



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y TERATOGENESIS DE
CASIOPEÍNAS® EN PEZ CEBRA (*Danio rerio*)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

LAURA GUADALUPE HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

DIRECTORA

DRA. MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y TERATOGENESIS DE CASIOPEÍNAS® EN PEZ
CEBRA (*Danio rerio*)**

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Microbiología

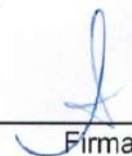
Presenta:

Laura Guadalupe Hernández Martínez

Dirigido por:

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez
Presidente


Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Secretario


Firma

Dra. Angelina Rodriguez Torres
Vocal


Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez
Vocal


Firma

Dra. Mónica Eugenia Figueroa Cabañas
Vocal


Firma

Centro Universitario

Santiago de Querétaro, Querétaro 2022, México.

“Recuerda mirar arriba, a las estrellas, y no abajo, a tus pies. Intenta encontrar el sentido a lo que ves y pregúntate qué es lo que hace que el Universo exista. Sé curioso.

Por muy difícil que te parezca la vida, siempre hay algo que puedes hacer y en lo que puedes tener éxito.

Lo único que cuenta es no rendirse”

Stephen Hawking

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis la Dra. María del Carmen Mejía Vázquez. Le agradezco la confianza y el apoyo brindado durante el proceso del proyecto, compartiendo sus experiencias y apoyándome para mejorar cada día más en laboratorio, por su amistad y cariño que me permitió aprender mucho más de lo que se estaba planteado.

Al Dr. Fausto Arellano Carbajal. Usted ha sido siempre un increíble doctor y docente y lo admiro mucho, porque le apasiona y ama hacer ciencia, le agradezco por su apoyo y sus pláticas, sin duda alguna aprendí tanto de usted en este proceso de la licenciatura, y me llevo en el corazón una gran enseñanza que usted nos brinda y es amar lo que hacemos.

A la Dra. Angelina Rodríguez Torres. Cuando la conocí me encantó la manera en que da sus clases, la admiro mucho porque tiene un conocimiento maravilloso, por la gran docente que es y por lo importante que es para usted que sus alumnos estén bien, le agradezco ser parte de mi comité.

A la Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez. Gracias Doctora por su apoyo en este proceso, no tuve la oportunidad de tomar muchas clases con usted, pero recordaré siempre a una clase que entre a escondidas, y usted aplicaba juegos para aprender y me quede sorprendida porque me hubiese encantado poder conocerla más y aprender de sus clases y su conocimiento.

A la Dra. Mónica Eugenia Figueroa Cabañas. Tengo tanto que agradecerle doctora, más que un sinodal o una docente en el proceso de la carrera o tesis, te convertiste en una amiga. Tus consejos, tu apoyo y la paciencia que me brindaste no tengo palabras ni forma de agradecértelo. He aprendido tanto de ti, amar lo que hago y seguir buscando en mi camino lo que me haga feliz, disfruto las pláticas y las historias de cualquier tema. Sin duda alguna eres y fuiste una de las partes más fundamentales para poder terminar este proceso, gracias por apoyarme con R y bioestadística, por regresarme y abrir libros, volver a programar y desempolvarme un poco. De verdad muchas gracias Móni porque eres y siempre serás una parte importante en todo mi proceso.

Gracias a todos ustedes, porque la ciencia sigue avanzando y ustedes nos siguen guiando en este camino.

DEDICATORIAS

Este Proyecto se lo dedico principalmente a mi toda mi familia aun cuando sus nombres no estén plasmados en esta lista, tíos, tías, primos.

Laura Martínez López mi madre. Siempre ha cuidado y amado de mí, ella confió en cada uno de los logros y me apoyo en momentos de dificultad. La mujer que más amo y admiro por su valentía, fuerza y carácter, una clave fundamental para lograr todo lo que me he propuesto y lo que soy.

José Juan Hernández Domínguez mi padre. Gracias por tus consejos y perseverancia conmigo, por apoyarme en cada sueño que he tenido, por amarme como me amas y protegerme como lo haces, te amo y admiro padre.

Lizeth Hernández Martínez mi hermana. Te amo con todo mi ser, agradezco tanto tener la mejor amiga y hermana del universo, tus palabras me reconfortaron cuando creía no poder más, tu inteligencia me lleva admirar cada parte de ti. Dentro de todo este rompecabezas llamado vida eres esa parte fundamental que va en el centro y que sin ti ninguna otra pieza tendría sentido, te amo.

José Juan Hernández Martínez mi hermano menor. Aun siendo el pequeño de la casa, te sorprenderías cuanta alegría traes a nuestra vida, gracias por cantar y desestresarme cuando sentía que ya no podía continuar con este proyecto, gracias por tus abrazos y tus palabras que me hicieron siempre seguir adelante, te amo.

Romualda López y Pedro Martínez mis abuelitos. En especial esta tesis va dedicada a ustedes dos aun cuando mi abuelito se fue antes y no pudo verme concluir con el título en mano, ustedes dos me enseñaron de valores, humildad y amor. Gracias, mamá Roma por siempre estar al pendiente de mí y por todo tu amor.

Nanci Palacios Godínez una parte importante en mi vida. Te agradezco tus pláticas, el escucharme, el viajar y venir a verme cuando algo no andaba bien, el mostrarme lugares y paisajes diferentes, el reír conmigo aun cuando sentía que ya no podía más. Agradezco con todo mi corazón haberte conocido y que te convirtieras en una de las personas más importantes en mi vida, y en todo este proceso de la tesis gracias. Gracias por todo tu amor y apoyo.

Erika Martínez López mi tía. Cuando te vi defender tu tesis, me inspiraste eres como mi hermana mayor y a la que siempre he admirado por tu lucha y jamás dejarte vencer te amo.

Margarita y J. Guadalupe mis abuelitos. Les agradezco su amor y apoyo en todo este proceso.

A los docentes que me formaron durante la licenciatura y el desarrollo de tesis, pero en especial a mis compañeros de carrera y laboratorio. Salvador siempre me guiaste y acompañaste hasta finalizar este proceso, eres mi más grande amigo, gracias por todo. También a Mayra, Silvia, Liliana, Víctor, Anaí, Raúl Pacheco, Lizbeth, Raúl, gracias por sus consejos, su experiencia y las pláticas.

Mis amigos de vida les agradezco sus risas y su apoyo en momentos turbulentos: Victoria, Fernanda, Alejandra, Miriam, Mayenne, Alma, las quiero mucho.

Índice

1.- Introducción	1
2.- Antecedentes	2
2.1 Desarrollo de nuevos fármacos	2
2.2 Toxicidad	4
2.3 Teratogénesis	4
2.4 Casiopeínas®	5
2.5 Pez cebra (<i>Danio rerio</i>) como modelo	6
3.- Justificación	9
4.- Hipótesis	10
5.- Objetivos	11
5.1 Objetivo General	11
5.2 Objetivos específicos	11
6.- Materiales y Métodos	12
6.1 Reactivos y preparación de soluciones	12
6.2 Mantenimiento del pez cebra	12
6.3 Alimentación del pez cebra	13
6.4 Producción y recolección de los huevos	13
6.5 Prueba de toxicidad	14
6.6 Prueba de Teratogénesis	15
6.7 Observación y registro del desarrollo del pez cebra	15
6.8 Análisis Estadísticos	16
7. Resultados	16
7.1.- Toxicidad	16
7.1.1 Embriones	16
7.1.2 Alevines	20
7.1.3 Diferencias entre la mortalidad del pez cebra de acuerdo a su estadio.	23
7.1.4 Mortalidad de acuerdo al tratamiento empleado	23

7.2.-Teratogénesis	25
7.2.1 Embriones	25
7.2.2 Alevines	31
7.3.- Análisis de Supervivencia	34
7.3.1 Casiopeína IIgly	35
7.3.2 Casiopeína III Ea	36
7.3.3 Casiopeína IIIa	37
7.3.4 Cisplatino	38
7.4.-Determinación de CL50 en embriones y alevines.	39
8.- Discusión	41
9.- Conclusiones	44
10.- Bibliografía	45

Índice de Tablas.

Tabla 1. Parámetros dependientes del estadio del pez cebra.	15
Tabla 2. Efecto de mortalidad dependiendo del tratamiento en embriones.	23
Tabla 3. Comparación de Casiopeínas contra Cisplatino en embriones.	24
Tabla 4. Efecto de mortalidad dependiendo del tratamiento en alevines.	24
Tabla 5. Comparación de Casiopeínas vs Cisplatino en alevines	24
Tabla 6. Diferencias en el flujo sanguíneo dependiendo del tratamiento.	28
Tabla 7. Relación entre los tratamientos y las malformaciones en alevines.....	34
Tabla 8. CL50 para todos los tratamientos en embriones.	39
Tabla 9. CL50 para todos los tratamientos en alevines	40

Índice de Figuras.

Figura 1. Estructura de las Casiopeínas® Ilgly, IIIEa y IIIia.....	5
Figura 2. Mecanismo de acción de las Casiopeínas®.....	6
Figura 3. Ciclo de vida del pez cebra.....	8
Figura 4. Preparación de stocks para Casíopeinas® y Cisplatino.....	14
Figura 5. Mortalidad en Embriones.....	17
Figura 6. Cinética de mortalidad en embriones	18
Figura 7. Mortalidad en embriones.....	19
Figura 8. Mortalidad en alevines.....	21
Figura 9. Mortalidad en alevines.....	22
Figura 10. Eclosión en embriones.....	26
Figura 11. Flujo sanguíneo en embriones.....	27
Figura 12. Embriones expuestos a tratamientos de Casíopeinas® y Cisplatino.....	29
Figura 13. Malformaciones en embriones.....	30
Figura 14. Movilidad en alevines.....	31
Figura 15. Alevines tratados con Casiopeínas® y Cisplatino.....	32
Figura 16. Malformación en alevines.....	33
Figura 17. Sobrevivencia con Casiopeína Ilgly.....	35
Figura 18. Sobrevivencia con Casiopeína IIIEa.....	36
Figura 19. Sobrevivencia con Casiopeína IIIia.....	37
Figura 20. Sobrevivencia con Cisplatino.....	38

Resumen

El cáncer siendo una de las enfermedades más severas a llevado a la necesidad de contar con nuevos fármacos. El desarrollar nuevos compuestos como las Casiopeínas® (Cas), una familia con centro activo de cobre(II), que *in vitro* e *in vivo*, han demostrado tener actividad antitumoral, citotóxica y genotóxica. Se propone que su mecanismo de acción incluye especies reactivas de oxígeno e inducción de apoptosis mitocondrial. Sin embargo, ha sido poco estudiado su efecto tóxico, por lo que propusimos emplear el modelo del pez cebra (*Danio rerio*) para averiguar estos efectos. Se usaron embriones de 48 horas post-fertilización (hpf) y alevines de 72hpf, tratados con Cas IIgly, III Ea y III Ia y Cisplatino en concentraciones de 1, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/ml. Posteriormente los peces fueron analizados con un microscopio estereoscópico a las 24, 48 y 72h. Observamos que a concentraciones mayores a 25 µg/ml, las Cas originan daños tóxicos en los embriones y alevines, produciendo muerte y malformaciones en el desarrollo morfológico. Mientras que a concentraciones menores a 1 µg/ml no se observó daño tóxico a las 24h, pero sí a las 48 y 72h, produciendo el mismo efecto que las concentraciones altas. En altas concentraciones, las Casiopeínas presentan efectos tóxicos importantes sobre los embriones y alevines de pez cebra. Las altas concentraciones de las Casiopeínas producen toxicidad en el desarrollo de embriones como alevines.

Palabras clave: Casiopeínas®, toxicidad, teratogenesis, *Danio rerio*.

Summary

Cancer being one of the most severe diseases has led to the need for new drugs. The development of new compounds such as Casiopeínas® (Cas), a family with an active center of copper(II), which in vitro and in vivo, have been shown to have antitumor, cytotoxic and genotoxic activity. It's mechanism of action is proposed to include reactive oxygen species and induction of mitochondrial apoptosis. However, its toxic effect has been little studied, so we proposed using the zebrafish (*Danio rerio*) model to find out these effects. Embryos 48 hours post-fertilization (hpf) and fingerlings of 72 hpf, treated with Cas IIgly, IIIEa and IIIia and Cisplatin at concentrations of 1, 10, 25, 50, 100 and 200 µg/ml were used. Subsequently, the fish were analyzed with a stereoscopic microscope at 24, 48 and 72h. We observed that at concentrations greater than 25µg/ml, Cas cause toxic damage to embryos and fingerlings, causing death and malformations in morphological development. While at concentrations less than 1µg/ml, no toxic damage was observed at 24h, but it was at 48 and 72h, producing the same effect as high concentrations. In high concentrations, Casiopeínas have significant toxic effects on zebrafish embryos and fry. High concentrations of Casiopeínas produce toxicity in the development of embryos such as larvae.

Keywords: Casiopeinas®, toxicity, teratogenesis, *Danio rerio*.

1.- Introducción

El cáncer se ha convertido en uno de los principales problemas que afectan a la sociedad, ya que es una de las enfermedades más severas cuyo impacto se refleja a nivel tanto fisiológico como psicológico (World Health Organization, 2018). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en el año 2020 se presentaron 20 millones de muertes por cáncer, representando una de las principales causas de muerte en los países desarrollados y la segunda en los países sub-desarrollados (World Health Organization, 2018). Por su parte, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) dio a conocer que en 2020 el cáncer fue la segunda causa de muerte en América, causando 1.7 millones de muertes (Organización Mundial de la Salud, 2020).

El cáncer es un crecimiento anormal de las células, generado por una actividad irregular, donde la pérdida de homeostasis celular provoca la multiplicación de algunos tipos de células de una manera descontrolada formando una masa tumoral (Rodríguez et al., 2016).

La importancia de conocer los mecanismos en el proceso carcinogénico es esencial no solo para la prevención, sino además para la implementación de nuevos fármacos. Las investigaciones están mayormente enfocadas en terapias que puedan combatir el cáncer. Es por esto que el desarrollo de nuevos compuestos más específicos y menos tóxicos se ha vuelto una prioridad (Mejía et al., 2018).

Los metales pesados han alcanzado gran interés en el campo biomédico, ya que juegan un papel fundamental en los sistemas biológicos debido a su efecto en numerosas reacciones y procesos celulares (Mejía et al., 2018). Así mismo, los nuevos medicamentos a base de metales para el tratamiento del cáncer suelen ser prometedores, no obstante, la toxicidad intrínseca de los metales no debe tomarse a la ligera. Tal es el ejemplo del cisplatino [*cis*-diamminodicloroplatino (II)], un complejo de metales pesados que contiene un átomo central de platino con dos átomos de cloruro y dos moléculas de amoníaco en la posición *cis*, con actividad principalmente anticancerígena. El modo de acción del cisplatino se ha relacionado con su capacidad

para interactuar con las bases de purina en el ADN, donde interfiere con los mecanismos de reparación del ácido desoxirribonucleico, causando daño en el ADN para posteriormente inducir la apoptosis en las células cancerosas (Dasari, Tchounwou et al., 2014). Sin embargo, este medicamento causa toxicidad sistemática extensa (Rai et al., 2018), y múltiples efectos secundarios en el humano (Dasari, Tchounwou et al., 2014).

Es así que surgen las Casiopeínas® (Cas), una familia de compuestos de Cu(II) cuya fórmula general es $[Cu (NN) (NO) H_2O] NO_3$, donde NN = diiminas como 1,10-fenantrolina, 2,2-bipiridina o sustituida y NO = aminoacidato o $[Cu (NN) (OO) H_2O] NO_3$, donde NN = diiminas como 1,10-fenantrolina, 2,2-bipiridina o sustituida y OO = acetilacetato, salicilaldehidato (Ruiz-Azuara, 1992; Ruiz-Azuara, 1996; Ruiz-Azuara, 2002). Debido a su composición química se espera que las Cas sean menos tóxicas y más eficientes en el tratamiento del cáncer (Ruiz-Azuara, 1997). Las Cas han demostrado tener actividad antineoplásica, citostática (Davila-Manzanilla et al., 2017) y genotóxica (Jiménez et al., 2016).

A pesar de que existen nuevos fármacos prometedores, la toxicidad intrínseca de los medicamentos es una razón principal para retirar medicamentos del mercado.

En este trabajo se sugiere una evaluación sobre los posibles efectos tóxicos que un medicamento puede llegar a ocasionar. Siendo el pez cebra (*Danio rerio*) el modelo que se ha utilizado en estudios de toxicología y para llevar a cabo la detección de seguridad de fármacos.

2.- Antecedentes

2.1 Desarrollo de nuevos fármacos

Las moléculas y compuestos con potencial efecto terapéutico, deben ser evaluados en múltiples modelos para decidir qué molécula será objeto de desarrollo. A partir de esto, se realiza un proceso de caracterización físico-químico-farmacéutica, en la cual se realizan pruebas farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas (Vallejo, 2014).

La farmacodinamia es el estudio de las acciones y los efectos del fármaco en el organismo. La farmacocinética analiza los efectos del organismo sobre el fármaco como lo son la absorción, distribución, metabolización y excreción (ADME). Mientras que las pruebas toxicológicas incluyen la aplicación de una dosis única (toxicidad aguda), dosis múltiple (toxicidad subaguda y crónica), genotoxicidad, carcinogénesis, toxicidad ambiental y toxicidad del desarrollo. La finalidad de los estudios toxicológicos es conocer la dosis máxima tolerable sin que produzcan efectos nocivos y la toxicidad que podrían presentar las dosis elevadas (Ashby, 1991). Este proceso físico-químico-farmacéutico abarca de 9 a 13 años, con inversiones aproximadas a los 800 millones de euros (Herrero et al. 2010). Son costos elevados tomando en cuenta que de cada 10,000 nuevos compuestos, solo 250 pasan a fase de estudios preclínicos y de éstos, solo 2 llegan a ser comercializados (Vargesson, 2015).

Las pruebas de toxicidad y teratogénesis para la evaluación de nuevos fármacos son de gran importancia. En 1961 el fármaco Talidomida (Laboratorio Grünenthal GmbH) bajo el nombre de Distaval, Tensival, Valgraine y Asmaval, comercializado como sedante y calmante de las náuseas durante los tres primeros meses de embarazo, mostró efecto teratígeno en embriones humanos, dando como resultado el nacimiento de niños sin brazos o piernas (Bayona, 2012). Esto se debió a que no se realizaron pruebas suficientes antes de sacar el producto al mercado farmacéutico, pues en aquella época no existían lineamientos estrictos a los que debían ser sometidos los nuevos fármacos (Vargesson, 2015). El desastre de la Talidomida evidenció por primera vez que existen diferencias entre las diversas especies respecto a la reacción de las drogas. Esto llevó a la necesidad de implementar nuevas y más rigurosas pruebas para mejorar la comprensión del nuevo fármaco en diferentes modelos con homologías cercanas al ser humano.

En la actualidad, los compuestos químicos que son utilizados en la composición de fármacos antineoplásicos, tienen efectos tóxicos en el humano. No obstante, una gran proporción de estos compuestos son estables y conducen a trastornos en el funcionamiento del organismo; estos compuestos se transfieren de la madre al embrión y conducen a malformaciones congénitas (Peterovova et al., 2008). Por lo tanto, el desarrollo de nuevos fármacos que sean seguros y eficaces sigue siendo altamente

dependiente de estudios de toxicología en animales, por lo que cada estudio debe estar bien diseñado para posteriormente ejecutarlo de manera cuidadosa (Morton, 1998).

2.2 Toxicidad

El cribado toxicológico es muy importante para el desarrollo de nuevos medicamentos y para la extensión del potencial terapéutico de las moléculas existentes (Parasuraman, 2011).

La toxicidad de los fármacos se refiere al nivel de daño que un compuesto puede causar a un organismo. Los efectos tóxicos dependen de la dosis y pueden afectar a un sistema completo como en el sistema nervioso central o un órgano específico (Riley et al., 2010). De acuerdo al principio de Paracelso, todos los compuestos son tóxicos en dosis altas y todos son seguros en dosis muy bajas (Guengerich et al., 2011). Generalmente la toxicidad provocada por los fármacos ocurre en dosis que exceden la eficacia terapéutica y esto puede evaluarse a nivel conductual o fisiológico. Desde el punto de vista del comportamiento, la toxicidad de los fármacos puede manifestarse de diversas formas, por ejemplo, disminución de la actividad locomotora, pérdida de la coordinación motora o deterioro cognitivo. Los ejemplos de efectos fisiológicos incluyen lesiones al tejido, muerte neuronal y muerte celular (Riley et al., 2010).

Las pruebas de toxicidad pueden clasificarse de la siguiente manera (Castillo Morales, 2004):

- *Toxicidad aguda*: efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo usualmente de pocos días.
- *Toxicidad crónica*: efectos tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia.

2.3 Teratogénesis

Ahora bien, los compuestos que inducen defectos en la morfología del embrión o en la función del órgano antes de causar la muerte se definen como teratógenos (McGrath, 2012), provocando un daño teratogénico.

La teratogenicidad de los fármacos se ha demostrado experimentalmente durante más de 30 años debido al descubrimiento de las embriopatías inducidas por la Talidomida, causando daños fetales por la ingesta del fármaco. Actualmente se sabe que no solo el fármaco en cuestión producirá el daño teratógeno, sino también su dosis, tiempo y frecuencia de administración, así como la susceptibilidad genética e individual del embrión son factores importantes (Hill, 1984). En la actualidad la prevalencia de malformaciones debidas a fármacos es baja pero también evitable. Esto hace necesaria la información precisa y actualizada sobre el potencial tóxico y teratógeno de los fármacos (Pérez et al., 2003).

2.4 Casiopeínas®

Los medicamentos a base de metales son importantes por su actividad terapéutica, especialmente los compuestos coordinados de cobre porque han demostrado tener actividad antineoplásica con efectos menos tóxicos a diferencia del cisplatino, ya que el cobre al ser un elemento esencial en varios procesos biológicos puede detoxificarse mediante enzimas antioxidantes como el glutatión (GSH), creando aductos con el metal.

Las Casiopeínas® (Cas), una familia de compuestos con centro activo de cobre(II) (Figura 1), han demostrado tener actividad antitumoral, tanto *in vitro* (Larios-Cervantes A. et al 2022) como *in vivo* (Trejo-Solís et al., 2005), destacando su acción antiproliferativa (Castillo-Rodríguez et al., 2021), citotóxica y genotóxica (Castillo-Rodríguez et al., 2021).

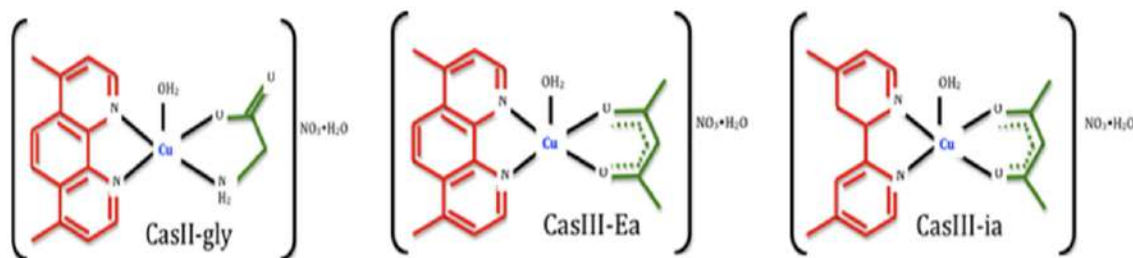


Figura 1. Estructura de las Casiopeínas®(Cas). CasIIgly [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicinato)], CasIIIEa [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)], CasIIIia [Cu (4,4-dimetil-2,2-bipiridina) (acetilacetionato)]

Se propone que las Cas inducen apoptosis por la vía intrínseca en células neoplásicas, esto debido al estrés oxidativo mitocondrial causado por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) (Mejia et al., 2008). Además interfieren con la replicación del DNA induciendo la formación de aductos en las bases nitrogenadas (Marín-Hernández et al., 2012); (Becco, 2014), junto con el desacople de la cadena respiratoria interactuando con el succinato, piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Marín-Hernández et al., 2012) (Figura 2).

Se han realizado estudios de toxicidad en animales con los cuales se pretende estimar el riesgo que las Casiopeínas pueden presentar al ser administradas en humanos. En un estudio en perros la dosis letal 99 (DL99) de las Cas Illia y Ilgly, indujeron la muerte de manera aguda en un periodo de 30-50 min debido a edema pulmonar y fallo cardiaco. Lo anterior sugiere que la liberación de radicales libres afectó a las células cardiacas (Leal et al., 2006).

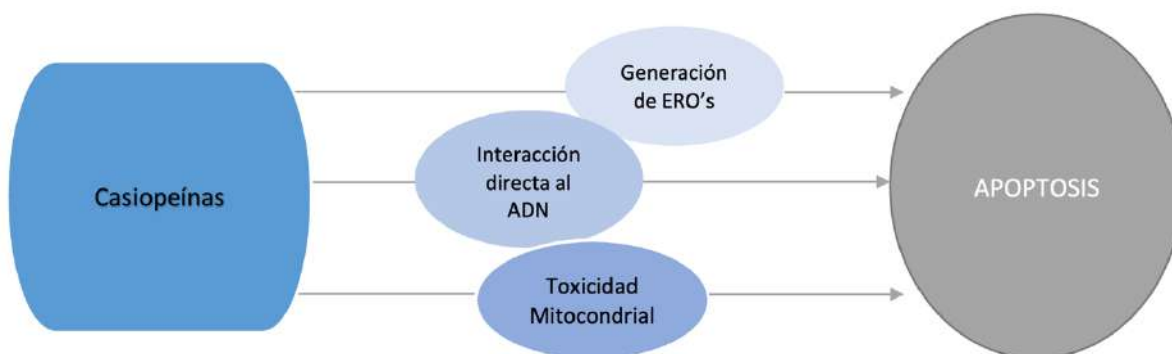


Figura 2. Mecanismo de acción de las Casiopeínas.

Las Casiopeínas® representan ser un compuesto prometedor en el tratamiento del cáncer, por lo que se hace prioritario evaluar las propiedades toxicológicas y teratógenas de estos compuestos en modelos animales.

2.5 Pez cebra (*Danio rerio*) como modelo

El modelo del pez cebra (*Danio rerio*), ofrece varias ventajas para seleccionar una gran cantidad de compuestos en el desarrollo de fármacos y estudios toxicológicos y demostrar la seguridad de los fármacos durante el desarrollo embrionario (Alafiatayo et al., 2019; Kittipaspallop et al., 2018; Moreman et al., 2017). Un número significativo de

candidatos a fármacos ha fallado en las pruebas preclínicas debido a su efecto adverso sobre el desarrollo y la reproducibilidad, en comparación con las pruebas de mamíferos convencionales (He et al., 2014).

El modelo del pez cebra ofrece ventajas experimentales, por tener un periodo de desarrollo corto (2-3) meses (Figura 3). En cada puesta lo peces cebra pueden producir hasta 200 embriones; el desarrollo embriológico se desarrolla fuera de la madre lo que permite su manipulación; los embriones son transparentes durante las primeras semanas, facilitando la observación directa de los órganos internos mediante un microscopio estereoscópico; los embriones son permeables a fármacos (Gilbert-Barness, 2010).

Una de las principales ventajas del modelo del pez cebra en comparación con un modelo de mamífero como el ratón, es que los procesos de desarrollo embrionario son más accesibles (Gilbert-Barness, 2010; McGrath, P. et al, 2008); además los embriones pueden vivir sin alimentación externa varios días después de la fertilización (Gilbert-Barness, 2010); comparten el 70% de homología con el genoma humano y el 80% de homología con genes tumorales. El modelo también ofrece mayor manipulación, menor período de prueba, bajo costo y menor cantidad de compuesto requerido. Los compuestos pueden difundirse a través de la piel y las branquias de los embriones y en los alevines, entran al cuerpo por vía oral cuando el pez cebra comienza a tragar, aproximadamente 72 h después de la fecundación (hpf) (Lantz-Mcpeak, 2014). Las evaluaciones de toxicidad y seguridad que utiliza el pez cebra también han sido aceptadas por la FDA (Food and Drug Administration) y la EMA (The European Medicines Agency) para la aprobación de un nuevo medicamento bajo investigación (He, J et al., 2014).

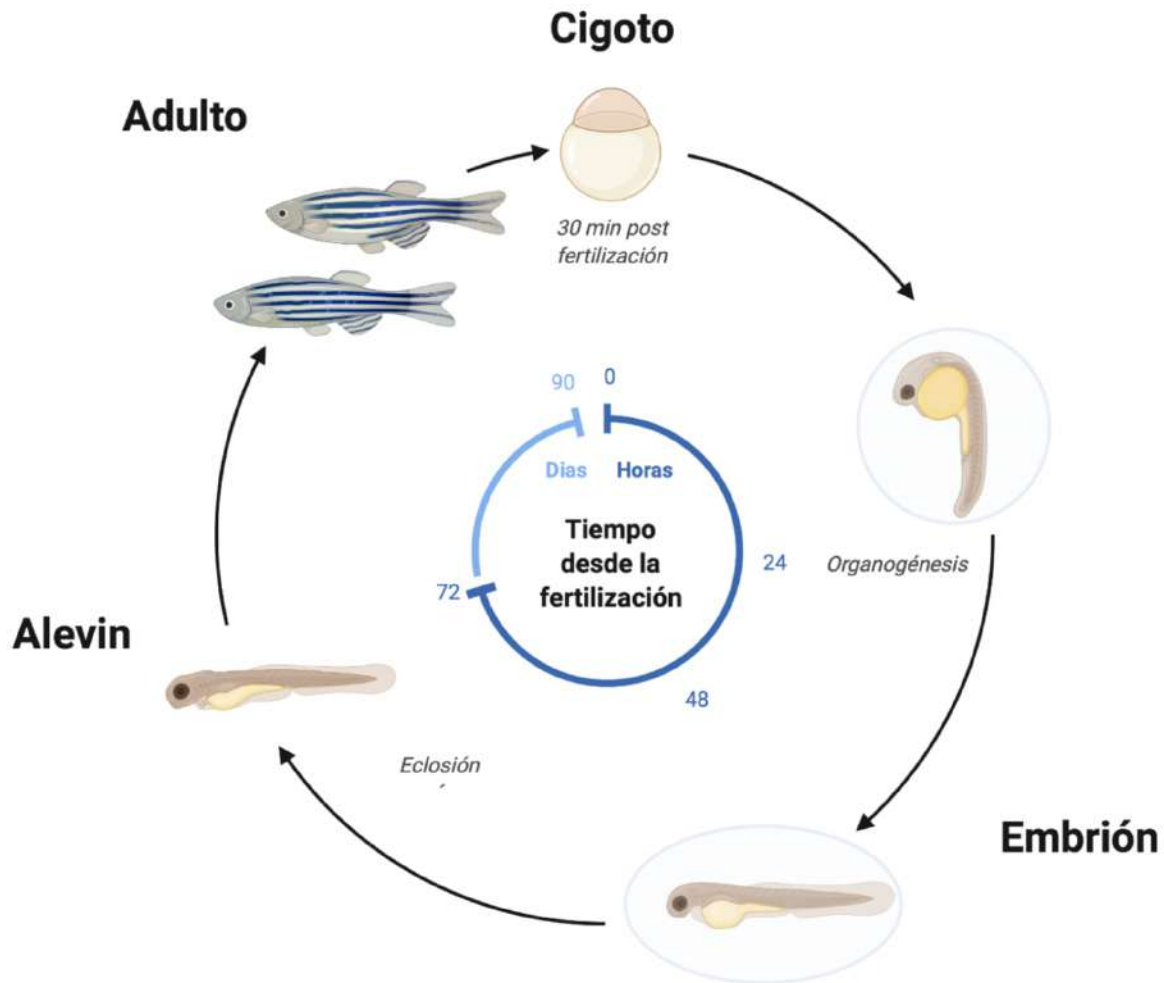


Figura 3. Ciclo de vida del pez cebra. El pez tiene un desarrollo rápido desde su fertilización, hasta la capacidad de reproducción.

El pez cebra es un modelo animal apropiado para estudios de desarrollo en compuestos farmacológicos y toxicológicos. Los modelos en mamíferos tienen una similitud del 55% al 100% con el pez cebra, para la evaluación de la toxicidad de sustancias químicas durante el desarrollo (Brannen et al., 2010). Sin embargo, la concordancia entre ratas, conejos y ratones es del 56% (Hurt et al., 2003), lo que sugiere que la respuesta del pez cebra está a la par con los modelos de toxicidad en mamíferos, apoyando así el uso del modelo de *Danio rerio* en la investigación de toxicidad y teratogénesis.

3.- Justificación

La búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos tiene el propósito de aumentar la efectividad y disminuir la toxicidad, tal es el caso las Casiopeínas®. No obstante, una de las causas más importantes de la lentitud en la comprobación de la seguridad de nuevos productos, reside en la carencia de modelos experimentales adecuados útiles para predecir si serán efectivos y su grado de toxicidad en humanos para el tratamiento contra el cáncer.

Esto justifica el hecho de contribuir en la evaluación de las Casiopeínas® (IIgly, IIIEa y IIIia) para seguir evaluando la actividad tóxica y los efectos teratogénicos en el modelo de pez cebra (*Danio rerio*).

4.- Hipótesis

Las Casiopeínas® (IIgly, IIIEa, IIIia) no causarán toxicidad ni teratogénesis en el modelo de pez cebra (*Danio rerio*).

5.- Objetivos

5.1 Objetivo General

- Determinar el efecto tóxico y teratígeno de las Casiopeínas® en el pez cebra.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la toxicidad de las Casiopeínas® en embriones y alevines en un modelo de pez cebra.
- Estudiar la teratogénesis de las Casiopeínas® en el modelo de estudio.
- Evaluar en una cinética de tiempo las alteraciones morfológicas debidas al tratamiento con Casiopeínas® en un modelo de pez cebra.

6.- Materiales y Métodos

6.1 Reactivos y preparación de soluciones

Los compuestos de cobre Cas IIgly [Cu (4,7-dimetil-1,10- fenantrolina) (glicinato) aqua, 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, nitrato de glicinato y cobre (II); Cas IIIia [Cu (4,4 'dimetil) (2,2 '-dipiridina) (acetilacetato) aqua, 4,4-dimetil-2,2'-bipiridina, acetilacetato cobre (II) nitrato]; y Cas IIIEa [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina), 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, acetilacetato de cobre(II) nitrato], fueron sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM, siguiendo el procedimiento patentado (Ruiz-Azuara, 1992; Ruiz-Azuara,1996; Ruiz-Azuara, 2002); el Cisplatino se adquirió en SIGMA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Las diferentes concentraciones para las pruebas se determinaron al momento de cada experimento y se obtuvieron por dilución de la solución madre (1:1), donde se disolvió 1 mg de cada compuesto en 1 ml de agua destilada. Las concentraciones que se utilizaron para cada Casiopeína (IIgly, IIIEa y IIIia) y Cisplatino fueron de 1, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/ml.

6.2 Mantenimiento del pez cebra

El mantenimiento de los peces adultos y embriones se realizó con agua marca AGUAQ obtenida de la Universidad Autónoma de Querétaro. La información nutrimental del agua por porción de 100 ml es 0 kcal, proteínas 0 g, sodio 3.1 mg y su proceso de purificación fue cloración, lecho profundo, carbón activado, osmosis inversa, luz ultravioleta y ozono. El agua en el acuario se mantuvo con un pH de 7.5 y una temperatura de 23°C a 26°C. Los peces adultos se separaron en hembras y machos y se colocaron en dos tanques con un volumen de 25 litros y flujo constante de oxígeno. La limpieza total de agua por tanque se realizó cada 10 días para no estresar a los peces, y diariamente se realizó el cambio de ½ litro de agua para mantener los tanques limpios sin producir un cambio osmótico que permitiera mantener un pH estable.

La temperatura en el acuario se mantuvo a 26°C con el equipo de aire acondicionado MIRAGE VLU, y la iluminación se controló con un temporizador en ciclos de 14 h de luz por 10 h de oscuridad.

6.3 Alimentación del pez cebra

Los peces adultos se alimentaron dos veces al día con una mezcla de TetraMin® (Tetra Japan & Spectrum Brands, Inc., Tokyo Japan) y con camarón de salmuera mejor conocido como *Artemia salina* (Premium Grade Brine Shrimp Eggs, Ogden, Utah USA).

El cultivo de *A. salina* se realizó colocando 1 gr de huevos en un cono de criadero con soporte en 700 ml de agua (AGUAQ) y 63 ml de stock de sales por cada 100 ml de agua, así como 9 ml de stock de sales. Durante el proceso de eclosión se colocó un flujo de oxígeno dentro del cono, el cual se mantuvo en exposición de luz por 48 h. Finalmente se recolectó la *A. salina* eclosionada, se filtró y se limpió con agua (AGUAQ). Para posteriormente añadirle hojuelas molidas de TetraMin® para alimentar a los peces.

6.4 Producción y recolección de los huevos

Para la obtención de embriones, se colocaron los peces adultos (1:2 hembra y macho) en un tanque de reproducción, la noche anterior a la fertilización. A la mañana siguiente poco después del primer contacto con la luz, el pez cebra puso huevos por apareamiento natural. Para evitar la depredación de los huevos, el tanque de cría contenía en la superficie interna una placa de acrílico con orificios pequeños que permitían el paso de los huevos protegiéndolos de los peces adultos. Después de dos horas del primer contacto con la luz, los peces adultos fueron retirados del tanque de cría y reacomodados en los tanques iniciales de acuerdo a su sexo para posteriores experimentos. Los huevos fertilizados se recolectaron y fueron depositados en cajas Petri con agua mantenidos a temperatura ambiente, donde se observaron para identificar la etapa del desarrollo embrionario del pez cebra (Kimmel et al., 1995).

6.5 Prueba de toxicidad

En una caja multi-pozos de 24 pozos, se utilizaron las diferentes concentraciones a partir del stock madre de Cas y Cisplatino (Figura 4).

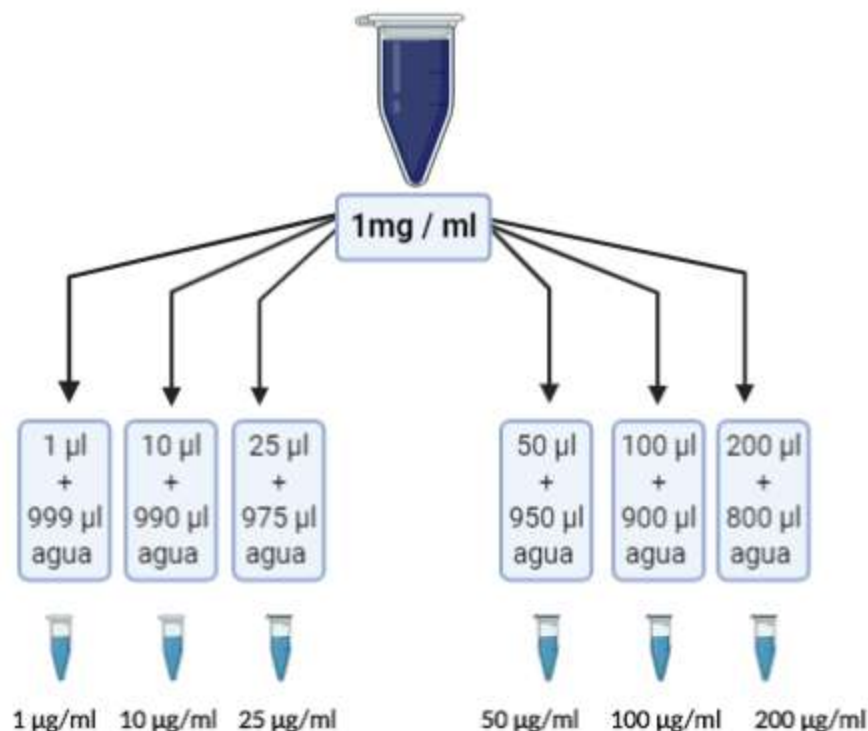


Figura 4. Preparación de stocks para Casiopeínas® y Cisplatino.

Se prepararon 4 tubos de 1ml para cada concentración, se asignaron dos pozos por concentración y cada uno se llenó con 2ml de agua de pecera. Para el control negativo se usó agua destilada sin compuesto. En cada pozo se depositaron 5 embriones de 2dpf (dos días post-fertilización) o alevines de 3dpf viables, lo que en los tratamientos se ubicó como tiempo cero.

Para evaluar la toxicidad se utilizó como punto final la mortalidad las 24, 48 y 72 h posteriores a la exposición de los diversos compuestos, tanto para embriones como para alevines (Tabla 1). Se consideró un efecto tóxico en embriones cuando éstos estaban muertos o coagulados dentro del corion, y en los alevines cuando había ausencia de vida; todo esto comparado con los peces que no recibieron tratamiento. Para ambos grupos se buscó la CL50 (concentración letal media).

6.6 Prueba de Teratogénesis

A partir de la prueba de toxicidad en embriones y alevines, se evaluó la teratogénesis en los peces vivos teniendo como base la Guía 236 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) (*Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*, 2013).

Los peces se evaluaron para teratogénesis, cada 24 h hasta las 72 h, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros dependientes del estadio del pez cebra.

Individuos	Toxicidad	Teratogénesis
Embriones	• Muerte	• Malformación • Disminución de flujo sanguíneo • No Eclosión
Alevines	• Muerte	• Malformación • Sin Movilidad

6.7 Observación y registro del desarrollo del pez cebra

Los embriones y alevines fueron examinados diariamente. La sobrevivencia se identificó mediante la aparición de un latido cardíaco y movimiento en el pez. Los embriones y los alevines muertos fueron mantenidos a -20°C después de su registro y observación. Se tomaron imágenes de anomalías morfológicas por medio de un microscopio

estereoscópico marca Carl Zeiss Microscopy, utilizando el software ZEN versión 2.3, con una escala de 10x y 20x.

6.8 Análisis Estadísticos

Se utilizó un modelo logístico para determinar si los **tratamientos**, las **concentraciones** y el **tiempo**, tenían un efecto por si solos o en conjunto sobre la toxicidad y la teratogénesis (Gelman & Hill, 2007).

Para encontrar si existían diferencias entre la mortalidad del pez cebra debido a su **estadio**, se realizó una prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (Daniel, 2008). Adicionalmente, se separaron los datos por tratamiento para determinar si existían diferencias en la mortalidad dentro de cada tratamiento, debidas al estado del pez empleando la misma prueba.

Para contestar si había diferencias en la mortalidad debidas al tratamiento, se llevó a cabo un análisis unilateral de la varianza por jerarquías de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones *a posteriori* con el procedimiento de Dunn (Gibbons y Chakraborti 2003). Para conocer cuál compuesto era más tóxico, se comparó el Cisplatino con todas las Casiopeínas, empleando el método de Nemenyi-Damico-Wolfe (Hollander y Wolfe 1999).

7. Resultados

Los ensayos de toxicidad y teratogénesis fueron divididos en dos grupos de acuerdo a la etapa del pez cebra. El primer grupo se seleccionó en la etapa de embriones cuando tenían 48 hpf, mientras que el segundo grupo fue seleccionado en etapa de alevín a las 72 hpf.

7.1.- Toxicidad

El ensayo de toxicidad para ambos grupos se evaluó principalmente con la mortalidad.

7.1.1 Embriones

Todos los embriones murieron durante las primeras 24 h cuando se expusieron a las concentraciones de 50, 100 y 200 µg/ml de Casiopeínas (Ilgly, IIIEa y IIIia) (Figura 5).

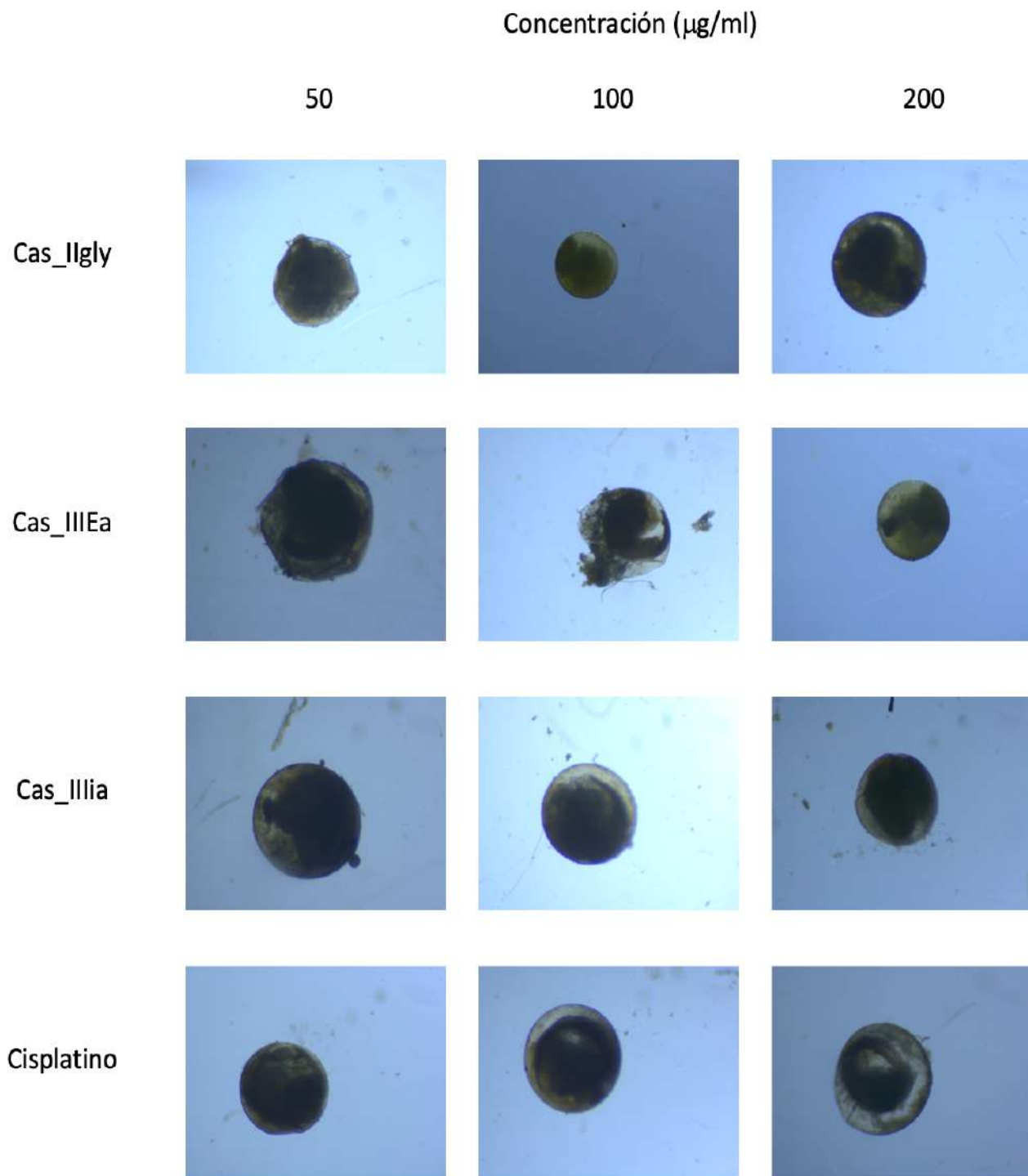


Figura 5. Mortalidad en Embriones. Tratados con las diferentes Casiopéinas (Ilgly, III Ea, III ia) y Cisplatino, en concentraciones de 50 a 200 $\mu\text{g/ml}$.

Con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Cisplatino a las 24 h, se observó la mayor sobrevivencia (80 %). Mientras que a las 48 y 72 h, se observó que en concentraciones menores a 25 $\mu\text{g/ml}$ las CasIIgly y CasIIIEa, resultaron tener un mayor porcentaje de mortalidad en los embriones a diferencia de la CasIIIia y el Cisplatino (con 16 y 26 %) (Figura 6).

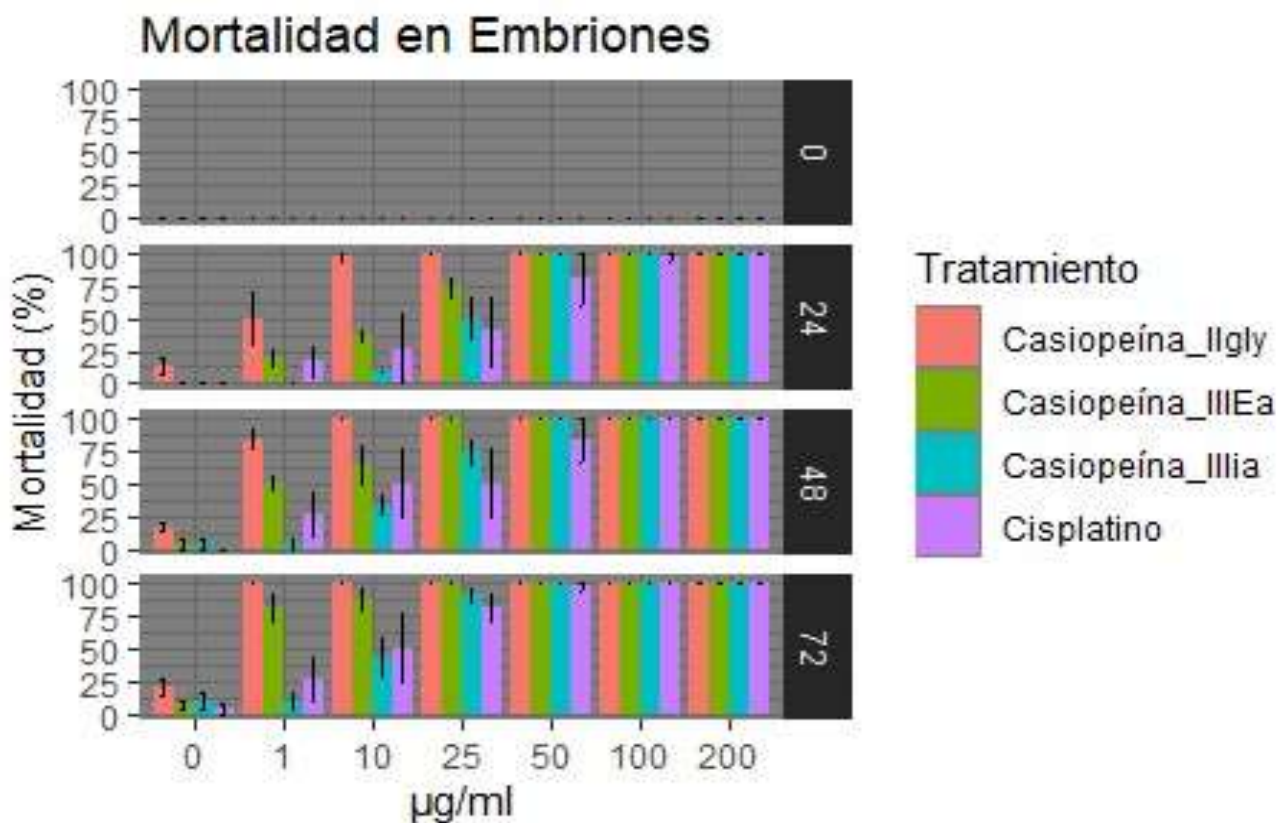


Figura 6. Cinética de mortalidad en embriones. La figura muestra las gráficas de mortalidad de los embriones expuestos a los tratamientos (Cas IIgly, Cas IIIIEa, Cas IIIia y Cisplatino) en las diferentes concentraciones y tiempos.

Se observó que la Cas IIIia en concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 h, produjo menor porcentaje (0% y 10%, respectivamente) de mortalidad en los embriones, seguido por el Cisplatino (16 y 26 %) en comparación con los demás tratamientos (Figura 7).

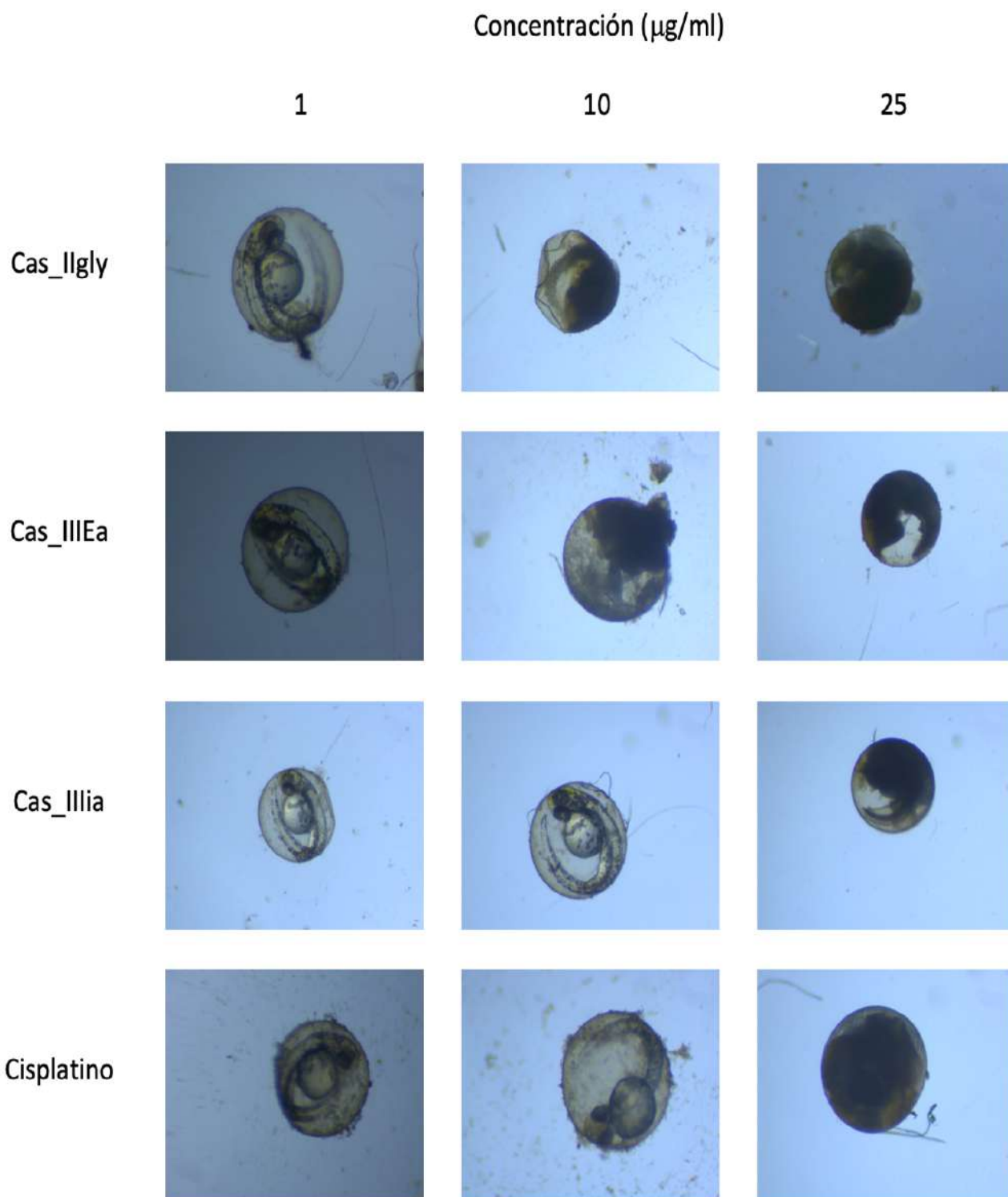


Figura 7. Mortalidad en embriones. Tratados con las diferentes Cas (IIgly, IIIEa, IIIia) y Cisplatino. En la concentración $1\mu\text{g/ml}$ para todos los tratamientos observamos que los embriones permanecieron vivos; en la concentración de $10\mu\text{g/ml}$ con CasIIgly y CasIIIEa observamos mortalidad; mientras que con la concentración de $25\mu\text{g/ml}$ observamos a todos los embriones muertos bajo todos los tratamientos.

De acuerdo al modelo logístico, se encontró que la concentración y el tiempo tuvieron un efecto altamente significativo ($p < 0.001$) sobre la mortalidad en embriones. La interacción entre el tratamiento y la concentración es significativa ($p < 0.05$), así como la relación entre el tratamiento y el tiempo ($p < 0.01$), y la interacción entre la concentración y el tiempo es altamente significativa ($p < 0.001$).

7.1.2 Alevines

El efecto de los tratamientos en los alevines de *Danio rerio* dependía del tipo de tratamiento, la concentración y el tiempo de exposición. El porcentaje de sobrevivencia disminuyó (6.67%) en las concentraciones mayores a 25 µg/ml con todos los tratamientos durante las primeras 24 h (Figura 8).

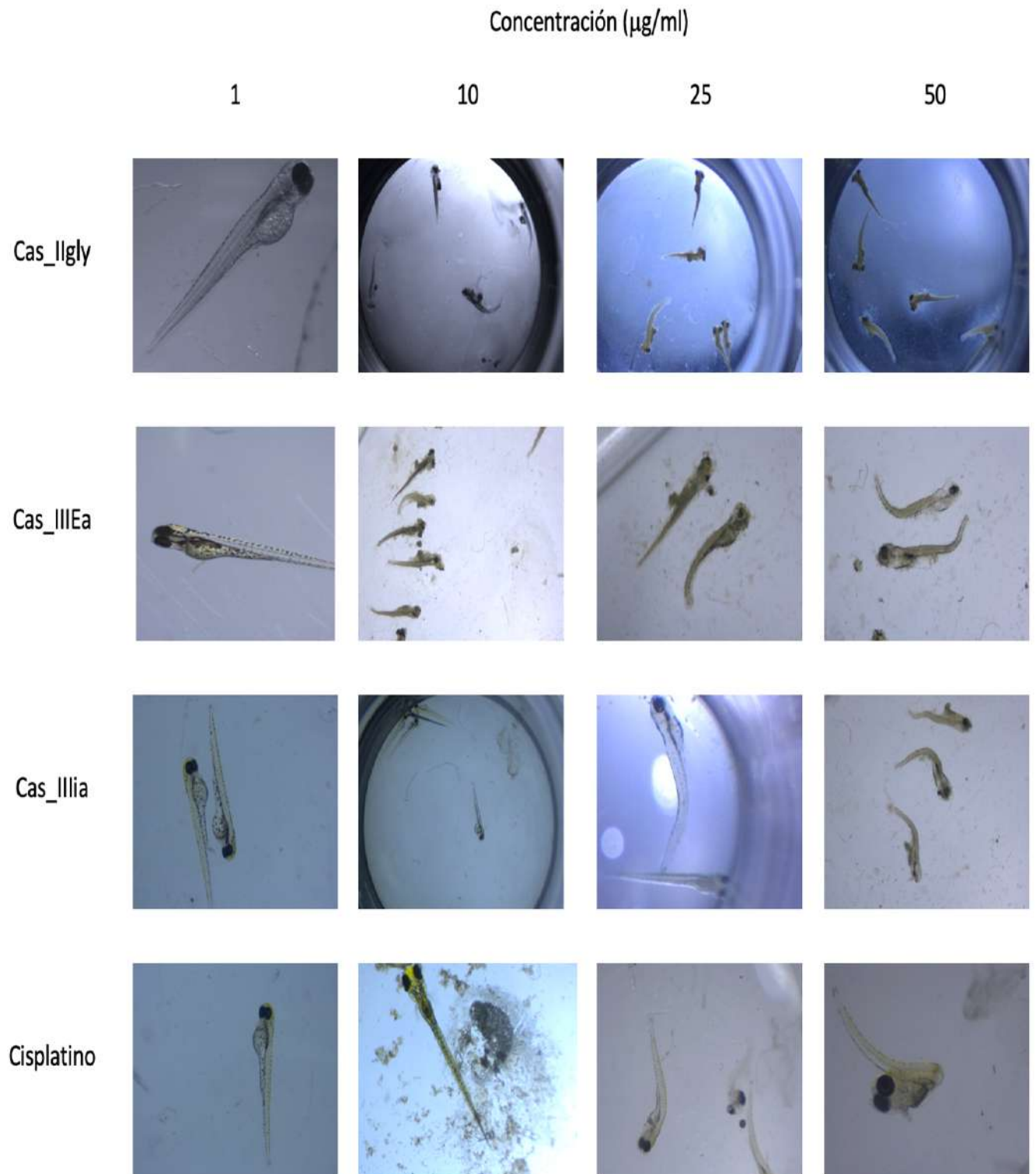


Figura 8. Mortalidad en alevines. Se muestran los alevines muertos que fueron tratados con las diferentes Cas (Ilgly, III Ea, III ia) y Cisplatino, en concentraciones de 1 a 50 $\mu\text{g/ml}$.

El mayor porcentaje (100%) de mortalidad para los alevines tratados con las Casiopeínas Ilgly y IIIIEa, ocurrió a las 24h en todas sus concentraciones.

Sin embargo, los alevines expuestos a 1 y 10µg/ml de Cas IIIia y Cisplatino, mostraron bajo porcentaje (10-13.33 % y 3.33 -10%, respectivamente) de mortalidad, en un periodo de 72h (Figura 9).

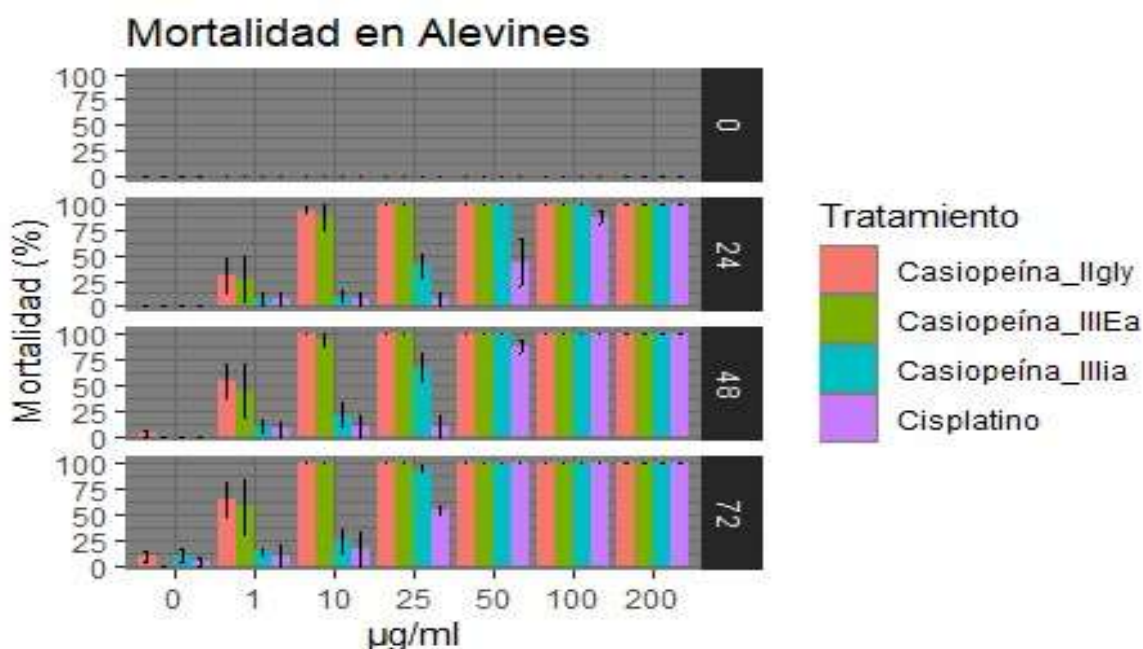


Figura 9. Mortalidad en alevines. La figura muestra los porcentajes de mortalidad de alevines expuestos a los tratamientos (Cas Ilgly, Cas IIIIEa, Cas IIIia y Cisplatino) en las diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

En alevines, el modelo logístico registró que la concentración y el tiempo tienen un efecto altamente significativo ($p < 0.001$) sobre la mortalidad de los alevines. La interacción entre el tratamiento y la concentración es también muy significativa ($p < 0.001$), no así la interacción entre el tratamiento y el tiempo ($p > 0.05$). Pero la relación entre la concentración y el tiempo si es altamente significativa ($p < 0.001$).

7.1.3 Diferencias entre la mortalidad del pez cebra de acuerdo a su estadio.

Se utilizó la prueba de Wilcoxon para determinar si efectivamente había diferencias entre la mortalidad por estadio. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.3596$) por lo tanto, el estadio de embrión o alevín no es susceptible a tener mayor índice de mortalidad.

7.1.4 Mortalidad de acuerdo al tratamiento empleado

Embriones.

Para saber si existían diferencias significativas entre las diferentes Cas comparadas con el Cisplatino, en embriones se hizo una prueba de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones con el procedimiento de Dunn (Gibbons y Chakraborti 2003). Encontramos diferencias significativas entre la CasIIgly y el Cisplatino, y entre la CasIIIa y la CasIIgly; sin embargo, las otras Casiopeínas no presentaban una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la mortalidad de los embriones (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de mortalidad dependiendo del tratamiento en embriones.

Comparación de tratamientos			Valor ($p < 0.05$)
Casiopeína IIgly	vs	Cisplatino	0.013
Casiopeína IIIIEa	vs	Cisplatino	0.748
Casiopeína IIIa	vs	Cisplatino	1.000
Casiopeína IIIIEa	vs	Casiopeína IIgly	0.768
Casiopeína IIIa	vs	Casiopeína IIgly	0.033
Casiopeína IIIa	vs	Casiopeína IIIIEa	1.000

Para conocer si el Cisplatino era más tóxico que las Casiopeínas, empleamos el método de Nemenyi-Damico-Wolfe (Hollander y Wolfe 1999). Se observó que la única Casiopeína diferente al Cisplatino era la CasIIgly que resultó ser significativamente más tóxica que el Cisplatino (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de toxicidad de Casiopeínas contra Cisplatino en embriones.

Comparación de tratamientos	Valor Z	Valor ($p < 0.05$)
Casiopeína IIgly - Cisplatino	2.891	0.011*
Casiopeína III Ea - Cisplatino	1.451	0.293
Casiopeína III Ia - Cisplatino	0.266	0.790

Alevines

La prueba de Kruskal-Wallis en alevines demostró que sí había diferencias significativas dependiendo del tratamiento utilizado ($p < 0.05$). Se encontró que las únicas diferencias significativas en comparación de las Cas con el Cisplatino en los alevines, fueron las encontradas entre CasIIgly vs Cisplatino y CasIII Ea vs Cisplatino, empleando un nivel de significancia menor a 0.05 (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de mortalidad dependiendo del tratamiento en alevines.

Comparación de tratamientos			Valor ($p < 0.05$)
Casiopeína IIgly	vs	Cisplatino	0.0039
Casiopeína III Ea	vs	Cisplatino	0.0099
Casiopeína III Ia	vs	Cisplatino	0.7920
Casiopeína III Ea	vs	Casiopeína IIgly	1.0000
Casiopeína III Ia	vs	Casiopeína IIgly	0.3421
Casiopeína III Ia	vs	Casiopeína III Ea	0.6082

Para demostrar si el Cisplatino era más tóxico que las Cas, en los alevines se empleó el mismo método de Nemenyi-Damico-Wolfe. Se observó que la CasIIgly y CasIII Ea son estadísticamente diferentes al Cisplatino (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de Casiopeínas vs Cisplatino en alevines

Comparación de tratamientos	Valor Z	Valor ($p < 0.05$)
Casiopeína IIgly vs Cisplatino	3.169	0.0045
Casiopeína III Ea vs Cisplatino	2.923	0.0069
Casiopeína III Ia vs Cisplatino	1.400	0.1614

7.2.-Teratogénesis

El ensayo de teratogénesis se evaluó tanto para embriones como para alevines.

7.2.1 Embriones

- Eclosión

La eclosión de los embriones comenzó a las 72 hpf aproximadamente, en los pozos control (Figura 12). La tasa de eclosión de los embriones tratados con la CasIIIa fue mayor (43%) a diferencia de los otros tratamientos, seguido por la CasIIIEa (23.33%) en concentraciones menores de 25 µg/ml. Solo se registró la eclosión de embriones hasta la concentración de 25 µg/ml, ya que a concentraciones mayores todos los peces murieron (Figura 10).

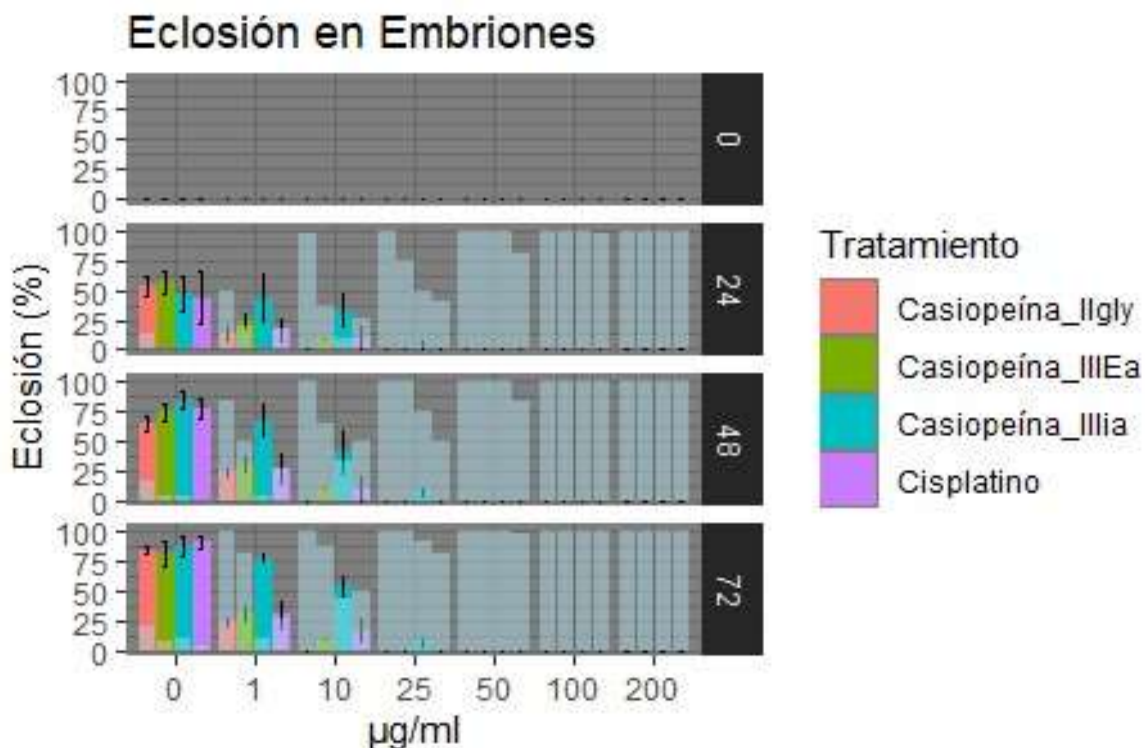


Figura 10. Eclosión en embriones. La gráfica de barras muestra los resultados de la eclosión de embriones para todos los tratamientos, en conjunto se muestran al fondo barras “fantasma” indicando el contraste con la mortalidad de los embriones en los cuales no hubo eclosión.

El modelo logístico para embriones mostró que las variables de concentración y tiempo por si solas, tienen un efecto altamente significativo ($p < 0.001$) sobre la eclosión. Por otro lado, las interacciones entre el tratamiento y la concentración, entre el tratamiento y el tiempo y entre la concentración y el tiempo, fueron altamente significativas ($p < 0.001$).

- **Flujo sanguíneo**

Al inicio de todos los ensayos nos aseguramos que los embriones tuvieran un flujo sanguíneo constante (Figura 12), lo cual continuó cuando se administraron las Cas Ilgly, III Ea, IIIa y el Cisplatino por 24h, en concentraciones bajas (1, 10 y 25 µg/ml). Sin embargo, los peces que fueron tratados con las concentraciones altas (50 100 y 200 µg/ml) no tenían flujo sanguíneo, a excepción del tratamiento con 50 µg/ml de Cisplatino (Figura 11).

En concentraciones menores a 25 $\mu\text{g/ml}$, los embriones tratados con Casiopeína IIIa mantenían un flujo sanguíneo constante en los diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72h); sin embargo, había una disminución de dicho flujo en las siguientes concentraciones (Figura 11). El Cisplatino en concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ a las 72h presentó un flujo sanguíneo constante; sin embargo las Cas IIgly y IIIEa, a las 72 h con las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ provocaron ausencia del flujo sanguíneo (Figura 11).

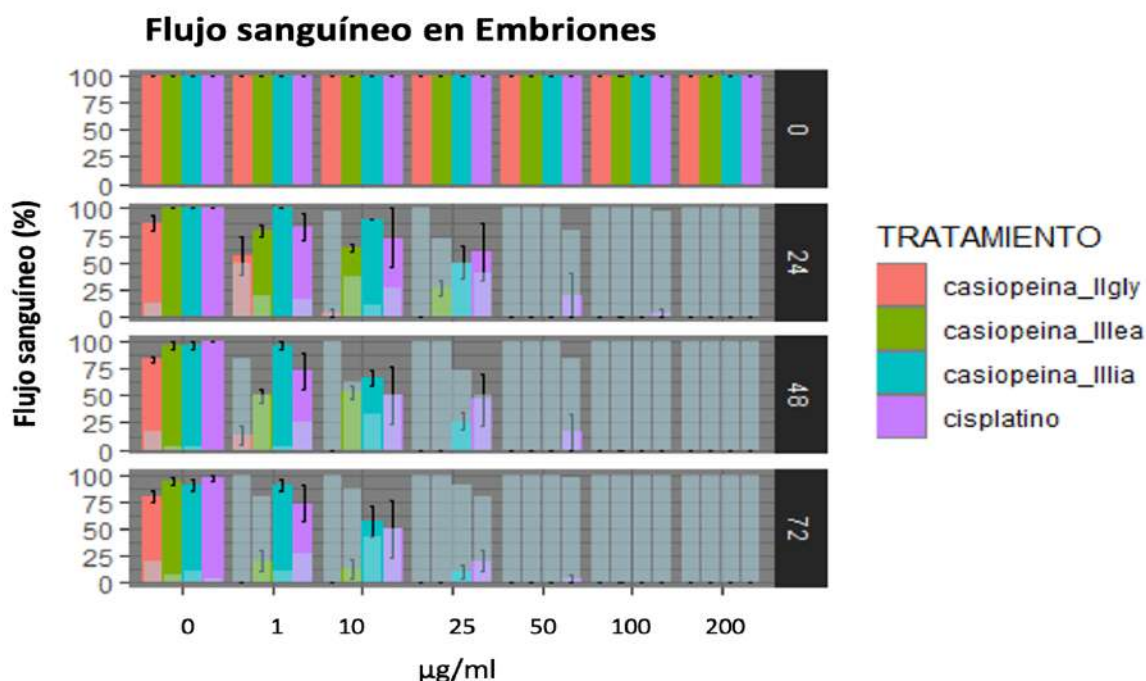


Figura 11. Flujo sanguíneo en embriones. La gráfica muestra el porcentaje del flujo sanguíneo en embriones expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones medidos cada 24 h durante un lapso de 72 h.

El modelo logístico utilizado para comparar el tiempo, concentración y tratamiento en embriones, arrojó que el efecto de los tratamientos sobre el flujo sanguíneo de los peces y las concentraciones fue significativo ($p < 0.001$); mientras que el tiempo no tuvo un efecto significativo ($p > 0.05$). Las diferentes interacciones: tratamientos-concentraciones, tratamientos-tiempos y concentraciones-tiempos, resultaron significativas ($p < 0.001$).

Para saber si había diferencias en la disminución del flujo sanguíneo atribuibles al tratamiento, se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis y mostró que si existían diferencias

significativas entre los tratamientos en relación al flujo sanguíneo ($p = 0.007$). Para comprobar el análisis se realizó el procedimiento de Dunn, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos en relación al flujo sanguíneo del pez (Tabla 6).

Tabla 6. Diferencias en el flujo sanguíneo dependiente del tratamiento.

Tratamiento		Valor ($p < 0.05$)
Casiopeína IIgly	Cisplatino	0.012182 *
Casiopeína III Ea	Cisplatino	0.809221
Casiopeína III a	Cisplatino	1.000000
Casiopeína III Ea	Casiopeína IIgly	1.000000
Casiopeína III a	Casiopeína IIgly	0.029338 *
Casiopeína III a	Casiopeína III Ea	1.000000

- **Malformaciones en embriones**

En los embriones del pez cebra se observaron curvaturas en el cuerpo y en la cola impidiendo el desarrollo del embrión (Figura 12).

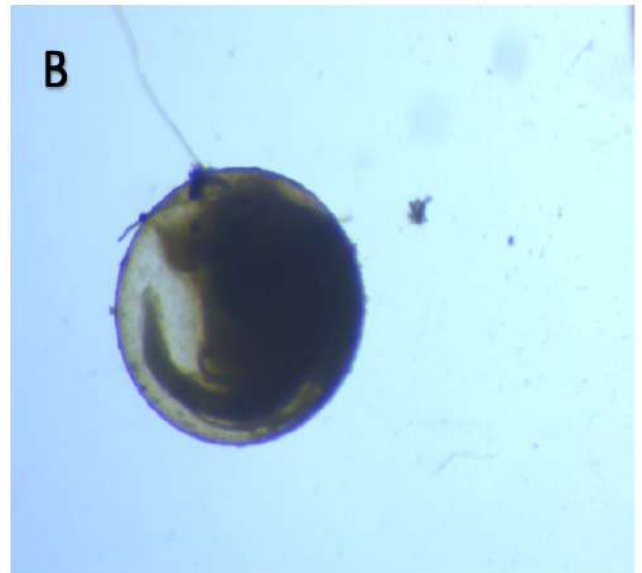


Figura 12. Embriones expuestos a tratamientos de Cas y Cisplatino. A) Embrión control sin tratamiento, B) Embrión coagulado sin eclosionar, C) La flecha continua muestra la cola curvada y la flecha discontinua muestra el flujo sanguíneo, D) La flecha muestra al embrión eclosionando.

Los embriones del grupo control negativo se desarrollaron normalmente; sin embargo, los embriones tratados con los diferentes compuestos mostraron malformaciones con las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 y 72h. La Cas IIIa y el Cisplatino, mostraron mayor porcentaje de malformaciones en el cuerpo en un periodo de tiempo de 48 y 72h (Figura 13).

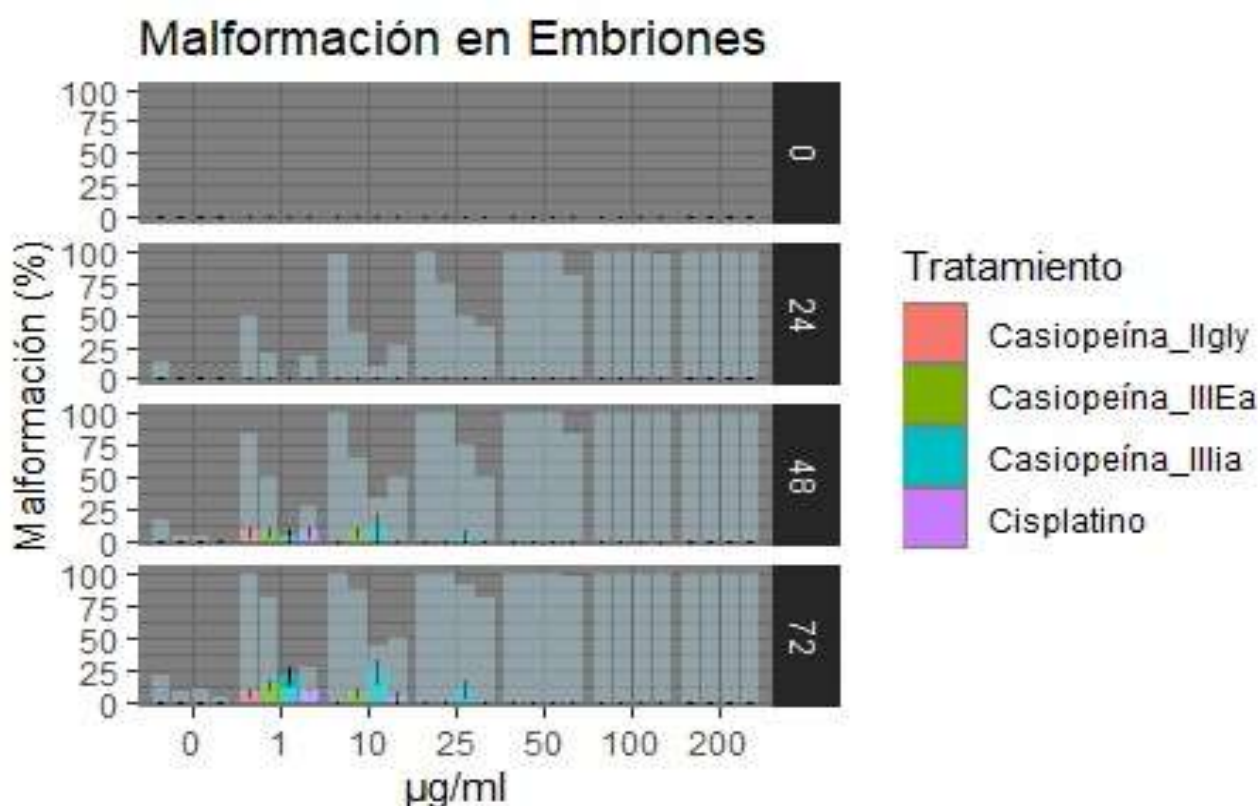


Figura 13. Malformaciones en embriones. La gráfica de barras muestra el porcentaje de las malformaciones en los embriones causadas por los tratamientos en las diferentes concentraciones y tiempos.

El modelo logístico para las malformaciones en los embriones, mostró que las variables concentración y tiempo tuvieron un efecto altamente significativo ($p < 0.001$); mientras que su interacción no lo fue ($p > 0.05$).

7.2.2 Alevines

- **Movilidad**

Durante las primeras 24 h, los alevines expuestos a 25 µg/ml de Cas y hasta 50 µg/ml de Cisplatino presentaban movilidad, la cual disminuyó a las 48 h. A las 72 h solo con las concentraciones de 10 y 25 µg/ml de Casiopeína IIIia y Cisplatino, se observó movilidad en los alevines (Figura 15).

Por su parte, las Casiopeínas IIgly y IIIEa en las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 µg/ml a las 24 h, resultaron ser más tóxicas ya que ocasionaron el 100% de mortalidad, lo que se puede observar en las barras blancas de la Figura 14. En cambio, cuando los tratamientos se aplicaron en la concentración de 1 µg/ml a las 24 h, se observó una movilidad del 60 al 76% en los alevines, dependiendo del tratamiento (Figura 14).

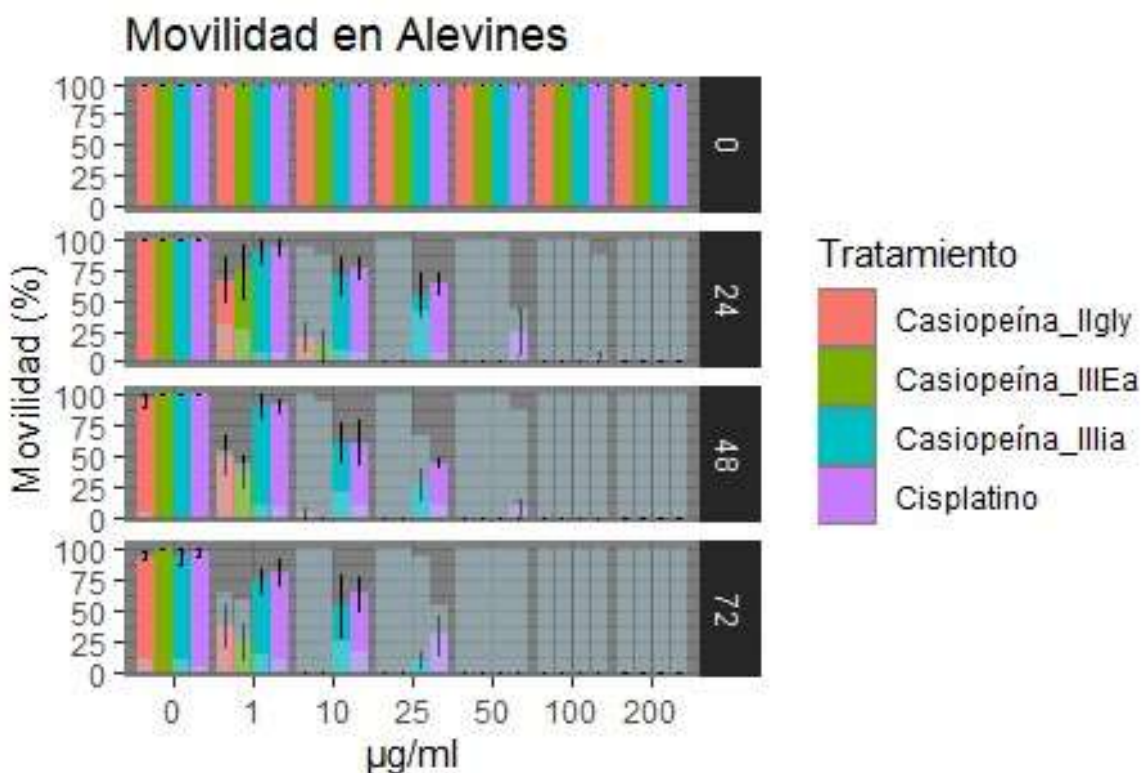


Figura 14. Movilidad en alevines. Gráfica de barras que muestra la disminución en la movilidad en alevines causada por los tratamientos en las diferentes concentraciones y tiempos.

Con el modelo logístico para evaluar la movilidad en alevines, encontramos que las variables de concentración y tiempo, así como su interacción, tuvieron un efecto altamente significativo ($p < 0.001$). Las interacciones entre tratamiento y concentración y entre tratamiento y tiempo, fueron significativas también ($p < 0.05$).

- **Malformaciones en alevines**

Los resultados obtenidos indicaron que todos los tratamientos indujeron anomalías morfológicas, las cuales incluyeron malformaciones en el cuerpo o enrollamiento de la cola durante la etapa de alevín del pez cebra (Figura 15).

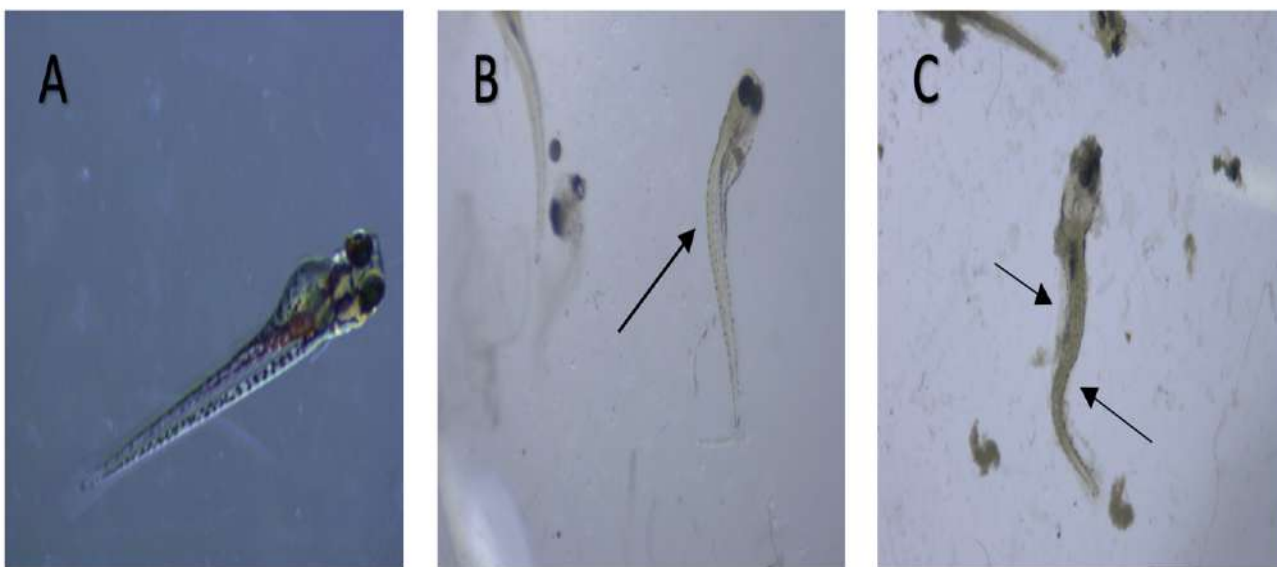


Figura 15. Alevines tratados con Cas y Cisplatino. A) Alevín control sin tratamiento, B) La flecha indica malformación en el cuerpo, C) Las flechas muestran malformación en cuerpo y cola.

Para los tratamientos de Casiopeína IIgly a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y para Casiopeína IIIia y Cisplatino a partir de la concentración 25 $\mu\text{g/ml}$ a las 24h, se registró un alto índice de mortalidad (40 a 100%); sin embargo, los alevines que se encontraban muertos tenían el cuerpo doblado o la cola deformada (Figura 16).

Como se observa en la Figura 16, todos los tratamientos en cualquier concentración y en todos los tiempos (24, 48 y 72h) tuvieron efecto teratogéno en los alevines, mostrando la siguiente relación CasIII Ea > CasIII Ia > Cisplatino > CasII gly.

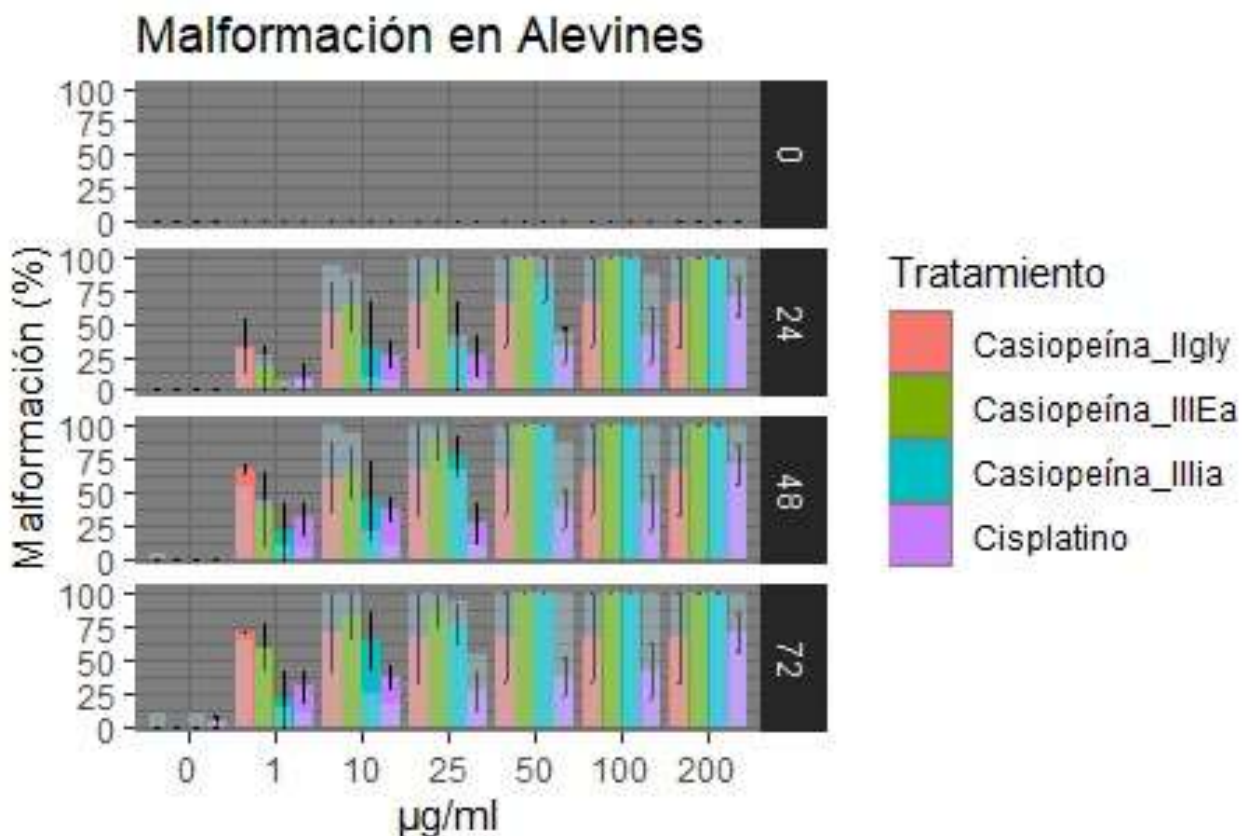


Figura 16. Malformaciones en alevines. Gráfica de barras que muestra el porcentaje de malformaciones en alevines causadas por los tratamientos.

El modelo logístico para malformaciones en alevines, mostró que las variables concentración y tiempo con o sin interacción, presentaron una relación altamente significativa ($p < 0.001$). Mientras que la interacción entre el tratamiento y la concentración si fue significativa ($p < 0.05$).

Para saber si existía diferencia entre los tratamientos y las malformaciones, se utilizó un análisis estadístico de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones con el procedimiento de Dunn, lo que arrojó una relación altamente significativa ($p < 0.016$). Sin embargo, encontramos que solo dos tratamientos eran diferentes (Tabla 7).

Tabla 7. Relación entre los tratamientos y las malformaciones en alevines.

Tratamiento	Tratamiento	Valor (p<0.05)
Casiopeína Igly	Cisplatino	0.879582
Casiopeína III Ea	Cisplatino	0.008090**
Casiopeína III Ia	Cisplatino	0.359849
Casiopeína III Ea	Casiopeína Igly	0.505902
Casiopeína III Ia	Casiopeína Igly	1.000000
Casiopeína III Ia	Casiopeína III Ea	1.000000

7.3.- Análisis de Supervivencia

Para analizar la sobrevivencia de los embriones y alevines, se evaluaron las diferentes concentraciones de cada tratamiento en un periodo de 24 a 72 h.

7.3.1 Casiopeína Ilgly

En cuanto a la sobrevivencia en los peces tratados con Casiopeína Ilgly en la concentración 1 µg/ml, se observó que durante las primeras 24 h sobrevivieron hasta un 76% de embriones y hasta 87% de alevines. Para el mismo tiempo, pero en la concentración 10 µg/ml, el porcentaje de sobrevivencia fue muy similar tanto para embriones (62 %) como para alevines (67 %). A las 48 h sobrevivieron un 47% de embriones y un 55% de alevines. Mientras que a las 72 h con las concentraciones de 10 y 25 µg/ml, no sobrevivieron los embriones ni los alevines tal y como se muestra en la Figura 17.

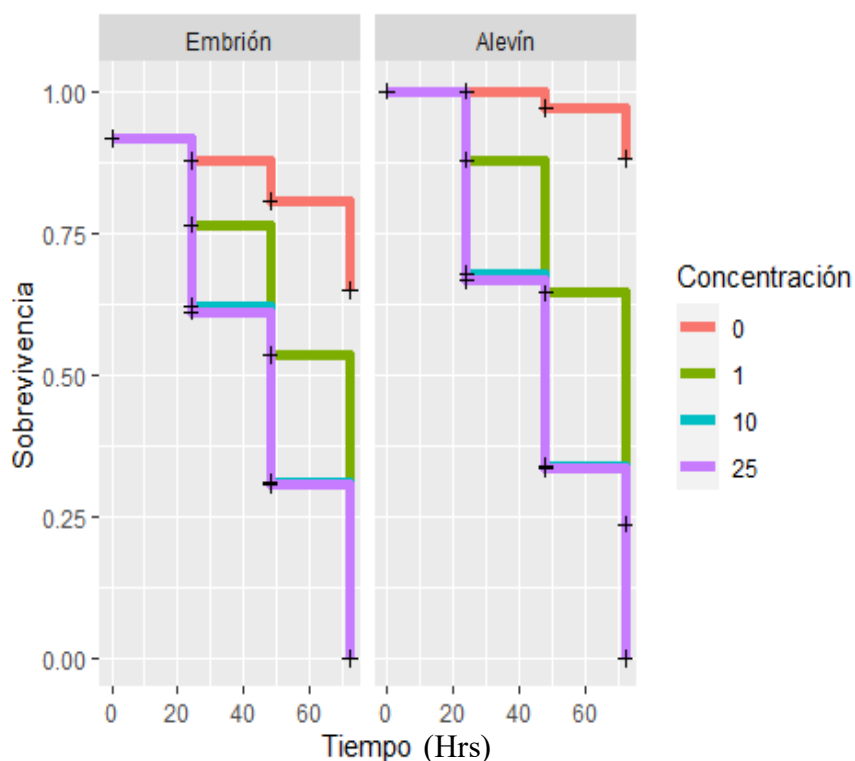


Figura 17. Sobrevivencia con Casiopeína Ilgly. El gráfico muestra la sobrevivencia a las concentraciones de 0, 1, 10, 25 µg/ml de Cas Ilgly en embriones (A) y alevines (B).

7.3.2 Casiopeína IIIEa

El tratamiento con Casiopeína IIIEa en embriones y alevines muestra que a las primeras 24 h con las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$, el porcentaje de sobrevivencia es similar para embriones (89%) y alevines (82%). A las 48 h el porcentaje de sobrevivencia es mayor en los embriones (65%) que en los alevines (54%). A las 72 h con la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, se observa una sobrevivencia en embriones del 7%, mientras que en alevines ya no hay sobrevivientes (Figura 18).

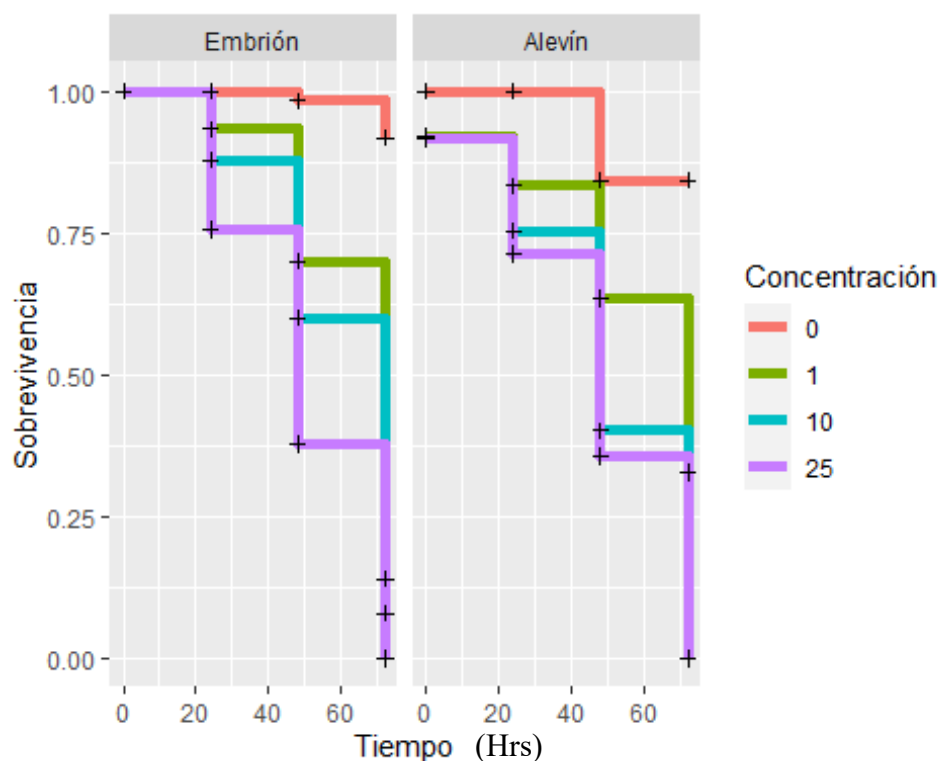


Figura 18. Sobrevivencia con Casiopeína IIIEa. La sobrevivencia se ensayó con las concentraciones 1, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ para embriones (A) y alevines (B).

7.3.3 Casiopeína IIIa

La exposición a 1 µg/ml de Casiopeína IIIa, mostró un alto porcentaje de sobrevivencia tanto en embriones (99%) como en alevines (97%) durante las primeras 24 h. La concentración de 25 µg/ml presentó un mayor porcentaje de sobrevivencia en alevines (86%) comparado con los embriones (77%). A las 48 h ambos grupos tuvieron un alto porcentaje de sobrevivencia (97% en embriones y 93% en alevines), para la concentración de 1 µg/ml. Con la concentración de 10 µg/ml, los embriones presentaron 82% de sobrevivencia y los alevines un 87%. Para la concentración de 25 µg/ml los alevines presentaron 55% de sobrevivencia. A las 72 h en la concentración de 1 µg/ml, la sobrevivencia fue de 91% para embriones y 81% para alevines, y con 10 µg/ml el porcentaje de sobrevivencia en embriones fue de 46% y 66% para alevines. Cabe destacar que en las dos etapas del pez observamos una sobrevivencia de 46% en embriones y de 66% en alevines en la concentración de 25 µg/ml (Figura 19).

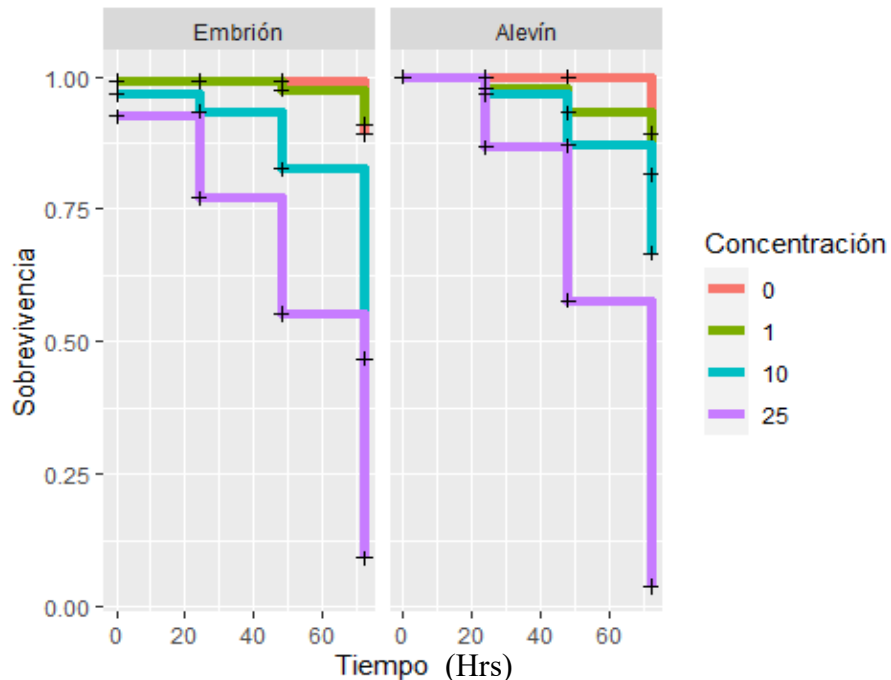


Figura 19. Sobrevivencia con Casiopeína IIIa. El gráfico muestra el porcentaje de sobrevivencia a 1, 10 y 25 µg/ml para embriones (A) y alevines (B).

7.3.4 Cisplatino

En cuanto a la sobrevivencia de los embriones y los alevines tratados con Cisplatino, en las primeras 24 h para la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ había un 94% de embriones y un 98% de alevines; mientras que con la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ la sobrevivencia fue de 91% y 97% en embriones y alevines. Con la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ la sobrevivencia fue de 86% para embriones y 97 % para alevines. A las 48 h, disminuyó la sobrevivencia de los embriones (81%) a diferencia de los alevines (95%) para la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$; mientras que con la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ la sobrevivencia fue de 68% para embriones y 91 % para alevines, y con la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ fue de 65% en embriones y 94% para alevines. Para las 72 h con la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, la sobrevivencia de los embriones fue de 60% y de 86% para los alevines. Para la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ a las 72 h, había una sobrevivencia de 34% de embriones y 76% de alevines; en tanto que con la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ a las 72 h la sobrevivencia fue de 13% en embriones y 44% en alevines (Figura 20).

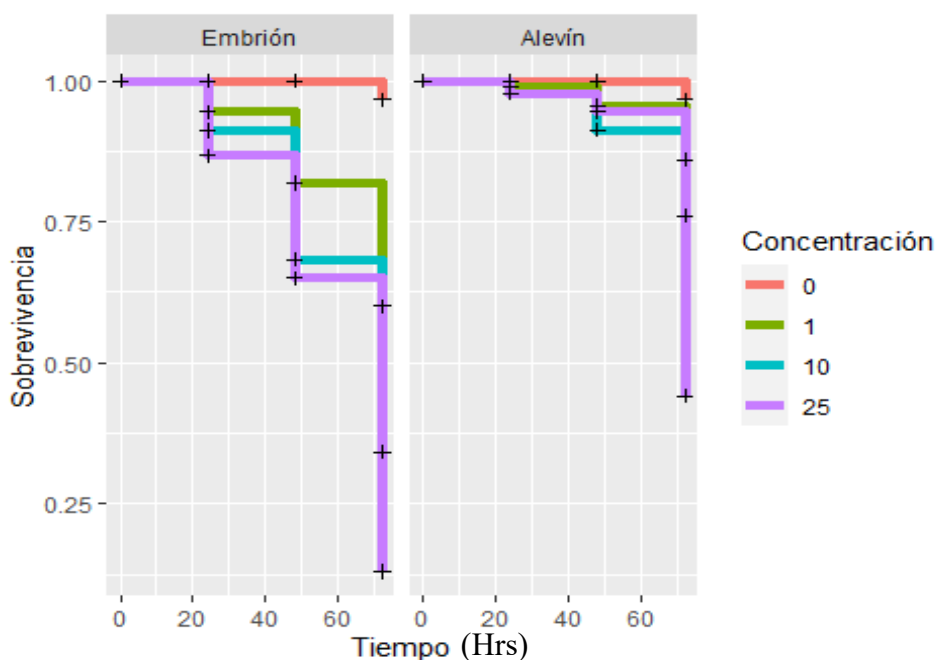


Figura 20. Sobrevivencia con Cisplatino. El gráfico muestra el porcentaje de sobrevivencia en embriones (A) y alevines (B).

7.4.-Determinación de CL50 en embriones y alevines.

Los valores para todos los tratamientos a las 48 y 72 horas, no difieren en ninguno de los dos grupos de estadio del pez. En los embriones y alevines a las 24 h, la CasIIgly fue el tratamiento más tóxico y la CasIIIa el menos tóxico. Para las 48 y 72 h, la toxicidad mostrada fue la siguiente Cas IIgly > Cas IIIEa > Cas IIIa > Cisplatino (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. CL50 de los tratamientos en embriones.

Horas	Tratamiento	CL50 µg/ml
24	Cisplatino	0.0146
	Cas IIgly	0.000114
	Cas IIIEa	0.00692
	Cas IIIa	0.0216
48	Cisplatino	0.00721
	Cas IIgly	0.0000225
	Cas IIIEa	0.00074
	Cas IIIa	0.00674
72	Cisplatino	0.0027
	Cas IIgly	0.00000221
	Cas IIIEa	0.0000952
	Cas IIIa	0.00185

Tabla 9. CL50 para todos los tratamientos en alevines

Horas	Tratamiento	CL50 µg/ml
24	Cisplatino	0.0452
	CasIIgly	0.00178
	CasIIIEa	0.00217
	CasIIlia	0.0186
48	Cisplatino	0.0267
	CasIIgly	0.000306
	CasIIIEa	0.00127
	CasIIlia	0.0118
72	Cisplatino	0.00926
	CasIIgly	0.0000918
	CasIIIEa	0.000936
	CasIIlia	0.00232

8.- Discusión

El descubrimiento y desarrollo de compuestos para ser utilizados como posibles fármacos, ha llevado a profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción a través de diferentes modelos biológicos. Es por eso que todos los compuestos deben ser sometidos a una serie de estudios preclínicos antes de pasar a las fases de estudio en humanos. Los estudios preclínicos van desde los ensayos químicos hasta los toxicológicos (Herrero et al. 2010). Las Cas propuestas para ser utilizadas como antineoplásicos, precisan de información en relación a sus efectos tóxicos y teratogénos que puedan apoyar su aplicación en humanos. Por lo que en este proyecto de investigación se trabajó con embriones y alevines de pez cebra (*Danio rerio*) tratados con las Casiopeínas IIgly, IIIEa, IIIia y Cisplatino.

Los datos de nuestro estudio demostraron que las Cas eran agudamente letales para embriones en concentraciones mayores a 50 µg/ml y para alevines mayores a 25 µg/ml. Sin embargo, se ha reportado que las nanopartículas de Cobre también son tóxicas en peces cebra adultos con una CL50 calculada en 1–1,5 mg/L a las 48 h (Griffitt et al., 2007). Y en otro estudio se reportó el valor de CL50 de CuO fue de 960 mg/L (Kovřížnych et al., 2013). El Cobre es un metal esencial en la homeostasis celular, asociado a una mayor proliferación y crecimiento celular, así como en la participación de angiogénesis y metástasis (Oliveri, 2022). Por lo cual la toxicidad de los peces en este proyecto, se debió a la respuesta al estrés por su contacto con el Cu, ya que el Cu conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno y cuando éste excede su límite, se puede inhibir su control por parte de las enzimas antioxidantes, conduciendo a daños celulares y llevando finalmente a la muerte celular.

En concentraciones menores de 10 µg/ml la mortalidad de alevines fue muy baja (10 %), mientras que 25 µg/ml los embriones fueron los especímenes con un menor (10%) porcentaje de mortalidad con todos los tratamientos. Cabe mencionar que los embriones están protegidos aun por el corion que posee dos membranas, la coriónica y la vitelina con un espacio perivitelino en el medio, esta membrana tiene poros de ~0,5–0,7 µm de diámetro (Rawson et al., 2000; Lee et al., 2007), considerando esto los embriones son

menos propensos a verse afectados por productos químicos transmitidos por el agua en comparación con los alevines y los adultos (Osaki et al., 2006). Sin embargo, otros estudios en peces cebra han apoyado que las primeras etapas de la vida en las que el corion aún no se ha endurecido son particularmente susceptibles a los compuestos transmitidos por el agua (Herrmann, 1993).

La CasIIIa y el Cisplatino tienen un efecto similar con una baja mortalidad. Lo cual hace suponer que la estructura de los compuestos juega un papel importante en la toxicidad que ejerce sobre el pez ya que tienden a ser similares. Ejemplo de ello es que la estructura de la CasIIIa está basada en la estructura química del Cisplatino; en cambio las CasIIgly y CasIIIEa comparten solo parte de su estructura respecto a las dimiinas. No obstante, en otros modelos las Cas presentan menos toxicidad a diferencia del Cisplatino. Algunos de esos ejemplos vienen de experimentos realizados en perros Beagle donde se administraron 7 mg/kg de CasIIIa para observar toxicidad, mientras que se aplicaron 4 mg/kg de Cisplatino; en tanto que en células HeLa se emplearon 5.5 μ M de CasIIgly y 5.1 μ M de Cisplatino.

Otra de nuestras preguntas a contestar fue ¿Si las Casiopeínas inducían teratogénesis en el pez cebra? Uno de los parámetros analizados fue la eclosión de los embriones. Efectivamente las CasIIgly, CasIIIEa y Cisplatino mostraron bajas tasas de eclosión en comparación con el grupo control sin tratamiento y la CasIIIa, por lo cual si había teratogénesis en los tres tratamientos mencionados. Esta inhibición de la eclosión también se observó en otros trabajos con nanopartículas de cobre donde se mostró que la dosis era dependiente del tiempo, inhibiendo la eclosión. Esto se debía a la interferencia de los iones de Cu sobre la enzima de eclosión corionasa (Lin et al., 2011). De igual manera en otro estudio se demostró que los iones de Cu retrasaban la eclosión (Bai et al., 2010a). De acuerdo a Ganesan, por medio de un análisis de microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de rayos X con dispersión de energía (SEM/EDS), se reveló la acumulación de nanopartículas de Cu en los embriones y esta acumulación inhibió el proceso de eclosión (Ganesan et al., 2016).

El flujo sanguíneo en embriones se vio afectado en las concentraciones altas ($> 50\mu\text{g/l/ml}$) con las Cas. A pesar de que en esta investigación no se monitoreó la frecuencia cardiaca, en otros estudios similares con Cobre se vio afectada la función cardiaca en embriones expuestos a 40 y 60 ppm, ya que la inducción de ROS podría haber provocado bradicardia, ya que las especies reactivas de oxígeno regulan los cardiomiocitos y contribuyen a la fisiología celular normal, por tanto su desequilibrio puede causar enfermedades vasculares y cardiacas (Ganesan et al., 2016).

Las malformaciones en embriones fueron más visibles con los tratamientos de CasIIIa y Cis, lo que puede deberse al retraso en la ecllosión, ya que se altera el crecimiento normal de los embriones. En nuestro estudio, la observación de las malformaciones del cuerpo y la cola fueron similares a las de los embriones expuestos a nanopartículas de óxido de cobre (Ganesan et al., 2016). Hay otro estudio con nanopartículas de oro (Browning et al., 2009) y en este evidenciaron que la entrada a los embriones era a través de los canales coriónicos, lo que conduce a las anomalías del desarrollo y revela el potencial teratógeno de algunos compuestos en embriones de pez cebra.

Ganesan y colaboradores también observaron que al acumularse el cobre en los peces se inhibía la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), la cual se ve implicada en ejercer la función moduladora esencial para la proliferación celular (Zhang et al., 2002), la migración celular (Drews, 1975), la regulación de la diferenciación a través de la señalización (Falugi et al., 2012) y en última instancia, el desarrollo embrionario (Falugi, 1993). Ellos explican que tal alteración en las actividades de la AChE podría haber interferido en los procesos antes mencionados, alterando el desarrollo y haciendo que termine en teratogenicidad.

Las malformaciones en alevines se observaron principalmente con la Casiopeína IIIa y Cisplatino, Aunque encontramos un alto índice de mortalidad, también pudimos observar alevines muertos y con la cola deformada. Durante el desarrollo, la etapa de alevín parece tener una mayor sensibilidad a la toxicidad del cobre a diferencia de las etapas embrionarias y adultas (McKim et al., 1978; Shazili y Pascoe, 1986; Scudder et al., 1988; Jakubowska , 2020).

En nuestro estudio observamos que la movilidad en alevines se vio afectada gradualmente dependiendo del tratamiento y la concentración; el tiempo por su parte también jugó un papel importante. En estudios con iones de Cu^{2+} , se observó que el cobre ejerce efectos tóxicos durante la neurogénesis y la miogénesis, lo que provoca que haya un comportamiento disfuncional en alevines de pez cebra (Zhang et al.2015; Sun et al., 2016).

En cuanto a los tratamientos por 72 h, se observó que los embriones tenían un mayor porcentaje de sobrevivencia a diferencia de los alevines, sin importar a que tratamiento fueran expuestos. Recordando que el corion como primera barrera hace menos propensos a los embriones a verse afectados (Osaki et al., 2006).

Los futuros estudios deberían explorar más tiempos de exposición a los tratamientos, diferentes estadios del pez, observar qué genes están involucrados y los mecanismos de comportamiento/fisiología en función de los mecanismos de transporte del cobre de las Casiopeínas®.

9.-Conclusiones

Este estudio exploratorio hizo el primer intento de revelar las posibles características tóxicas y teratógenas inducidas por las Casiopeínas durante las primeras etapas de la vida del pez cebra (embrión y alevín), esto basándose en un análisis exhaustivo de múltiples parámetros y puntos de tiempo.

Los resultados obtenidos muestran que las Casiopeínas presentan toxicidad dependiendo del tiempo de exposición y la concentración a la cual son aplicadas, tanto en embriones como alevines.

También se observó que las altas concentraciones de Casiopeínas resultaron ser tóxicas. Sin embargo, al establecer las CL50 observamos que ésta era menor para las Casiopeínas, sugiriendo su alta efectividad.

Esta investigación contribuye a integrar más información sobre los mecanismos moleculares y celulares implicados en los efectos toxicológicos de las Casiopeínas, así como a informar sobre los efectos en un importante modelo de investigación como lo es el pez cebra.

10.- Bibliografía

1. Adekoya, A. A., Lai, K.-S., Syahida, A., Mahmood, M., & Shaharuddin, N. A. (2019). Phytochemical evaluation, Embryotoxicity and Teratogenic effects of *Curcuma longa* extract in Zebrafish (*Danio rerio*). *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/551044>
2. Alberto, LC.A., Georgina, CC.E., Miryam, MH. *et al.* Antimicrobial effect of Casiopeinas® copper- and ruthenium-based compounds on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and in vitro cell viability onto osteoblasts cells. *Braz J Microbiol* **53**, 179–184 (2022). <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00648-3>
3. Ashby, J, RW Tennant. 1991. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the USNTP. *Mutat Res* 257:229-306.
4. Barbara C. Scudder; James L. Carter; Harry V. Leland (1988). Effects of copper on development of the fathead minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque., 12(2), 107–124. doi:10.1016/0166-445x(88)90029-x
5. Bayona, A., & Fajardo, N. (2012). Desarrollo De Nuevos Medicamentos: Oportunidades Y Beneficios Para El Perú. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, 29(4), 521-528. Doi:10.1590/S1726-46342012000400016.
6. Becco, L., García-Ramos, J. C., Azuara, L. R., Gambino, D., & Garat, B. (2014). Analysis of the dna interaction of copper compounds belonging to the casiopeínas® antitumoral series. *Biological Trace Element Research*, 161(2), 210–215. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0098-1>.
7. BEEKHUIJZEN, M., DE KONING, C., FLORES-GUILLÉN, M.-E., DE VRIES-BUITENWEG, S., TOBOR-KAPLON, M., VAN DE WAART, B. y EMMEN, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, vol. 56, pp. 64-76. ISSN 08906238. DOI 10.1016/j.reprotox.2015.06.050.
8. Brannen K. C. , Panzica-Kelly J. M., Danberry T. L., Augustine-Rauch K. A. (2010). Development Of A Zebrafish Embryo Teratogenicity Assay And Quantitative Prediction Model. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 89, 66–77.
9. Brent, R. L. (2004, April). Utilization Of Animal Studies To Determine The Effects And Human Risks Of Environmental Toxicants (Drugs, Chemicals, And Physical Agents).

10. Browning LM, Lee KJ, Huang T, Nallathamby PD, Lowman JE, Xu XH. Random walk of single gold nanoparticles in zebrafish embryos leading to stochastic toxic effects on embryonic developments. *Nanoscale*. 2009 Oct;1(1):138-52. doi: 10.1039/b9nr00053d. Epub 2009 Aug 28. PMID: 20644873; PMCID: PMC2914682.
11. Castillo Morales, G. (2004). ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CALIDAD DE AGUAS (Primera ed). Retrieved from <https://idl-bnc-idrc.dspacedirect.org/bitstream/handle/10625/26391/IDL-26391.pdf?sequence=106&isAllowed=y>.
12. Castillo-Rodríguez RA, Palencia G, Anaya-Rubio I, Pérez JCG, Jiménez-Farfán D, Escamilla-Ramírez Á, Zavala-Vega S, Cruz-Salgado A, Cervantes-Rebolledo C, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Trejo-Solis C. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-invasive effect of the copper coordination compound Cas III-La through the induction of reactive oxygen species and regulation of Wnt/ β -catenin pathway in glioma. *J Cancer*. 2021 Jul 25;12(19):5693-5711. doi: 10.7150/jca.59769. PMID: 34475984; PMCID: PMC8408120.
13. Cells-Derived Xenograft Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1868 <https://doi.org/10.3390/ijms23031868>.
14. Chen, X., Zou, H., Li, H., Lin, R., Su, M., Zhang, W., Zhou, Y., Zhang, P., Hou, M., Deng, X., & Zou, C. (2017). Weekly Versus Triweekly Cisplatin-Based Chemotherapy Concurrent with Radiotherapy in the Treatment of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. In *International Journal of Gynecological Cancer* (Vol. 27, Issue 2, pp. 344–349). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000883>.
15. Crona, D. J., Faso, A., Nishijima, T. F., McGraw, K. A., Galsky, M. D., & Milowsky, M. I. (2017). A Systematic Review of Strategies to Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *The Oncologist*, 22(5), 609–619. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0319>.
16. D M. Rawson; T. Zhang; D. Kalicharan; W L. Jongebloed (2000). Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration . , 31(3), 325–336. doi:10.1046/j.1365-2109.2000.00401.x
17. DANIEL, W.W., 2008. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 4. México: Limusa. Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin In Cancer Therapy: Molecular Mechanisms Of Action. *European Journal Of Pharmacology*, 0, 364–378. [Http://Doi.Org/10.1016/J.Ejphar.2014.07.025](http://doi.org/10.1016/J.Ejphar.2014.07.025).

18. Davila-Manzanilla, S. G., Figueroa-de-Paz, Y., Mejia, C., & Ruiz-Azuara, L. (2017). Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 129, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.045>.
19. De Vries, G., Rosas-Plaza, X., van Vugt, M. A. T. M., Gietema, J. A., & de Jong, S. (2020). Testicular cancer: Determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 88). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102054>.
20. Drews U. Cholinesterase in embryonic development. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 1975 ;7(3):1-52. PMID: 1094493.
21. Etchin, J., Kanki, J. P., & Look, A. T. (2011). Zebrafish As A Model For The Study Of Human Cancer. *The Zebrafish: Disease Models And Chemical Screens Methods In Cell Biology*, 309-337. Doi:10.1016/B978-0-12-381320-6.00013-8.
22. Falugi C. Localization and possible role of molecules associated with the cholinergic system during "non-nervous" developmental events. *European Journal of Histochemistry: EJH*. 1993 ;37(4):287-294. PMID: 7510534.
23. Falugi, C., & Aluigi, M. G. (2012). Early appearance and possible functions of non-neuromuscular cholinesterase activities. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5, 54. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00054>
24. Ganesan, S., Anaimalai Thirumurthi, N., Raghunath, A., Vijayakumar, S., & Perumal, E. (2016). Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 36(4), 554–567. <https://doi.org/10.1002/jat.3224>
25. García-Ortuño, L.E.; M. Leal, I. Gracia; F. Constantino; J. Bouda; C. Cedillo Y L. Ruiz. 2006. Estudio De Los Efectos Tóxicos Agudos De Las Casiopeínas III-ia En Perros. 2° Congreso Nacional De Química Médica. Queretaro, México. *Revista Salud Publica Y Nutrición*. 7: Resumen 32. 2007.
26. GIBBONS, J.D. y CHAKRABORTI, S., 2003. *Nonparametric statistical inference*. 4th ed., rev.expanded. New York: Marcel Dekker. Statistics, textbooks and monographs, v. 168. ISBN 978-0-8247-4052-8. QA278.8 .G498 2003.
27. Gilbert-Barness, E. (2010). *Teratogenic Causes Of Malformations*. Retrieved December 15, 2017, From [Http://Www.Annclinlabsci.Org/Content/40/2/99.Full#Cited-By](http://www.annclinlabsci.org/content/40/2/99.full#Cited-By)
28. Griffitt RJ, Weil R, Hyndman KA, Denslow ND, Powers K, Taylor D, Barber DS. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish

(Danio rerio). Environ Sci Technol. 2007 Dec 1;41(23):8178-86. doi: 10.1021/es071235e. PMID: 18186356.

29. Guengerich, FP (2011). Mecanismos De Toxicidad Farmacológica Y Relevancia Para El Desarrollo Farmacéutico. Metabolismo Farmacológico Y Farmacocinética ,26 (1), 3–14.
30. He, J., Gao, J., Huang, C., & Li, C. (2014). Zebrafish Models For Assessing Developmental And Reproductive Toxicity. Neurotoxicology And Teratology, 42, 35-42. Doi:10.1016/J.Ntt.2014.01.006.
31. HERRERO, G.H., GONZALEZ, A.M. (COL), CHAVARINO, A.P. (COL) Y GARCIA, F.Z. (COL), 2010. Tratado De Medicina Farmaceutica / Treatise On Pharmaceutical Medicine. S.L.: Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-84-9835-010-4.
32. Hill, L. M., & Kleinberg, F. (1984). Effects Of Drugs And Chemicals On The Fetus And Newborn (First Of Two Parts). Mayo Clinic Proceedings, 59(10), 707-716. Doi:10.1016/S0025-6196(12)62060-6.
33. HOLLANDER, M. y WOLFE, D.A., 1999. Nonparametric Statistical Methods. Second. USA: John Wiley and Sons, Inc. Wiley series in probability and statistics. ISBN 0-471-19045-4.
34. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
35. Hurtt M. E. , Cappon G. D., Browning A. (2003). Proposal For A Tiered Approach To Developmental Toxicity Testing For Veterinary Pharmaceutical Products For Food-Producing Animals. Food Chem. Toxicol . 41, 611–619.
36. JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M.M., FERLAY, J., WARD, E. Y FORMAN, D., 2011. Global Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal For Clinicians, Vol. 61, No. 2, Pp. 69-90. ISSN 00079235. DOI 10.3322/Caac.20107.
37. Jiménez, V. E., Pimentel, E., Cruces, M. P., Amaya-chávez, A., & Ruiz-azuara, L. (2016). Study on the relationship of genotoxic and oxidative potential of a new mixed chelate copper antitumoral drug , Casiopeina II-gly (Cas II-gly) in Drosophila melanogaster. Environmental Toxicology and Pharmacology, 48, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.008>.
38. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages Of Embryonic Development Of The Zebrafish. Developmental Dynamics, 203(3), 253-310. Doi:10.1002/Aja.1002030302.
39. Kittipaspallop, W., Taepavarapruk, P., Chanchao, C., & Pimtong, W. (2018). Acute toxicity and teratogenicity of α -mangostin in zebrafish embryos. Experimental

40. Kovřížnych JA, Sotníková R, Zeljenková D, Rollerová E, Szabová E, Wimmerová S. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages - comparative study. *Interdiscip Toxicol*. 2013 Jun;6(2):67-73. doi: 10.2478/intox-2013-0012. PMID: 24179431; PMCID: PMC3798858.
41. Lantz-Mcpeak, S., Guo, X., Cuevas, E., Dumas, M., Newport, G. D., Ali, S. F., . . . Kanungo, J. (2014). Developmental Toxicity Assay Using High Content Screening Of Zebrafish Embryos. *Journal Of Applied Toxicology*, 35(3), 261-272. Doi:10.1002/Jat.302.
42. Leal, M. H. Sumano, L.E. García, I. Gracia Y L.Ruíz. 2006. Caracterización Y Tratamiento De Los Efectos Tóxicos Agudos De Las Casiopeínas III-Ia Y II-Gly (Cas III-IA Y Cas IIGly). 2° Congreso Nacional De Química Médica. Queretaro, México. *Revista Salud Publica Y Nutrición*. 7: Resumen 53. 2007.
43. Lee, K. J., Nallathamby, P. D., Browning, L. M., Osgood, C. J., & Xu, X. H. (2007). In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS nano*, 1(2), 133–143. <https://doi.org/10.1021/nn700048y>
44. Magdalena Jakubowska, Marcin Białowas, Milda Stankevičiūtė, Agnieszka Chomiczewska, Janina Pažusienė, Karolina Jonko-Sobuś, Anna Hallmann, Barbara Urban-Malinga, (2020). Effects of chronic exposure to microplastics of different polymer types on early life stages of sea trout *Salmo trutta*. *Science of The Total Environment*, (), 139922–. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139922
45. MARÍN-HERNÁNDEZ, A., GALLARDO-PÉREZ, J.C., LÓPEZ-RAMÍREZ, S.Y., GARCÍA-GARCÍA, J.D., RODRÍGUEZ-ZAVALA, J.S., RUIZ-RAMÍREZ, L., GRACIA-MORA, I., ZENTELLA-DEHESA, A., SOSA-GARROCHO, M., MACÍAS-SILVA, M., MORENO-SÁNCHEZ, R. y RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S., 2012. Casiopeína II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Archives of Toxicology*, vol. 86, no. 5, pp. 753-766. ISSN 0340-5761, 1432-0738. DOI 10.1007/s00204-012-0809-3.
46. McGrath, Patricia, And Chun-Qi Li. “Zebrafish: A Predictive Model For Assessing Drug-Induced Toxicity.” *Drug Discovery Today*, Vol. 13, No. 9-10, 2008, Pp. 394–401., Doi:10.1016/J.Drudis.2008.03.002.
47. McKim, J.M., Eaton, J.G. & Holcombe, G.W. Metal toxicity to embryos and larvae of eight species of freshwater fish—II: Copper. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 19, 608–616 (1978). <https://doi.org/10.1007/BF01685847>

48. MEJIA, C. y RUIZ-AZUARA, L., 2008. Casiopeinas Ilgly and Illia Induce Apoptosis in Medulloblastoma Cells. *Pathology & Oncology Research*, vol. 14, no. 4, pp. 467-472. ISSN 1219-4956, 1532-2807. DOI 10.1007/s12253-008-9060-x.
49. Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., & Tyler, C. R. (2017). Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae. *Environmental Science and Technology*, 51(21), 12796–12805. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03283>.
50. Morton, Douglas M. "Importance Of Species Selection In Drug Toxicity Testing." *Toxicology Letters*, Vol. 102-103, 1998, Pp. 545–550., Doi:10.1016/S0378-4274(98)00263-X.
51. O'Grady, S., Finn, S. P., Cuffe, S., Richard, D. J., O'Byrne, K. J., & Barr, M. P. (2014). The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 40, Issue 10, pp. 1161–1170). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.10.003>.
52. OECD guideline for testing of chemicals No. 236 Fish embryo acute toxicity (FET) test Adopted 26 July 2013.
53. Oliveri, V. (2022). Selective Targeting of Cancer Cells by Copper Ionophores: An Overview. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.841814>
54. Organización Mundial de la Salud. (2019). OPS/OMS | Programa de Cáncer. Retrieved September 11, 2020, from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292:cancer-program&Itemid=3904&lang=es.
55. Osaki, K., Kashiwada, S., Tatarazako, N. et al. Toxicity Testing of Leachate from Waste Landfills Using Medaka (*Oryzias Latipes*) for Monitoring Environmental Safety. *Environ Monit Assess* 117, 73–84 (2006). <https://doi.org/10.1007/s10661-006-7670-x>
56. Parasuraman, S. (2011). Toxicological screening. 2(2). <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895>.
57. Pérez Landeiro A, Allende-Bandrés MA, Agustín Fernández MJ, Palomo Palomo P. Teratogénesis: Clasificaciones. *Farm Hosp* 2002; 26: 171-77.
58. Peterovova E, Sedmera D, Mišek I, Et Al. (2008). Bendiocarbamate Toxicity In The Chick Embryo. *Fol Biol* 55:61–65.

59. Qi, L., Luo, Q., Zhang, Y., Jia, F., Zhao, Y., & Wang, F. (2019). Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. In Chemical Research in Toxicology (Vol. 32, Issue 8, pp. 1469–1486). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00204>.
60. RADAMES ALEMÓN-MEDINA, [Sin Fecha]. Casiopeína ligly-Induced Oxidative Stress And Mitochondrial Dysfunction In Human Lung Cancer A549 And H157 Cells. Toxicology, 268(3), 176–183 | 10.1016/J.Tox.2009.12.010. [En Línea]. [Consulta: 12 Julio 2019]. Disponible En: <https://Sci-Hub.Tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2826547/>.
61. Riley A.L., Kohut S. (2010) Drug Toxicity. In: Stolerman I.P. (Eds) Encyclopedia Of Psychopharmacology. Springer, Berlin, Heidelberg.
62. Rodríguez, E.H., Cabanell, M.P. Y Serrano, P.I., 2016. Trabajo Fin De Grado Terapias Dirigidas Contra El Cáncer. , Pp. 20.
63. RODRÍGUEZ, E.H., CABANEL, M.P. y SERRANO, P.I., 2016. TRABAJO FIN DE GRADO TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL CÁNCER. , pp. 20.
64. Ruiz-Azuara L (1996) Process To Obtain New Mixed Cooper Amino-Acidate From Methyl Phenanthroline Complexes To Be Used As Anticancerogenic Agents. US Paten.
65. Ruiz-Azuara L. Dirección General De Invenciones, Marcas Y Desarrollo Tecnológico (SECOFI), Registro Núm. 18801-120579 Y 18802-120580. U.S. Patents: Number AP. 21 (1992) 5, 107, 005; Nov. 19 (1996), 5, 576, 326; Feb. 18, (1997).
66. Shazili, N.A.M., Pascoe, D. Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36, 468–474 (1986). <https://doi.org/10.1007/BF01623536>
67. Sipes N. S. , Padilla S., Knudsen T. B. (2011). Zebrafish: As An Integrative Model For Twenty-First Century Toxicity Testing. Birth Defects Res. C Embryo Today 93, 256–267.
68. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. (2013). OECD.
69. Trejo-Solís C, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez-Ropon A, Osorio-Rico L, Luvia ST, Gracia-Mora I, Marquez-Rosado L, Sánchez A, Moreno-García ME, Cruz A, Bravo-Gómez ME, Ruiz-Ramírez L, Rodríguez-Enriquez S, Sotelo J. Cas Ilgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. Neoplasia. 2005 Jun;7(6):563-74. doi: 10.1593/neo.04607. PMID: 16036107; PMCID: PMC1501287.

70. VALLEJO, M.S., 2014. Tratado de Psicofarmacología (eBook online). S.I.: Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-84-9835-557-4.
71. VARGESSON, N., 2015. Thalidomide-Induced Teratogenesis: History And Mechanisms. *Birth Defects Research*, Vol. 105, No. 2, Pp. 140. DOI 10.1002/Bdrc.21096.
72. Winardi, D., Chu, P.-Y., Chen, G.-Y., Wang, K., Hsu, W.-Y., Hsieh, C.-L., Chen, Y.-H., Wu, Y.-C., & Yang, J.-C. (2022). Novel Aurora A Kinase Inhibitor Fangchinoline Enhances Cisplatin–DNA Adducts and Cisplatin Therapeutic Efficacy in OVCAR-3 Ovarian Cancer
73. World Health Organization. (2020). Global cancer data (pp. 13–15). Retrieved from <http://gco.iarc.fr/>.
74. Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, Guo LH, Alemany M, Zhang LY, Shi YF. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ*. 2002 Aug;9(8):790-800. doi: 10.1038/sj.cdd.4401034. PMID: 12107822.
75. ZHANG, T., XU, L., WU, J.-J., WANG, W.-M., MEI, J., MA, X.-F. y LIU, J.-X., 2015. Transcriptional Responses and Mechanisms of Copper-Induced Dysfunctional Locomotor Behavior in Zebrafish Embryos. *Toxicological Sciences*, vol. 148, no. 1, pp. 299-310. ISSN 1096-6080, 1096-0929. DOI 10.1093/toxsci/kfv184.
76. ZHANG, Y., ZHANG, R., SUN, H., CHEN, Q., YU, X., ZHANG, T., YI, M. y LIU, J.-X., 2018. Copper inhibits hatching of fish embryos via inducing reactive oxygen species and down-regulating Wnt signaling. *Aquatic Toxicology*, vol. 205, pp. 156-164. ISSN 0166445X. DOI 10.1016/j.aquatox.2018.10.015.