

## Efecto de *Campyloneurum phyllitidis* (L.) C. Presl y de *Asplenium serratum* L. sobre el desarrollo embrionario de *Danio rerio*

Benítez Acuña, J.A.<sup>1-3</sup>; Ibarra, P<sup>2</sup>; López, T.<sup>4</sup> y Segovia, E.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Hidrobiología. San Lorenzo, Paraguay

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Laboratorio de Química y Toxicología. San Lorenzo, Paraguay

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Laboratorio de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay

<sup>4</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biotecnología Ambiental

\*E-mail del autor: edith.segovia@cemit.una.py; edaluz@gmail.com

**Evaluación de *Campyloneurum phyllitidis* (L.) C. Presl y de *Asplenium serratum* L. sobre el desarrollo embrionario de *Danio rerio*.** Las plantas de uso medicinal *Campyloneurum phyllitidis* y *Asplenium serratum* se utilizan en la medicina popular como abortivas. El objetivo de este trabajo fue evaluar los extractos acuosos de *Campyloneurum phyllitidis* y *Asplenium serratum* sobre el desarrollo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*) para determinar sus posibles efectos tóxicos. Se utilizaron huevos de 4 hpf (horas pos fecundación) y cuatro concentraciones (0,03%, 0,06%, 0,125% y 0,25%) de extracto de cada planta medicinal, como control positivo se utilizó cafeína 2,4 mM; se los expuso por cinco días y se evaluaron parámetros agrupados en tres categorías: Efecto letal (coagulación de los embriones), efecto subletal (ausencia de formación de los somitas, latidos cardiacos, circulación sanguínea, pigmentación, eclosión, formación de edema, retardo del desarrollo) y efecto teratogénico (deformación de la columna vertebral). En la evaluación de *C. phyllitidis* se observó que el efecto letal fue significativo a las dosis de 0,125 y 0,25%, no se observó algún efecto subletal o teratogénico significativo, ya que entre el 90% y el 100% de los embriones, respectivamente, coagularon. En la evaluación de *A. serratum* se observó que el efecto letal fue significativo a la dosis de 0,25%, los efectos subletales fueron significativos a 0,06 y 0,125% (ausencia de somitas, ausencia de latidos, ausencia de circulación y ausencia de pigmentos); el efecto teratogénico no fue significativo. *C. phyllitidis* presentó un efecto letal (coagulación del embrión), mientras que *A. serratum* presentó efectos significativos sobre el desarrollo, además se registró efecto teratogénico, no significativo.

**Palabras clave:** Plantas medicinales, teratogénesis, *Danio rerio*

**Evaluation of *Campyloneurum phyllitidis* (L.) C. Presl and *Asplenium serratum* L. on the embryonic development of *Danio rerio*.** The medicinal plants *Campyloneurum phyllitidis* and *Asplenium serratum* are used in popular medicine as abortifacient. The aim of this work was to evaluate the aqueous extracts of *Campyloneurum phyllitidis* and *Asplenium serratum* L. on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) to determine their possible toxic effects. Eggs of 4 hpf (hours after fertilization) and four concentrations (0.03%, 0.06%, 0.125% and 0.25%) of each medicinal plant were used; 2.4 mM caffeine was used as a positive control. They were exposed for five days, and parameters grouped into three categories were evaluated: Lethal effect (embryo coagulation), sub-lethal effect (absence of somite formation, heartbeat, blood circulation, pigmentation, hatching, edema formation, developmental delay), and teratogenic effect (deformation of the spine). In the evaluation of *C. phyllitidis* it

was observed that the lethal effect was significant at the doses of 0.125 and 0.25%, no significant sub-lethal or teratogenic effect was observed, since between 90% and 100% of the embryos, respectively, coagulated. In the evaluation of *A. serratum* it was observed that the lethal effect was significant at the dose of 0.25%, the sub-lethal effects were significant at 0.06 and 0.125% (absence of somites, absence of heartbeats, absence of circulation and absence of pigments); the teratogenic effect was not significant. *C. phyllitidis* had a lethal effect (embryo coagulation), while *A. serratum* had significant effects on development, and a non-significant teratogenic effect was also recorded.

**Keywords:** Medicinal plants, teratogenesis, *Danio rerio*

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son utilizadas por el 80% de la población mundial (Soares-Bezerra *et al.*, 2013). Entre estos usos se encuentra el control de la fertilidad humana, donde extractos de plantas medicinales producen efectos como inhibición de la ovulación, la implantación del óvulo, actúa como emenagogo, entre otros efectos (Kumar *et al.*, 2012).

*Campyloneurum phyllitidis* (L.) C. Presl. Pertenece a la familia Polypodiaceae, es una hierba epífita o terrestre; presenta rizomas cortos, escamosos; peciolo corto; lámina monomorfa, entera, coriácea, glabra, venas areoladas, soros circulares, sin indusio, en varias filas entre la costa y el margen; se distribuye desde Estados Unidos hasta Bolivia y Brasil (Peña-Chocarro *et al.*, 1999), en el Paraguay se encuentra en los departamentos de Alto Paraná, Central, Cordillera, Itapúa y Paraguari, (Pin *et al.*, 2009).

*Asplenium serratum* L. es una planta de uso medicinal, pertenece a la familia Aspleniaceae, es una especie epífita, a veces terrestre, con hojas simples, soros en líneas continuas paralelas a los nervios de las hojas, que comúnmente crece sobre troncos muertos (Fundación Moisés Bertoni, 2006) y se distribuye desde el sur de Florida hasta Argentina y Para-

guay (Peña-Chocarro *et al.*, 1999). Presenta rizomas erectos, robustos, cortos a medianos cubiertos densamente por escamas castañas a castaño-oscuros, lanceoladas, con ápice agudo a largamente acuminado, en el ápice del rizoma y la base de los peciolos (Ponce *et al.*, 2016). Presenta 5-20 frondes por rizoma, erectas, fasciculados, generalmente en roseta; peciolos cortos, de 2-7 cm de largo, surcados adaxialmente, no alados, pardo-verdosos en el lado adaxial a pardo oscuros en el abaxial. Láminas simples, enteras, lanceoladas, de 20-110 x 4-16 cm, atenuadas hacia la base, ápice acuminado, margen subentero a aserrado, cartáceas, verde claras a oscuras, con escasas escamas sobre la costa, costa nigrescente. Soros cercanos a la costa, paralelos, lineares, de 5-50 mm de largo; indusios lineares, membranáceos a coriáceos, hialinos. Esporas de 40-43 x 28-30  $\mu\text{m}$ , con perisporio alado-dentado, con abundantes pliegues parcialmente fusionados, perforaciones ocasionales (Ponce *et al.*, 2016). Ambas especies, anteriormente descritas, son utilizadas, en el Paraguay, como abortivos (Fernández *et al.* 1999) (Figura 1); el extracto acuoso de *C. phyllitidis* también se utiliza como antiinflamatorio, expectorante, en la medicina popular (Pin *et al.*, 2009, Degen de Arrúa *et al.* 2014). En un trabajo realizado por Fernández *et al.* (1999),

se analizó la acción de *Campyloneurum phyllitidis* y *Asplenium serratum* sobre el ciclo replicativo celular utilizando como modelo de estudio *Allium cepa* L., donde *Asplenium serratum* redujo el in-

dice mitótico concluyendo que es ciclo activo a diferencia de *Campyloneurum phyllitidis*, el cual no mostró diferencias significativas.



**Figura 1.** A) *Asplenium serratum*. B) Detalle de soros de *Asplenium serratum*. C) *Campyloneurum phyllitidis*. D) Detalle de soros de *Campyloneurum phyllitidis*

El ensayo en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), es de fácil mantenimiento, económica y podría reducir el uso de animales en la investigación (Yang *et al.*, 2009). No existen reportes, de las especies descritas, de datos sobre sus efectos secundarios tóxicos, en mamíferos u otros organismos. Los ensayos biológicos son herramientas de evaluación del potencial tóxico, ya que estos son adecuados para la determinación del efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Castillo Morales y Morales, 2004). El pez cebra (*Danio rerio*) es un vertebrado de la clase Actinopterygii, de la familia Cyprinidae que se distribuye ampliamente por el sudeste asiático (India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistan) (Espinosa, 2016). Es de tamaño pequeño, de fácil manejo en el laboratorio, genera un elevado número de proge-

nie y se ha convertido en un modelo importante, principalmente para los estudios genéticos (Pierce, 2010). Embriones de pez cebra (*Danio rerio*) se utilizan como modelo de estudio del efecto de agentes químicos, físicos o biológicos sobre el desarrollo embrionario inicial en vertebrados (OECD, 2013) y puede ser utilizado para evaluar extractos acuosos de plantas de uso medicinal (Zainol Abidin *et al.*, 2020; Thiagarajan *et al.*, 2019). De acuerdo con Nagel (2002), los parámetros evaluados en *Danio rerio* pueden ser letales, sub letales o teratogénicos y los mismos fueron utilizados en este trabajo. Considerando el uso en el control de la natalidad de ambas plantas descritas, y ante la falta de estudios sobre el desarrollo embrionario, el objetivo de este trabajo fue analizar el potencial tóxico de los extractos acuosos de estas especies en embriones del modelo biológico, el pez cebra, mediante la evalua-

ción de parámetros letales, sub letales y/o teratogénicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los ejemplares de estudio fueron colectados del vivero etnobotánico-medicinal del Jardín Botánico de la ciudad de Asunción (25°14'45,4''S, 57°34'11,6''W), en el mes de octubre de 2017. Se colectaron hojas de varios individuos de cada especie. Las especies se encontraban en un jardín cultivado de suelo arenoso, con media sombra, de hábito terrestre y presentaban hojas fértiles. Se depositó un ejemplar de cada especie, en el herbario de FACEN-UNA (Colectas 01 y 02. Benítez Acuña, J.A).

### Extracción acuosa de *C. phyllitidis* y *A. serratum*

Las hojas de ambas especies se congelaron en nitrógeno líquido y se licuaron en una licuadora industrial para obtener partículas pequeñas. Se utilizaron 76,4 g de hojas de *C. phyllitidis* y 153,7g de hojas de *A. serratum*. Las hojas fueron pulverizadas y se agregó, a cada muestra, 1,5L de agua destilada que se calentó evitando la ebullición, luego se filtró, y las infusiones fueron concentradas mediante evaporación en un rotavapor EYELA SB-1000. Se almacenó a -20°C cada muestra, hasta la liofilización en un Liofilizador LABCONCO FreeZone.

### Mantenimiento de pez cebra

Los peces fueron obtenidos de acuarios comerciales y se aclimataron por 3 meses en el Laboratorio de Hidrobiolo-

gía del Departamento de Biología (FACEN-UNA). La temperatura promedio en cada pecera fue de 28°C y pH de 8.

### Obtención de huevos fecundados

Para la obtención de los huevos se separaron parejas de 2x2 (dos hembras y dos machos) un día antes de la colecta de los huevos, que fueron recogidos utilizando una pipeta Pasteur y examinados bajo microscopio óptico con un aumento de 40x para descartar los huevos no fecundados o los que se encuentren en mal estado. Los huevos fueron expuestos a las 6 horas pos fecundación. La dilución de las concentraciones de cada extracto evaluadas se realizó en Medio para Embrión.

### Medio para embrión utilizado

Solución: (0,358 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro) y 0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mL H<sub>2</sub>O (1%), 8 g NaCl y 0,4 g KCl, 100 mL H<sub>2</sub>O (1%), 0,35 g NaHCO<sub>3</sub>, 10 mL H<sub>2</sub>O (1%), 1,23 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mL H<sub>2</sub>O (1%), 0,72 g CaCl<sub>2</sub>, 50 mL H<sub>2</sub>O (1%), 95,9 mL de agua) (Westerfield, 2000).

### Exposición de los embriones a los extractos

Para el ensayo de toxicidad se tuvo en cuenta la guía de ensayo 236 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, 2013) y al protocolo propuesto por Martínez-Jerónimo & Espinosa Chávez, (2008).

### Tratamientos

Los huevos fueron expuestos a cuatro concentraciones en placas de 96 pocillos, utilizándose 10 pocillos por con-

centración, con un huevo por pocillo, en 200µL. Las concentraciones analizadas fueron 0,03; 0,06; 0,125 y 0,250% de cada planta, peso/200 µL. Como control negativo se utilizó el medio embrión y como control positivo cafeína (2,4 mM), diluido en el mismo medio. El ensayo se realizó por triplicado, tomando como réplica una placa con las 4 concentraciones de prueba y los dos controles, 10 huevos por tratamiento, 60 por placa para cada planta. Las réplicas se realizaron en diferentes tiempos. Todos los embriones fueron controlados a las 24, 48, 72, 96 y 144 horas en microscopio óptico con un aumento de 40x y se registraron las observaciones de los efectos; coagulación-efecto letal (24 y 48 h) y ausencia de somitas (24hpf), ausencia de latidos y de circulación (48 hpf), ausencia de pigmentos y formación de edema (72 hpf), deformación de la columna (96 y 144

hpf), de acuerdo a Nagel (2005).

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y el Test de Tukey, utilizando el software para el análisis estadístico (SPSS 21), considerando estadísticamente significativo un valor  $P \leq 0,05$ .

### RESULTADOS

Para evaluar el efecto tóxico del extracto acuoso de *C. phyllitidis*, y de *A. serratum*, en embriones de pez cebra fueron tratados con 4 concentraciones de cada extracto. Los efectos fueron evaluados a las 24, 48, 72, 96 y 144 hpf, tiempos donde se pueden observar efectos letales, subletales y teratogénicos (Figura 2).



**Figura 2.** Desarrollo normal del embrión de *Danio rerio* en medio embrión (Control negativo) en 6 tiempos, control positivo y tratado con *C. phyllitidis*: A) 4 hpf; B) 24 hpf; C) 48 hpf; D) 72 hpf; E) 96 hpf; F) 144 hpf. G) deformación de la columna vertebral y formación de edema, 72 hpf (Cafeína: control positivo). H) Huevo coagulado, 24 hpf (*C. phyllitidis* 0,06%)

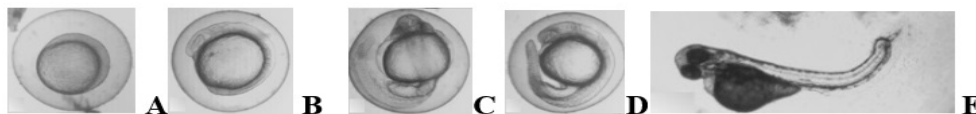
En la Figura 2 se pueden observar los distintos estadios normales de las primeras 144 hpf (horas pos fecundación) del control negativo, mantenido en el Medio para Embrión. En la Figura 2.A se observa un huevo de 4 hpf, al momento de iniciar el ensayo; en 2.B se observa un embrión de 24 hpf, la presencia de somitas y la ausencia de pigmentación; en 2.C, a las 48 hpf, se observa la presencia de pigmentación en los ojos y el cuerpo, además se registran otros parámetros

como como el latido cardiaco y la circulación sanguínea, no posibles de visualizar en fotografías; en 2.D, a las 72 hpf, se produce la eclosión de los embriones, en 2.E y 2.F se puede observar mayor cantidad de pigmento y menor tamaño del vitelo, además un tamaño general superior. En la Figura 2.G se observa el efecto del tratamiento de un embrión con cafeína (control positivo), donde el embrión presenta una deformación de la columna y la formación de edema. Varias

drogas como la cafeína producen retardo en el desarrollo, se observan los efectos de la cafeína a una concentración de 2,4 mM y se puede apreciar una curvatura en la columna vertebral y un doblamiento de la cola además de la formación de edema, en los embriones pertenecientes a este grupo no se registró circulación sanguínea. Los tratamientos con *C. phyllitidis* tuvieron un efecto letal sobre los embriones de *D. rerio*. En la Figura 2.H se observa un huevo coagulado (efecto letal), tratado con la menor concentración de *C. phyllitidis*. La letalidad aumentó a concentraciones mayores, registrándose diferencias significativas en los tratamientos de 0,125% y 0,25%. El 100% de los huevos coagularon en la concentración de 0,25%. Los números indican la cantidad de huevos coagulados en cada grupo experimental, por triplicado. La menor cantidad de huevos coagulados se observó en los embriones del control negativo y el número mayor, 100%, en el tratamiento de concentra-

ción 0,25%, tanto a las 24 como 48h. No se observó importante diferencia entre los días, es decir, a las 24 hpf resulta letal en forma definitiva, solo en el tratamiento de concentración 0,125% se observó una variación (datos no mostrados). En la evaluación de los efectos sub letales, los parámetros evaluados resultaron no significativos (Tabla 1).

En la Figura 3 se observan los efectos de los tratamientos, con diferentes concentraciones, de *A. serratum*. En 3.A se observa un embrión sin formación de somita. En la Figura 3.B se observa un embrión de 24 hpf con retardo en el desarrollo y retardo en la formación de somitas, al compararlo con el control negativo (1.B) (Figura 2B), en 3.C se observa la ausencia de pigmentos, en 3.D se observa la formación de edema y en 3.E se observa la deformación de la columna, que se observó en tres embriones tratados con la concentración más alta del extracto.



**Figura 3.** Efectos letales, subletales y teratogénicos en embriones de *Danio rerio* tratados con diferentes concentraciones de *A. serratum*. A) Ausencia de la formación de somitas, 24 hpf (0,125%); B) Retardo del desarrollo y en la formación de somitas, 24 hpf (0,03%); C) Ausencia de pigmentos, 72 hpf (0,06%); D) Formación de edema, 72 hpf (0,06%); E) deformación de la columna vertebral, 144 hpf (0,06%)

En la Tabla 2 se presenta el resumen de los parámetros evaluados en los diferentes tiempos de estudio de los efectos del extracto acuoso de *A. serratum*. Se agruparon en tres categorías, letal (coagulación, ausencia de la formación de somitas, ausencia de latidos cardiacos), subletal (ausencia de circulación

sanguínea, ausencia de pigmentación y formación de edema) y teratogénico (deformación de la columna vertebral). La coagulación se evaluó a las 24h, resultando no significativa y a las 48h, cuando ya fue significativa y el 100% de los huevos coagularon en el mayor tratamiento. Se observa diferencia sig-

nificativa para los parámetros ausencia de formación de somitas, ausencia de latidos cardíacos, ausencia de circulación y ausencia de pigmentos, con valores significativos a partir de la concentra-

ción de 0,060% (significativo), cuando comparados con el control negativo. Se observaron tres embriones con deformación de la columna, en la concentración de 0,060%.

**Tabla 1.** Efecto letal, subletal y teratogénico de *C. phyllitidis* sobre embriones de *Danio rerio*

Categoría	Parámetro	Controles		Tratamientos			
		C+	C-	0,030	0,060	0,125	0,250
Letal	Coagulación	10/30	2/30	7/30	18/30	27/30*	30/30*
	Ausencia de somita	6/26	0	4/23	0/12	2/6	-
	Ausencia de latidos	2/20	0	0	0	0	-
Subletales	Ausencia de circulación	20/20*	0	0	0/12	2/3	-
	Ausencia de pigmentos	1/20	0	1/23	0/12	1/2	-
	Formación de edema	20/20*	0	0	0	0	-
Teratogénico	Deformación de la columna	20/20*	0	0	0	0	-

C- : control negativo. C+: control positivo. “/”: el efecto se calcula sobre el total (en el caso de coagulación) o sobre los sobrevivientes. \*Estadísticamente significativo

## DISCUSIÓN

Considerando que los extractos acuosos de *C. phyllitidis* y *A. serratum* se utilizan, durante la gestación humana, como abortivos y ambas especies vegetales presentan características similares (Pin *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 1999) y ante el desconocimiento de los efectos

secundarios de las plantas de uso medicinal *C. phyllitidis* y *A. serratum* sobre el embrión, se realizó un estudio de sus posibles efectos tóxicos y teratogénicos en embriones de *Danio rerio*. En un ensayo previo, se evaluaron las posibles concentraciones de estudio, el polvo obtenido de la liofilización de cada extracto se suspendió en el Medio para Embrión, en

*Benítez Rodas, J.A. et.al. Efecto de Campyloneurum phyllitidis y de Asplenium serratum en Danio rerio*

**Tabla 2.** Efecto letal, subletal y teratogénico de *A. serratum* sobre embriones de *Danio rerio*

Categoría	Parámetro	Controles		Tratamientos			
		C+	C-	0,030	0,060	0,125	0,250
Letal	Coagulación	09/30	2/30	4/30	0	6/30	30/30*
	Ausencia de somita	0	0	4/26	23/30*	26/27*	-
	Ausencia de latidos	01/20	0	0	29/30*	24/24*	-
Subletales	Ausencia de circulación	21/21*	0	0	29/30*	24/24*	-
	Ausencia de pigmentos	00/20	0	0	27/30*	24/24*	-
	Formación de edema	21/21*	0	0	6/30	0	-
Teratogénico	Deformación de la columna	21/21*	0	0	3/30	0	-

C- : control negativo. C+: control positivo. “/”: el efecto se calcula sobre el total (en el caso de coagulación) o sobre los sobrevivientes. \*Estadísticamente significativo

concentraciones de 0,5%, 1% y 2,5%, de acuerdo a Fernández *et al.* (1999). Todos los tratamientos resultaron letales a estas concentraciones, por lo que en este trabajo se evaluaron concentraciones menores. El modelo biológico *Danio rerio* se utiliza para evaluar efectos tóxicos o teratogénicos de agentes químicos (Chahardehi *et al.*, 2000; Veeren *et al.*, 2021).

Para la realización de este trabajo se siguieron las guías de la OECD (2013). El extracto acuoso de *C. phyllitidis* es utilizado en la medicina popular, como emenagogo, anticonceptivo y abortivo, expectorante, sedante, antiinflamatorio (Pin *et al.*, 2009; Degen de Arrúa y Gon-

zález, 2014). No se registran en la literatura científica efectos sobre estados patológicos o sobre su uso seguro en individuos sanos o mujeres embarazadas.

En este trabajo evaluamos los posibles efectos tóxicos en embrión de *Danio rerio* a fin de determinar la inocuidad del extracto acuoso de esta planta durante el desarrollo embrionario. Al analizar los embriones del ensayo se observó que los embriones del control negativo presentaron un desarrollo conforme a la literatura, con presencia de pigmentación de los ojos y el cuerpo, latido cardíaco y circulación sanguínea, conforme a los estadios del desarrollo normal de *Danio*



*rerio* (Nagel, 2002), mientras que los resultados obtenidos en los embriones tratados con cafeína (control positivo) coinciden con lo encontrado por Rodríguez *et al.* (2014), que observaron un fenotipo de cuerpo enroscado y retardo en el desarrollo para periodos cortos de exposición. El efecto de extracto acuoso de *C. phyllitidis*, planta de uso medicinal, fue analizado en embriones de *D. rerio* y se observó que el tratamiento no produjo efectos subletales, en ninguna de las concentraciones analizadas. Esto puede ser debido a que la letalidad de las concentraciones evaluadas, no permiten que los efectos subletales se observen (Reimers *et al.* 2004). Se observaron huevos coagulados, a las 24 y 48 hpf, a las concentraciones mayores, siendo este efecto significativo y proporcional al aumento de las concentraciones analizadas. Un huevo se considera coagulado al no observarse ninguna estructura clara en el embrión (Busquet *et al.*, 2008), este parámetro se evaluó a las 24 hpf y 48 hpf y es el único parámetro considerado como letal en el trabajo. Los tratamientos con las diferentes concentraciones resultaron no significativos en los demás parámetros evaluados. Ciertos parámetros como la no formación de los somitas (Figura 3.B), el no desprendimiento de la cola del vitelo o la ausencia de latidos cardíacos se pueden considerar letales luego de las 48 hpf, pero dentro de los ensayos de teratogenicidad para una mejor comparación con mamíferos solo se sugiere el punto final de coagulación como un efecto letal (Nagel, 2002).

En la evaluación de *A. serratum* no se observó ninguna malformación en los individuos del control negativo, se ob-

servó la coagulación de dos embriones (6,6%), que está de acuerdo con las recomendaciones de la OECD (2013). En los tratamientos de embriones con *A. serratum* no se observó un efecto letal significativo, en casi todas las concentraciones evaluadas, excepto la concentración de 0,250%, donde el total de los huevos tratados coagularon, pero el efecto no fue de tipo dosis dependiente. Al evaluarse los efectos subletales se observó que la ausencia de somitas, de latidos cardíacos, de circulación y de pigmentos fue significativa en las concentraciones mayores evaluadas. Los somitas son estructuras que se forman en la primera etapa del desarrollo del pez cebra, componentes del mesodermo y que aparecen a partir de las 10 horas post fecundación (hpf), y de las cuales se derivan el esqueleto axial, los músculos esqueléticos y parte de la dermis (Kimmel *et al.*, 1995; Rojas M. y Smok C., 2014), por lo que la ausencia de los somitas afecta todo el desarrollo del embrión. Las células pigmentadas derivan de la cresta neural, que es una población de células pluripotentes cuya formación ocurre temprano en el desarrollo de los vertebrados (Cedrona *et al.*, 2020), y la ausencia de estas células podría indicar efectos sobre el desarrollo de tejidos. Se observó un efecto teratogénico, no significativo, pero que podría indicar un potencial teratogénico en menores concentraciones. No se ha reportado el perfil fitoquímico de estas especies, por lo que se desconocen las posibles causas de sus efectos. El control positivo, cafeína, utilizado tanto en la evaluación de *C. phyllitidis* como de *A. serratum*, de manera independiente, tuvo efectos subletales,

con ausencia de circulación y formación de edema, que fueron significativos, así como el efecto teratogénico. Autores observaron que el tratamiento con cafeína afecta la angiogénesis en embriones de *D. rerio* (Yeh *et al.*, 2012; Basnet *et al.*, 2021). A este efecto sobre la angiogénesis podrían deberse los efectos observados en los embriones.

## CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de plantas medicinales comercializadas como Kalaguala'i (*Campyloneurum phyllitidis* y *Asplenium serratum*) sobre el desarrollo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*). *C.phyllitidis* presentó un efecto letal (coagulación del embrión), mientras que *A serratum* presentó efectos significativos sobre el desarrollo, además se registró efecto teratogénico, no significativo.

Se recomienda realizar otros estudios, para determinar el perfil fitoquímico de ambas especies y evaluar sus efectos en vertebrados como ratones, para determinar si uno a ambos extractos tiene efectos tóxicos sobre los embriones o comprometen su viabilidad. También se podrían realizar estudios *in vitro* en células humanas para determinar todos los posibles efectos sobre la salud humana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basnet R. M., Zizioli D., Muscò A., Finazzi D., Sigala S., Rossini E., Tobia C., Guerra J., Presta M., & Memo M. (2021). Caffeine Inhibits Direct and Indirect Angiogenesis in Zebrafish Embryos. *Int J Mol Sci. May 3;22(9):4856*. doi: 10.3390/

ijms22094856.

Busquet F., Nagel R., Landenberg F. Von, Mueller S. O., Huebler N., & Broschard, T. H. (2008). Development of a New Screening Assay to Identify Proteratogenic Substances using Zebrafish *Danio rerio* Embryo Combined with an Exogenous Mammalian Metabolic Activation System (m Dar T). *Toxicological Sciences, 104(1)*, 177–188. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn065>.

Castillo Morales, G., & Morales, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=GD7->

Chahardehi A. M., Arsad H., & Lim V. (2000). Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants (Basel). Oct 12;9(10):1345*. doi: 10.3390/plants9101345.

Cedrona V.P., Weinerb A. M. J., Vera M., & Sanchez L. (2020). Acetaminophen affects the survivor, pigmentation and development of craniofacial structures in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochemical Pharmacology 174*. 113816.

Yeh C.H., Liao Y.F., Chang C.Y., Tsai J. N., Wang Y.H., Cheng C. C., Wen C. C., & Chen Y. H. (2012). Caffeine treatment disturbs the angiogenesis of zebrafish embryos. *Drug Chem Toxicol. Oct;35(4):361-5*. doi: 10.3109/01480545.2011.627864. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22313413.

Degen de Arrúa R. y González Y. (2014). Plantas utilizadas en la medicina po-

- pular paraguaya como antiinflamatorias. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(3),213-231.[fecha de Consulta 13 de Mayo de 2021]. ISSN: 0717-7917. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85631010001>.
- Espinosa, M. B. (2016). El Pez Cebra : una herramienta en educación The Zebrafish : A Tool in Education Resumen Introducción, 19, 11–18.
- Fernández V., Desvars N., Diana D., Benítez B., y Joachini J. (1999). Acción de algunas plantas medicinales paraguayas sobre el ciclo replicativo celular. *Revista de Ciencia y Tecnología. vol. 1, f 1*, 17-23.
- Fundación Moisés Bertoni. (2006). Helechos de Tapyta, una guía educativa por jóvenes campesinos de Paraguay. Asunción.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., & Schilling T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn. Jul;203(3):253-310*. doi: 10.1002/aja.1002030302.
- Kumar D., Kumar A., & Prakash O. (2012). Potential antifertility agents from plants: a comprehensive review. *J Ethnopharmacol. 2012 Mar 6;140(1):1-32*.doi: 10.1016/j.jep.2011.12.039. Epub. Jan 5. PMID: 22245754 Review.
- Nagel, R. (2002). DarT : The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *Altex*, 19, 38–48.
- Martínez-Jerónimo F. F., y Espinosa Chávez, F. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*. In Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en Mexico (pp. 167–190). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- OECD. 2013. Fish embryo acute toxicity (FET) test. Test guideline n° 236. Guidelines for the testing of chemicals. Paris: OECD.
- Peña-Chocarro M., Marín G., Jiménez B. y Knapp S. (1999). Helechos de Mbarakayú, una guía de los Helechos de la Reserva Natural del Bosque Mbarakayú, Paraguay. The Natural History Museum. London.
- Pierce B A. (2010). Fundamentos de genética, conceptos y relaciones. Editorial médica panamericana. 1ª edición. España.
- Pin A., González G., Marín G., Céspedes G., Cretton G., Christen P. y Roguet, D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. Asunción, PY: Asociación Etnobotánica Paraguaya.
- Ponce M., Arana M., y Zuloaya F, (2016). Flora Vasculare de la República Argentina. Vol. 2, Licófitas, Helechos, Gymnospermae. 1ª edición. Instituto de Botánica Darwinión.
- Reimers M. J., Flockton A. R., & Tanguay R. L.(2004). 15451041. Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol. Nov-Dec;26(6):769-81*. doi: 10.1016/j.ntt.2004.06.012.
- Rodríguez S., Haugen R., Rueber A., & Huang C. (2014). Reversible neuronal and muscular toxicity of caffeine in developing vertebrates. *Compa-*

- rative Biochemistry and Physiology, Part C, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.03.004>.
- Rojas M. y Smok C. (2014). Modelando el cuerpo del embrión durante el periodo somático. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 1(1):57-62.
- Soares-Bezerra R. J., Calheiros A. S., da Silva Ferreira N.C., da Silva Frutuoso V., & Alves L. A. (2013). Natural Products as a Source for New Anti-Inflammatory and Analgesic Compounds through the Inhibition of Purinergic P2X Receptors. *Pharmaceuticals (Basel)*. Apr 29;6(5):650-8. doi: 10.3390/ph6050650
- Thiagarajan S. K., Rama Krishnan K., Ei T., Husna Shafie N., Arapoc D. J., & Bahari H. (2019). Evaluation of the Effect of Aqueous Momordica charantia Linn. Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. *Evid Based Complement Alternat Med*. May 2;2019:9152757. doi: 10.1155/2019/9152757.eCollection.
- Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U. (2009). Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol*. 2009 Sep;28(2):245-53. doi: 10.1016/j.reprotox..04.013.
- Veeran B., Bringart M., Turpin C., Rondeau P., Planesse C., Ait-Arsa I., Gimmié F., Marodon C., Meilhac O., Gonthier M. P., Diotel N., & Bascands J. L. (2021). Caffeic Acid, One of the Major Phenolic Acids of the Medicinal Plant *Antirhea borbonica*, Reduces Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Biomedicines*. Mar 30;9(4):358. doi: 10.3390/biomedicines9040358.
- Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- Yang L., Ho N. Y., Alshut R., Legradi J., Weiss C., Reischl M., Mikut R., Liebel U., Müller F., & Strähle U. (2009). Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol*. 2009 Sep;28(2):245-53. doi: 10.1016/j.reprotox..04.013. Epub 2009 May 4.
- Zainol Abidin I. Z., Fazry S., Jamar N. H., Ediwar Dyari H. R., Zainal Ariffin Z., Johari A. N., Ashaari N. S., Johari N. A., Megat Abdul Wahab R., & Zainal Ariffin S.H. (2020) The effects of Piper sarmentosum aqueous extracts on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and caudal fin tissue regeneration. *Sci Rep*. Aug 25;10(1):14165. doi:10.1038/s41598-020-70962-7.