



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VIVO*  
DE DOS ÉSTERES DE DAFNANO AISLADOS DE *HURA*  
*CREPITANS* (FAMILIA EUPHORBIACEAE)**

**AUTOR:**

Andrea Cecilia Garcia Sandoval

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Lima, Perú

2021

**ASESOR:**

Prof. George Edward Malaga Trillo, PhD.

**JURADO CALIFICADOR:**

Presidente: Maria Rivera Chira

Secretario: Francisco Villafuerte Castrillon

Vocal: Claudia Machicado Rivero

## CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VIVO DE DOS ÉSTERES DE DAFNANO AISLADOS DE HURA CREPITANS (FAMILIA EUPHORBIACEAE)

### INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>4%</b>	<b>4%</b>	<b>1%</b>	<b>0%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>2</b>	<b>patents.google.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>3</b>	<b>www.jove.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>4</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<b>www.researchgate.net</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>infotratamiento.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>cybertesis.urp.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>www.deutscher-apotheker-verlag.de</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>

## INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN:.....	3
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN: .....	6
3. OBJETIVOS:.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS: .....	7
4.1 MATERIALES: .....	7
4.2 MÉTODOS: .....	11
5. RESULTADOS:.....	17
5.1 Supervivencia de embriones y dosis letal media: .....	17
5.2 Efectos generales en líneas silvestres.....	19
5.2.1 Efectos tempranos:.....	19
5.2.2 Efectos generales tardíos .....	23
5.3 Efectos específicos tempranos estudiados por inmunotinciones: .....	28
5.4 Efectos específicos tardíos por medio de líneas transgénicas HB9::GFP y BACmpo::GFP .....	30
5.5.1 HB9::GFP .....	30
5.5.2 BACmpo::GFP.....	30
6. DISCUSIÓN:.....	33
7. CONCLUSIONES.....	39
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
9. ANEXOS.....	49

## RESUMEN:

El Perú cuenta con una inmensa riqueza de especies vegetales, entre ellas, *Hura crepitans*, un árbol tropical de la familia Euphorbiaceae. El laboratorio PHARMA-DEV (Toulouse, Francia) ha aislado 24 ésteres de dafnanos de *H. crepitans* y dos de ellos, *Huratoxina* y *Stelleralide J*, reducen en un 30% la viabilidad de la línea humana de cáncer colorrectal Caco-2, sin afectar el control. Estudios previos de otros ésteres de dafnano revelaron múltiples actividades biológicas de estos compuestos, incluidas antitumorales.

En este trabajo se aprovechó la relevancia como modelo animal *in vivo*, facilidad de manipulación, y rapidez de desarrollo del embrión del pez cebra (*Danio rerio*) para estudios toxicológicos e identificar los procesos biológicos afectados por *Stelleralide J* y *Huratoxina*. La concentración letal media (CL50) a las 72 horas post fertilización (hpf) promedio de dos líneas de peces zebra de *Huratoxina* es de 1.60  $\mu\text{M}$  y de *Stelleralide J* 13.86  $\mu\text{M}$ . Los embriones expuestos a altas concentraciones de ambos compuestos (2-4  $\mu\text{M}$  *Huratoxina*, 20-50  $\mu\text{M}$  *Stelleralide J*) presentaron daño a las células de la envoltura (cEVL) a las 4 hpf. Las inmunotinciones de embriones de 6 hpf revelaron la presencia de grandes células binucleadas, fenotipo ya reportado para compuestos que afectan la división celular. A bajas concentraciones ambos compuestos generan un retraso dosis dependiente. En particular, se postula que para *Huratoxina* (1-2  $\mu\text{M}$ ), los efectos tempranos en las cEVL se arrastran durante todo el desarrollo, ya que a las 48 hpf la cola presenta bordes aserrados de la cola (tejido originado por cEVL). En cambio, para *Stelleralide J* (5-10  $\mu\text{M}$ ), los efectos ocurren a nivel circulatorio-hematopoyético que consisten en formación de edema en la región caudal hematopoyética, interrupción de flujo en vasos sanguíneos caudales y dorsales, reducción de frecuencia cardíaca y reducción de número de neutrófilos.

Este estudio preliminar ha identificado las concentraciones de trabajo de los compuestos y sus efectos biológicos. Los efectos biológicos comprenden actividades muy valoradas para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades: la división celular y actividad circulatoria-hematopoyética, lo que justifica su posterior estudio en otros modelos.

**Palabras clave:** plantas medicinales, *Hura crepitans*, ésteres de dafnano, *Danio rerio*, CL50, cEVL, división celular, angiogénesis.

## ABSTRACT:

Plants have been extensively used for medicinal purposes. Peru is rich in plant species, including *Hura crepitans*, a tropical tree from the Euphorbiaceae family.. PHARMADEV Laboratory (Toulouse, France) has isolated by ultra-high potency liquid chromatography new daphnane esters from the latex. Among them, *Huratoxina* and *Stellularide J*, reduce by 30% the cellular viability of caco-2 cells, a colorectal cancer cell line, without affecting the control. Daphnane esters have been previously described as having different biological activities which include antitumoral ones, thus there is a great interest in exploring these compounds.

This work used zebrafish embryos (*Danio rerio*) to study the effect of these compounds at organism level in aspects such as toxicology and biological activity. The lethal medium concentration (LC50) at 72 hours post fertilization (hpf) for *Huratoxina* is 1.60  $\mu$ M while for *Stellularide J* is 13.86  $\mu$ M. The exposition of high compounds concentration (2-4  $\mu$ M *Huratoxina*, 20-50  $\mu$ M *Stellularide J*) caused damaged in the envelope cells (cEVL) at 4 hpf. Immunostaining coupled with confocal microscopy of 6 hpf embryos revealed binucleated cells, phenomena previously reported for cellular division inhibitors. At low concentrations, both compounds caused a concentration dependent developmental delay. For *Huratoxina* (1-2  $\mu$ M), cEVL damage seems to drag an effect throughout development resulting in undulated tail borders (a tissue originated by cEVL) at 48 hpf. Differently, *Stellularide J* (5-10  $\mu$ M) induces circulatory-hematopoyetic changes such as oedema formation at the caudal hematopoietic region, caudal and dorsal vessels flow blockage, blood flow reduction and decrease in neutrophils number.

This preliminary study has identified the working concentrations of the compounds and biological effects important for cancer and other diseases treatment: cellular division and circulatory effects (angiogenesis), which justifies their posterior study in more specialized models.

**Key words:** medicinal plants, *Hura crepitans*, daphnane esters, *Danio rerio*, LC50, cEVL, cellular division, angiogenesis.

# I. INTRODUCCIÓN:

## **1.1 Las plantas medicinales como fuentes de compuestos:**

Latinoamérica es una región con mucho potencial para el estudio de las plantas medicinales debido a que cuenta con riqueza vegetal y del conocimiento de las comunidades nativas (Luziatelli *et al*, 2010). A fines del siglo pasado, el IPCB (International Program of Co-operation for Biodiversity) incentivó el estudio de las plantas empleadas por las comunidades indígenas peruanas. (Hamburger & Hostettmann, 1991; Aponte *et al*, 2008). En este siglo, las investigaciones han continuado, especialmente dentro de la Universidad Peruana Cayetano Heredia dónde se ha estudiado la actividad de la maca y la uña de gato extensivamente (Lozada-Requena *et al*, 2015; Gonzales *et al*, 2008). Sin embargo, en la región los estudios siguen siendo escasos y con resultados variables (Gonzales & Valerio, 2006) así como limitados a un solo uso terapéutico (Hamburger & Hostettmann, 1991). Por lo tanto, es de interés local incrementar el número de estudios en los siguientes años.

### **1.1.2 Hura crepitans y las propiedades de su látex:**

Este trabajo se centra en *Hura crepitans*, árbol conocido localmente como “catahua” o “jabillo”, que forma parte de la familia Euphorbiaceae y está distribuido a lo largo del trópico, incluida la Amazonia del Perú. Al árbol se le han atribuido propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, y antihepatotóxicas (Oloyede *et al*, 2016).

En particular, el látex ha sido utilizado por comunidades nativas para tratar problemas epiteliales, eliminar parásitos intestinales, y curar la elefantiasis, la lepra y la fiebre reumática (Francis, 1990). Esto incentivó el aislamiento y caracterización de compuestos del látex. Entre los compuestos más conocidos están: las lectinas, la enzima proteolítica *Huraína* las toxoalbúminas como la *Hurina* y la *Crepitina*, y los ésteres diterpénicos como la *Huratoxina* y la hexahydro*Huratoxina* (Oloyede *et al*, 2016; Sakata *et al*, 1971; Jaffé, 1943). Sin embargo, estos compuestos no fueron estudiados para fines terapéuticos.

En el 2018, el Laboratorio PHARMA-DEV (Toulouse, Francia) aisló por medio de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento 24 ésteres de dafnano del látex de *Hura crepitans*, (Trinel *et al*, 2018). Posteriormente, el Institut de Recherche en Santé Digestive

(ISRD) (Toulouse, Francia) estudió la citotoxicidad de los compuestos en dos líneas de cáncer colorrectal: Caco-2 y HT29. Dos de ellos, *Huratoxina* y *Stelleralide J*, redujeron la viabilidad de las células Caco-2 en un 25-30%, sin afectar a las células control (IEC6). Mientras que en cultivos 3D de células Caco-2 los compuestos produjeron cambios morfológicos y de migración celular. Pese a los esfuerzos hechos, aún no ha sido posible determinar el mecanismo de acción ni el blanco de estos compuestos *in vitro* (comunicación personal, Valérie Julian).

Los ésteres de dafnano son metabolitos secundarios de las plantas que presentan múltiples actividades como antitumoral, antiviral, apoptóticas y neurotróficas (supervivencia de neuronas) (He *et al*, 2002). Por ejemplo, ésteres de dafnano aislados de *D. genkwa* y de *D. acutiloba* reducen la viabilidad de numerosas líneas de cáncer (Li *et al*, 2013). La Gnidimacrina, aislada de *S. chamaejasme*, es activa frente a líneas tumorales humanas y también directamente en tumores de ratón (Yoshida *et al*, 2003).

Los usos medicinales, los estudios *in vitro* de los ésteres de dafnano aislados de *H. crepitans* y los resultados de otros ésteres de dafnano, demuestran el potencial que tienen estos compuestos como tratamiento de enfermedades como el cáncer, y respaldan su investigación y desarrollo como drogas terapéuticas.

### **1.1 Desarrollo de drogas terapéuticas**

El desarrollo de una droga inicia por el descubrimiento de su actividad y es seguido por estudios más precisos para determinar su potencial administración en humanos. En la etapa preclínica se utilizan modelos *in vitro* e *in vivo* para comprobar su actividad y especificidad, evaluar la seguridad de la droga y si es posible, determinar su mecanismo de acción. Una vez obtenida la información necesaria, se procede con los estudios clínicos en humanos para poder finalmente obtener la aprobación de su comercialización (FDA, 2018).

Los modelos *in vitro* son de bajo costo y han mejorado con el paso del tiempo, llegando a recrear la estructura de varios tejidos; sin embargo, los modelos animales siguen siendo imprescindibles para comprobar el efecto fisiológico y toxicológico de un compuesto antes de probarlo en humanos (Barré-Sinoussi & Montagutelli, 2015). El modelo de ratón es el más usado debido a su cercanía evolutiva al humano y a su fácil manipulación. No



obstante, el uso de otros modelos como el pez cebra (*Danio rerio*) está incrementando. Este último representa una optimización en la investigación con especies menores de vertebrados lo que implica un menor costo y conflicto ético (Ericsson *et al*, 2013).

La posibilidad de múltiples efectos biológicos de *Huratoxina* y *Stelleralide J* requiere el uso de un modelo donde se puedan identificar y estudiar varios procesos biológicos. Por tal motivo se empleó el modelo embrionario del pez cebra que presenta ventajas experimentales y biológicas para un estudio inicial de compuestos.

### 1.1.2 Validación de nuevas drogas usando el modelo embrionario del pez cebra

El pez cebra es un vertebrado con similitudes genéticas y anatómicas a los humanos. Su genoma ha sido totalmente secuenciado y se ha hallado que el 71% de las proteínas humanas tienen un ortólogo en esta especie y presentan regiones funcionales semejantes, lo que implica una gran conservación en las vías de señalización (Howe *et al*, 2013). A nivel anatómico, presenta un sistema integral de órganos, que, a pesar de haber evolucionado para la vida acuática, mantienen la funcionalidad, morfología y composición de su contraparte humana (MacRae & Peterson, 2015). Su desarrollo embrionario es externo y rápido: a las 24 horas post fertilización (hpf), el plano corporal está establecido, mientras que a las 72 hpf, la mayoría de órganos presentan pleno funcionamiento (Kimmel *et al*, 1995). El hecho de que los embriones sean permeables y transparentes permite visualizar el efecto de una droga en tiempo real en distintos órganos y tejidos por microscopía (Parng *et al*, 2002).

A lo largo del desarrollo los embriones atraviesan una serie de procesos biológicos esenciales para poder formar los tejidos, órganos y sistemas principales. Algunos de los procesos más importantes son la proliferación y migración celular, transición epitelio mesénquima, angiogénesis y apoptosis. Estos procesos también ocurren y son importantes para el inicio o desarrollo de enfermedades (Terriente & Pujades, 2013). Si bien el embrión es un organismo sano donde las células carecen de alternaciones genéticas/epigenéticas y no se encuentran en el microambiente ligado a las enfermedades, los mecanismos moleculares y celulares son los mismos.

En este trabajo se utilizó el modelo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*) para identificar los procesos biológicos afectados por dos ésteres de dafnano aislados de *H.*

*crepitans*. Para tal fin, se administraron los compuestos a los embriones a las 4 horas post fertilización y se evaluaron la mortalidad y los fenotipos durante estadios específicos del desarrollo, abarcando un total de 72 horas de desarrollo. Los fenotipos encontrados fueron estudiados a profundidad por medidas fisiológicas, inmunotinciones y el uso de líneas transgénicas.

## **2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:**

¿Cuáles son los efectos toxicológicos, morfológicos, fisiológicos y celulares de Huratoxina y Stelleralide J, dos ésteres de dafnano aislados de *Hura crepitans*, en el desarrollo embrionario del pez cebra?

## **3. OBJETIVOS:**

### **3.1 Objetivo general:**

Evaluar los efectos toxicológicos, morfológicos, fisiológicos y celulares de dos ésteres de dafnano en los tres primeros días de desarrollo embrionario del pez cebra.

### **3.2 Objetivos específicos:**

1. Estudiar los efectos toxicológicos y morfológicos de ambos compuestos en el desarrollo del pez cebra.
  - a. Determinar la concentración letal media (CL50).
  - b. Determinar los efectos morfológicos tempranos y tardíos de ambos compuestos.
2. Profundizar el estudio de efectos morfológicos que causan los compuestos usando pruebas fisiológicas, celulares y líneas transgénicas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 4.1 MATERIALES:

#### 4.1.1 Organismo modelo - Pez cebra (*Danio rerio*):

Todas las cepas de pez cebra provienen y son criadas en el bioterio del Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo (LID, UPCH)

Cepa genética	Descripción
Tab5	Cepa silvestre híbrido de cruce entre la cepa AB y Tübingen. Se caracteriza por su buena fecundidad y ausencia de mutaciones embrionarias letales (ZFIN, 2016).
Wild type Konstanz (WT <sup>KN</sup> )	Cepa silvestre híbrido de cruces y retrocruces de la cepa AB y una cepa de Konstanz, Alemania.
BACmpo::GFP	Cepa transgénica que presenta fluorescencia en los neutrófilos (granulocitos) y sus precursores (Renshaw <i>et al</i> , 2006).
HB9::GFP	Cepa transgénica que presenta fluorescencia en el rombencéfalo, neuronas motoras y en células $\beta$ del páncreas (Flanagan-Steet <i>et al</i> , 2005).

#### 4.1.2 Materiales y equipos para crianza y manipulación de peces:

Equipo	Descripción	Marca
Sistema automatizado de acuarios	ZebTec Active Blue Stand Alone	Tecniplast, Italia
Tanques de apareamiento o cruces	ZebTec breeding tanks	Tecniplast, Italia
Incubadora	28.5 °C	Thermo Fisher Scientific, USA
Net para peces	-	Tecniplast, Italia

#### 4.1.3 Materiales generales

Artículo	Descripción	Marca
Placas Petri	90 mm (plástico)	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Placas multipocillo	24 pocillos (4x6)	Corning Inc., USA
Tubos falcon	10 y 50 mL	Corning Inc., USA
Tubos de micro centrifuga	0.2 y 1.5 mL	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Micropipetas	P10, P20, P200, P1000	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Puntas para micropipetas	10 µL, 20 µL, 200 µL, 1 µL	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Probetas	250 mL (vidrio)	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Frascos laboratorio	50, 250, 500 y 1000 mL (vidrio)	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Lámina porta y cubreobjetos	-	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Aguja ultrafina	-	Greiner Bio-One GmbH, Alemania
Grasa sólida	-	Greiner Bio-One GmbH, Alemania

#### 4.1.4 Reactivos

Reactivos	Especificación	Marca
Cloruro de Sodio (NaCl)		Merck KGaA, Alemania
Cloruro de potasio (KCl)		Merck KGaA, Alemania
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )		Merck KGaA, Alemania
Paraformaldeído (PFA)		Merck KGaA, Alemania
Buffer fosfato salino (PBS)		Merck KGaA, Alemania
Tritón	Triton X - 100	Merck KGaA, Alemania

Dimetilsulfóxico (DMSO)		Merck KGaA, Alemania
Glicerol 100%	-	Sigma-Aldrich, USA
Suero de cabra	-	Sigma G9023, USA
Tricaína	Metanosulfonato Etil-3-aminobenzoato	Sigma-Aldrich, USA
DAPI	-	Merck, Alemania
Faloidina (rojo lejano)	CytoPainter Phalloidin-iFluor 647	Abcam, UK
Anticuerpo primario B-catenina	Anticuerpo policlonal producido en conejo	Abcam, UK
Anticuerpo primario E-cadherina	Anticuerpo policlonal producido en ratón	BD BIOSCIENCES
Anticuerpo secundario CY3	Burro anti-IgG de conejo	Sigma-Aldrich, USA
Anticuerpo secundario Alexa Fluor 488	Cabra anti-IgG de ratón	Sigma-Aldrich, USA

#### 4.1.5 Soluciones

<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
Medio E3 stock 60X:	300 mM NaCl, 10.2 mM KCl, 19.8 mM CaCl <sub>2</sub> y 19.8 mM MgSO <sub>4</sub> en agua miliQ (autoclavado)
1 L de medio embrionario 1X	16.7 ml de E3 stock 60X, 12.5 µL de azul de metileno en 1 L de agua miliQ (previamente ajustada a pH 7 y autoclavada)
Solución de PBS stock 10X	1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en agua miliQ (posteriormente pH ajustado a 7.4 y autoclavado)
Solución PBS-T	0.1% de Tritón en PBS
Solución PBS-DT	1% de Dimetilsulfóxido + 0.1% de Tritón en PBS
Solución de PFA 4%	4% de Paraformaldehído en PBS
Solución de Glicerol	25, 50 y 75% de Glicerol en PBS

Solución de Tricaína (MS-222) stock 4mg/mL	4 mg de Tricaína en 1.05 mL de Tris 1-M y 48.95 mL de agua miliQ. Ajustada a pH 7.
--	--

#### 4.1.6 Fármacos

Fármaco	Especificación	Procedencia
Huratoxina	Compuestos aislados por UHPLC y secados en rotavapor de <i>Hura crepitans</i>	Donación generosa de la Dra. Valérie Julien (Universidad de Toulouse, Francia)
Stelleralide J		

#### 4.1.7 Hardware

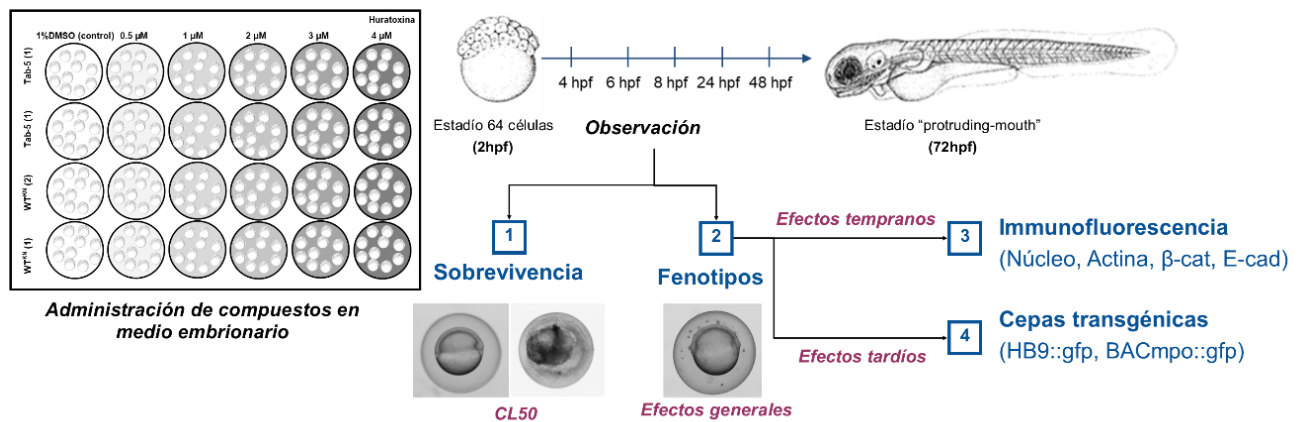
Equipo	Especificación	Marca
Estereomicroscopio de disección	Stemi 508	Zeiss, Alemania
Estereomicroscopio de fluorescencia	Axiozoom v16	Zeiss, Alemania
Microscopio confocal	LSM 880	Zeiss, Alemania
Microcentrifuga	MiniSpin	Eppendorf, Alemania
Vortex		Fisher Scientific, USA
Ph-metro	HI 2210	Hanna Instruments, Romania
Balanza analítica		Radwag Wagi Elektronicze, Polonia
Refrigeradora 4°C		Miray, Perú
Refrigeradora -20°C		Coldex, Perú

#### 4.1.8 Software

Software	Especificación	Marca
ZEN Microscope	Zen 2.0.0 System	Zeiss, Alemania
Adobe Photoshop	CC 2015	Adobe Systems, USA
GraphPad Prism	Prism 7	GraphPad Software Inc., USA

## 4.2 MÉTODOS:

### 4.2.1 Plan de trabajo:



**Figura 1.** Esquema del plan de trabajo de la tesis. Los dibujos de los embriones fueron obtenidas de Kimmel (Kimmel *et al*, 1995). Las imágenes fueron tomadas por García.

### 4.2.2 Crianza de los peces cebra:

El bioterio del Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo cuenta con un sistema de acuarios automatizados (ZebTec, Tecniplast) en dónde se cría una población aproximada de 1000 peces entre líneas silvestres y transgénicas. Los peces fueron mantenidos a 28.5°C, ph 7 y bajo luz superficial para recrear un ciclo 14 horas día y 10 horas noche. Su alimentación diaria se basa en cuatro raciones de artemia (*Artemia salina*) y hojuelas.

### 4.2.3 Obtención, recolección y selección de embriones:

El día anterior a cada experimento, se colocó una pareja de peces en un tanque de cruce de 1.7 litros con doble fondo (huevos caen en la parte inferior) y separación (evitar apareamiento) lleno con agua del ZebTec a 28 °C. El día del experimento, a las 8:00 am se encendieron las luces del bioterio y se removió la separación, lo que permitió el apareamiento de la pareja y liberación de huevos. Los huevos fueron colocados en una placa Petri con medio E3. Utilizando un estereomicroscopio, se seleccionaron los embriones fertilizados y sanos para los experimentos; mientras que los embriones dañados o no fertilizados fueron descartados. Entre 10-20 embriones fueron colocados por pocillo en una placa de 24 pocillos con 500 µL de medio E3.

#### 4.2.4 Administración de los compuestos:

Las soluciones stock de los compuestos fueron elaboradas disolviendo los extractos secos obtenidos por cromatografía líquida de ultra rendimiento (Toulouse, Francia) en DMSO al 100%, solvente también usado en las pruebas de citotoxicidad previas. Los stocks tienen como concentración 2000  $\mu\text{M}$  (*Huratoxina*) y 10000  $\mu\text{M}$  (*Stellularide J*) y están almacenados a 4°C.

La OECD recomienda para las pruebas de toxicología administrar los compuestos lo más temprano en el desarrollo y al menos en cinco concentraciones (OECD, 2013). Se realizaron cinco diluciones seriales a concentración 2X en E3-2% DMSO (excepción de la primera a E3 puro). Posteriormente, 500  $\mu\text{L}$  de cada solución fueron añadidos a los pocillos conteniendo embriones y 500  $\mu\text{L}$  de E3, resultando en un volumen final de 1 mL de E3-compuesto por pocillo y la concentración de DMSO al 1%. Cabe resaltar que el DMSO al 1% no resultó tóxico para los embriones en experimentos preliminares de este proyecto, otros proyectos del laboratorio y otros estudios (Maes *et al*, 2012). Se realizó una única administración de los compuestos al medio E3 entre el estadio 64 y 128 células (2-2.25 hpf). Se escogió ese estadio ya es lo suficientemente tardío para garantizar que los embriones sean viables y sin deformidades.

#### 4.2.5 Toxicología general:

Se realizaron experimentos preliminares para hallar un rango de concentraciones donde se sitúe la concentración letal media (CL50), concentración donde ocurra la mortalidad del 50 por ciento de embriones y se presenten efectos morfológicos en los embriones. Estos experimentos consistieron en 2 o 3 repeticiones con un bajo número muestral (n=10 embriones por tratamiento) y un amplio número de concentraciones (9 para *Huratoxina* y 13 para *Stellularide J*). Estos experimentos fueron realizados en triplicado.

Se trabajó con dos líneas silvestres, WT<sup>KN</sup> y Tab-5, para asegurar que la mortalidad y efectos observados no se deban al trasfondo genético de los embriones. Los puntos de observación corresponden a estadios claves del desarrollo embrionario del pez cebra. Se escogieron varios puntos para detectar los cambios a penas ocurran y antes de que los embriones mueran (Driever *et al*, 1996). El estudio de estadios tempranos está enfocado en la división y migración celular. En el estadio “sphere” (4hpf) se evaluó la forma y apariencia del blastodermo, en “shield” (6hpf) la formación del escudo embrionario y en



“75% epiboly” (8hpf) la progresión de la epibolia (primer proceso de morfogénesis). Mientras que en los estadios tardíos se estudió el desarrollo corporal del embrión (forma y tamaño) así como el funcionamiento de distintos órganos y sistemas. En el estadio “Prim-5” (24 hpf) se evaluó la estructura del cerebro y formación de somitas, en “long-pec” (48 hpf) el desarrollo cardíaco y en “protruding mouth” (72 hpf) en el desarrollo general de todos los órganos, pero específicamente el desarrollo de la cola, aletas pectorales, ojos y orejas (Driever *et al*, 1996; Haffter *et al*, 1996).

Las cinco concentraciones ensayadas de *Huratoxina* fueron 0.5, 1, 2, 3 y 4  $\mu\text{M}$ , mientras que para *Stellularide J* fueron 5, 10, 15, 20 y 50  $\mu\text{M}$ . Las observaciones se realizaron utilizando un estereomicroscopio (Zeiss) a 50X. En cada revisión se anotó el número de embriones supervivientes, muertos y con fenotipos. Además, se removieron cuidadosamente con una micropipeta los embriones muertos ya que podrían liberar productos de degradación tóxicos que afecten la supervivencia de los demás embriones. Se realizaron tres experimentos independientes que llegaron a un total de entre 4 a 7 repeticiones por línea (Tab-5 y WTKN, respectivamente) que comprenden al menos 10 embriones por pocillo.

#### **4.2.5.1 Determinación de supervivencia a distintas etapas del desarrollo y la concentración letal media (LC50):**

Se utilizaron los criterios de la OECD para catalogar como muerto a un embrión: presencia de coagulación severa, ausencia de somitas, falta de salida de cola y paro de latido cardíaco (OECD, 2013). Se halló la curva de supervivencia en distintos estadios y la CL50 a las 72 hpf para ambas líneas en conjunto por cada compuesto.

#### **4.2.5.2 Descripción de efectos generales tempranos y tardíos:**

Se detectaron fenotipos específicos (conjunto de características) que presentan los embriones tratados frente al control (1% DMSO) durante los tres primeros días del desarrollo. Para cada fenotipo se anotó el número de embriones que lo presentan y se tomaron fotos representativas (1-3 embriones) usando el estereomicroscopio AxioZoom (Zeiss). Se tuvieron como referencia los fenotipos de mutantes estudiados para cada sistema o estadio (Artículos de la edición especial de *Development* - The Company of Biologists dedicados al modelo en 1996, <https://dev.biologists.org/content/139/22/4099>).

Para estudiar con mayor profundidad el efecto de los compuestos en el desarrollo se realizaron medidas morfológicas previamente descritas para el retraso, ritmo cardiaco y tamaño del ojo (Kimmel *et al*, 1995; Ahmad *et al*, 2015). En *Stelleralide J* se estudiaron embriones tratados con 5 y 10  $\mu\text{M}$ , mientras que para *Huratoxina*, embriones tratados con 1 y 2  $\mu\text{M}$ , tanto a las 24, 48 y 72 hpf. A las 24 hpf, los embriones fueron trasladados a una placa Petri donde se removió el corión manualmente utilizando pinzas. En cada punto de observación, 10-20 embriones fueron anestesiados al ser trasladados a un pocillo con 0.016% de tricafina y acomodados de manera lateral para tomar una foto grupal (medidas de retraso – *Huratoxina* y *Stelleralide J*) y grabar un video de 30 segundos (ritmo cardiaco - solo *Stelleralide J* a las 72 hpf) a 16X utilizando el estereomicroscopio AxioZoom (Zeiss). Finalmente, fueron lavados en E3 limpio y regresados a sus respectivos pocillos. Se realizaron dos experimentos independientes que representan 40-45 embriones por tratamiento.

**Las mediciones de retraso y diámetro del ojo** se realizaron en el programa ZEN2 (Zeiss, Alemania) a partir de las fotografías tomadas. Las mediciones de retraso son “*embryo length*” (EL): distancia entre la punta del hocico hasta el fin del embrión, “*head-trunk angle*” (HTA): ángulo que forman una primera recta que pasa por el notocordio y una segunda recta que atraviesa el ojo y la vesícula ótica, y “*otic vesicle length*” (OVL): número de vesículas óticas que caben en la distancia entre la vesícula ótica y el ojo. El diámetro del ojo fue medido en dirección anterior-posterior. Se realizaron dos experimentos independientes que representan 40-45 embriones por tratamiento.

**El ritmo cardiaco** (número de latidos por minuto) a las 72 hpf de los embriones tratados con *Stelleralide J* fue cuantificado contando manualmente el número de latidos del vídeo de 30 segundos y multiplicando por dos. El protocolo es una adaptación de Ahmad *et al*. 2015 (Ahmad *et al*, 2015). Se realizaron dos experimentos independientes que representan 40-45 embriones por tratamiento.

#### **4.2.6 Uso de cepas transgénicas para estudios en embriones tardíos:**

Se utilizaron las cepas HB9::GFP y BACmpo::GFP tratadas con concentraciones subletales: *Huratoxina* 1-2  $\mu\text{M}$  y *Stelleralide J* 5-10  $\mu\text{M}$  y en estadios determinados (HB9::GFP, 24 y 48 hpf; BACmpo::GFP, 48 y 72 hpf). Los estadios escogidos corresponden a momentos específicos para el estudio del cerebro y desarrollo inmune

(Haffter *et al*, 1996). Los embriones fueron fotografiados usando el estereomicroscopio de fluorescencia AxioZoom. En el caso de los embriones de BACmpo::GFP se realizaron tomas en el eje Z para cuantificar los neutrófilos. Mientras que los embriones de la cepa HB9::GFP fueron fijados a 4% PFA (30 horas a 4°C) para su posterior montaje y observación de estructuras neuronales en el microscopio confocal. Para la cabeza (magnificación: 100X, intensidad: 2.0%, pinhole: 1AU = 5.5  $\mu$ M, número tomas: 9 (grosor total: 50  $\mu$ M), tamaño: 1024x1024, rapidez: 5, promedio: 2). Para el cuerpo (magnificación: 200X, intensidad: 2.0%, pinhole: 1AU = 1.5  $\mu$ M, número tomas: 7 (grosor total: 30  $\mu$ M), tamaño: 1024x1024, rapidez: 4, promedio: 2). Se realizó un solo experimento con 20 embriones por tratamiento.

#### **4.2.7 Tinciones de embriones tempranos (6 hpf – Shield):**

Los embriones tratados (*Huratoxina* 4  $\mu$ M; *Stelleralide J* 50  $\mu$ M) fueron sacrificados a las 6 hpf en hielo y fijados a 4% para formaldehído (PFA) durante 30 horas aproximadamente a 4 °C. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS (remover el PFA), tres con PBS-T y uno con PBS-DT (permeabilizar embriones). Se añadió la solución de bloqueo (10% de suero de cabra en PBS-DT) a temperatura ambiente por dos horas para luego añadir siguientes anticuerpos primarios: anti  $\beta$ -catenina de conejo (1:500) y anti e-cadherina de ratón (1:500). Después de 24 horas de incubación a 4°C, se removió el anticuerpo primario y se lavó tres veces con PBS-T. Se añadieron los colorantes fluorescentes, DAPI (núcleo) (1:500), faloidina 647 (actina polimerizada) (1:100), y los anticuerpos secundarios, CY3 anti-IgG de conejo y AF 488 anti-IgG de ratón (1:1000). Se incubó de nuevo por 24 horas y se lavó tres veces en PBS-T. Se realizaron dos tipos de montaje: entero y plano (blastoderma separado de la yema usando pinzas de microdissección). Para ambos fines, se lavaron los embriones con concentraciones crecientes de glicerol (25, 50, 75%) y fueron colocados en laminas portaobjetos. Las fotografías fueron realizadas en el microscopio confocal LSM880 (Zeiss) usando las siguientes longitudes de onda DAPI (405 nm), Faloidina (633 nm),  $\beta$ -catenina (561 nm) y E-cadherina (488 nm) con un ancho de barrido de 0.75  $\mu$ m para a 800X y 120  $\mu$ m para 100X. Se realizó un experimento con análisis de 3-5 embriones por condición.

#### **4.2.8 Análisis estadísticos:**

La concentración letal media (LC50) se calculó aplicando logaritmo a las concentraciones, normalizando los valores de supervivencia y realizando una regresión no lineal con pendiente variable. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos cuentan con distribución normal. Para determinar diferencias de los parámetros morfológicos se realizó la prueba T-student con corrección de Welch para aquellos con distribución normal o de lo contrario la prueba de Mann-Whitney. Para determinar la diferencia de áreas entre células se realizó la prueba T-Student no apareada entre los diferentes grupos. Todos los gráficos y la estadística fueron realizados usando el programa Graphpad Prism 7

#### **4.2.9 Comité de ética:**

El proyecto detallado en esta propuesta ha sido aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de inscripción 104736, Fecha de validez: 28/08/2019-27/08/2020).

## 5. RESULTADOS:

En primer lugar, se realizaron experimentos preliminares con menos embriones (10 embriones) mezclados de dos cepas silvestres (WT<sup>KN</sup> y Tab-5), en donde se cuantificó la supervivencia a una amplia gama de concentraciones de ambos compuestos (**Anexo 1, A-B**). A partir de ello, se determinó el rango de concentraciones de trabajo: 0.5-4  $\mu\text{M}$  para *Huratoxina* y 5-50  $\mu\text{M}$  para *Stellularide J*. Dentro de estas cinco concentraciones, la máxima ocasiona 100% de mortalidad, mientras que la mínima un fenotipo normal, tal como lo recomienda la OECD (OECD, 2013).

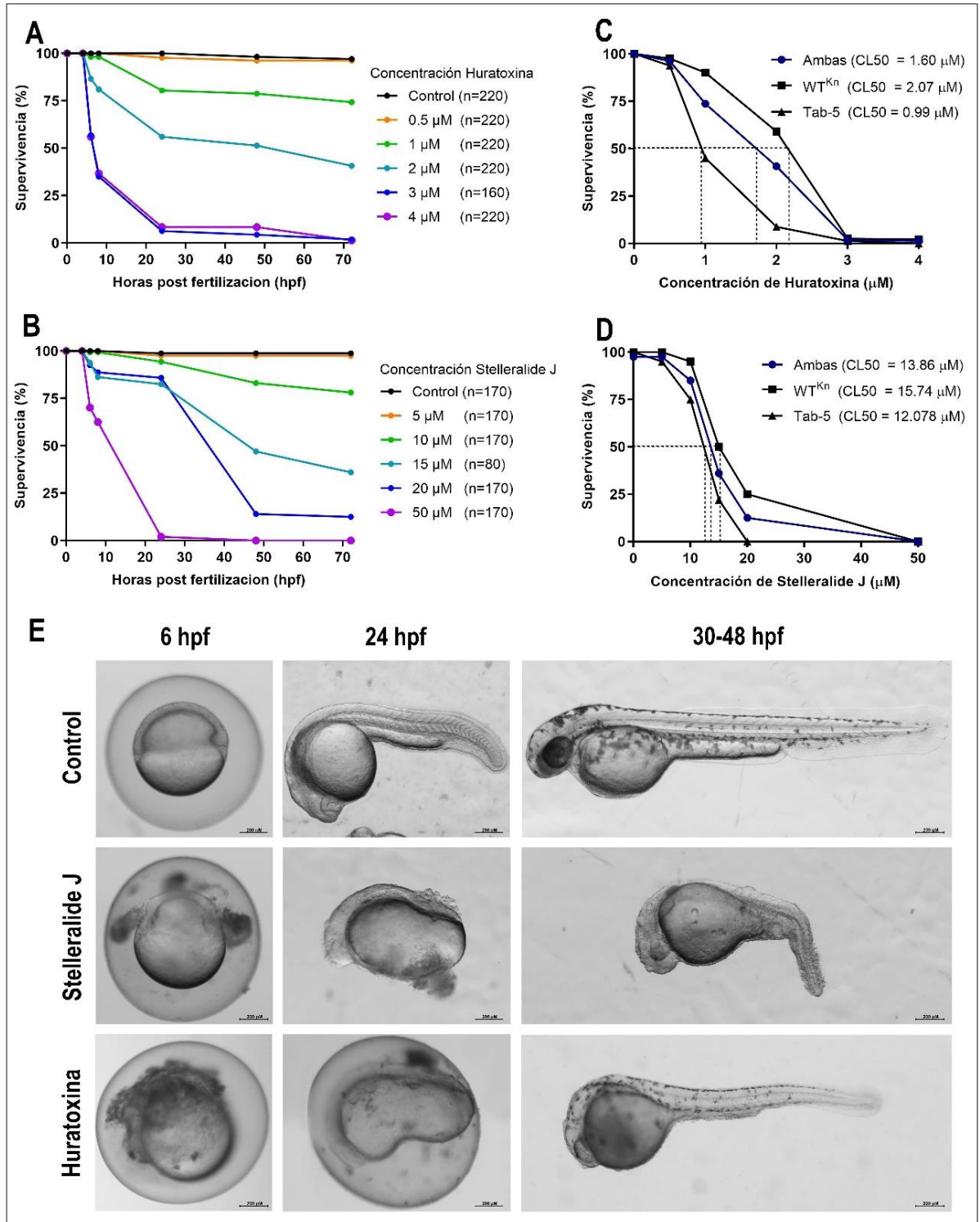
### 5.1 Supervivencia de embriones y dosis letal media:

En los experimentos oficiales se emplearon ambas cepas de manera independiente para asegurar que los efectos toxicológicos no estén ligados a un trasfondo genético particular y un mayor número muestral (20 embriones por pocillo por tratamiento) para aumentar la rigidez estadística. Se registró la supervivencia acumulada y las causas de muerte de los embriones expuestos a concentraciones crecientes de compuestos y en varios estadios del desarrollo (de 4 a 72 hpf).

La toxicidad de los compuestos es dosis y tiempo dependiente. A concentraciones altas (3-4  $\mu\text{M}$  *Huratoxina*, 50  $\mu\text{M}$  *Stellularide J*) la mayoría de embriones muere durante el primer día de desarrollo, y los restantes a las 48hpf. Las causas de muerte más comunes son: el desprendimiento total de blastodermo (capa de células que dan origen a todo el embrión) a las 6 y 8 hpf, o por ausencia de cola a las 24 hpf. Mientras que, a concentraciones intermedias (1-2  $\mu\text{M}$  *Huratoxina*, 10-20  $\mu\text{M}$  *Stellularide J*) mueren menos embriones y de manera gradual durante los tres días por paro del latido cardiaco. Finalmente, a concentraciones menores de 0.5  $\mu\text{M}$  *Huratoxina* y 5  $\mu\text{M}$  *Stellularide J* no se observa mortalidad, ni tampoco efectos morfológicos (mostrado luego) (**Fig. 1 A, B, E**).

Se calculó la concentración letal media (CL50) para ambos compuestos usando los datos de supervivencia a las 72 hpf de ambas cepas. La CL50 de *Huratoxina* es 1.60  $\mu\text{M}$ , promediando los resultados de ambas cepas (2,07  $\mu\text{M}$ , WT<sup>KN</sup> y 0,99  $\mu\text{M}$ , Tab-5). Mientras que la CL50 a las 72hpf de *Stellularide J* es 13.86  $\mu\text{M}$  (15.74  $\mu\text{M}$ , WT<sup>KN</sup> y 12.08  $\mu\text{M}$ , Tab-5) (**Fig. 1 C, D**). *Stellularide J* presenta una LC50 ocho veces más alta que *Huratoxina*, es decir se requiere una mayor cantidad de compuesto para causar

mortalidad, y por lo tanto es menos tóxica. Además, cabe resaltar que hay una diferencia en la susceptibilidad de las cepas, siendo los embriones de la cepa Tab-5 más sensibles.



**Figura 1.** Supervivencia embriones después de una única administración de distintas concentraciones de los compuestos a las 2-2.5 hpf. **A-B)** Curva de supervivencia de la combinación de embriones de la cepa Tab-5 y WT<sup>KN</sup> durante los primeros 3 días del desarrollo (0, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 horas post fertilización (hpf)). **C-D)** Supervivencia de embriones de las cepas WT<sup>KN</sup>, Tab-5 y combinada a las 72 horas post fertilización (hpf). El

cálculo de la CL50 fue realizado en GraphPad Prism (ver metodología, 4.2.8, análisis estadísticos) **E)** Embriones muertos: Stelleralide J (6 hpf y 24 hpf – 50  $\mu$ M, 30 hpf – 20  $\mu$ M), Huratoxina (6 hpf – 8  $\mu$ M, 24 hpf – 4  $\mu$ M, 48 hpf – 3  $\mu$ M), en comparación con el control. Escala 200  $\mu$ m. Se realizaron tres experimentos que representan 4-7 repeticiones, el número de embriones está indicado al costado de cada tratamiento.

## 5.2 Efectos generales en líneas silvestres

Aprovechando la transparencia de los embriones de pez cebra y su rápido desarrollo embrionario, se realizaron observaciones morfológicas en estadios claves del desarrollo usando un estereomicroscopio de campo claro (ver metodología). Se utilizaron las mismas cinco concentraciones y dos cepas que en los experimentos de toxicología. Se tomaron fotos representativas de los fenotipos observados y cuantificó su frecuencia (porcentaje de embriones).

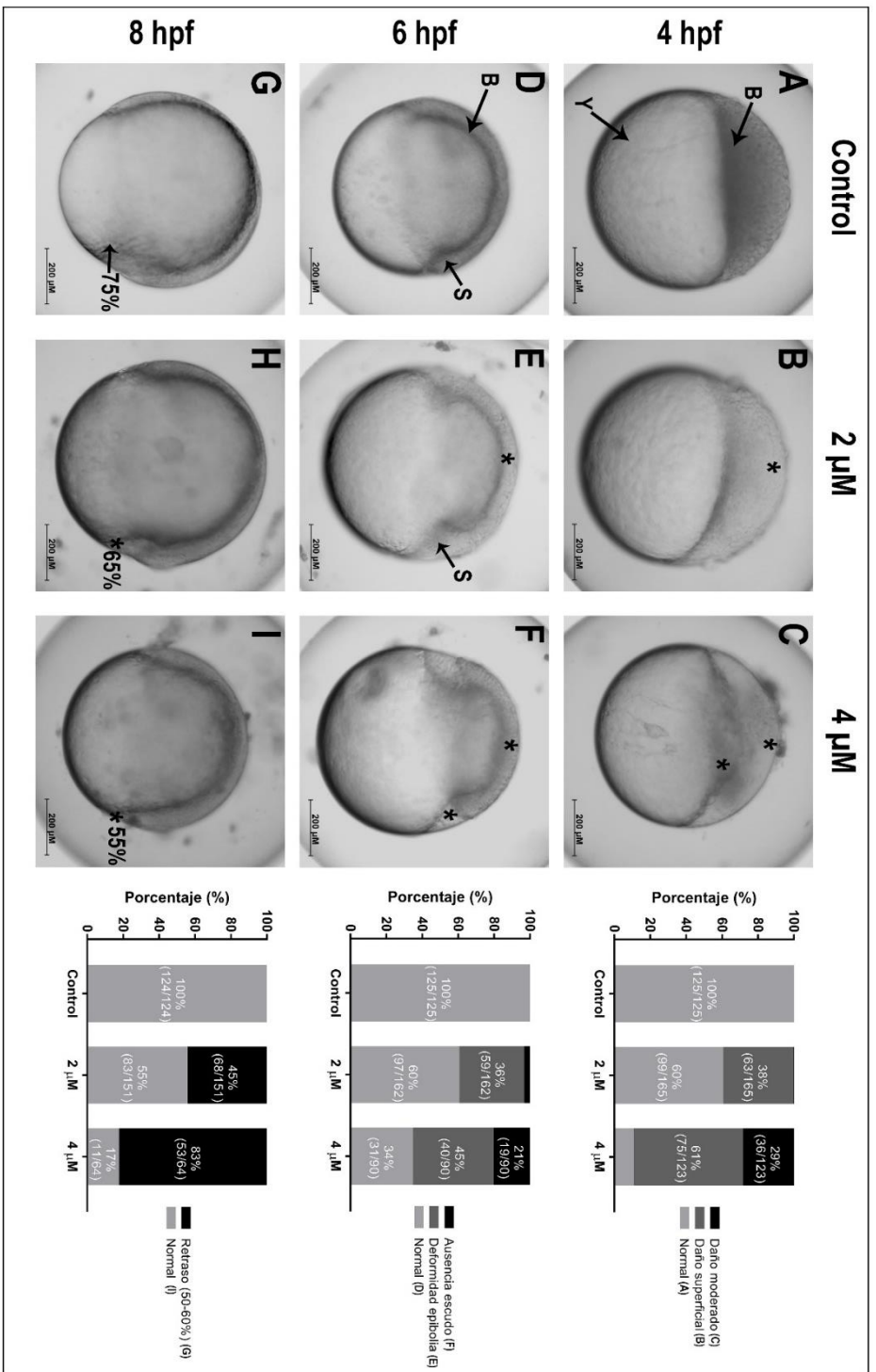
### 5.2.1 Efectos tempranos:

Los efectos tempranos solo se observaron a altas concentraciones de ambos compuestos (2-4  $\mu$ M *Huratoxina*, 20-50  $\mu$ M *Stelleralide J*), siendo más frecuentes e intensos en las concentraciones más altas (4  $\mu$ M *Huratoxina* y 50  $\mu$ M *Stelleralide J*) (**Fig. 2 y 3**).

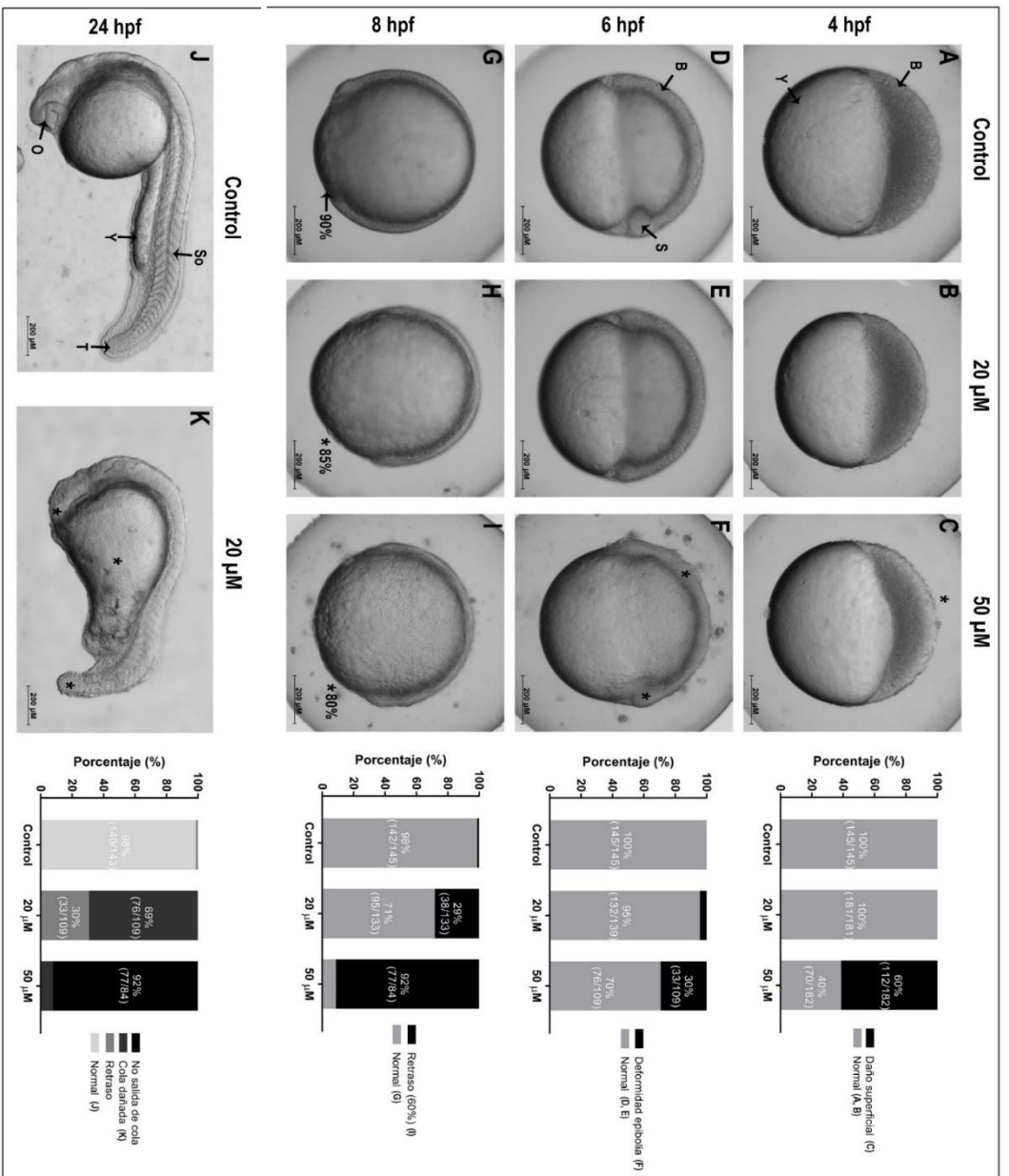
Los efectos morfológicos fueron detectados desde el primer punto de observación, dos horas después de la adición de las drogas, es decir a las 4 horas de desarrollo. A mayor concentración ocurren con mayor intensidad y frecuencia. **A las 4 hpf**, ambos compuestos causan una alteración en el blastodermo, cúmulo de células sobre la yema del embrión. Específicamente, se observó el desprendimiento de las células de la superficie, conocidas como las células de la envoltura (cEVL) que se ha catalogado como “daño superficial” (38% 2  $\mu$ M, 61% 4  $\mu$ M *Huratoxina*, 60% 50  $\mu$ M *Stelleralide J*). Mientras que algunos embriones (29%) tratados con 4  $\mu$ M *Huratoxina* presentan daño adicional en las células profundas del blastodermo, referido como “daño moderado” (**Fig. 2 A-D, Fig. 3 A-C**). **A las 6 hpf**, ambos compuestos afectan la epibolia, primer gran movimiento de células, al retrasar la formación del escudo embrionario (región inductora de la parte dorsal del embrión) y deformación del blastodermo. Este retraso se mantiene ya que los embriones tratados presentan una menor progresión de la epibolia (menor área de blastodermo cubre la yema) con respecto al control **a las 8 hpf** (45% 2 $\mu$ M, 83% 4  $\mu$ M *Huratoxina*, 29% 20  $\mu$ M y 92% 50  $\mu$ M *Stelleralide J*) (**Fig. 2 E-, Fig. 3 D-I**).

Finalmente, **a las 24 hpf**, el 100% de embriones tratados con 20  $\mu$ M de *Stelleralide J* presentan cambios morfológicos: daño en la cola y la extensión de la yema. A las 48 hpf para el desarrollo y muere la mayoría (**Fig. 3 J-L**). Ya que las cEVL juegan un papel en la epibolia, al estar unidas al blastodermo migrante; así como en la formación de la cola, al constituir el peridermis (van Eeden *et al*, 1996), es muy posible que el daño ocasionado tempranamente en las cEVL sea la causa de la mayoría de fenotipos observados.





**Figura 2: Efectos generales tempranos (4-8 hpf) Huratoxina: Iguierda:** Fotografías representativas de los fenotipos observados en los embriones tratados con 1% DMSO (control), 2 y 4 μM de Huratoxina. **B:** Blastodermo, **Y:** Yema, **S:** "Shield". Los porcentajes (**G-I**) denotan la progresión de la epibolia. Los asteriscos marcan las diferencias de los embriones tratados respecto al control. **Derecha:** Porcentaje de los distintos fenotipos observados, los números entre paréntesis corresponden al número de individuos que presentaron el fenotipo sobre el total de embriones observados. Al costado de cada fenotipo está indicado a que fotografía corresponde. Se realizaron tres experimentos que representan 4-7 repeticiones y 80-220 embriones por tratamiento.



**Figura 3: Efectos generales tempranos (4-24 hpf) Stelleratide J: Izquierda:** Fotografías representativas de los fenotipos observados en los embriones tratados con 1% DMSO (control), 20 y 50 µM de *Stelleratide J*. **B:** Blastodermo, **Y:** Yema, **S:** "Shield", **O:** Ojo, **So:** somites, **T:** cola. Los porcentajes (G-I) denotan la progresión de la epibolia. Los asteriscos marcan las diferencias de los embriones tratados respecto al control. **Derecha:** Porcentaje de los distintos fenotipos observados, los números entre paréntesis corresponden al número de individuos que presentaron el fenotipo sobre el total de embriones observados. Al costado de cada fenotipo está indicado a que fotografía corresponde. Se realizaron tres experimentos que representan 4-7 repeticiones y 80-220 embriones por tratamiento.

### 5.2.2 Efectos generales tardíos

Como se mencionó anteriormente, a las 24 hpf la mayoría de los embriones tratados con concentraciones altas de ambos compuestos mueren, en cambio, los embriones tratados con bajas concentraciones, aquellas cercanas o menores a la concentración letal media, empiezan a mostrar cambios morfológicos visibles por microscopía de campo claro.

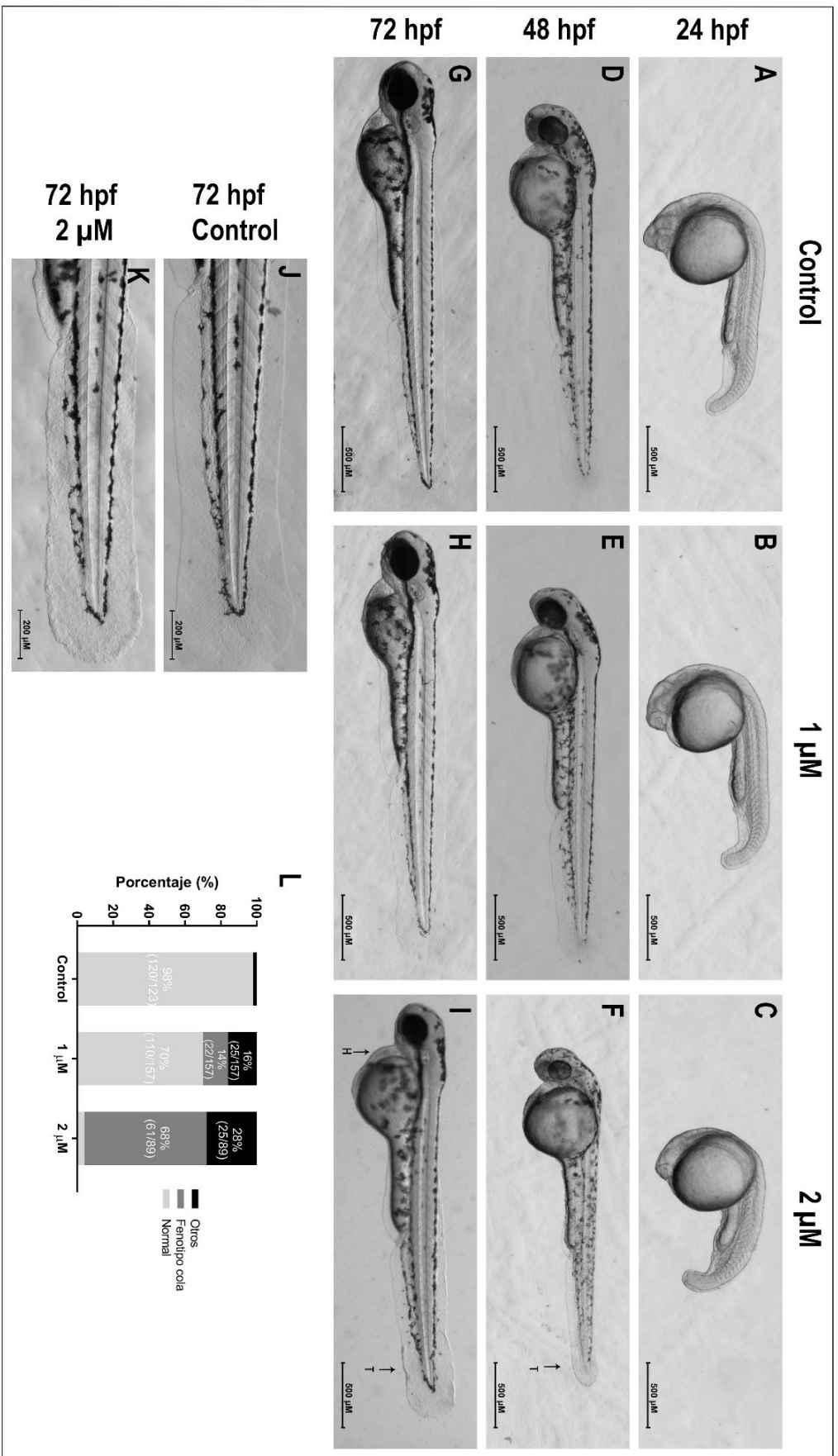
Aquellos tratados con *Huratoxina* presentan bordes aserrados en la cola (en vez de lisos como el control) a partir de las 48 hpf tanto a 1  $\mu\text{M}$  como 2  $\mu\text{M}$  (**Fig. 4 F**). A las 72 hpf, a parte del daño en la cola presentan edema en la yema y reducido uso de las aletas pectorales en el nado el 14% de embriones a 1  $\mu\text{M}$  y 68% a 2  $\mu\text{M}$  (**Fig. 4 H-I**). Este fenotipo guarda relación con el observado en etapas tempranas, ya que el borde de la cola, o la peridermis, está formada por las células superficiales del embrión (cEVL) que a altas concentraciones se ven afectadas tempranamente.

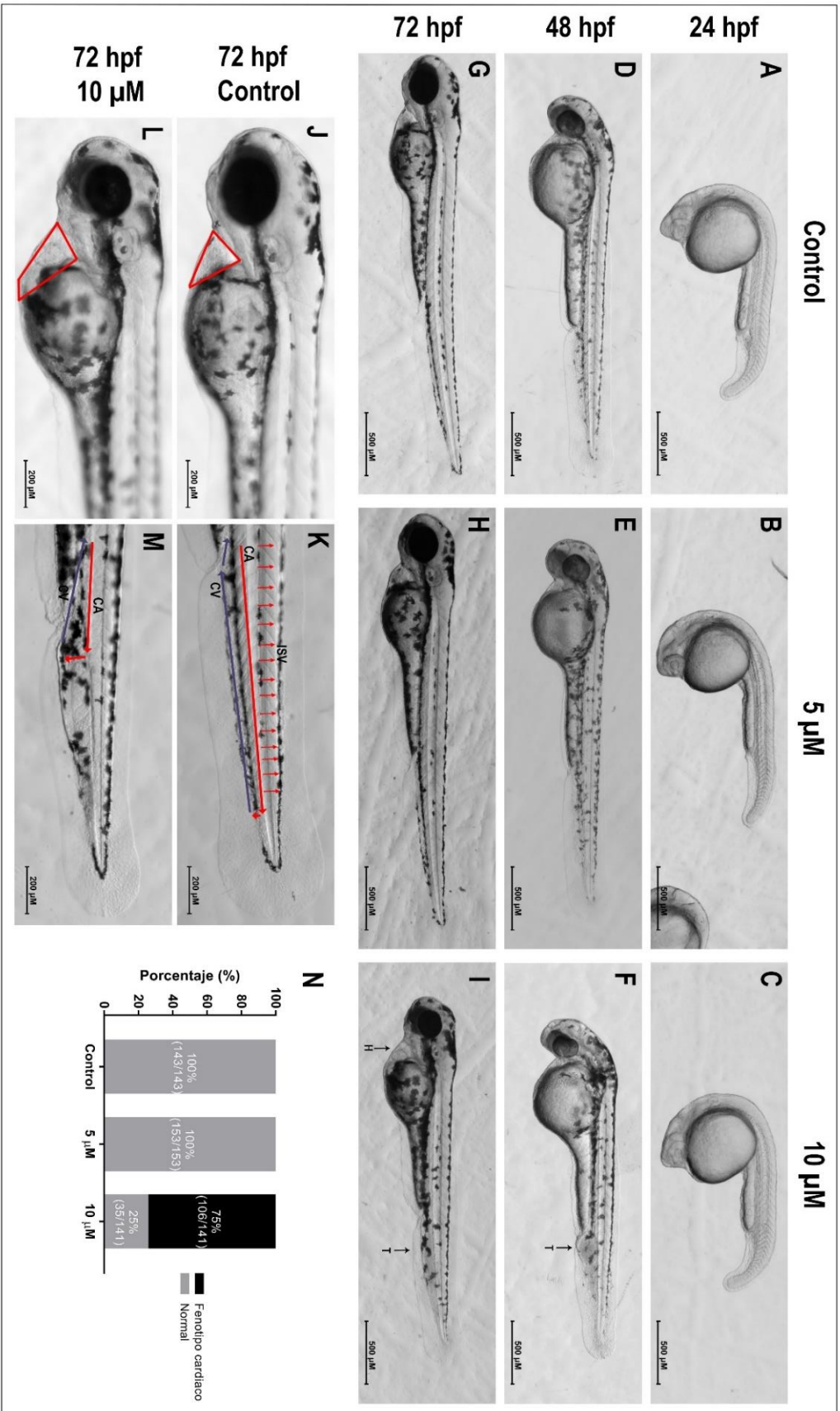
Por otro lado, aquellos expuestos a 10  $\mu\text{M}$  de *Stelleralide J* presentan problemas cardiacos a partir de las 48 hpf. En este estadio, el 75% de los embriones presenta un edema en la zona ventral de la cola que coincide con la región caudal hematopoyética y el plexo de la vena caudal. Además, el flujo sanguíneo se detiene en esa región en vez de continuar hacia la parte posterior del embrión (**Fig. 5 F**). Posteriormente, a las 72 hpf, se mantiene la interrupción del flujo sanguíneo tanto en la zona caudal como en la zona dorsal (escaso flujo por los vasos intersegmentales que irrigan la zona dorsal del embrión) y un ensanchamiento del pericardio, tejido del corazón (**Fig. 5 I, L, M**). Este fenotipo no guarda relación evidente con el daño a las cEVL observado en etapas tempranas. Mostrando por primera vez una diferencia en los efectos de ambos compuestos.

Asimismo, los embriones presentan un retraso en el desarrollo. Particularmente a 2  $\mu\text{M}$  de *Huratoxina* el retraso ha sido arrastrado de estadios previos, mientras que a 1  $\mu\text{M}$  *Huratoxina* y 10  $\mu\text{M}$  *Stelleralide J* recién se hace evidente a las 24 hpf. Consideramos importante estudiar el retraso para interpretar correctamente los cambios morfológicos en los embriones. Para dicho fin se emplearon medidas estandarizadas para este modelo (**Ver metodología, Fig. 6 C**). El retraso es dosis dependiente ya que, a mayor concentración, mayor diferencia en los valores y mayor significancia estadística en todas las variables frente al control. Por ejemplo, hay diferencia más significativa a 2  $\mu\text{M}$  que a 1  $\mu\text{M}$

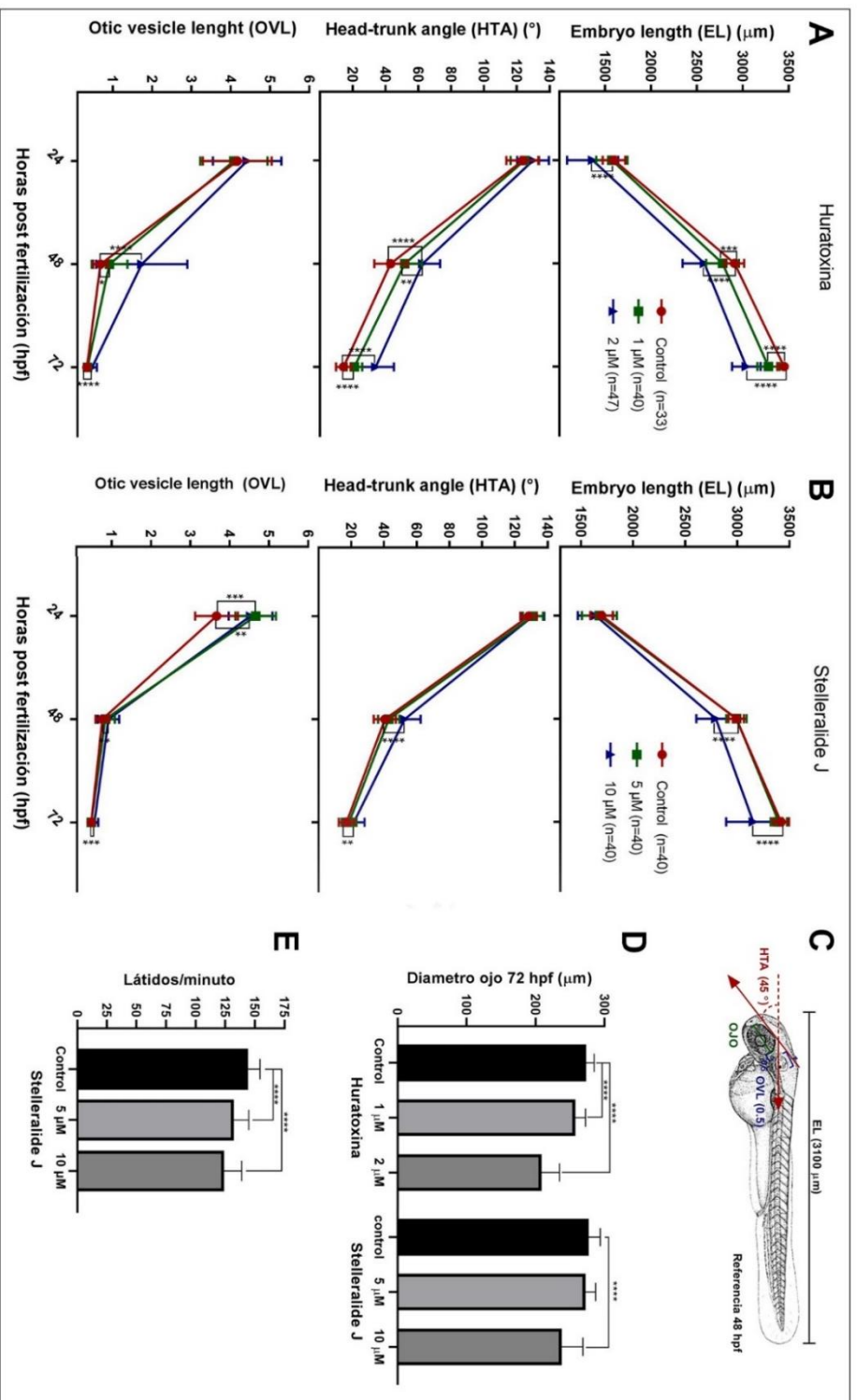
*Huratoxina* frente al control en todas las variables (**Fig. 6 A-B**). Estos resultados demuestran que sí se presenta retraso, y que no es producto de fenómenos independientes como reducción en la longitud del embrión (EL), falla en la formación de los ejes (HTA) o desarrollo a nivel ótico (OVL), como sí se ha reportado anteriormente (Hoeksma *et al*, 2019)

También se realizaron otras medidas como el diámetro de los ojos y el ritmo cardiaco. El diámetro de los ojos es una medida cráneo-facial que permite estudiar el desarrollo neuronal (Nishimura *et al*, 2016). Los embriones tratados con 1-2  $\mu\text{M}$  Huratoxina y 10  $\mu\text{M}$  Stelleralide J presentaron una reducción del diámetro con respecto al control (**Fig. 6 D**). Mientras que la medición del ritmo cardiaco (solo en Stelleralide J) buscaba comprobar si la obstrucción del flujo en la vena caudal y vasos intersegmentales está afectando el funcionamiento del corazón. Los embriones tratados con 5  $\mu\text{M}$  ( $132\pm 13$  latidos por minuto, lpm) y a 10  $\mu\text{M}$  ( $123\pm 14$  lpm), muestran una reducción significativa frente a los embriones control ( $144\pm 10$  lpm) (**Fig. 6 E**). Estudios posteriores del sistema nervioso como el cardiaco son necesarios para confirmar el efecto.





**Figura 5: Efectos generales tardíos (24-72 hpf) Stelleralide J:** A-D) Fotografías representativas de los fenotipos observados en los embriones tratados con 1% DMSO (control), 5 y 10  $\mu\text{M}$  de *Stelleralide J*. T: Cola, H: corazón. J-M) Acercamiento de la zona anterior y posterior del embrión. J y L) El área del tejido pericárdico está marcado en rojo. K y M) En rojo se señalan las arterias y en azul las venas. CA: arteria caudal, CV: vena caudal, ISV: vasos Inter segmentales. N) Porcentaje de embriones con fenotipo cardiaco (ensanchamiento de tejido pericárdico e interrupción del flujo sanguíneo). Se realizaron tres experimentos que representan 4-7 repeticiones y 80-220 embriones por tratamiento. Se realizaron tres experimentos que representan 4-7 repeticiones y 80-220 embriones por tratamiento.



**Figura 6. Medidas morfológicas de embriones tratados con Hurtoxina y Stelleralide J:** **A)** Embriones de la cepa WT<sup>Kn</sup> tratados con 1 y 2  $\mu\text{M}$  de Hurtoxina y **B)** embriones de la cepa Tab-5 y WT<sup>Kn</sup> tratados con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de Stelleralide J fueron fotografiados a 16X con el estereomicroscopio AxioZoom a las 24, 48 y 72 hpf. El número de asteriscos indica la magnitud de la significancia de dos experimentos independientes con dos replicas cada uno (número de embriones entre paréntesis). Tratamiento estadístico: Prueba de Mann-Whitney. **C)** Imagen de embrión a 48 hpf donde se señalan las tres medidas de retraso y diámetro del ojo, modificada de (Kimmel *et al*, 1995). **D)** Diámetro del ojo a las 72 hpf de los embriones tratados con ambos compuestos (dos experimentos, n=28-29). Tratamiento estadístico: Prueba T-Student no apareada **E)** Frecuencia cardiaca a las 72 hpf de embriones tratados con Stelleralide J (dos experimentos, n=28-29). Tratamiento estadístico: Prueba T-Student no apareada.

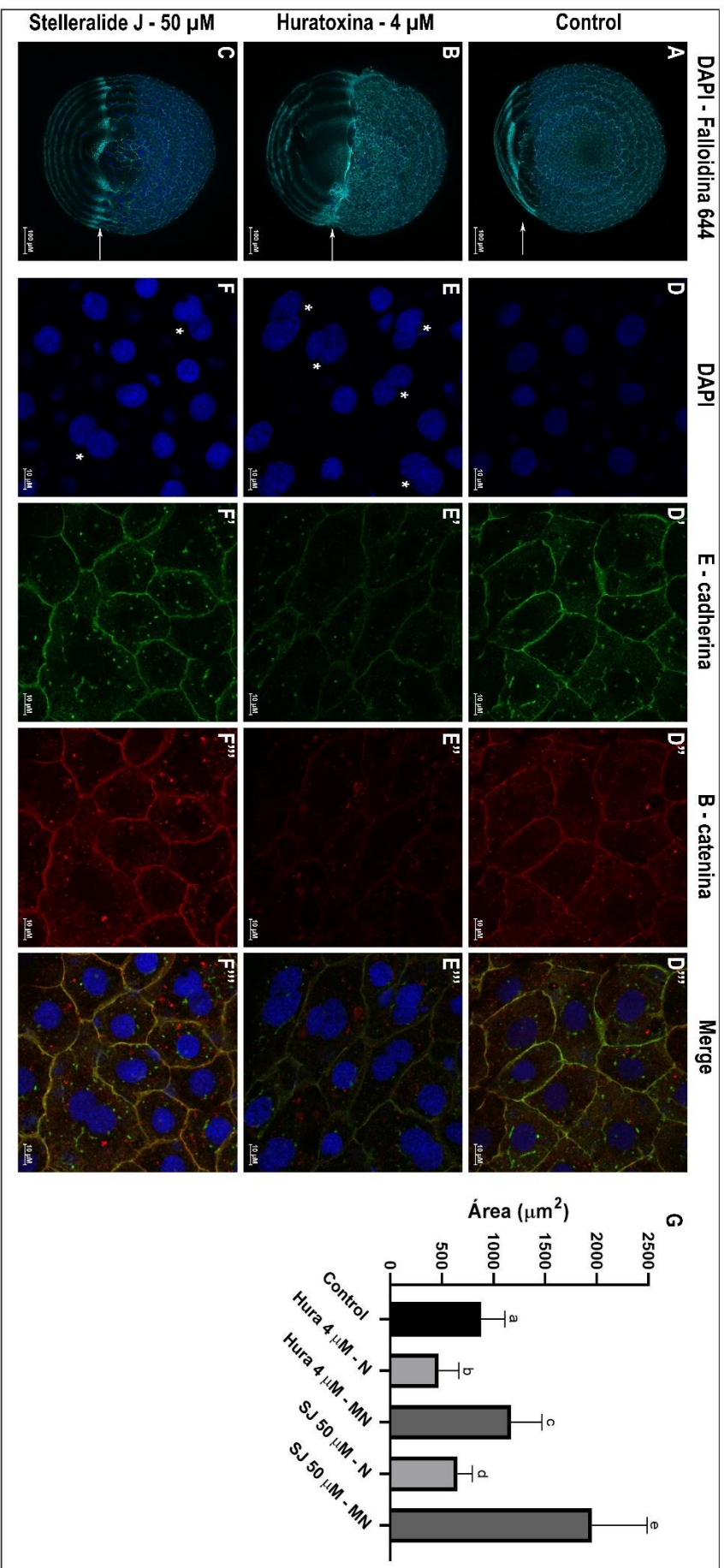
### 5.3 Efectos específicos tempranos estudiados por inmunotinciones:

Los embriones tratados a altas concentraciones de los compuestos presentaron retraso en el desarrollo (ausencia escudo embrionario y menor progresión de epibolia) y deformidad en el blastodermo a las 6 y 8 hpf, mientras que los embriones tratados a bajas concentraciones de *Huratoxina*, daño en la cola a partir de las 48 hpf. Si bien es cierto el retraso del desarrollo podría deberse a una reducción en la migración celular, es más probable que la causa sea aún más temprana y este siendo arrastrada a lo largo del desarrollo. El efecto morfológico observado más tempranamente fue el desprendimiento de las células de la envoltura (cEVL) a las 4hpf.

Los cambios en las cEVL más reportados en la literatura científica ocurren a nivel de diferenciación, apoptosis, división celular y uniones intercelulares (Lepage *et al*, 2014). En esta investigación se decidió investigar los cambios a nivel de uniones intercelulares debido al desprendimiento de células y la deformidad del blastodermo durante la epibolia, sin detectar un menor número o tamaño de células en las observaciones a campo claro. Para probar dicha hipótesis, se realizaron tinciones tanto para observar a mayor detalle la morfología de las cEVL (actina, componente del citoesqueleto y el núcleo); así como componentes de las uniones adherentes,  $\beta$ -catenina y e-cadherina. Se trabajó con embriones de 6 hpf en plena epibolia y tratados con altas concentraciones de compuestos para que el efecto sea evidente, no obstante, el objetivo a largo plazo es trabajar con concentraciones por debajo de la dosis letal media.

Los embriones enteros control y tratados con 50  $\mu$ M *Stelleralide J* presentan un patrón de células ordenado (**Fig. 7 A, C**), mientras que un desordenamiento del blastodermo se evidencia en aquellos tratados con 4  $\mu$ M *Huratoxina* (**Fig. 7 B**). Ambos compuestos producen retraso, fenómeno ya reportado previamente (**Fig. 7 A-C**). Al observar los embriones a 800X, los embriones control presentan células rectangulares con núcleos circulares. En cambio, los embriones tratados presentan dos poblaciones de células: : a) pequeñas con forma regular y mononucleadas y, b) células grandes con forma irregular y binucleadas (**Fig. 7 D-F**). El área de las células multinucleadas es el doble de las uninucleadas, posible indicio de una fusión celular. Mientras que el área de las células control es intermedia entre ambos (**Fig. 7 G**).





**Figura 7. Tinciones de embriones a 6 hpf tratados con *Huratoxina* y *Stelleralide J* observados en el microscopio confocal.** Los embriones de 6 hpf tratados con 4 µM *Huratoxina*, 50 µM *Stelleralide J* o control (1% DMSO) fijados y teñidos con DAPI-azul (núcleo), Faloidina 647-celeste (actina), CY3-rojo (B-catenina) y AF488-verde (E-cadherina). **A-C:** embriones “whole-mount” teñidos con DAPI y faloidina a 100X, la flecha señala la progresión del blastodermo, **D-F:** blastodermo montado en “flat-mount” donde se ven las CEVL a 800X, los asteriscos señalan células multinucleadas. **G**) Área de las células, en donde **N:** normales, **MN:** multinucleadas. Tratamiento estadístico: Prueba de T Student no pareada entre cada condición. Se realizó un experimento con 3-5 embriones y 16-19 células medidas por tratamiento.

## 5.4 Efectos específicos tardíos por medio de líneas transgénicas HB9::GFP y BACmpo::GFP

A pesar de la transparencia de los embriones, el uso de un estereomicroscopio tiene limitaciones en la detección de cambios morfológicos. Se recomienda utilizar líneas fluorescentes para explorar efectos menos evidentes de los compuestos (Haffter *et al*, 1996). Los embriones tratados con ambos compuestos presentan reducción del diámetro del ojo. Para comprobar que esto implica un efecto a nivel neuronal se utilizó la línea HB9::GFP, en donde las neuronas expresan la proteína verde fluorescente, mientras que para estudiar los efectos en el sistema inmune, y determinar si los compuestos están afectando la producción de células inmunes en la región caudal hematopoyética, se utilizó la línea BACmpo::GFP, en donde los neutrófilos son verde fluorescente.

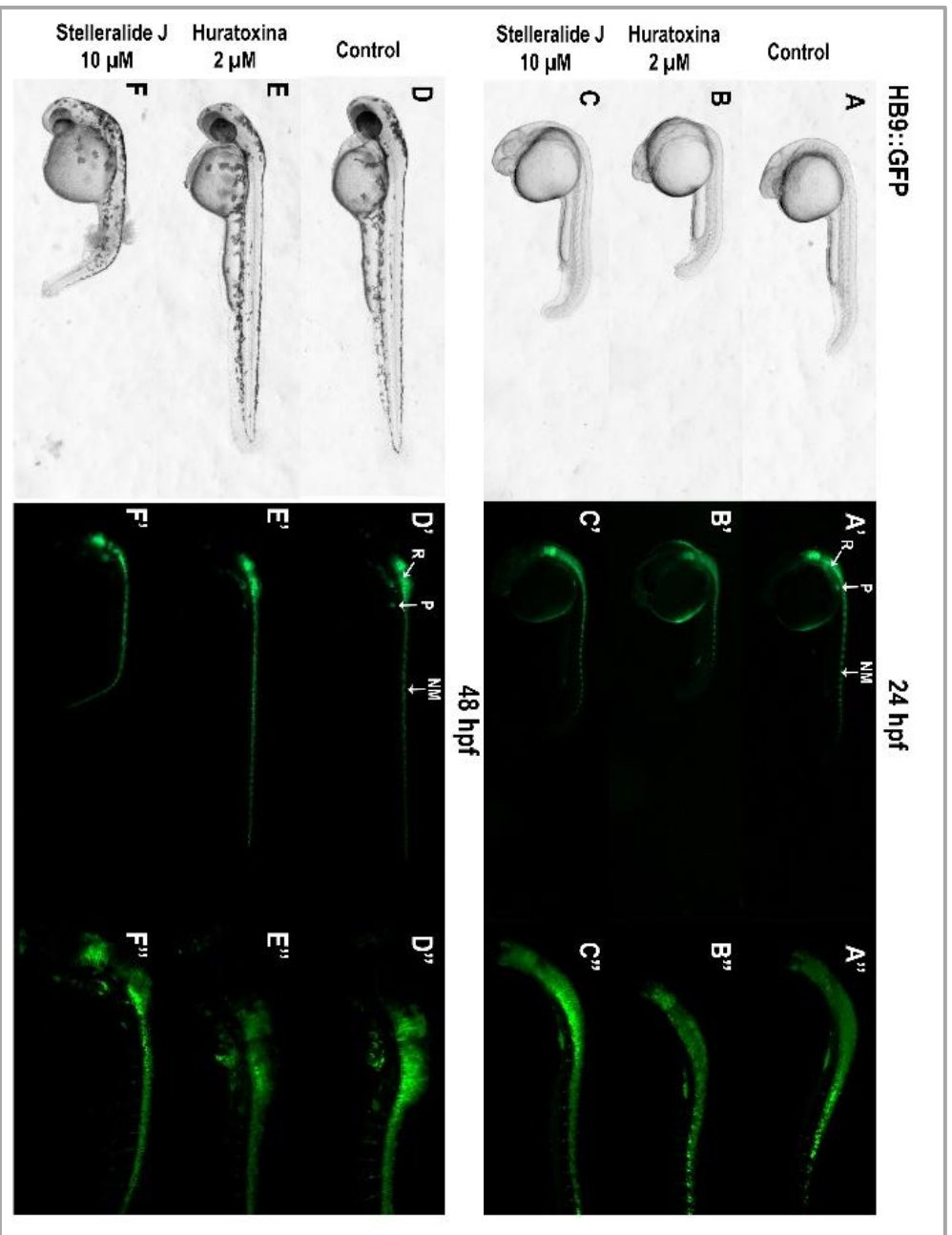
### 5.5.1 HB9::GFP

Los embriones de la cepa HB9::GFP tratados con ambos compuestos no presentaron cambios en el patrón o intensidad de fluorescencia en el cerebro (rombo-encéfalo), neuronas motoras, y páncreas; incluso tras la inspección en el microscopio confocal (**Fig. 8**). Estos resultados descartan un posible efecto en el sistema nervioso.

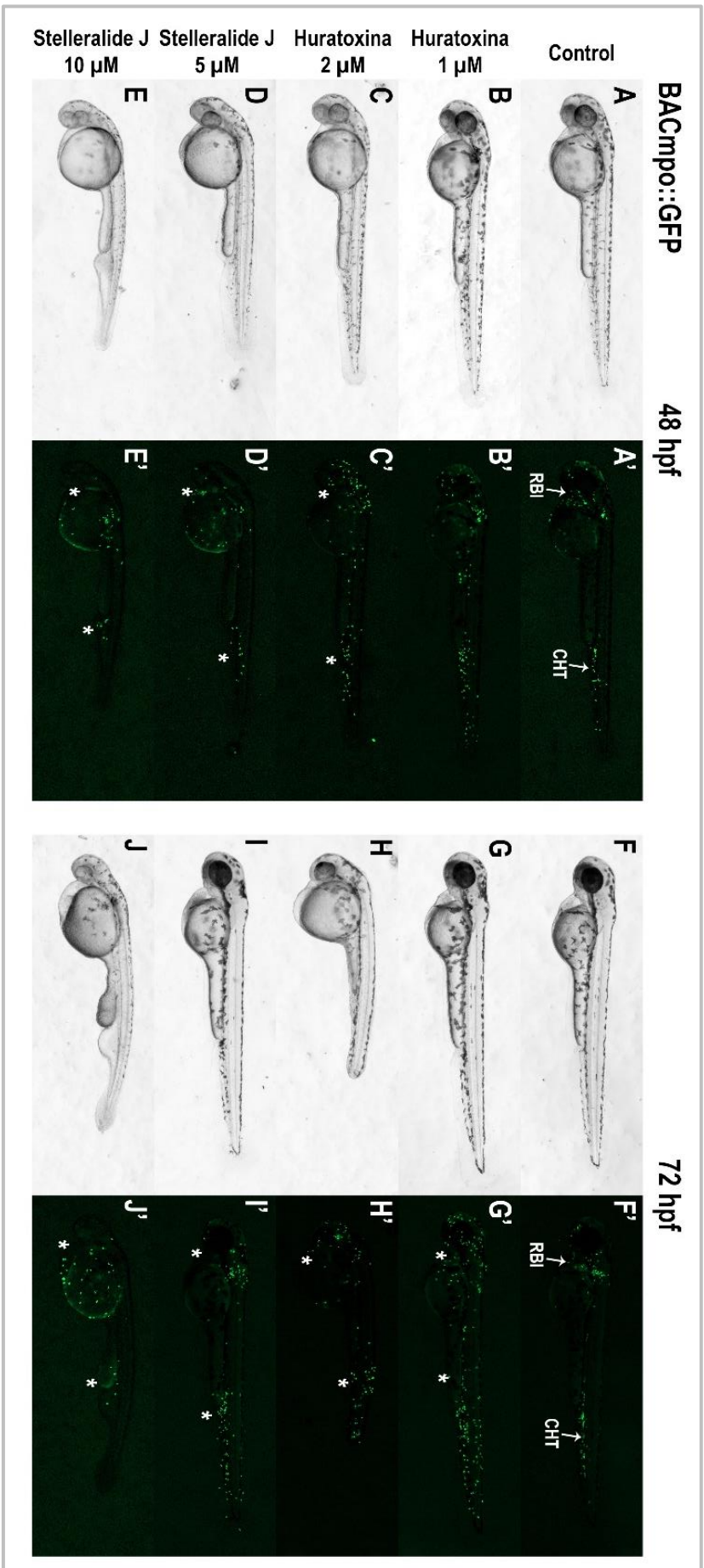
### 5.5.2 BACmpo::GFP

En los embriones de la cepa BACmpo::GFP, el tratamiento con 1 y 2  $\mu\text{M}$  *Huratoxina* ocasionó migración de neutrófilos alrededor de todo el cuerpo y en particular la cabeza y cola, en vez de solo concentrarse en la región rostral (RBI) y caudal hematopoyética (CHT) como sucede en los controles (**Fig. 9. A'-D',F'-I'**). En cambio, los embriones tratados con 10  $\mu\text{M}$  *Stelleralide J* presentan un menor número de neutrófilos (24 neutrófilos a las 48 hpf y 39 a las 72 hpf)(n=5) con respecto al control (71 a las 48 hpf y 103 a las 72 hpf) (n=5) o lo esperado para esos estadios (Renshaw *et al*, 2006)(**Fig. 9 E', J'**). Puede que esta reducción esté relacionada al retraso en el desarrollo que presentan los embriones, sea un efecto específico en la región caudal hematopoyética o ambos.

Por último, los embriones transgénicos son más sensibles, específicamente la línea BACmpo. Los embriones tratados con *Stelleralide J* a 10  $\mu\text{M}$  a las 72 hpf presentan fenotipo más severo y menor supervivencia que los silvestres a esta misma concentración (75% BACmpo::GFP, 85% silvestres).



**Figura 8. Embriones de la línea transgénica HB9::GFP tratados con Huratoxina y Stelleralide J.** Los embriones fueron tratados con *Huratoxina* 1-2  $\mu\text{M}$  y *Stelleralide J* 5-10  $\mu\text{M}$  a las 2-2.25 hpf y se revisó el patrón de fluorescencia a las 24 y 48 hpf. Fotos de embriones vivos anestesiados en estereomicroscopio de fluorescencia AxioZoom, campo claro (A-C, D-F) y GFP (A'-C', D'-F'). (A'',-C'', D''-F''): Fotos de embriones fijados en el microscopio confocal. **R:** rombocéfalo, **P:** páncreas, **NMI:** neuronas motoras. Se realizó un solo experimento con 20 embriones por tratamiento.



**Figura 9. Embriones de la línea transgénica BACmpo::GFP tratados con Huratoxina y Stelleralide J.** Los embriones fueron tratados con Huratoxina 1-2  $\mu$ M y Stelleralide J 5-10  $\mu$ M a las 2-2.25 hpf y se revisó el patrón de fluorescencia a las 48 y 72 hpf. Fotos de embriones vivos anestesiados en estereomicroscopio de fluorescencia AxioZoom, campo claro (A-J) y GFP (A'-J'). CHT: "caudal hematopoietic tissue" – tejido caudal hematopoyético, RBI: "rostral blood island" – isla de sangre rostral. Los asteriscos señalan las diferencias con respecto al control. Se realizó un solo experimento con 20 embriones por tratamiento.

## 5 DISCUSIÓN:

En esta investigación se pudo determinar la concentración letal media, efectos morfológicos generales y específicos tempranos y tardíos, así como efectos fisiológicos y celulares de dos ésteres de dafnano aislados de *H. crepitans* en el modelo embrionario del pez cebra. Información que servirá como punto de inicio para futuras investigaciones de estos compuestos en este u otros modelos.

Es la primera investigación en probar esteres de dafnano en este modelo, y una de las investigaciones iniciales usando este modelo para el estudio de compuestos en el Perú. Esto representa una ampliación en el repertorio de modelos animales manejados a nivel nacional para fines experimentales, así como una iniciativa de incrementar el estudio de las plantas medicinales peruanas que, como se mencionó anteriormente, hay riqueza en cantidad, pero pobreza en estudios.

### *i) La supervivencia de embriones y la concentración letal media:*

La concentración letal media (CL50) es usada internacionalmente para evaluar la toxicidad de los compuestos a través de la medición de un parámetro cuantificable: la muerte. Es importante obtener una CL50 precisa y reproducible ya que este valor va a ser usado en las experimentaciones futuras con un modelo y puede ser tomado en cuenta para los estudios clínicos en humanos. Sin embargo, muchos estudios reportan CL50 muy variables, como aquellos para el PMA, un compuesto químicamente similar a los esteres de dafnano (Hrubik *et al*, 2016; Liu *et al*, 2018; Davis *et al*, 2011). Para tal fin, se decidió respetar los criterios de la OECD para las pruebas de toxicidad aguda: el número y la distancia entre, el número y calidad de los embriones y los criterios de muerte (OECD, 2013). Además, se adicionó el uso dos cepas de peces silvestres para tener un repertorio variado de sensibilidad. Prueba de ello fue lograr visualizar la relación directamente proporcional que guardan la concentración y mortalidad a través del tiempo, tal como ha sido reportada en otros estudios (Li *et al*, 2018; Bakkiyanathan *et al*, 2012).

En este estudio la **CL50** a las 72 hpf es de 1.60  $\mu\text{M}$  (0.93  $\mu\text{g/mL}$ ) para *Huratoxina* y 13.86  $\mu\text{M}$  (8.60  $\mu\text{g/mL}$ ) para *Stelleralide J*. Ahora que se han identificado los procesos biológicos afectados, en un futuro se priorizará el uso de concentraciones más bajas que la CL50 para evitar la muerte celular.

Los **estudios previos de citotoxicidad *in vitro*** con la línea de CRC Caco-2 dieron una concentración inhibitoria media (CI50) de 4.51 µg/mL (7.72 µM) para *Huratoxina* y 8.30 µg/mL (13.38 µM) para *Stellularide J*. La CL50 y la CI50 guardan relación entre los compuestos. A pesar de ser estructuralmente semejantes, *Huratoxina* es más tóxica tanto *in vitro* como *in vivo*. Es decir, posiblemente en el caso de administración a otras especies o humanos se debería ser menor la dosis administrada de *Huratoxina* que *Stellularide J*. Sin embargo, estudios realizados por nuestros colaboradores durante el transcurso de la tesis, revelaron que *Stellularide J* no presenta poder citotóxico mientras que *Huratoxina* inhibe el crecimiento a un 30% en las células de Caco-2 (Trinel *et al*, 2020). Sin embargo, puede que no se hayan observado efectos debido a una misma concentración administrada cuando *Stellularide J* requiere de concentraciones más altas para mostrar un efecto. Además, cabe resaltar que estos experimentos solo han sido realizados en una línea de cáncer específica. El hecho que efectos morfológicos, fisiológicos y celulares, que serán discutidos posteriormente, hayan sido encontrados para esta molécula, promueven su futuro estudio.

Estudios de toxicidad aguda (exposición de 24 horas) de drogas anticancerígenas en desarrollo clínico (Taxol, Talidomida, Ácido gambógico, etc.) en este modelo arrojaron CL50 entre 0.4 y 55 µM a las 96 hpf (Gao *et al*, 2014). A pesar de que la administración es más temprana y prolongada, y los puntos de evaluación son diferentes, la LC50 de ambos compuestos está comprendida en el rango de drogas ya probadas en humanos, lo que sugiere la viabilidad de administración en humanos. Aún falta determinar la dosis efectiva, es decir concentración a la cual se obtiene el efecto deseado, la cual debería ser lo suficientemente menor a la dosis letal media para evitar efectos indeseados.

En el futuro se deberá tomar en cuenta la absorción de estos compuestos por los embriones. En este estudio las diluciones seriadas del fármaco fueron administradas en el medio embrionario a las 2-2.5 hpf sin recambio (sistema estático) durante los tres días de observación debido a la escasez de compuestos (estos fueron aislados en Francia y transportados a Perú). Lo ideal hubiera sido medir la concentración del químico en el medio usando un espectrómetro de masas, al menos en la concentración más alta y baja, al inicio y fin del estudio. Si es que la concentración cambia, sus efectos deberían ser expresados en relación con la nueva concentración. Si es que la concentración varía considerablemente (por ejemplo, mitad) se debería optar por renovar la solución o por un

sistema de distribución continua por flujo (OECD, 2013). También dado que los compuestos son apolares existe la posibilidad que no sean totalmente absorbidos por el embrión. De ser cierto eso, sería recomendable usar un tipo de administración directa como es la microinyección en la yema o en las células (Michiels et al, 2019; Kim et al, 2015).

ii) ***Los estudios morfológicos:***

Ha sido conveniente la observación de los embriones en distintas etapas del desarrollo para identificar tempranamente los fenotipos antes de que terminen en muerte por coagulación (Haffter *et al*, 1996). En este estudio en particular, se escogieron estadios específicos por su relevancia biológica para obtener pistas sobre los procesos biológicos blancos de los compuestos, así como su temporalidad. Esto ha sido útil para caracterizar efectos como el daño a las células de la EVL a las 4 hpf, aserramiento en los bordes de la cola (*Huratoxina*) y aparición de edema acompañado de interrupción de flujo y reducción de frecuencia cardíaca (*Stelleralide*) que aparecen a partir de las 48 hpf. Finalmente, la variedad de fenotipos presentados en distintos sistemas (cardíaco, epitelial, hematopoyético) confirma que el modelo de pez cebra es ideal para el estudio de compuestos a nivel de organismo, y a su vez apropiado para estudiar mecanismos a nivel celular, como la aparición de células multinucleadas.

***El desprendimiento de las cEVL y los efectos morfológicos tempranos y tardíos.***

Las células de la envoltura (cEVL) derivan de blastómeros, células que componen la blástula, externos que cubren a todas las células profundas del embrión. A las 4 hpf, se restringe su linaje y su ciclo celular se alarga (Fukazawa *et al*, 2010). En las próximas horas de desarrollo juegan un rol importante en la epibolia, primer evento morfogénico (formación corporal) del pez cebra. Durante la epibolia, la matriz de actinmiosina jala al sincitio de la yema, a las cEVL y a las células profundas; resultando en un movimiento coordinado que hará que todo el blastodermo cubra a la yema (Lepage *et al*, 2014). En particular las cEVL se aplanan, relocalizan y atraviesan al menos una división celular en el plano animal-vegetal (arriba-abajo) para poder cubrir de manera eficaz la yema y reducir la tensión generada en ambos polos (Campinho *et al*, 2013). Posteriormente, las cEVL van a formar la capa externa de la epidermis, conocida como la peridermis, que recubre todo el embrión, incluyendo la cola y las aletas (Fukazawa *et al*, 2010).

Los embriones tratados con ambos compuestos muestran desprendimiento de las células de la envoltura acompañado de retraso durante todo en desarrollo, tanto a bajas como altas concentraciones. A altas concentraciones los efectos se manifiestan durante las primeras 24 horas de desarrollo en forma de desprendimiento de cEVL, deformidad en blastodermo, retraso en el desarrollo y daño en la cola, los cuales finalizan en muerte embrionaria. A bajas concentraciones solo de Huratoxina, se observan efectos en la cola y en las aletas, tejidos compuestos de peridermis. El fenotipo de desprendimiento celular guarda relación con aquel observado para el extracto crudo del látex de *H. crepitans* que induce la disgregación de los esferoides de la línea de CRC HT29 (comunicación personal, Claire Racaud-Sultan).

Para estudiar a más a fondo la morfología celular de las cEVL, células afectadas tempranamente, pero cuya alteración posiblemente resulta en los fenotipos descritos a lo largo del desarrollo, se realizaron inmunotinciones de moléculas de adhesión celular, citoesqueleto y núcleo de embriones de 6 hpf. En embriones tratados por ambos compuestos, las cEVL presentan dos fenotipos: células grandes deformes multinucleadas, mientras otras pequeñas con forma regular y mononucleadas.

La fusión podría explicar la presencia de dos núcleos y el mayor tamaño de células. Este fenotipo ha sido reportado previamente para embriones tratados con inhibidores de división (Aphidicolina 150  $\mu$ M e Hydroxyurea 20-30 nM) donde las cEVL se fusionan para aliviar la tensión superficial entre ambos polos (Campinho *et al*, 2013). A nivel fisiológico, los embriones presentan daño a nivel epitelial y menor tamaño a las 24 hpf (Zhang *et al*, 2008). Tanto el fenotipo celular como morfológico del tratamiento con *Huratoxina* y *Stelleralide J* coincide con el observado para estos inhibidores de división, indicando un posible mecanismo común.

La inhibición de la división ha sido reportada por el equipo de PHARMA-DEV en Toulouse en paralelo mientras se llevaba a cabo este proyecto de investigación. Usando una línea caco-2 reportera para las distintas fases del ciclo celular se encontró que *Huratoxina* causa un arresto en la fase G1 (Trinel *et al*, 2020). Del mismo modo la Grindamicrina detiene la división celular en G1 mediante la inhibición de la quinasa dependiente de ciclina 2 (cdk2) lo que desencadena la muerte celular o apoptosis (Yoshida *et al*, 2003). Existe un interés en el desarrollo de inhibidores de cdk ya que han mostrado tener un efecto gran terapéutico en pacientes con cáncer y reducidos efectos secundarios



(Dickson & Schwartz, 2009). Sin embargo, aún queda probar si *Huratoxina*, así como *Stelleralide J*, causan un bloqueo del ciclo celular a través del mismo mecanismo que la Grindamicrina.

Si bien los resultados *in vitro* e investigaciones de otros esteres de dafnano, respaldan la hipótesis de inhibición del ciclo celular en las cEVL del modelo embrionario del pez cebra, los resultados siguen siendo preliminares. Es necesario realizar más repeticiones de las tinciones donde se cuantifique el tamaño y número de células. Para caracterizar mejor el fenómeno de inhibición del ciclo celular y posterior fusión celular, se podría adicionar: observar las células profundas para determinar la especificidad espacial y de tipo celular de los compuestos, estudiar más estadios del desarrollo para estudiar la temporalidad del efecto, así como emplear concentraciones más bajas para ver si el efecto a nivel celular aparece en etapas tempranas a pesar de carencia de efecto fisiológico evidente. Para comprobar el efecto en la división celular se pueden realizar tinciones anti-PHH3, marcador de proliferación, que se espera que se encuentre menos expresado en los embriones tratados, mientras para la apoptosis tinciones con naranja de acridina o anticuerpos anti-caspasa-3. Para confirmar si hay un bloqueo en el ciclo celular se puede realizar estudio del ciclo celular con un marcaje con yoduro de propidio, que es más predominante en las células con más ADN como aquellas en fase S. Luego se puede explorar el mecanismo de acción enfocándose en *cdk2*, blanco reportado para la Grindamicrina, a través del uso de inhibidores o técnicas de silenciamiento genético.

#### ***El fenotipo cardíaco en Stelleralide J:***

El sistema cardíaco en el pez cebra se desarrolla a partir de angioblastos. A las 22 hpf ocurre la vasculogénesis, en la cual los angioblastos migran y se unen formando tres vasos principales: la aorta dorsal, la vena cardinal y los vasos craneales, generando así un circuito simple, pero funcional. Posteriormente, a las 30 hpf, empieza la angiogénesis donde se forman los vasos intersegmentales que irrigan la parte dorsal y el plexo venoso caudal que irriga la zona posterior del embrión (Gore *et al*, 2012; Isogai *et al*, 2001).

A las 48 hpf los embriones tratados con 10  $\mu$ M de *Stelleralide J* presentan un edema en la región del plexo venoso caudal (formado por angiogénesis) acompañado de una obstrucción del flujo sanguíneo hacia la parte posterior del embrión, menor circulación en los vasos intersegmentales, así como una reducción en la frecuencia cardíaca. Si bien

los embriones tratados con *Huratoxina* (1-2  $\mu\text{M}$ ) presentan ligeros edema pericárdico, este ha sido considerado inespecífico y será discutidos posteriormente. Estos resultados sugieren que la angiogénesis, más no la vasculogénesis, está siendo alterada; ya que solo los vasos secundarios están siendo afectados. Sin embargo, se desconoce si los vasos están formados y hay una obstrucción de flujo sanguíneo o de lo contrario si hay un defecto en las células endoteliales (derivadas de angioblastos). Para tal fin, podría ser utilizada la línea transgénica *fli1::gfp*, que marca las células endoteliales de los vasos sanguíneos, usada en caracterizar la red vascular en este modelo (Chávez *et al*, 2016). A pesar de que el origen de falta de flujo es desconocido, se sabe que el funcionamiento del corazón está siendo alterado ya que hay una disminución significativa de la frecuencia cardiaca.

Es de gran interés en el estudio de fenotipos cardíacos ya que la vasculogénesis y angiogénesis cumplen un rol importante en contexto fisiológico (desarrollo y regeneración) y patológico (cáncer y artritis)(Bakkiyanathan *et al*, 2012). En particular, el microambiente canceroso está caracterizado por ser un ambiente de falta de oxígeno (hipoxia) que favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos gracias a la secreción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF. Los anticuerpos contra VEGF o su receptor son utilizados de rutina para el tratamiento de varios cánceres, sin embargo, varios pacientes sufren de resistencia. Es por eso que es importante desarrollar nuevas drogas inhibitorias (Teleanu *et al*, 2020). Sería interesante evaluar en un futuro si *Stelleralide J* presenta dicha actividad usando modelos de cáncer.

El origen del sistema hematopoyético depende del sistema circulatorio. Los precursores hematopoyéticos derivan de las células endoteliales de la aorta y luego se especifican en la región caudal hematopoyética (CHT) (Wattus & Zon, 2018). Ya que la morfología CHT (formación de edema) como el flujo de la aorta se ven alteradas, se decidió estudiar si la producción de un tipo de células hematopoyéticas, específicamente células mieloides, los neutrófilos, está siendo afectada. En experimentos preliminares con embriones de la cepa *BACmpo::GFP* tratados con 10 $\mu\text{M}$  de *Stelleralide J*; se detectaron menos neutrófilos de lo esperado para los todos los estadios estudiados (Renshaw *et al*, 2006). Por un lado, esta reducción podría ser producto de un daño particular en esa zona, pero también puede deberse a un retraso en el desarrollo considerando que los neutrófilos estaban concentrados la isla de sangre rostral (primer sitio de hematopoyesis), en vez de

estar en la región caudal (segundo sitio de hematopoyesis) (Harvie & Huttenlocher, 2015). En estudios posteriores se incluirán administraciones tardías para ver el efecto temporal, independientemente del retraso. En cambio, el tratamiento con 1 y 2  $\mu\text{M}$  *Huratoxina* ocasionó una distribución de neutrófilos alrededor de todo el cuerpo y en la cabeza, tal vez reflejando un efecto tóxico generalizado, que es importante tener en cuenta.

### ***Los efectos morfológicos inespecíficos***

Ambos compuestos causan retraso tanto tempranamente como tardíamente. Se confirmó por medio de medidas morfológicas tardías que el retraso ocurre de manera integral, es decir no es una simple reducción del tamaño corporal, como se ha reportado para otros compuestos (Hoeksma *et al*, 2019). La reducción del tamaño del ojo puede estar relacionada con el retraso, ya que al usar una línea transgénica neural (HB9::GFP) no se detectaron cambios neurológicos.

Si bien el retraso es considerado un fenómeno común, inespecífico y reversible; como lo prueba un estudio en donde 180 de 502 drogas antitumorales causaban retraso o malformación en el desarrollo a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Li *et al*, 2012). Es importante reportarlo por tres motivos: puede permitir que los compuestos actúen por más tiempo en periodos sensibles del desarrollo, puede ser un efecto teratogénico de los compuestos y en algunos casos, sí puede estar relacionado a un efecto biológico, como por ejemplo, una alteración hormonal (Teixidó *et al*, 2013).

Asimismo, la formación de edemas en el corazón o en la yema obtenidos en ambos compuestos, son efectos comunes (Haffter *et al*, 1996) y suelen presentarse junto con otros cambios no específicos como menor pigmentación, extensión de la yema, ausencia de aletas pectorales y reducción de motilidad (Gao *et al*, 2014). Por tal motivo este fenotipo no fue explorado a profundidad.

## **6 CONCLUSIONES**

1. La mortalidad de los embriones es concentración y tiempo dependiente a lo largo del desarrollo. A las 72 hpf, la concentración letal media (CL50) de *Stelleralide J* (13.86  $\mu\text{M}$ ) es mayor que *Huratoxina* (1.60  $\mu\text{M}$ ), relación que también se guarda *in vitro*.

2. Altas concentraciones de ambos compuestos (*Huratoxina* 4  $\mu\text{M}$ , *Stellularide J* 50  $\mu\text{M}$ ) causan desprendimiento de las cEVL y menor migración de las células del blastodermo posiblemente debido a una falta de división y fusión de las células de la envoltura (cEVL)
3. Bajas concentraciones de ambos compuestos causan retraso en el desarrollo, un efecto inespecífico, pero acompañados de otros efectos morfológicos específicos que difieren entre compuestos. *Huratoxina* (1-2  $\mu\text{M}$ ) afecta las estructuras superficiales como cola y aletas, mientras que *Stellularide J* (10  $\mu\text{M}$ ) el sistema circulatorio-hematopoyético
4. Si bien este estudio es preliminar usando embriones sanos, se evidencian efectos en la división celular y circulación/hematopoyesis, actividades muy valoradas para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades. Esto justifica su posterior estudio en otros modelos.

## 7 LIMITACIONES E INVESTIGACIÓN FUTURA

Una de las principales limitaciones de este proyecto es el bajo número de repeticiones para las inmunotinciones y experimentos con líneas transgénicas. La pandemia causada por el SARS-COVID-19 impidió el acceso a los laboratorios y, por lo tanto, no se pudieron realizar más repeticiones ni experimentos confirmatorios.

Solo las células con determinados perfiles son susceptibles a estos compuestos, sean las cEVL y las endoteliales (que forman los vasos sanguíneos o las líneas cancerosas *in vitro*). Para comprobar esto es indispensable probar otros métodos de administración directos como la microinyección (celular o en la yema) para comprobar que los efectos reportados en células y tejidos más externos sean fruto de una especificidad hacia estos y no se deban a una falta de penetración a tejidos más internos (Michiels et al, 2019; Kim et al, 2015).

Se logró determinar el rango de concentraciones donde son activos los compuestos y se descubrió una variedad de posibles efectos morfológicos (división celular y circulación/hematopoyesis). En el futuro es necesario estudiarlos de manera rigurosa. Además, se debería determinar si estos efectos se visualizan a concentraciones menores, donde los efectos secundarios indeseados como el retraso ya no aparecen.

Una vez confirmado los efectos anteriores en el pez cebra, estos podrán ser explorados en otros modelos biológicos más específicos sea en esta u otras especies. Por ejemplo, la membrana corioalantoica de pollo es una estructura altamente vascularizada que sirve para estudiar el efecto de drogas en la formación de vasos sanguíneos (Nowak-Sliwinska, 2014).

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Ahmad F, Liu X, Zhou Y & Yao H (2015) An in vivo evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles in larval-embryo Zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* **166**: 21–28 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.003>
- Aponte JC, Vaisberg AJ, Rojas R, Caviedes L, Lewis WH, Lamas G, Sarasara C, Gilman RH & Hammond GB (2008) Isolation of cytotoxic metabolites from targeted peruvian amazonian medicinal plants. *J. Nat. Prod.* **71**: 102–105
- Bakkiyanathan A, Nathan JR, Ravikumar S, Gopalakrishnan TS, Aruldas FMM & Malathi R (2012) Anti-angiogenic effects of theophylline on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biomed. Prev. Nutr.* **2**: 174–178 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bionut.2012.03.001>
- Barré-Sinoussi F & Montagutelli X (2015) Animal models are essential to biological research: Issues and perspectives. *Futur. Sci. OA* **1**: 4–6
- Campinho P, Behrndt M, Ranft J, Risler T, Minc N & Heisenberg CP (2013) Tension-oriented cell divisions limit anisotropic tissue tension in epithelial spreading during zebrafish epiboly. *Nat. Cell Biol.* **15**: 1405–1414 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1038/ncb2869>
- Chávez MN, Aedo G, Fierro FA, Allende ML & Egaña JT (2016) Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration. *Front. Physiol.* **7**: 1–15
- Davis R V, McKernan LN, Rhodes J & Kulkosky J (2011) In Vivo Effects of Antiviral Protein Kinase C Modulators on Zebrafish Development and Survival. *ISRN Toxicol.* **2011**: 1–7
- Dickson MA & Schwartz GK (2009) Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr. Oncol.* **16**: 36–43
- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J & Boggs C (1996) A genetic

- screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**: 37–46 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007227>
- van Eeden FJ, Granato M, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Warga RM & Nüsslein-Volhard C (1996) Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**: 255–62 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007245>
- Ericsson AC, Crim MJ & Franklin CL (2013) A Brief History of Animal Modeling. *Mo. Med.* **110**: 201–205
- FDA (2018) The Drug Development Process | FDA. Available at: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process> [Accessed August 8, 2019]
- Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D & Sanes JR (2005) Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development* **132**: 4471–4481
- Francis J (1990) *Hura crepitans* L. Sandbox, molinillo, jabillo. Euphorbiaceae. Spurge family. *USDA For. Serv. South. For. Exp. Station. Insittute Trop. For.* **38**: 1–5
- Fukazawa C, Santiago C, Park KM, Deery WJ, Gomez de la Torre Canny S, Holterhoff CK & Wagner DS (2010) *Poky/chuk/ikk1* is required for differentiation of the zebrafish embryonic epidermis. *Dev. Biol.* **346**: 272–283 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.07.037>
- Gao XP, Feng F, Zhang XQ, Liu XX, Wang Y Bin, She JX, He ZH & He MF (2014) Toxicity assessment of 7 anticancer compounds in zebrafish. *Int. J. Toxicol.* **33**: 98–105 Available at: <https://doi.org/10.1177/1091581814523142>
- Gonzales G & Valerio L (2006) Medicinal Plants from Peru: A Review of Plants as Potential Agents Against Cancer. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **6**: 429–444 Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=6&issue=5&spage=429>

- Gonzales GF, Gasco M, Malheiros-Pereira A & Gonzales-Castañeda C (2008) Antagonistic effect of *Lepidium meyenii* (red maca) on prostatic hyperplasia in adult mice. *Andrologia* **40**: 179–185
- Gore A V., Monzo K, Cha YR, Pan W & Weinstein BM (2012) Vascular development in the zebrafish. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* pp 1–22.
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C & Nüsslein-Volhard C (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**: 1–36 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007226>
- Hamburger M & Hostettmann K (1991) Bioactivity in Plants *Phytochemistry* 1991 30. *Phytochemistry* **30**: 3864–3874
- Harvie EA & Huttenlocher A (2015) Neutrophils in host defense: new insights from zebrafish. *J. Leukoc. Biol.* **98**: 523–537
- He W, Cik M, Appendino G, Puyvelde L, Leysen J & Kimpe N (2002) Daphnane-Type Diterpene Orthoesters and their Biological Activities. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2**: 185–200
- Hoeksma J, Misset T, Wever C, Kemmink J, Kruijtz J, Versluis K, Liskamp RMJ, Boons GJ, Heck AJR, Boekhout T & den Hertog J (2019) A new perspective on fungal metabolites: identification of bioactive compounds from fungi using zebrafish embryogenesis as read-out. *Sci. Rep.* **9**: 1–16 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-54127-9>
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch G-J, White S, Chow W, et al (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**: 498–503 Available at: <http://www.nature.com/articles/nature12111>
- Hrubik J, Glisic B, Samardzija D, Stanic B, Pogrmic-Majkic K, Fa S & Andric N



- (2016) Effect of PMA-induced protein kinase C activation on development and apoptosis in early zebrafish embryos. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* **190**: 24–31
- Isogai S, Horiguchi M & Weinstein BM (2001) The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev. Biol.* **203**: 278–301 Available at: [https://zfish.nichd.nih.gov/Intro Page/intro1.html](https://zfish.nichd.nih.gov/Intro%20Page/intro1.html) [Accessed July 1, 2020]
- Jaffé BWG (1943) Hurain, a new plant protease from *Hura crepitans*. **149**: 1–7
- Kim SM, Yoo JA, Baek JM & Cho KH (2015) Diethyl phthalate exposure is associated with embryonic toxicity, fatty liver changes, and hypolipidemia via impairment of lipoprotein functions. *Toxicol. Vitro.* **30**: 383–393 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.026>
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B & Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253–310 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589427>
- Lepage SE, Tada M & Bruce AEE (2014) Zebrafish Dynamin is required for maintenance of enveloping layer integrity and the progression of epiboly. *Dev. Biol.* **385**: 52–66 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.015>
- Li F, Sun Q, Hong L, Li L, Wu Y, Xia M & Ikejima T (2013) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Daphnane-type diterpenes with inhibitory activities against human cancer cell lines from *Daphne genkwa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**: 2500–2504 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.025>
- Li J, Zhang Y, Liu K, He Q, Sun C, Han J, Han L & Tian Q (2018) Xiaoaiping Induces Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos Through Activation of ER Stress, Apoptosis and the Wnt Pathway. *Front. Pharmacol.* **9**: 1–12 Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01250/full>
- Li Y, Huang W, Huang S, Du J & Huang C (2012) Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**: 85–90

- Liu T, Shi Y, Chan MTV, Peng G, Zhang Q, Sun X, Zhu Z, Xie Y, Sham K W Y, Li J, Liu X, Ho IHT, Gin T, Lu Z, Wu WKK & Cheng CHK (2018) Developmental protein kinase C hyper-activation results in microcephaly and behavioral abnormalities in zebrafish. *Transl. Psychiatry* **8**: 1–11 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-018-0285-5>
- Lozada-Requena I, Núñez C, Álvarez Y, Kahn L & Aguilar J (2015) Poblaciones linfocitarias, células dendríticas y perfil de citoquinas en ratones con melanoma tratados con *Uncaria tomentosa*. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **32**: 633
- Luziatelli G, Sorensen M, Theilade I & Molgaard P (2010) Asháninka medicinal plants : a case study from the native community of Bajo Quimiriki ,. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **6**: 1–23
- MacRae CA & Peterson RT (2015) Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**: 721–731 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4627>
- Maes J, Verlooy L, Buenafe OE, de Witte PAM, Esguerra C V. & Crawford AD (2012) Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS One* **7**: 1–9
- Michiels EDG, Vergauwen L, Lai FY, Town RM, Covaci A, van Nuijs ALN, Van Cruchten SJ & Knapen D (2019) Advancing the Zebrafish embryo test for endocrine disruptor screening using micro-injection: Ethinyl estradiol as a case study. *Environ. Toxicol. Chem.* **38**: 533–547
- Nishimura Y, Inoue A, Sasagawa S, Koiwa J, Kawaguchi K, Kawase R, Maruyama T, Kim S & Tanaka T (2016) Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. **56**: 18–27
- OECD (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test OECD Available at: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test\\_9789264203709-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en) [Accessed May 23, 2019]
- Oloyede G, Adaramoye O & Olatinwo M (2016) Chemical Constituents of Sandbox Tree (*Hura crepitans* Linn.) and Anti-hepatotoxic Activity of the Leaves and Stem Bark Extracts. *West Indian Med. J.* Available at:

<https://www.mona.uwi.edu/fms/wimj/article/2756>

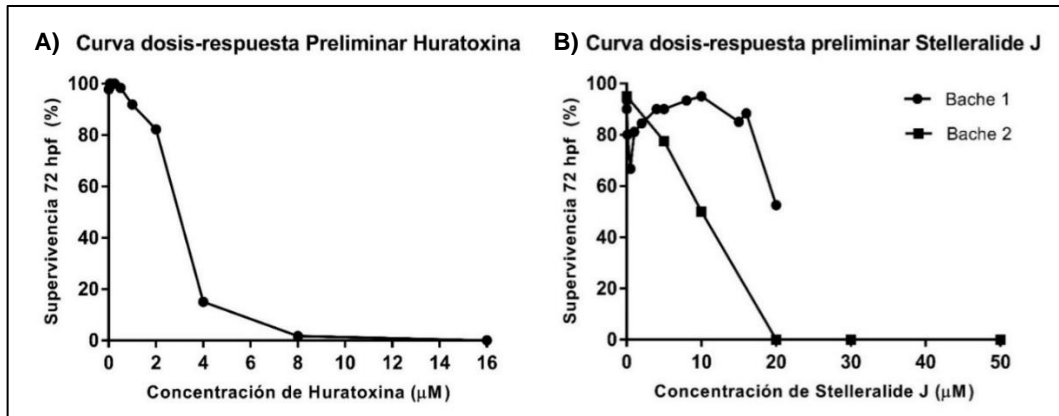
- Parng C, Seng WL, Semino C & McGrath P (2002) Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. *Assay Drug Dev. Technol.* **1**: 41–48
- Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DMI, Elworthy S, Ingham PW & Whyte MKB (2006) Atransgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* **108**: 3976–3978
- Sakata K, Kawazu K & Mitsui T (1971) Studies on a Piscicidal Constituent of *Hura crepitans*. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 2113–2126 Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1971.10860183>
- Teixidó E, Piqué E, Gómez-Catalán J & Llobet JM (2013) Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicol. In Vitro* **27**: 469–478
- Teleanu RI, Chircov C, Grumezescu AM & Teleanu DM (2020) Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment. *J. Clin. Med.* **9**:
- Terriente J & Pujades C (2013) Use of Zebrafish Embryos for Small Molecule Screening Related to Cancer. *Dev. Dyn.* **242**: 97–107
- Trinel M, Jullian V, Le Lamer AC, Mhamdi I, Mejia K, Castillo D, Cabanillas BJ & Fabre N (2018) Profiling of *Hura crepitans* L. latex by ultra-high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **29**: 627–638
- Trinel M, Lamer A Le, Jullian V, Jacquemin D, Graton J, Cristofoli V, Crossay E, Yassine M, Rolland C, Vergnolle N, Mejia K, Joel B, Racaud-sultan C & Fabre N (2020) Bioorganic Chemistry Daphnanes diterpenes from the latex of *Hura crepitans* L. And activity against human colorectal cancer cells Caco-2. *Bioorg. Chem.* **103**: 104132 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104132>
- Wattrus SJ & Zon LI (2018) Stem cell safe harbor: The hematopoietic stem cell niche in zebrafish. *Blood Adv.* **2**: 3063–3069
- Yoshida M, Heike Y, Ohno S, Ikekawa T & Wakasugi H (2003) Involvement of PKC

$\beta$ II in anti-proliferating action of a new antitumor compound gnidimacrin. *Int. J. Cancer* **105**: 601–606

ZFIN (2016) Genotype: AB/Tuebingen. *Mutat. Details Curation Older Featur.*  
Available at: <https://zfin.org/action/genotype/view/ZDB-GENO-010924-10>  
[Accessed July 6, 2020]

Zhang L, Kendrick C, Jülich D & Holley SA (2008) Cell cycle progression is required for zebrafish somite morphogenesis but not segmentation clock function. *Development* **135**: 2065–2070

## ANEXOS:



**Anexo 1. Resultados de los experimentos preliminares:** La supervivencia de los embriones a las 72 horas post fertilización (hpf) después de la única administración de distintas concentraciones de los compuestos a las 2-2.25 hpf. Se realizaron tres experimentos con tres repeticiones de 10 embriones por pocillo de ambas cepas WT<sup>KN</sup> y Tab-5. A) *Huratoxina*: 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 µM. B) Se emplearon dos baches de *Stelleralide J* : 0, 0.05, 0.10, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0, 15.0, 16.0, 20.0, 30.0, 50.0 µM.