

EVALUACIÓN TERATOGENICA Y EMBRIOTÓXICA DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE LA PLANTA MARINA THALASSIA TESTUDIUM

Lic. Eliane de la Torre Núñez¹, Dra. Dalmis Pérez Carrasco, MSc¹, Dra. C. Idania Rodeiro Guerra²

¹ Escuela Latinoamericana de Medicina, La Habana, Cuba.

² Centro de Bioproductos Marinos, CEBIMAR, La Habana, Cuba.

correo electrónico: eliane@infomed.sld.cu

RESUMEN

Los productos naturales con propiedades terapéuticas se utilizan en la medicina tradicional. Una fuente no explorada suficientemente son los organismos marinos. Como línea de investigación, el Centro de Bioproductos Marinos patentó un extracto hidroalcohólico, a partir de las hojas de la *Thalassia testudinum* (BM-21), al cual se le atribuyen propiedades beneficiosas para la salud humana. **OBJETIVO:** Determinar el potencial embriotóxico y teratogénico del extracto hidroalcohólico obtenido de la planta marina *Thalassia testudinum* (BM-21) en ratas Wistar preñadas, mediante su administración oral en el período de organogénesis. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se realizó una investigación experimental donde se evaluó el potencial embriotóxico y teratogénico del BM-21 en ratas Wistar como parte de la evaluación del potencial toxicológico del producto. Se formaron tres grupos experimentales y un control. Se administró vía oral a ratas preñadas desde el día 6 hasta el 15 de la preñez. Se pesaron los días 0, 6, 9, 12, y 15 y el 20 se les practicó eutanasia, se extrajeron los fetos, se analizó peso, talla y ocurrencia de malformaciones externas, viscerales y/o esqueléticas. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** Se encontró disminución de la ganancia de peso materno e incremento de las reabsorciones en ratas tratadas con dosis máxima, cuyos fetos mostraron disminución del peso y talla. No se observaron fetos con malformaciones externas, viscerales y/o esqueléticas en ningún grupo. **CONCLUSIONES:** El extracto hidroalcohólico BM-21 no es teratogénico, ni induce embrioletalidad, pero sí tiene efecto tóxico materno, con el consiguiente efecto embriotóxico, a dosis de 2000 mg/Kg/día, bajo estas condiciones experimentales.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos el conocimiento de los efectos beneficiosos de las plantas fue avanzando paralelamente durante siglos con el estudio de la medicina. El uso de las plantas medicinales estuvo presente desde el inicio en la práctica curativa. Los descubrimientos de las plantas medicinales fueron la mayor parte de las veces, producto de la casualidad, al tener que andar en busca de nuevos alimentos y para ello probar todas las especies botánicas que ofrecía la tierra que habitaban.¹

La literatura define las plantas medicinales como todas aquellas plantas que contienen uno o más principios activos, los cuales, administrados con la dosis adecuada, producen un efecto curativo a las enfermedades del hombre y los animales.² Otros autores las definen como plantas que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias o compuestos químicos que al entrar en contacto con el organismo humano son capaces de actuar sobre determinados procesos morbosos produciendo un efecto terapéutico, o bien servir como materia prima en la producción de medicamentos^{4,5}

El hecho de contener más de un principio activo hace que una planta medicinal pueda servir para tratar diferentes afecciones o trastornos. Estos principios activos se pueden incorporar de muchos modos, dependiendo de que su uso sea interno o externo, de la enfermedad que se busca curar y de las características de la planta misma.^{2,3,5}

La administración de las plantas medicinales y de los productos derivados de estas debe estar acompañada de los máximos cuidados, para garantizar el buen suceso del tratamiento. Contrariamente a la creencia general, los mejores resultados no siempre se obtienen con el uso de las plantas frescas o con preparaciones caseras. El hacer extractos de plantas procesadas permite obtener más principios activos.⁵

Los productos naturales con propiedades terapéuticas han sido utilizados ampliamente en la medicina. Muchos de estos tienen como soporte su uso tradicional, sin que existan datos que científicamente demuestren su utilidad, puesto que el estudio de los mismos es una ciencia relativamente joven. Los extractos de plantas de origen terrestre han representado hasta el presente una de las fuentes de mayor interés potencial para la obtención de fitofármacos. Tal es el caso del extracto estandarizado de las hojas de Ginkgo biloba, de amplio consumo por sus efectos neuroprotectores⁶⁻¹⁰ y el extracto de los frutos de la planta Silybum marianum (Silimarina), también de amplio consumo por sus probados efectos hepatoprotectores.^{11,12}

Una fuente potencialmente útil aún no explorada al máximo son los organismos marinos. Estos, al evolucionar y vivir en condiciones ecológicas únicas y como resultado de su gran diversidad taxonómica en relación a la de los organismos terrestre, pueden sintetizar moléculas que no tienen equivalencia con las encontradas hasta el presente en estos últimos, lo cual puede derivar en la obtención de estructuras químicas novedosas con

efectos farmacológicos *sui generis*.^{13,14} Con el desarrollo de los equipos e implementos de buceo, se ha facilitado la recolección de nuevas especies con disímiles propiedades biológicas, de las cuales se han aislado diversos tipos de metabolitos bioactivos con estructuras químicas novedosas.

Las praderas de fenogramas marinas se distribuyen en el Mar Caribe y Océano Atlántico Occidental Tropical. En Cuba se encuentran en ambas costas. Están presentes en aguas poco profundas y hasta los 25 metros, aunque son más abundantes en fondos arenofangosos, de alto contenido de materia orgánica. Una de las especies que componen estas praderas es la *Thalassia testudinum*¹⁵, la cual muestra una floración común durante todo el año, pero no al mismo tiempo en todas las plantas, y cuyo principal mecanismo de distribución es la propagación vegetativa. Otra de las características de las pradera de *Thalassia testudinum*, conocida también como pasto de Tortuga o seiba, es la velocidad con que almacena energía por su actividad fotosintética (productividad primaria), lo que la ubica entre las más altas de los sistemas y es comparable a los sistemas de cultivo terrestre. Es por ello que se desarrollan en aguas pocas profundas ya que necesitan buena iluminación para poder realizar este proceso de fotosíntesis, aunque en las aguas cubanas debido al alto grado de transparencia se encuentran a mayor profundidad, y han sido observadas *Thalassia* hasta 30 metros.^{16,17}

El Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR) ha desarrollado el tamizaje de numerosos extractos obtenidos de organismos marinos, para determinar aquellos con actividades anti-inflamatorias, analgésicas y antioxidantes.¹⁸⁻²² Uno de los productos desarrollados y patentados es el BM-21, que se obtiene a partir de las hojas secas de la *Thalassia testudinum*. En estudios farmacológicos preclínicos se ha demostrado que este nuevo producto presenta actividad antioxidante, cicatrizante, antiinflamatoria, hepatoprotectora y neuroprotectora.²³

En el curso del desarrollo de nuevos candidatos a fármacos de origen natural, una vez demostrados los efectos farmacodinámicos que sustentan la utilidad potencial del producto como nuevo medicamento, deben ser realizados estudios de toxicología experimental que pongan de manifiesto su toxicidad potencial, y a partir de ahí comenzar los estudios clínicos para constatar si los efectos observados también se manifiestan en los seres humanos.²⁴ El BM-21, de acuerdo a sus propiedades farmacológicas, podría ser utilizado por un amplio espectro poblacional, incluyendo mujeres en edad reproductiva. De ahí que resulta necesario e imprescindible comprobar su inocuidad.

Considerando que en estudios previos el extracto BM-21 no resultó mutagénico en bacterias, ni clastogénico en ratones y, además, que no existen hasta el presente reportes de embriotoxicidad de los componentes del mismo, se realizó el presente estudio bajo la siguiente **hipótesis:**

- La administración del extracto hidroalcohólico obtenido de la planta marina *Thalassia testudinum* (BM-21), con probadas propiedades anti-inflamatorias, citoprotectoras y antioxidantes, no provoca efectos teratogénicos a ratas Wistar.

De manera que se trazó como **objetivo:**

- Determinar el potencial embriotóxico y teratogénico del extracto hidroalcohólico obtenido de la planta marina *Thalassia testudinum* (BM-21) en ratas Wistar preñadas, mediante su administración oral en el período de organogénesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 40 ratas adultas jóvenes vírgenes de la línea Wistar Albina, con una edad promedio de 12 semanas de nacidas, y peso aproximado entre 180 y 200 g, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB); y 20 machos adultos con un peso de 200 a 270 g de la misma línea y procedencia.

Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales. Después de un periodo de aclimatación de 2 semanas, se inició el apareamiento, en horas de la tarde a razón de dos hembras por un macho, determinado aleatoriamente. Al día siguiente se comprobó la cópula mediante smear vaginal con suero fisiológico, tomándose la presencia de espermatozoides en la lámina como día cero de la gestación.

De acuerdo a su día 0 de gestación las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en los distintos grupos (uno control y tres de tratamiento) de 10 ratas cada uno. Las dosis fueron seleccionadas teniendo en cuenta los niveles de dosis que se proponen por las Guías nacionales e internacionales diseñadas para este tipo de estudios²⁵ y los resultados del estudio de toxicidad aguda oral del extracto en ratas, donde quedó demostrado que este producto es seguro y bien tolerado por los animales hasta 2000 mg/kg.²⁶

Se establecieron cuatro grupos experimentales a los que se les administró diferentes dosis del extracto suministrado por el Departamento de Química de CEBIMAR:

1. Grupo Control - Recibió agua destilada (vehículo) bajo las mismas condiciones que los grupos tratados con el producto.
2. Grupo 1 - 500 mg/kg de peso (dosis mínima)
3. Grupo 2- 1000 mg/kg de peso (dosis media)
4. Grupo 3 - 2000 mg/kg de peso (dosis máxima)

Las ratas fueron alojadas en jaulas individuales y debidamente identificadas, y ubicadas en estantes donde las condiciones ambientales se equilibraran al máximo.

La preparación del extracto se realizó diariamente y la administración se realizó por vía oral empleando una cánula curva metálica, desde el día 6 hasta el día 15 de la preñez, coincidiendo con el período de organogénesis, de máxima susceptibilidad a los agentes teratógenos. Las ratas fueron observadas diariamente y pesadas los días 0, 6, 9, 12, 15 y 20 de la gestación.

Posterior a la administración oral del BM-21 los animales fueron observados buscando alteraciones en: piel y mucosas, ojos, sistema nervioso (convulsiones, letargo, somnolencia, coma), sistema circulatorio, sistema locomotor (posiciones extrañas del cuerpo y cola), comportamiento y otros signos como: temblores, trastornos de la respiración, diarrea y muerte.

El día 20 de la preñez las ratas se pesaron y se les aplicó la eutanasia, se les realizó la cesárea y se les extrajo los ovarios y los cuernos uterinos.

Para los estudios de embriotoxicidad, se examinaron macroscópicamente los órganos de las hembras preñadas y se exteriorizaron los cuernos uterinos para comprobar la vitalidad de los fetos. Se realizó examen macroscópico de los fetos para detectar cualquier anomalía estructural o cambios patológicos que pudieran influenciar la preñez.

Se registraron los siguientes datos de cada camada:

- Números de cuerpos lúteos en los ovarios.
- Números de implantaciones.
- Reabsorciones tempranas y tardías.
- Fetos vivos y muertos.

Con estos datos se calculó el índice de implantación y el índice de reabsorción de la siguiente forma:

Índice de implantación (%) = $\text{Implantes} / \text{Cuerpos Lúteos} \times 100$

Índice de reabsorción (%) = $\text{Reabsorciones} / \text{Implantes} \times 100$

Para realizar los estudios teratogénicos, se obtuvieron los fetos vivos, se lavaron con suero fisiológico y secaron con papel de filtro, se les tomó el peso en gramos (g), y la talla, desde el vértice del hocico hasta el final de la cola, en milímetros (mm). Fueron examinados minuciosamente en busca de anomalías o malformaciones externas. Además se realizó examen de las placentas, que incluyó el peso y las características físicas.

Una parte de los fetos se fijó en solución Bouin para ser analizados, usando la técnica modificada de los cortes de Wilson²⁷, por observación directa en el microscopio estereoscópico en busca de malformaciones viscerales y al resto se les realizó estudio esquelético, empleando la técnica de tinción doble con rojo alizarina y azul alcian, para la determinación de malformaciones óseas utilizando la técnica de Dawson, 1926.²⁸

Para expresar los resultados del estudio se emplearon variables morfométricas y morfológicas:

Variables morfométricas

- **Peso de la madre:** peso de la rata obtenido en los días 0, 6, 9, 12, 15 y 20 del experimento expresado en gramos.
- **Peso:** peso del feto en el momento del nacimiento y expresado en gramos.
- **Talla:** medida del feto desde el vértice del hocico hasta el final de la cola sobre un papel milimetrado.

Variables morfológicas

- **Número de cuerpos lúteos:** Total cuerpos lúteos gravídicos presentes en cada ovario observados a través del microscopio estereoscópico.
- **Número de implantaciones:** Total de implantaciones observadas a simple vista en cada cuerno uterino una vez abiertos.
- **Reabsorciones:** embriones implantados con desarrollo insuficiente, en etapas embrionarias tempranas o más avanzadas, observados a simple vista (expresados en número).
- **Fetos vivos:** fetos que una vez extraídos del cuerno uterino responden a estímulo manual con la ayuda de una pinza. (Se expresa en número).
- **Fetos muertos:** fetos que una vez extraídos del cuerno uterino no responden a estímulo. (Se expresa en número).
- **Malformaciones externas:** todo tipo de alteraciones macroscópicas presente en el feto una vez extraídos de la cavidad amniótica y observada a simple vista.
- **Malformaciones viscerales:** alteraciones macroscópicas presentes en cualquiera de los órganos internos del feto, observadas en el microscopio estereoscópico, después de la técnica aplicada.
- **Malformaciones esqueléticas:** alteraciones presentes en cualquiera de los componentes del sistema esquelético del feto, observados a simple vista, después de la técnica aplicada.

Todas las acciones llevadas a cabo con los animales siguieron las normas éticas, emitidas por el Consejo Canadiense al efecto, las cuales están reflejadas en la "Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación"²⁹

Los datos obtenidos fueron recogidos de forma manual y registrados en una base de datos. El procesamiento estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS, versión 11.5.

Para el análisis descriptivo se calcularon las medias y error estándar para las variables cuantitativas. Para las variables cualitativas se calcularon números absolutos y porcentajes. La camada se tomó como unidad experimental. Los datos

fueron analizados empleando las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de P fueron menores a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se produjeron muertes maternas en ninguno de los grupos experimentales. Solamente se observaron signos clínicos en las ratas tratadas con la dosis máxima administrada, que mostraron signos de agresividad y notable intranquilidad durante el momento de la administración del producto a lo largo del período de exposición. El análisis estadístico del consumo de alimentos no evidenció diferencias significativas entre las ratas de control y las administradas con el BM-21.

En la **Tabla 1** se muestra la ganancia de peso materno en los diferentes grupos en los días 0, 6, 9, 12, 15 y 20 de la preñez. El análisis del comportamiento de este parámetro evidenció que la ganancia del peso corporal mostró diferencias en algunos períodos de análisis entre los diferentes grupos de tratamiento. Entre el día 6 hasta el día 9 se observó una tendencia al incremento del peso de los animales en todos los grupos de tratamiento con respecto al control, siendo significativa la diferencia observada entre el grupo de dosis media y el control. En la ganancia de peso desde el día 9 hasta el día 12 se observa que en el grupo de dosis mínima es similar la ganancia del peso con respecto al grupo control, sin embargo, en los grupos de las dosis media y máxima se observó una disminución en la ganancia del peso, que resultó significativamente diferente al grupo control ($p < 0.05$). Con respecto a la ganancia de peso en los períodos desde el día 12 al 15 y desde el día 15 al 20, se observa que la ganancia de peso de los grupos experimentales es similar al grupo control.

Al comparar la ganancia de peso durante toda la gestación, es posible apreciar que el grupo de dosis mínima tuvo una ganancia de peso por encima del grupo control. Con respecto al grupo de dosis máxima se observa una disminución de la ganancia de peso durante toda la gestación, la cual es significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

En la **Tabla 2** se muestra los resultados obtenidos acerca de los efectos del extracto BM-21 sobre el desarrollo embrionario y fetal. Al analizar el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios, se constató que los datos registrados en los grupos de animales expuestos al extracto no difieren del grupo control.

Al calcular el porcentaje del índice de implantación en las hembras preñadas, se pudo determinar que el porcentaje de embriones que se implantan de los que fueron concebidos del grupo de dosis mínima es ligeramente superior al del grupo

control y el grupo de dosis máxima muestra una disminución en el porcentaje de implantaciones, que coincide con un menor número de fetos vivos, aunque no resultó significativo con respecto al grupo control.

A partir de los datos obtenidos se observó que en el número de reabsorciones entre los grupos tratados con el producto y el control se muestra una diferencia significativa en el grupo de dosis máxima, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$). Al calcular el índice de reabsorción, se constató que el grupo dosis máxima fue el de más alto índice de reabsorción, mostrando diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Los índices de implantación y de reabsorción son indicadores de los efectos embriotóxicos de un medicamento. Constituyen medidas indirectas de la viabilidad del cigoto, su proceso de implantación y el desarrollo embrionario.³⁰

El análisis del porcentaje de las pérdidas post-implantación observadas difirieron significativamente entre el grupo control y el grupo de dosis máxima, lo que evidenció que las hembras embarazadas tratadas con el extracto a esta dosis perdieron un mayor número de implantes en esta etapa del embarazo que las ratas controles.

Todos los fetos de los grupos tratados y el control respondieron a estímulos en el momento del nacimiento.

La **tabla 3** muestra los parámetros de talla y peso fetales y peso placentario. El análisis de los valores del peso de las placentas registrado no muestra diferencias entre ninguno de los grupos experimentales y el control.

En el caso de los valores de peso de los fetos por grupo, el grupo de dosis máxima tuvo disminución significativa en el comportamiento de este parámetro con respecto al grupo control. La talla también mostró diferencias significativas en el grupo de dosis máxima con respecto a la talla observada en los fetos procedentes de las madres del grupo control. En todos los grupos los fetos del sexo masculino superaron a los fetos del sexo femenino.

La búsqueda o estimación del peso y la talla fetal constituye un elemento indispensable en la gestación, debido a que el bajo peso al nacer es considerado el índice más importante para determinar las posibilidades del recién nacido de sobrevivir y tener un crecimiento sano.³¹

La ganancia de peso en la gestación está estrechamente relacionada con el crecimiento y el bienestar fetal durante su desarrollo en la vida intrauterina. Según el curso normal de un embarazo, en la medida que este avanza debe aumentar gradualmente el peso corporal materno, y por consiguiente, el peso del feto, de manera que el aumento de peso insuficiente durante la gestación se asocia a un retardo en el crecimiento fetal. Diversos son los factores que pueden modificar

estas condiciones, entre los que se encuentra la exposición a medicamentos, aspecto que es considerado por los expertos como un posible efecto tóxico del producto.^{32, 33}

En el presente estudio, la ganancia de peso materno se comportó de manera similar en los grupos de dosis mínima y media con respecto al grupo control. En el caso del grupo de dosis máxima, la ganancia de peso materno estuvo disminuida con respecto al grupo control, así como un aumento de las reabsorciones y una disminución del peso y la talla en los fetos, a lo que se suma la modificación del comportamiento materno al administrar el producto. Todo lo anterior sugiere un efecto tóxico materno, con el consiguiente efecto embriotóxico fetal, a esta dosis, bajo las condiciones experimentales.

No existen antecedentes de los posibles efectos tóxicos del producto a dosis tan altas como 2000 mg/Kg en similares condiciones experimentales, por lo que estos constituyen los primeros datos que pudieran estar aportando información acerca del potencial tóxico del extracto de BM-21 administrado por vía oral hasta estos niveles de dosis a ratas preñadas.

En la literatura revisada se encontró referencias de otros estudios en los que se emplean métodos de investigaciones similares a los utilizados en este estudio y con en el mismo período, como los realizados con el Policosanol³⁴ y Vimang³⁵, en los cuales los resultados obtenidos no tienen coincidencia en todas variables estudiadas.

En este estudio no se observaron fetos con malformaciones externas en ninguno de los grupos. El estudio del tejido blando y de los esqueletos de los fetos observados tampoco reveló malformaciones esqueléticas, ni viscerales. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es posible sugerir que el BM-21 no es un agente inductor de aberraciones cromosómicas, ni es un producto capaz de provocar alteraciones en la división celular ni inducción de muerte celular programada (apoptosis) a un nivel tal que cause alteración en el desarrollo en estas condiciones experimentales. Sin embargo, es necesario enfatizar que la demostración de la inocuidad de un producto sobre el proceso de la reproducción no sólo conlleva la evaluación de su potencial teratogénico en el período de organogénesis, sino debe ser realizado un estudio de sus posibles efectos sobre el proceso de gametogénesis, el ciclo estral, la conducta en el apareo, la fertilidad, y el desarrollo pre y postnatal de las crías, incluida una evaluación de su función reproductora. Por otra parte, también debe evaluarse el potencial teratogénico en una especie no roedora. Los resultados obtenidos en el presente trabajo deben ser complementados con estudios futuros que permitan predecir con mayor profundidad los efectos de este nuevo producto sobre todo el proceso de la reproducción y la descendencia.

Los protocolos utilizados en este trabajo se corresponden con las metodologías propuestas y aplicadas tanto a nivel nacional como internacional en los estudios de toxicología de la reproducción dentro de los estudios preclínicos de los nuevos productos.

CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico BM-21, obtenido de las hojas de la planta marina *Thalassia testudinum*, administrado por vía oral durante el período de organogénesis a ratas Wistar no es teratogénico, ni induce embrioletalidad, pero sí tiene efecto tóxico materno, con el consiguiente efecto embriotóxico fetal, a dosis de 2000 mg/Kg/día, bajo estas condiciones experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Historia de las plantas medicinales. [citado 6 Mayo 2013]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/medicinasnaturalesuimgroo/historia-de-las-plantas-medicinales>
2. Breve historia de las plantas medicinales. [citado 6 Mayo 2013]. Disponible en: <http://www.hierbatura.com/breve-historia-de-las-plantas-medicinales/>
3. Vázquez C, Quintana M. Uso de las plantas medicinales por pobladores de Artemisa. Rev Cubana Enfermer. 2008;24(1)
4. Planta medicinal. [citado 6 Mayo 2013]. Disponible en: <http://books.google.com/cu/books?id=K8eI-7ZeFpsC&pg=PR11&lpg=PR11&dq=historia+de+las+plantas+medicinales&source/>
5. Albis M. Características estructurales y fisiológicas de las praderas de *thalassia testudinum*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Centro de Estudios en Ciencias del Mar (Cecimar). 2010
6. Usuki T, Yasuda N, Yoshizawa-Fujita M, Rikukawa M. Extraction and isolation of shikimic acid from *Ginkgo biloba* leaves utilizing an ionic liquid that dissolves cellulose. Chem Commun (Camb). 2011;47(38):10560-2.
7. Lau AJ, Yang G, Chang TK. Isoform-selective activation of human constitutive androstane receptor by *Ginkgo biloba* extract: functional analysis of the SV23, SV24, and SV25 splice variants. J Pharmacol Exp Ther. 2011;339(2):704-15.
8. Lei HP, Wang G, Wang LS, Ou-yang DS, Chen H, Li Q, et al. Lack of effect of *Ginkgo biloba* on voriconazole pharmacokinetics in Chinese volunteers identified as CYP2C19 poor and extensive metabolizers. Ann Pharmacother. 2009;43(4):726-31.
9. Yamamoto Y, Adachi Y, Fujii Y, Kamei C. Effect of *Ginkgo biloba* extract on memory deficits in radial maze performance induced by some drugs in rats. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. 2005;25(2):85-90.
10. Kim JL, Kang SW, Kang MK, Gong JH, Lee ES, Han SJ, et al. Osteoblastogenesis and osteoprotection enhanced by flavonolignan silibinin in osteoblasts and osteoclasts. J Cell Biochem. 2012;113(1):247-59. doi: 10.1002/jcb.23351.
11. Raza SS, Khan MM, Ashafaq M, Ahmad A, Khuwaja G, Khan A, et al. Silymarin protects neurons from oxidative stress associated damages in focal cerebral

- ischemia: A behavioral, biochemical and immunohistological study in Wistar rats. *J Neurol Sci.* 2011;309(1-2):45-54.
- 12.Garateix A. El mar: fuente de nuevos fármacos. Universidad Autónoma de Puebla, México. *Revista Elementos.* 2005;58(12):39-47.
- 13.Nuñez R, Garateix A, Laguna A. Caribbean marine biodiversity as a source of new compounds of biomedical interest and others industrial applications. *Pharmacology on line.* 2006;3:111-9.
- 14.Regalado EL, Rodríguez M, Menéndez R. Repair of UVB-damaged skin by the antioxidant sulphated flavone glycoside Thalassiolin B isolated from the marine plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Mar Biotechnol (NY).* 2009;11(1):74-80
- 15.Regalado EL, Rodríguez M, Menéndez R, Fernandez X, Hernández I, Morales RA, et al. Photoprotecting action and phytochemical analysis of a multiple radical scavenger lipophilic fraction obtained from the leaf of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Photochem Photobiol.* 2011;87(5):1058-66. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00945.x.
- 16.Seibadal. [citado 6 Mayo 2013]. Disponible en: <http://www.ecured.cu/index.php/Seibadal>
- 17.Fernández, M.D. Llanio, M. Mustelier, E. Cabrera, B. Compuestos de origen marino con efectos antiinflamatorios. *Revista CNIC.*1999;30 (2):109.
- 18.Fernández, M.D., Llanio, M., Arteaga, F. et al., Propiedades antiinflamatoria-analgésica y antioxidante de una planta marina *Avicennia*, 2003;16:31-35.
- 19.Llanio, M., Fernández, M.D, Hernández, I, et al., Estudio de las propiedades antiinflamatoria, analgésica y antioxidante del extracto de la esponja *Ircinia felix*. *Rev Cubana de Farmacia.* 2002;36 (2):113.
- 20.Llanio, M. and Fernández, M.D. Compuestos de origen marino con actividad antiinflamatoria. *Avicennia.* 2003;16:22-25.
- 21.Llanio, M., Fernández, M.D, Valdés-Iglesias, O., et al., Búsqueda de actividades antiinflamatoria, analgésica y antioxidante en algunas algas de las costas cubanas *Avicennia*, 2003;16:26-30.
- 22.Aneiros A, Concepción AR, Arteaga F, Fernández MD, Llanio M, Fundora F, et. al. Extracto de la planta marina *T. Testudinum* con actividad anti envejecimiento, antiinflamatoria y analgésica, su obtención y formulaciones que lo contienen. Patente No. CU 22931, 2003.
- 23.Engel LW, Straus SE. Development of therapeutics: opportunities within complementary and alternative medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(3):229-37.
- 24.Conferencia Internacional de Armonización (ICH), Detección de Toxicidad para la reproducción de productos medicinales. Guía. 1995
- 25.Wilson, J. G., and Warkany, J. Principles and techniques.Chicago, IL: The University of Chicago Press. Teratology:1965.
- 26.ICH Harmonised Tripartite Guideline. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2).2005
- 27.Dawson, A.B., A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain. Technol.* 1926;123.
- 28.Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animals Ottawa Ontario. V. 1:1998
- 29.Herceg A, Simpson JM, Thompson JF. Risk factors and outcomes associate with a low birth weight delivery in the Australian Capital Territory. 1980-90. *J Pediatric Child Health.* 2001;30(4):331-5.

- 30.41. Tomé, L.O. Posibles efectos teratogenicos y abortivos de un hipoglicemiante oral en ratas. L1387.cal 118.La habana. 1997.
- 31.Herceg A, Simpson JM, Thompson JF. Risk factors and outcomes associate with a low birth weight delivery in the Australian Capital Territory. 1980-90. J Pediatric Child Health. 2001;30(4):331-5.
- 32.Kathleen M, Rasmussen KM, Yaktine AL (Editors). Weight Gain during Pregnancy: Reexamining the Guidelines. Washington, DC: National Academy Press. 2009: 869.
- 33.Schmitt D, Tran N, Peach J, Edwards T, Greeley M. Toxicologic evaluations of DHA-rich algal oil in rats: Developmental toxicity study and 3-month dietary toxicity study with an in utero exposure phase. 2012;50(11):4149-4157. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.035
- 34.Rodríguez MD. Toxicología de la reproducción del policosanol. Tesis doctoral. Centro nacional de investigaciones científicas. Centro de productos naturales. 1999
- 35.González JE , Rodríguez MD, Rodeiro I, Morffi J, Guerra E, Leal F,García H, Goicochea E, Guerrero S, Garrido G, Delgado R, Nuñez-Selles A.J. Lack of in vivo embryotoxic and genotoxic activities of orally administered stem bark aqueous extract of *Mangifera indica* L. (*Vimang*). Food and Chemical Toxicology. 2007;45:2526–2532.

ANEXOS

Tabla 1. Efecto del extracto hidroalcoholico de la planta marina *Thalassia testudinum* (BM-21) sobre los parámetros de toxicidad materna en ratas Wistar.

Tratamiento	Control		BM-21	
	0	500	1000	2000
Dosis (mg/kg)	0	500	1000	2000
No. de preñadas tratadas	10	10	10	10
No. animales a término con fetos vivos	10	10	10	10
Peso inicial (DG 0).	224.4± 13.0	231.9± 3.8	209.5±3.9	206.4± 5.5
Ganancia de peso materno (DG 6 – 9)	5.8± 0.5	4.8± 0.7	8.8± 0.8*	7.3±0.5
Ganancia de peso materno (DG 9 – 12)	15.9± 0.7	16.7±2.1	10.8±0.7 *	11.5±0.3 *
Ganancia de peso materno (DG 12 – 15)	12.6±0.5	12.2±1.7	11.7± 1.1	11.7± 0.7
Ganancia de peso materno (DG 15 – 20)	55.7±3.6	57.9±2.4	49.8±2.1	49.8±3
Ganancia neta de peso materno	109.8± 2.6	114.2± 4.7	109.2± 2.8	100.5± 2.7*

Los datos se presentan como media ± SEM

DG-Día de la gestación

* (p< 0,05), U de Mann-Whitney comparaciones con respecto al control

Tabla 2. Efecto del extracto hidroalcohólico de la planta marina *Thalassia testudinum* (BM-21) sobre los parámetros de toxicidad embrionarios y fetales en ratas Wistar

Tratamiento	Control		BM-21	
	0	500	1000	2000
Dosis (mg/kg)				
No. de cuerpos lúteos/camada.	10.0±0.8	12.2±0.7	10.1 ±0.8	11.5±0.5
Implantaciones/camada	9.6±0.8	11.9±0.8	9.6± 0.8	10.6±0.6
Índice de implantación (%)	96	97.5	95	92.1
No. de fetos vivos/camada.	9.4±0.7	11.7± 0.8	9.3± 0.8	8.7±0.4
No. fetos muertos.	0	0	0	0
No. de Reabsorciones.	2	2	3	17*
Pérdida post-implantación (%)	2.08	1.6	3.1	16

Los datos se presentan como media ± SEM

* (p< 0,05) U de Mann-Whitney, comparaciones con respecto al control.

% Pérdida post-implantación = No. Reabsorciones / No. Implantes x100

% Índice de implantación = No. Implantes / No. Cuerpos Lúteos x 100

Tabla 3. Efecto del extracto hidroalcohólico de la planta marina *Thalassia testudinum* (BM-21) sobre los parámetros de talla y peso fetales y placenta en ratas Wistar.

Tratamiento	Control		BM-21	
	0	500	1000	2000
Dosis (mg/kg)				
Peso de placentas/camada (g)	0.6±0.0	0.6± 0.0	0.6±0.0	0.5±0.2
Peso fetal/camada (g)	3.9±0.3	3.5±0.1	3.4± 0.1	3.2±0.0*
Talla fetal/camada (g)	54.2± 1.2	54.6± 0.7	52.4± 1.0	51.8±0.1*
Machos	5±0.8	6.1±0.8	4.8±0.6	4.4± 0.4
Hembras	4.4±0.6	5.6± 0.5	4.5±0.5	4.3±0.4

Los datos se presentan como media ± SEM

* (p< 0,05) U de Mann-Whitney, comparaciones con respecto al control.