652-661.
- Chou, Z., Chan, H., Peng, H., Liou, M., y Wu, S. (2011). Isolation of substances with antiproliferative and apoptosis-inducing activities against leukemia cells from the leaves of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. & Zucc. *Phytomedicine*, 18, 344-348., doi: 10.1016/j.phymed.2010.08.018.
- Conrejo, M. (2012). *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* (parchita) y su acción cardiotoxica en modelo experimental de pez cebra (*danio rerio*): evaluación morfofuncional (Tesis de pregrado). Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Recuperado de: <http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/15733/1/TRABAJO%20ESPECIAL%20DE%20GRADO.pdf>
- Cordero, C., Gómez-González, S., León-Acosta, C., Morantes-Medina, S., y Aristizabal, F. (2004). Cytotoxic activity of five compounds from Colombian plants. *Fitoterapia*, 75, 225-227., doi: 10.1016/j.fitote.2003.12.017.
- Esper, R., Caldera, B., y Morales J. (2010). Hiervas, medicina herbolaria y su impacto en la práctica clínica. *Revista de Investigación Médica Sur Mex*, 17(3): 124-130.
- Fang, J., Zhao, L., Deng, J., Chen, L., Li, Y., Cui, H.,..., y Deng, H. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. Recuperado de <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Fernández, C. (2015). *Efecto de los extractos etanólico/acuoso de Moussonia deppeana y Justicia spicigera sobre la proliferación y la viabilidad de la línea celular de carcinoma prostático LNCaP* (Tesis de doctorado). Universidad veracruzana. México. Recuperado de <file:///C:/Users/Portatil%20HP/Downloads/para%20el%20trabajo.pdf>
- Fernández-López, J., Fernández-Fidálgo, M., y Cieza, A. (2010). Los conceptos de calidad de vida, salud y bienestar analizados desde la perspectiva de la clasificación internacional del funcionamiento (CIF). *Revista Esp Salud Pública*, 84,169-184.

- Ferreira, M., Nakayama, H, de Arias, A., Schinini, A, de Bilbao N., Serna, E., Lagoutte, D., Soriano-agaton, F., Poupon, E., Hocquemiller, R. y Fournet, A. (2007). Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Revista Ethnopharmacol*, 109, 258-263.
- Gacha-Garay, M., Akleb, V., Encisocy, L., Garavito, V. (2017). La leucemia linfoblástica aguda y modelos animales alternativos para su estudio en Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. 21(4): 212-224.
- Galindo, C. (2013). *Evaluación in vitro e in vivo del potencial bioactivo sobre neuroprotección y obesidad de un extracto del olivo* (Tesis de doctorado). Universidad Miguel Hernández de Elche, España. Recuperado de <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/1558/7/Tesis%20Veciana%20Galindo.pdf>
- Galindo, C., Castell, E., Montell, T., Segura, E., Baezam M., y Guillén V. (2014). Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Revista Nutrición Hospitalaria*, 29(6) ,1388-1393.
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(4), 327-32.
- Gasca, E. (2015). *Evaluación del potencial anticonvulsivante y ensayos de toxicidad de la 5H-dibenzo (b, e) azepin-6,11-diona y la dibenzo (b, f) (1,4) diazocin-6,11(5H, 12H)-diona* (Tesis de pregrado). Universidad Veracruzana, México. Recuperado de <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/42520/GascaPerezEloy.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- González-García, K., Vélez-Castro, H., Nuevas P. L., Márquez, M. L., Garrido-Garrido, G. y González-Lavaut, J. A. (2008). Aislamiento y efecto antiinflamatorio de un alcaloide de *Zanthoxylum elephantiasis* Macf (Rutaceae) introducida en Cuba. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(5), 264 – 267.
- Guegués, J. (2017). Proliferación celular y regulación de la telomerasa en cáncer de mama. (Tesis de doctorado). Universidad de Málaga. Málaga, España. Recuperado de https://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/16368/TD_GUEGUES_SILVA_DIAS_Joao_Jose.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Guendéhou, F., Kènou, B., y Assogbadjo, C. (2018). Scholars Journal of Research in Agriculture and Biology Review of Studies Onzanthoxylum Zanthoxyloids (Lam): Availability and Ethnomedical Phytochemical. *Scholars Journal of Research in Agriculture and Biology*, 3(3), 244–254.
- Hans, F., y Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell división. *Oncogene*, 20, 3021–3027. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/1204326>
- Harris, C., y Hansen, J. (2012). *Developmental Toxicology, Methods and Protocols*. New York, United States: Editorial Springer Science Business Media.
- Jaimes, J. (2009). *Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de los extractos en petrol y en etanol de hojas y corteza de la planta Bursera tomentosa (jacq) tr. & pl*, (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Kadirkamanathan V, Anderson SR, Billings SA, Zhang X, Holmes GR, Reyes-Aldasoro CC, *et al.* (2012). The Neutrophil's Eye-View: Inference and Visualisation of the Chemoattractant Field Driving Cell Chemotaxis In Vivo. *PLOS ONE*, 7(4), Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035182>
- Katiuce, S., da Silva, V., Augusto, E., y Teixeira, P. (2009). Estudio fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. Ex Willd (Rutaceae). *Química Nova*, 32(1), 131-133.
- Kuetea, V., Krusche, B., Youns, M., Voukeng, I., Fankama, A. G., Tankeo, S., Lacmata, S., y Efferth, T. (2011). Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 803-812. ISSN: 0378-8741.
- León-Regal, M., Alvarado Borges, A., de Armas García, J., Miranda Alvarado, L., Varens Cedeño, J., y Cuesta del Sol, J. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Revista Finlay*, 5(1), 47–62. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222124342015000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Lozada, J., Palmeros, B., Ramírez, M., y Fernández, M. (2012). El pez cebra: una especie modelo. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana*, 19(1). Recuperado de <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num1/articulos/pez/>

- Lucetti, D. L., Lucetti, E. C. P., Bandeira, M. A. M., Veras, H. N. H., Silva, A. H., Kalyne, L., y Viana, G. B. (2010). Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart) Plumel. *Journal of Inflammation*, 7(1), 60., doi: <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-60>.
- Macías Peacock, Beatriz, Suárez Crespo, Maykel Fernando, Berenguer Rivas, Clara Azalea, y Pérez Jackson, Liliana. (2009). Intoxicaciones por plantas tóxicas atendidas desde un servicio de información toxicológica. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962009000200006&lng=es&tlng=es
- Macías, V., Cuca, L., y Jiménez, K. (2007). Usos en medicina folclórica, actividad biológica y fitoquímica de metabolitos secundarios de algunas especies del género *Zanthoxylum*. *Revista Internacional de Ciencias de la Salud*, 4(2), 140-159.
- Mendieta-Serrano, M. A., Schnabel, D., Lomelí, H., y Salas-Vidal, E. (2013). Cell Proliferation Patterns in Early Zebrafish Development. *Anatomical Record*, 296(5), 759–773. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/ar.22692>
- Mendiola, J., Fernández-Calienes V., Monzote, L., García, M., Sario, I., Acuña, D., Scull, R., y Gutiérrez, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 254-258. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000300009&lng=es&tlng=es.
- Montoya, G., Parra, M., y Gomez, B. (2011). Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspectivas de Nutrición Humana*, 11, 27-38.
- Moreno, M. (2013). *Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (Danio rerio)* (Tesis de pregrado). Universidad del País Vasco, Lejona, España. Recuperado de <https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/10642/TFG.%20Pez%20cebra.docx.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T., y Mitchison, T. J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, 459(7249), 996–999., doi: 10.1038/nature08119.

- Ngoumfo, R., Jouda, J., Mouafo, F., Komguem, J., Mbazoa, C., Shiao, T., Choudhary, M., Laatsch, H., Legault, J., Pichette, A., y Roy, R. (2010). In vitro cytotoxic activity of isolated acridones alkaloids from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. Et Perr. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3601-3605., doi: 10.1016/j.bmc.2010.03.040.
- Ocampo, G. (2019). *Estudio biodirigido de la actividad anticancerígena de fracciones y compuestos fenólicos de la corteza de Zanthoxylum rigidum (Rutaceae)* (Tesis de pregrado). Universidad del Quindío, Colombia.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. OMS. Recuperado de: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Cáncer. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Pascual, D., Pérez, Y., Morales, I., Castellanos, I., y González, E. (2014). Historia de la medicina: algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *Revista Médica de Santiago de Cuba*, 18(10), 1444.
- Patiño, J., Prieto, A., y Cuca, E. (2012). *Zanthoxylum* Genus as Potential Source of Bioactive Compounds. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, 185-210., doi: 10.5772/26037.
- Patiño, J., y Cuca, E. (2007). Estudio fitoquímico de la especie *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). *Scientia et Technica*, (33), 169–184. Recuperado de <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6101/3271>
- Peñaherrera, E., Jerves-Andrade, L., Cuzco, N., Wilches, I., León-Tamariz, F., y Tobar, V. (2016). Efecto antiinflamatorio de extractos metanólicos de plantas de Azuay y Loja (Ecuador) a través del modelo de Peces Cebra. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 14, 1390-1869. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/c752/db293a96743ff96bd55611f93be4bc5271ed.pdf>
- Prieto, J. (2012). *Estudio fitoquímico de Compsonera capitellata (Myristicaceae), Zanthoxylum rigidum (Rutaceae) y Ocotea longifolia (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de Sitophilus sp* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/11391/1/198020-2012.pdf>

- Rocha, A., Ruíz, S., y Coll, J. (2002). Método sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra. *Revista Producción Agraria: Producción y Sanidad Animales*, 17(1-2), 93-103. Recuperado de http://www.inia.es/gcontrec/pub/rocha2_1161097533500.pdf
- Rodríguez, L., Hernández, E., y Reyes, J. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada*, 21, 60–69.
- Saraceni, P. (2017). Zebrafish (danio rerio) as infection model to study the pathogenesis of the bacteria aeromonas hydrophila. (Tesis de doctorado). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11093/918>
- Spirita, V., y Ahila, J. (2015). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish Danio rerio (Hamilton). *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 3(6), 06-11.
- Valdés-Izaguirre, Lázaro Eduardo, Arias-Cedeño, Quirino, Ramírez-Arzuaga, Jorge, y Peña-Fuentes, Dilver. (2018). Actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de extractos etanólicos de *Jatropha aethiopica* Müell Arg var *inermis*. *Revista Cubana de Química*, 30(3), 440-453. Recuperado en 06 de septiembre de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212018000300005&lng=es&tlng=es.
- Yang, Y., Zheng, K., Mei, W., Wang, Y., Yu, C., Yu, B... y Hu, J. (2018). Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an in vivo zebrafish model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(2), 763–769. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.071>
- Ye, B., Xiong, X., Deng, X., Gu, L., Wang, Q., Zeng, Z... Wang, Y. (2017). Meisoindigo, but not its core chemical structure indirubin, inhibits zebrafish interstitial leukocyte chemotactic migration. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 673–679. Recuperado de <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1238949>
- Yebra-pimentel, E. S. (2014). *Toxicidad de nanotransportadores basados en ácido hialurónico en embriones de pez cebra* (Tesis de maestría). Universidad de Da Coruña, España. Recuperado de https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/13981/SantidrianYebraPimentel_Elena_TFM_2014.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., y Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, 21(5), 559, Recuperado de <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>

Anexos

Anexo 1. Ficha de ingreso de *Zanthoxylum rigidum* al Herbario de la Universidad del Quindío



HERBARIO UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO- HUQ

Zanthoxylum rigidum (Hum & Bonpl.ex).

Doncel

Rutaceae

Árbol de 10m de altura y 24cm de diámetro. De corteza áspera con muchas fisuras longitudinales de color pardo. Tronco recto. Las hojas son apareadas y pinnadas de gran tamaño de color verde oscuro.

Reserva Natural la Montaña Del Ocaso. Departamento de Quindío, Quimbaya, Quindío.

Alt. 970 m

N° 0016

11/07/2014

G. Ramos.

Anexo 2. Aval ético y bioético de la Universidad del Quindío.



Armenia, julio 04 de 2019.

Profesora: Marleny Salazar – Facultad de Ciencias de la Educación

Asunto: Concepto del CEBIUQ al proyecto de Investigación

Estimada profesora: cordialmente le informo que una vez revisados los aspectos Éticos y Bioéticos del proyecto de investigación titulado: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE UNA FRACCIÓN DE PLANTA (*Zanthoxylum rigidum*) EN EL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)”**, estos se encuentran bien sustentados al interior del mismo y se evidencia su pertinencia. Por lo anterior, el Comité decidió otorgarle el aval para la convocatoria en mención.

Aval ético y bioético otorgado y registrado en el Acta Nro 03 de marzo 14 de 2019.

Cordial saludo,

Enf. Mg. Carmen Aydé Fernández Rincón

Presidente Comité de Ética y Bioética de Investigación - CEBIUQ

Creado mediante Resolución 0546 del 17 de junio de 2014

e-mail: cebiuq@uniquindio.edu.co

Elaboró: Yaneth Cruz C

Anexo 3. Protocolo de preparación de la tricaina.

La tricaina (éster etílico del ácido 3-aminobenzoico, también llamado 3-aminobenzoato de etilo) viene en forma de polvo, y se preparó siguiendo las indicaciones de la 4ta edición de The Zebrafish Book, en donde se requieren:

-400 mg de polvo de tricaina

-97,9 ml de agua DD

-2,1 ml de Tris 1 M (pH 9).

Estos reactivos se mezclaron, se ajustó el pH a 7 y una vez preparada esta solución, se almacenó en el congelador a -20°C . Por otro lado, para utilizarla como anestésico, se combinaron 4,2 ml de tricaina en 100 ml de agua o solución stock de Hank's (4,2%).

Anexo 4. Protocolo de preparación de la solución stock de Hank's.

La Solución stock de Hank's o medio de embriones (ERM) contiene buffer y sales que permiten el metabolismo y desarrollo normal del embrión.

Inicialmente se deben realizar las siguientes diluciones:

-Stock 1: 8,0 g de cloruro de sodio (NaCl), 0,4 g de cloruro de potasio (KCl), en 100 ml de agua.

-Stock 2: 0,358 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4), 0,60 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4), en 100 ml de agua.

-Stock 4: 0,72 g de cloruro de calcio (CaCl_2) en 50 ml de agua.

-Stock 5: 1.23 g de sulfato de magnesio (MgSO_4) en 50 ml de agua.

-Stock 6: 0,35 g de Bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 10 ml de agua

Una vez realizadas las soluciones stock iniciales, se procedió a mezclar en un tubo falcon™ de 50 mL los siguientes volúmenes:

-95,9 mL de agua doble destilada (dd),

-1,0 ml de Stock 1

-0,1 ml de Stock 2

-1,0 ml de Stock 4

-1,0 ml de Stock 5

-1,0 ml de Stock 6.

-0,24 g de HEPES

Por último se añadió hidróxido de sodio (NaOH) 1M para completar un pH de 7,2.

Anexo 5. Protocolo de preparación de paraformaldehído (PFA) 4%.

Inicialmente se preparó el amortiguador fosfato salino (PBS) 10X con pH de 5,5. Para ello se realizó la mezcla en una botella de vidrio con tapón de rosca, añadiendo 10,8 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4), 6 g de fosfato monosódico (NaH_2PO_4), 80 g de cloruro de sodio (NaCl) y 2 g de cloruro de potasio (KCl) disueltos en 1 litro de agua.

Posteriormente se utilizó una solución de PBS 1X, la cual se calentó hasta alcanzar los 60°C, y se le disolvieron 4g de PFA en polvo. Se mezcló con el agitador magnético hasta que la solución se tornara translúcida y se realizaron alícuotas de 1 mL para almacenar a -20°C.