

**Toxicidad y cambios fenotípicos inducidos por moléculas tetrahydroquinolinas en
embriones de pez cebra (*Danio rerio*)**

Carol Andrea Vargas Castañeda

Proyecto de gado presentado para optar por el título de:

Bióloga

Director:

Prof. Vladimir V. Kouznetsov, *PhD, DSc*

Co-Director:

Dr. Carlos Eduardo Puerto Galvis, *PhD*

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Bucaramanga

2020

DEDICATORIA

A mis padres, pues sin su apoyo, fuerza y amor, no hubiese podido ver la luz en los difíciles momentos de los últimos años. Y, a mis dos abuelos, a quienes recuerdo a diario, como si nunca se hubieran ido.

“Los indígenas tradujeron el artículo 12 de la Constitución: ‘Porque nadie podrá llevar por encima de su corazón a nadie, ni hacerle mal en su persona, aunque piense y diga diferente’. Si nos aprendemos este artículo, salvamos al país”. Jaime Garzón.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi sincero agradecimiento al Profesor Vladimir Kouznetsov por su comprensión y paciencia durante este año de aprendizaje y por darme la oportunidad de ser miembro del Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular.

Agradezco a Dr. Carlos Puerto y a todo el LQOBio por su paciencia, ayuda y orientación académica.

A mi familia, por su apoyo moral, económico y su amor.

Por último, pero no menos importantes: Angélica Cáceres, Andrés Fiallo, Christian Hernández, Diego Acevedo, Diego Gómez, Diego Martínez, Karen Perutti, Nicolás Arévalo y Valerie Dennerlein por escucharme, aconsejarme y compartir momentos agradables, por ayudarme a mantener la perspectiva cuando los tiempos eran difíciles.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Introducción	15
1. Objetivos.....	22
1.1. Objetivo general.....	22
1.2. Objetivos específicos.....	22
2. Materiales y métodos.....	23
2.1. Instalación y adecuación de acuarios.....	23
2.2. Reproducción de los peces.....	23
2.3. Medición de variables del agua.....	23
2.4. Moléculas tetrahydroquinolinas (THQ) funcionalizadas.....	24
2.5. Determinación de la concentración letal (CL ₅₀)	25
2.6. Análisis de los cambios fenotípicos.....	26
2.7. Determinación de los valores del área de la superficie polar topológica (TPSA) y coeficiente de partición P (cLogP).....	28
2.8. Fijación del material seleccionado.....	28
3. Resultados y discusión.....	29
3.1. Medición de variables del agua.....	29
3.2. Determinación de la concentración letal (CL ₅₀)	30
3.3. Análisis de los cambios fenotípicos.....	34
3.4. Determinación de los valores del área de la superficie polar topológica	

(TPSA) y coeficiente de partición P (cLogP).....	55
3.5. Fijación material.....	58
4. Conclusiones.....	59
5. Recomendaciones.....	60
6. Competencias desarrolladas por la pasante.....	61
Referencias bibliográficas.....	62
Apéndices.....	73

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Síntesis de la biblioteca de las THQ	24
Esquema 2. Estructura de las moléculas THQ evaluadas.....	25

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Determinación de la CL ₅₀ en embriones de pez cebra para las moléculas THQ	26
Figura 2. Determinación de los cambios fenotípicos en embriones de pez cebra para las moléculas THQ a concentraciones por debajo de la CL ₅₀	27
Figura 3. Valores de CL ₅₀ promedio para las moléculas THQ y su comparación con el control positivo (DM360F) tras 96 hpi.....	32
Figura 4. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula THQ-01 a una concentración de 300 µM.....	37
Figura 5. Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 300 µM, 225 µM, 150 µM y 75 µM de la molécula THQ-01 con el error estándar de la media para cinco réplicas (N = 5) analizados por el software DanioScope™.....	38
Figura 6. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula THQ-02 a una concentración de 300 µM.....	39
Figura 7. Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 300 µM, 225 µM, 150 µM y 75 µM de la molécula THQ-02 con el error estándar de la media para cinco réplicas (N = 5) analizados por el software DanioScope™.....	40
Figura 8. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula THQ-03 a una concentración de 200 µM.....	42

- Figura 9.** Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 200 μM , 125 μM , 100 μM y 50 μM de la molécula THQ-03 con el error estándar de la media para cinco réplicas (N=5) analizados por el software DanioScopeTM.....43
- Figura 10.** Cambios fenotípicos inducidos por la molécula THQ-04 a una concentración de 300 μM45
- Figura 11.** Cambios fenotípicos inducidos por la molécula THQ-04 a una concentración de 225 μM46
- Figura 12.** Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 300 μM , 225 μM , 150 μM y 75 μM de la molécula THQ-04 con el error estándar de la media para cinco réplicas (N=5) analizados por el software DanioScopeTM.....49
- Figura 13.** Cambios fenotípicos inducidos por la molécula THQ-05 a una concentración de 200 μM50
- Figura 14.** Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 200 μM , 125 μM , 100 μM y 50 μM de la molécula THQ-05 con el error estándar de la media para cinco réplicas (N=5) analizados por el software DanioScopeTM.....51

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valor promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cinco variables del agua (amoníaco, nitrato, nitrito, pH y temperatura) durante cuatro meses.....	29
Tabla 2. CL ₅₀ en embriones de pez cebra para las cinco moléculas THQ	31
Tabla 3. Porcentaje de embriones que presentan el fenotipo curvatura del cuerpo.....	35
Tabla 4. Determinación de tres parámetros fisicoquímicos de las cinco THQ mediante el programa ChemDraw.....	56

LISTA DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice A. Protocolo para medir las variables del agua.....	73
Apéndice B. Guía para la limpieza de los acuarios.....	74
Apéndice C. Análisis fenotípico de las moléculas THQ	76

Resumen

TÍTULO: TOXICIDAD Y CAMBIOS FENOTÍPICOS INDUCIDOS POR MOLÉCULAS TETRAHIDROQUINOLINAS EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)*

AUTOR: CAROL ANDREA VARGAS CASTAÑEDA **

PALABRAS CLAVE: tetrahydroquinolinas, pez cebra, cambios morfológicos.

DESCRIPCIÓN:

Las tetrahydroquinolinas (**THQ**), moléculas bicíclicas nitrogenadas, presentes en la naturaleza como metabolitos secundarios de plantas y microorganismos, se caracterizan por exhibir una amplia gama de propiedades biológicas y actividades farmacológicas. El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad y los cambios morfológicos inducidos por una serie de cinco moléculas **THQ**, utilizando embriones de pez cebra (*Danio rerio*), como modelos de estudio biológico. Para tal fin, se midió distintos parámetros que establecieron la calidad del agua (amoníaco, nitritos, nitratos, pH y temperatura) durante los cuatro meses de estudio. Los valores registrados para el pH, temperatura, nitratos, nitritos y amoníaco fueron 7.07 ± 0.09 , $28.12 \pm 0.07^\circ\text{C}$, 8.27 ± 0.30 ppm, 0.27 ± 0.02 ppm y 0.23 ± 0.01 ppm, respectivamente. Todos los valores se encontraron dentro los rangos sugeridos para la cría y reproducción de peces adultos en el laboratorio. A continuación, se determinó la concentración letal media (CL_{50}) de cada molécula, exponiendo los embriones a diferentes concentraciones y analizando la tasa de mortalidad después de la exposición química. Las CL_{50} de las moléculas estuvieron en un rango de 54.24 ± 3.83 a 85.40 ± 0.71 mg/L. Para el análisis fenotípico, se evaluaron concentraciones por debajo del valor de la CL_{50} de cada molécula, y se observaron los cambios morfológicos inducidos por las moléculas **THQ** a las 96 hpf (horas post-fertilización). Algunos de estos cambios fueron, curvatura del cuerpo, reducción de la longitud del cuerpo, área de los ojos y área del pericardio. Según el valor de la CL_{50} las **THQ** fueron ligeramente tóxicas y los cambios morfológicos fueron concentración dependiente lo que sugiere una respuesta a un efecto tóxico y la interacción con diferentes dianas biológicas implicadas en el desarrollo y funcionamiento del corazón, riñones y la formación de los vasos sanguíneos en el pez cebra (*Danio rerio*).

*Pasantía de investigación

**Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Director: Prof. Vladimir V. Kouznetsov, *PhD*, *DSc*. Tutor: Carlos Eduardo Puerto Galvis, *PhD* (Escuela de Química).

Abstract

TITLE: TOXICITY AND PHENOTYPICAL CHANGES INDUCED BY TETRAHYDROQUINOLINE MOLECULES IN CEBRAFISH EMBRYOS (*Danio rerio*). *

AUTHOR: CAROL ANDREA VARGAS CASTAÑEDA **

KEY WORDS: tetrahydroquinolines, zebrafish, morphological changes.

DESCRIPTION:

Tetrahydroquinolines (**THQ**), nitrogen bicyclic molecules, present in nature as secondary metabolites of plants and microorganisms, are characterized by exhibiting a wide range of biological properties and pharmacological activities. The objective of this work was to determine the chemical toxicity and morphological changes induced by a series of five **THQ** molecules, using the Zebrafish embryo (*Danio rerio*), model for the biological study. For that purpose, eight aquariums were installed, in which five water variables were measured (ammonia, nitrates, nitrites, pH and temperature) during the four months of study. The values recorded for pH, temperature, nitrates, nitrites and ammonia were 7.07 ± 0.09 , $28.12 \pm 0.07^{\circ}\text{C}$, 8.27 ± 0.30 ppm, 0.27 ± 0.02 ppm and 0.23 ± 0.01 ppm, respectively. Then, the average lethal concentration (LC_{50}) was determined for each molecule, exposing the embryos to different concentrations and analyzing the mortality after chemical exposure. The LC_{50} for the tested molecules ranged from 54.24 ± 3.83 to 85.40 ± 0.71 mg/L. In the phenotypic analysis, the concentrations below the LC_{50} value of each molecule were evaluated and were observed the morphological changes induced by the **THQ** molecules at 96 hpf (post-fertilization hours). Some of these changes were, body curvature, reduction of eye's area and pericardium's area. According to LC_{50} values, the tested **THQ** molecules were slightly toxic and their morphological changes were concentration-dependent which specified a response to a toxic effect and the interaction with different targets involved in heart's development, kidney's development and the formation of blood vessels in zebrafish (*Danio rerio*).

*Internship of Investigation

**Science Faculty. School of Biology. Director: Prof. Vladimir V. Kouznetsov, *PhD*, *DSc.*, Tutor: Carlos Eduardo Puerto Galvis, *PhD* (School of Chemistry).

Introducción

El diseño y síntesis de nuevas moléculas que potencien los efectos biológicos de los fármacos se enfocan en la elaboración de compuestos de alta diversidad estructural, a partir de farmacóforos de derivados naturales y sintéticos (Puerto & Kouznetsov, 2012). El aislamiento y determinación de estas moléculas ha permitido la síntesis y desarrollo de agentes bioactivos, con los que se realizan diferentes estudios farmacológicos y bioquímicos (Savoia, 2012). Particularmente, los heterociclos polifuncionalizados han sido determinantes en el hallazgo de distintos fármacos con un amplio espectro de bioactividades (Yu *et al.*, 2011).

Entre los heterociclos de interés se encuentran las 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas (**THQ**) y sus derivados, estas moléculas son análogas reducidas de la quinolina y se caracterizan por poseer un núcleo heterocíclico de origen natural o sintético que ha servido de base para la preparación de una gran variedad de compuestos farmacológicamente activos y de amplia diversidad estructural (Sridharan *et al.*, 2011). Los derivados **THQ** son reconocidos por sus diferentes actividades biológicas, como actividad antibacteriana (Martínez *et al.*, 2019), antiparasitaria (Pinheiro *et al.*, 2019), antitumoral (Bindu *et al.*, 2019), antiviral (Su *et al.*, 2009), entre otras.

Se han desarrollado diferentes metodologías para la síntesis de nuevas moléculas **THQ** polifuncionalizadas debido a la importancia bioquímica que poseen (Sriramurthy & Kwon, 2010; Ren *et al.*, 2012;), creando bibliotecas de moléculas pequeñas, que tienen como principal objetivo estudiar los sistemas biológicos mediante perturbaciones directas (Shang & Tan, 2005). Para esto, no solo se consideran las uniones entre proteínas sino también los efectos fenotípicos que causan (Stockwell, 2004), lo que permite identificar las moléculas activas y su potencial uso como moléculas-líder en el desarrollo de nuevos fármacos (Spandl *et al.*, 2008).

Con el auge en la síntesis y desarrollo de una gran cantidad de fármacos y la variedad de moléculas que componen productos como pesticidas, cosméticos, alimentos y detergentes, se han realizado en diferentes organismos el análisis de los cambios bioquímicos, fisiológicos y moleculares tras la exposición química de estos compuestos (Abe *et al.*, 2017). Los modelos mamíferos han sido empleados por excelencia para medir la toxicidad, sin embargo, entre sus desventajas se encuentran: mantenimiento costoso y largos periodos de tiempo entre experimentos; por lo que se han desarrollado diferentes modelos animales que son: replicables, fiables y económicos, como alternativa para la determinación de la toxicidad de diferentes compuestos (Redfern *et al.*, 2008).

Los modelos mamíferos comúnmente utilizados para evaluar las bibliotecas de moléculas pequeñas son los ratones (*Mus musculus*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*), sin embargo, tienen altos costos y dificultades logísticas asociadas a la reproducción e implementación en el laboratorio, lo que condujo a una búsqueda de modelos alternativos en peces entre los que se emplearon especies como el salmón (*Oncorhynchus kisutchi*) o cachuelo (*Leuciscus idus melanotus*), en los que se evaluaban la toxicidad y se realizaban comparaciones entre especies para descubrir diferencias anatómicas tras la exposición química (Geyer *et al.*, 1993). Sin embargo, el modelo de pez cebra surgió como modelo animal para ensayos genéticos debido a su desarrollo embrionario (Streisinger *et al.*, 1989).

El pez cebra (*Danio rerio*) es un teleósteo nativo del Sur este de Asia, mide entre 3-5 cm de longitud, lo que facilita tenerlo y manipularlo en un laboratorio, no requiere mucho espacio o dinero en su mantenimiento comparado con otros modelos animales (Avdesh *et al.*, 2019). Este modelo tiene muchas características que lo convierten en uno de los modelos *in vivo* más utilizados para el descubrimiento de fármacos y ensayos toxicológicos desde 1980 (Bambino &

Chu, 2017), entre ellas: la mayoría de sus órganos se forman durante las primeras 24 horas y la organogénesis es completa a los cinco días post-fertilización (dpf) (Nishimura *et al.*, 2016), la fertilización es externa, se liberan cientos de huevos por cada postura, se pueden monitorear sus cambios morfológicos *in vivo* en tiempo real, las moléculas pueden ser dispuestas directamente en el medio embrionario, requiere pocas cantidades de compuesto por experimento y se pueden evaluar muchos embriones por ensayo (Lammer *et al.*, 2009).

La transparencia de su cuerpo durante los primeros 7 dpf, es otro de los aspectos de gran importancia de este modelo ya que permite la observación de los movimientos de las células y la formación de los órganos (Gamse & Gorelick, 2016), esto ha permitido situar este modelo como una excelente opción para evaluar la toxicidad de compuestos bioactivos (Hill *et al.*, 2005) puesto que sus primeros estadios han sido ampliamente descritos y caracterizados (Kimmel *et al.*, 1995), permitiendo la identificación de diferentes biomarcadores gracias al entendimiento de los mecanismos moleculares de las respuestas toxicológicas (Santos *et al.*, 2018).

El genoma del pez cebra fue secuenciado en el 2004, tiene 25 cromosomas y contiene 26.206 genes que codifican proteínas (Howe *et al.*, 2013). Aunque el pez cebra carece de algunos órganos como los pulmones, las extremidades o el septum del corazón, la mayoría de los órganos en los peces cebra tienen la misma función de aquellos que comparte con los seres humanos, adicionalmente tienen similitud en sus mecanismos moleculares y el desarrollo de sus tejidos es parecido. En la actualidad, se conoce que el pez cebra comparte el 71 % de genes ortólogos con los genes humanos (Lieschke & Currie, 2007) y 82 % de los genes relacionados con enfermedades humanas fueron identificados y están presentes en el pez cebra (Roper & Tanguay, 2018).

Por lo tanto, el pez cebra permite estudiar enfermedades cardiovasculares (Gray *et al.*, 2019), del sistema nervioso (Ziv *et al.*, 2018), oculares (Lee *et al.*, 2008) y musculares (Parsons *et al.*, 2002). Este modelo embrionario es más cercano filogenéticamente al ser humano y más fácil de utilizar que otros modelos animales utilizados en investigación (van der Sar *et al.*, 2004), por lo que puede ser empleado como primer tamizaje en la identificación de moléculas o medicamentos que puedan causar algún daño a la salud humana y realizar más pruebas antes de ponerlos en circulación (Dix *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta todas las características presentes en el pez cebra, desarrollaron un ensayo de toxicidad aguda en embriones (ZFET: Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test) cuyo protocolo fue publicado por la OECD (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos) en el 2013 (OECD 2013). Es un método que permite evaluar la toxicidad de diferentes sustancias químicas en embriones de pez cebra, el ensayo determina la concentración letal en la que ocurre el 50 % de las muertes en la población de embriones evaluados (CL_{50}) (Busquet *et al.*, 2014) a las 96 horas post-fertilización (hpf) con mediciones cada 24 horas desde el momento de la exposición química, la letalidad está definida como: ausencia en la formación de los somitas, coagulación en los embriones, ausencia del latido del corazón y desprendimiento de la cola (Selderslaghs *et al.*, 2009).

Determinar la concentración letal media (CL_{50}) abre paso a la exploración de los efectos tóxicos de diferentes moléculas, además de permitir una aproximación sobre los potenciales efectos tóxicos para el ser humano (Knöbel *et al.*, 2012). Los resultados toxicológicos en embriones de pez cebra pueden ser extrapolados a los humanos debido a la homología que presentan (Parng, 2005). Ha sido reportado en diferentes estudios la relación entre moléculas que

tienen efectos adversos en los seres humanos con la toxicidad evidenciada en los embriones con valores de CL_{50} bajos (Ducharme *et al.*, 2015).

En estudios previos, el ensayo evaluó 18 compuestos tóxicos y demostró una buena correlación con resultados hallados en roedores (Teraoka *et al.*, 2003). En el 2011 se realizó un ensayo de toxicidad que evaluó 60 compuestos de diferentes clases bioquímicas y en el que encontraron que el modelo de pez cebra tiene una buena predicción de la toxicidad en ratones; sin embargo, fue evidente que la correlación de la toxicidad entre los modelos depende del tipo de molécula y su naturaleza química (Ali *et al.*, 2011). En un estudio más reciente encontraron 487 compuestos con diferentes respuestas adversas en embriones de pez cebra, se demostró la concordancia en los efectos tóxicos de diferentes compuestos químicos en fase I en el desarrollo del pez cebra y estudios en ratas y conejos (Truong *et al.*, 2014).

Por otra parte, varios de estos compuestos inducen fenotipos anormales a concentraciones por debajo del valor de la CL_{50} , como es el caso del ácido valproico (Depakine[®], Ferbin[®], Valcote[®], etc., fármacos utilizados en psiquiatría para tratar la epilepsia y algunos trastornos de la conducta, como la bipolaridad y la depresión), al que se le halló un efecto tóxico y cambios morfológicos en los ojos, aleta caudal, vasos sanguíneos y corazón (Kokel *et al.*, 2010) o el bromuro de piridostigmina (Mestinon[®], un fármaco que se usa para el tratamiento de debilidad muscular en personas con miastenia graves) que genera neuro-toxicidad en humanos y, que en los embriones de *Danio rerio* tiene efecto tóxico, produciendo cambios morfológicos como curvatura en el eje del cuerpo, efectos en el saco vitelino y malformaciones cardíacas (Fischer *et al.*, 2015).

En Colombia, el modelo ha sido empleado para evaluar el efecto de la dieta en las estructuras del corazón en peces juveniles y adultos (Vargas & Vásquez, 2017) , la expresión de genes debido a elementos tóxicos presentes en el agua (Ossa-López *et al.*, 2017) y posibles agentes neoplásicos (Cardozo *et al.*, 2019), el LQOBio ha sido pionero en el uso del modelo de pez cebra en la determinación de la toxicidad y cambios fenotípicos de aceites esenciales y extractos de plantas endémicas de Colombia (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2014; Rosado-Solano *et al.*, 2018) y biofenoles (Merchan-Arenas *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que los efectos de los compuestos heterocíclicos nitrogenados y aromáticos sobre el sistema nervioso central, desarrollo de la notocorda y el corazón han sido previamente demostrados (Chlebowski *et al.*, 2017) como es el caso de las azetidinas y las pirrolidinas, que inducen hiperpigmentación, colas curvadas y reducción en la circulación (Feula *et al.*, 2013) o los amino-indoles, un tipo de heterociclos aromáticos, que han demostrado tener efecto en la formación de los vasos sanguíneos e inhibición completa del desarrollo de los embriones de pez cebra (Chamakuri *et al.*, 2013). Aunque el estudio del efecto de las moléculas **THQ** en embriones de pez cebra es reciente, se han reportado diferentes efectos producto de la exposición a derivados **THQ** macrocíclicos en su desarrollo, entre ellos, antiangiogénicos e inhibidores del desarrollo temprano de *Danio rerio* (Reddy Guduru *et al.*, 2013) y algunos derivados 2-metil-tetrahydroquinolínicos evidenciaron efectos en el desarrollo del intestino, afectando la formación del hígado y corazón de los embriones (Bonilla *et al.*, 2016).

Actualmente, el LQOBio ha enfocado sus esfuerzos en implementar un modelo *in vivo* que permita evaluar la toxicidad y los cambios fenotípicos de pequeñas moléculas heterocíclicas de origen natural y sintético como las moléculas THQ, por lo tanto, para el desarrollo de esta investigación se utilizó el modelo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal

de estudio, adquiriendo y utilizando herramientas adicionales como DanioScope™ un software que permite medir los cambios morfológicos de forma estandarizada.

Así, el objetivo del presente trabajo es establecer las condiciones para el mantenimiento y reproducción de peces cebra, con el fin de determinar la toxicidad y analizar los cambios morfológicos producidos por cinco moléculas **THQ-01–THQ-05** (del grupo 2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas C-4 y C-6 disustituidas) en embriones de *Danio rerio* a las 96 hpf.

1. Objetivos

1.1. General

Establecer las condiciones para el mantenimiento y reproducción de peces cebra en el laboratorio con el fin de determinar la toxicidad (CL_{50}) y los cambios morfológicos en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) a las 96 hpf inducidos por cinco moléculas tetrahydroquinolinas **THQ**.

1.2. Específicos

1. Medir durante toda la fase experimental las variables del agua del (pH, nitritos, nitratos, amonio y temperatura) garantizando las condiciones óptimas para la reproducción de especímenes adultos del pez cebra en condiciones de laboratorio.
2. Determinar la concentración letal media, CL_{50} de una colección de cinco moléculas **THQ** en embriones de pez cebra.
3. Reconocer y describir los cambios morfológicos (corazón, mandíbula, longitud del cuerpo, ojo y saco vitelino) inducidos por cada molécula **THQ** durante el desarrollo del pez cebra a concentraciones por debajo de la CL_{50} .

4. Realizar la fijación de los embriones expuestos a las moléculas **THQ** a concentraciones en las que se identifiquen cambios morfológicos evidentes para su posterior estudio histológico.

2. Materiales y métodos

2.1. Instalación y adecuación de acuarios.

Se adecuaron ocho acuarios cada uno con una capacidad de 50 L y un mecanismo de filtración independiente para evitar la contaminación entre acuarios. El sistema de filtración consistió en recirculación de agua y oxigenación individual, donde se ubicaron 120 especímenes adultos del pez cebra tipo silvestre (60 hembras y 60 machos) adquiridos por cuatro proveedores nacionales diferentes (se dispusieron 15 peces por acuario, separados por su sexo). Los acuarios fueron mantenidos a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo fotoperiodos naturales de luz y oscuridad, y fueron alimentados dos veces al día.

2.2. Reproducción de los peces.

Tras estandarizar las condiciones para la manutención de los especímenes adulto de pez cebra por un periodo de 4 meses. Se diseñaron peceras de reproducción para obtener una mayor cantidad de huevos fertilizados y en cada una de ella se ubicó una hembra y tres machos la noche previa a cada experimento, a la mañana siguiente los embriones fueron recolectados y aislados en una caja de Petri con medio E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.4 mM CaCl₂ y 0.16 mM MgSO₄) y llevados a una incubadora a 28 °C. A las 24 horas post-fertilización (hpf). Los embriones muertos, no fertilizados y con retraso en su desarrollo fueron descartados. Los

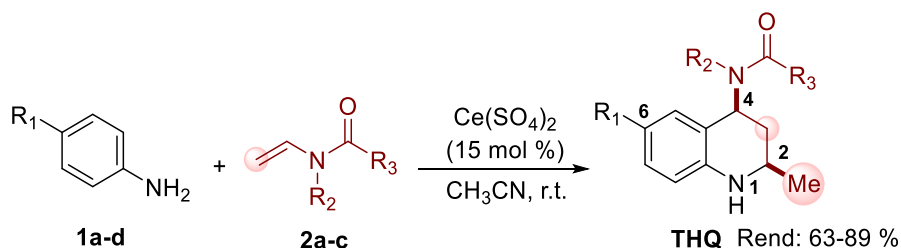
embriones sanos fueron tratados (10-15 minutos) con una solución de Pronasa (1 mg/L, Aldrich) con el fin de remover el corion. Luego se lavaron con medio E3 y fueron distribuidos individualmente en una microplaca de 96 pozos con 100 μ L de medio embrionario.

2.3. Medición de variables del agua.

Mediante el protocolo descrito por el Freshwater master test kit (Apéndice A), se hicieron mediciones diarias del pH y la temperatura. Los nitritos, nitratos y amoníaco fueron medidos el último día de cada semana. Todas las mediciones del agua fueron hechas a las nueve de la mañana con el propósito de hacer ajustes y monitoreo de los acuarios hasta las horas de la tarde, en caso que se presentara algún valor anormal que implicara un riesgo para los peces. Los acuarios recibieron mantenimiento técnico y preventivo cada mes.

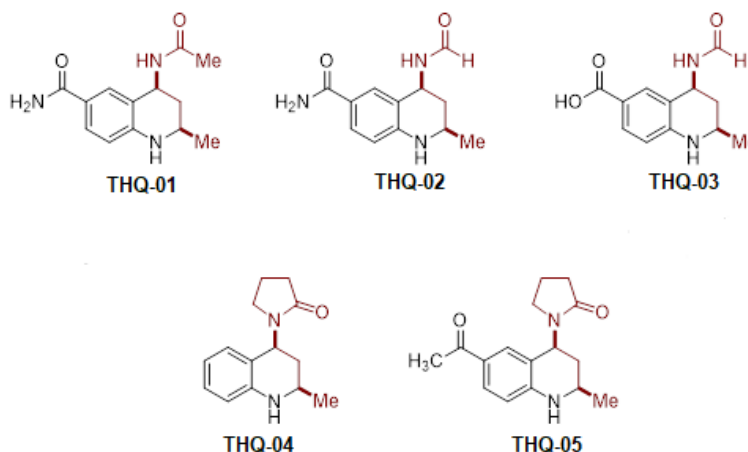
2.4. Moléculas tetrahydroquinolinas funcionalizadas.

Las moléculas **THQ** fueron obtenidas a través de procedimientos sintéticos desarrollados en el LQOBio con reactivos comerciales: anilinas sustituidas **1a-d** y *N*-vinilamidas **2a-c** (Bonilla *et al.*, 2016). Las moléculas seleccionadas pertenecen al grupo de *cis*-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas C-4 y C-6 disustituidas (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de la biblioteca de **THQ**.

Las moléculas **THQ** fueron caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas y se prepararon cantidades representativas de cada una de ellas para llevar a cabo los experimentos planteados en embriones de pez cebra (Esquema 2).



Esquema 2. Estructura de las moléculas **THQ** evaluadas.

2.5. Determinación de la concentración letal (CL₅₀).

Se distribuyó un embrión (24 hpf) por pocillo en una microplaca de 96 pozos, por concentración se evaluaron 2 embriones, los cuales fueron expuestos a una serie geométrica establecida (7 concentraciones desde 19.53 μM a 1250 μM) para las cinco moléculas **THQ-01** a **THQ-05**. Por cada experimento 16 embriones fueron empleados, 14 embriones por molécula (M) y dos embriones para los controles negativos. Los embriones tratados fueron aislados en una incubadora a 28 °C y la mortalidad y supervivencia de cada embrión se determinó tras 96 hpf al examinar el movimiento y los latidos del corazón de los embriones al ser estimulados bajo un estéreo microscopio. Se realizaron tres experimentos independientes para determinar el valor de CL₅₀ (expresada en $\mu\text{mol/L}$), para cada experimento se emplearon embriones provenientes de distintos padres en distintos días. El análisis estadístico se realizó con el modelo Probit usando el

programa SPSS, versión 19.0 para Windows, los datos se expresaron como el error estándar de la media de tres experimentos diferentes en duplicado (Figura 1).

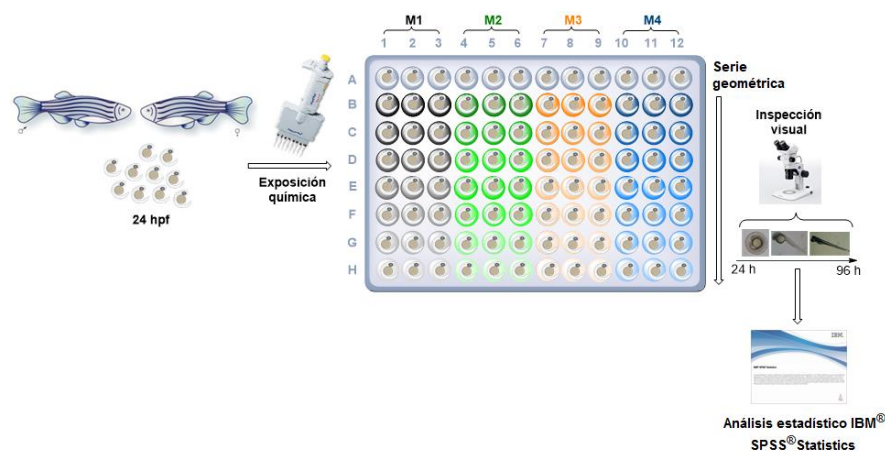


Figura 1. Determinación de la CL_{50} en embriones de pez cebra para las moléculas **THQ**.

2.6. Análisis de los cambios fenotípicos.

Se evaluó cada una de las moléculas a una serie geométrica de cinco concentraciones, una por encima y cuatro por debajo del valor determinado de la CL_{50} , para esto, se emplearon un total de 30 embriones, de los cuales 5 son embriones control en cuyo pozo había 200 μL de medio E3 y 5 embriones por cada concentración expuestos a la molécula evaluada a diferentes concentraciones. Una vez los embriones (24 hpf) fueron expuestos a cada **THQ**, se aislaron en una incubadora a 28°C, fueron examinados y fotografiados a las 48, 72 y 96 hpf, ya que son periodos de tiempo en el que se inicia la formación de los órganos y en los que se puede observar el avance en el desarrollo de las estructuras morfológicas.

De cada registro fotográfico se identificó cualquier malformación al ser comparados con los embriones control. Se observaron áreas como la cabeza, longitud del cuerpo, saco vitelino y

corazón; del mismo modo se evaluó mediante la comparación del registro fotográfico si la organogénesis y morfogénesis de cada embrión expuesto coincidía con la del embrión control en cada estadio del desarrollo embrionario estipulado (48, 72 y 96 hpf).

A las 96 hpf se les midió el área de los ojos, mandíbula, pericardio, saco vitelino y la longitud del cuerpo a los embriones expuestos a las moléculas y a los embriones control mediante el programa DanioScope™ el cual generó una matriz con los valores promedio de cada parámetro evaluado, el análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM SSPS Statistics, los resultados se analizaron mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa a un valor $p < 0.05$ y junto con el error estándar de la media para cinco replicas (N=5).

Los resultados obtenidos fueron contrastados con diferentes bases de datos que reúnen estudios previos en embriones de *Danio rerio* como la ZFIN (The Zebrafish Information Network) y se propuso una serie de potenciales dianas biológicas que podrían estar siendo afectadas con base en la asociación de los fenotipos observados con aquellos ya reportados (Figura 2).

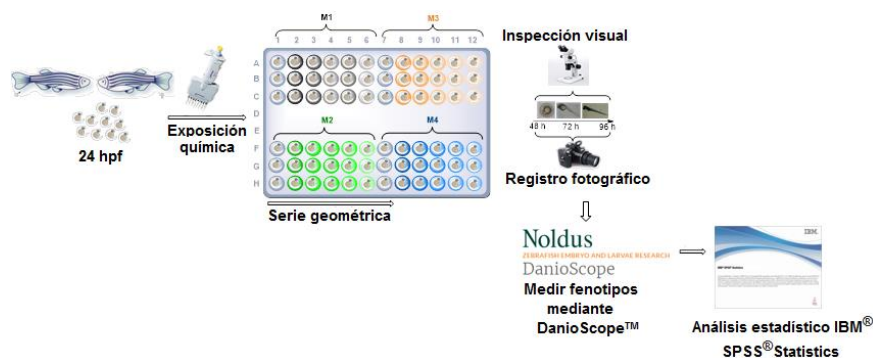


Figura 2. Determinación de los cambios fenotípicos en embriones de pez cebra para las moléculas THQ a concentraciones por debajo de la CL₅₀.

2.7. Determinación de los valores del área de la superficie polar topológica (TPSA) y coeficiente de partición P (cLogP).

Con el fin de hallar la solubilidad de las moléculas se determinaron los valores de cLogP, un parámetro fisicoquímico que permite calcular el grado de lipofila (o hidrofobicidad) de una molécula permitiendo inferir cómo será su comportamiento en el entorno de los fluidos biológicos del organismo y cómo será su paso a través de membranas biológicas. Otro de los parámetros fisicoquímicos evaluado fue el TPSA, que permite predecir su excelente capacidad de penetración de la barrera hematoencefálica, que está formada por uniones estrechas de alta resistencia de tipo epitelial dentro del endotelio de los capilares que perfunde el cerebro.

Mediante el programa ChemDraw se dibujaron las estructuras químicas de las moléculas y se calcularon tres parámetros fisicoquímicos de los cinco compuestos **THQ**, como el peso molecular, el área de la superficie polar topológica (TPSA) y el coeficiente de partición P (cLogP).

2.8. Fijación del material seleccionado.

Por cada molécula se fijaron tres embriones control y tres embriones por cada concentración (por cada molécula cuatro concentraciones que se encuentran por debajo del valor de CL_{50}) a las 48, 72 y 96 hpf.

Antes de realizar el proceso de fijación, a cada pozo se le adicionaron 583 mg L^{-1} de metasulfonato de tricaína (MS-222), después de 30 segundos se evaluó la actividad cardíaca bajo un estereoscopio. Una vez se comprobó que el embrión había muerto, se llevó a cabo el proceso de fijación. La fijación se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Wullimann y Puelles, 1999. Cada embrión fue tratado con formol (4 % en PBS) a 4°C por 12 horas en tubos de

microcentrífuga según cada estadio (48, 72 y 96 hpf). Posteriormente, cada embrión fue lavado tres veces con PBS. Los embriones se dejaron en metanol al 30% durante 24 horas y en metanol al 50% las siguientes 24 horas. Finalmente, se almacenaron individualmente en metanol (70%) y se etiquetaron para su posterior estudio histológico.

3. Resultados y discusión

3.1. Medición de las variables del agua.

Se instalaron ocho acuarios en los cuales se ubicaron especímenes adultos *Danio rerio* separados por sexo durante los cuatro meses del ensayo, realizando un continuo seguimiento y registro de las variables del agua como la temperatura, pH, amoníaco, nitritos y nitratos (Tabla 1), garantizando que los peces estuviesen sanos pudiendo tener una reproducción exitosa y así obtener embriones viables para los diferentes ensayos según los protocolos establecidos para el cuidado del pez cebra en el laboratorio (Lawrence, 2007).

Adicionalmente se estableció una guía para la limpieza de los acuarios de los peces adulto de *Danio rerio* en el LQOBio (Apéndice B).

Tabla 1.

Valor promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cinco variables del agua (amoníaco, nitrato, nitrito, pH y temperatura) durante cuatro meses.

Variable del agua	Promedio^a	σ^b	Promedio $\pm \sigma^c$
Amoníaco	0.23	0.01	0.23 \pm 0.01
Nitratos	8.27	0.30	8.27 \pm 0.30
Nitritos	0.27	0.02	0.27 \pm 0.02
pH	7.07	0.09	7.07 \pm 0.09
Temperatura	28.12	0.07	28.12 \pm 0.07

Las variables del amoníaco, nitratos y nitritos se midieron una vez por semana durante cuatro meses, las variables de la temperatura y pH se midieron una vez al día durante

cuatro meses. ^a Valor promedio hallado a cinco variables del agua durante los cuatro meses del estudio. ^b Desviación estándar. ^c Promedio de las cinco variables y la desviación estándar.

Según las condiciones ideales establecidas para cada una de las variables del agua, todas las mediciones registradas durante los cuatro meses del estudio estuvieron entre los valores óptimos. Las concentraciones promedio de amoníaco, nitrito y nitrato fueron 0.23 ± 0.01 ppm, 0.27 ± 0.02 ppm y 8.27 ± 0.30 ppm respectivamente, debido a que el amoníaco y el nitrito son tóxicos para los peces, se verificó que sus concentraciones no sobrepasaran los valores 0.5 ppm para el amoníaco y 2.0 ppm para el nitrito (Varga, 2011).

Los valores promedio registrados de temperatura fueron de $28.12 \pm 0.07^\circ\text{C}$ y de pH de 7.07 ± 0.09 , se comprobó que tanto la temperatura como el pH no excedieran los 7-8 para el pH y 24-28 °C para la temperatura (Matthews *et al.*, 2002), lo cual permite que los residuos nitrogenados que resultan tóxicos como el amoníaco y nitrito puedan ser metabolizados por las bacterias que se establecen en los acuarios y no se acumulen (Harper & Lawrence, 2011) evitando efectos nocivos secundarios que alteren la supervivencia y reproducción de los peces adultos.

3.2. Determinación de la concentración letal (CL₅₀).

Los embriones se incubaron en el medio E3 hasta las 24 hpf, se seleccionaron los embriones sanos y fueron expuestos a diferentes concentraciones de cada molécula las cuales fueron determinadas por una serie geométrica, los embriones se dispusieron en una incubadora a 28°C hasta las 96 hpf, la mortalidad y supervivencia de cada embrión fueron determinadas mediante un estéreo microscopio y se observó si había movimiento y latidos en el corazón, se tabularon los datos y la CL50 fue hallada mediante el modelo Probit usando el programa SPSS, versión 19.0 para Windows.

Los valores de CL_{50} y los cálculos estadísticos para las cinco moléculas se encuentran en la Tabla 2. De acuerdo con su grado de toxicidad (Tabla 2), se pudo clasificar las moléculas de la siguiente manera: **THQ-03** > **THQ-05** > **THQ-04** > **THQ-02** > **THQ-01**. La **THQ** con mayor toxicidad fue **THQ-03** ($CL_{50} = 54.24 \pm 3.83$ mg/L) que tiene un grupo formamida en la posición C-4 y un grupo carboxilo en la posición C-6. Las moléculas **THQ-04** ($CL_{50} = 72.90 \pm 0.85$ mg/L) y **THQ-05** ($CL_{50} = 62.18 \pm 2.97$ mg/L) también poseen un grupo amida, pero de estructura cíclica, pirrolidin-2-ona en la posición C-4 y la molécula **THQ-05** adicionalmente, presenta un grupo acetilo en el C-6, estas dos moléculas presentaron una toxicidad media respecto a los valores hallados para las cinco moléculas.

Las moléculas **THQ-01** ($CL_{50} = 85.4 \pm 0.71$ mg/L) y **THQ-02** ($CL_{50} = 80.54 \pm 0.27$ mg/L) resultaron ser menos tóxicas, teniendo como semejanza estructural el grupo 6-carboxiamida. La **THQ-01** tiene un grupo C-4-acetamida, mientras que la **THQ-02** contiene grupo formamida en la posición C-4 del esqueleto tetrahydroquinolínico.

Tabla 2.

CL₅₀ en embriones de pez cebra para las cinco moléculas THQ.

Molécula	Réplicas ^a			CL ₅₀ promedio ^b (μM)	σ ^c	CL ₅₀ ± σ ^d (μM)	CL ₅₀ ± σ ^e (mg/L)
	1	2	3				
DM360F	4.28	4.26	4.27	4.27	0.01	4.27 ± 0.01	1.52 ± 0.003
THQ-01	347.03	342.01	347.02	345.35	2.89	345.35 ± 2.89	85.40 ± 0.71
THQ-02	344.60	344.60	346.64	345.28	1.17	345.28 ± 1.17	80.54 ± 0.27
THQ-03	225.14	219.36	250.15	231.55	16.3	231.55 ± 16.3	54.24 ± 3.83
THQ-04	313.42	315.62	320.62	316.55	3.68	316.55 ± 3.68	72.90 ± 0.85
THQ-05	225.14	240.46	219.36	228.32	10.90	228.32 ± 10.90	62.18 ± 2.97

^a Se realizaron 3 experimentos independientes, empleando para cada ensayo 16 embriones en total, 8 por réplica donde se expusieron dos embriones a cada concentración de la serie geométrica, los valores tuvieron un límite de confianza de 95% $r^2 = 0.99$. ^b CL_{50} promedio en expresada en μM ($\mu\text{mol/L}$). ^c Desviación estándar. ^d CL_{50} promedio expresada en μM con la desviación estándar. ^e CL_{50} promedio expresada en mg/L con la desviación estándar.

En la Figura 3 se observa una comparación entre el grado de toxicidad de los valores de CL_{50} y de agente DM360F (control positivo). El control positivo empleado (DM360F) es un potente agente anticancerígeno ($CL_{50} = 1.52 \pm 0.003 \text{ mg/L}$) con un potencial inhibitorio en líneas cancerígenas (MCF 7, PC 3 y HeLa) y un valor alto de lipofilia ($c\text{LogP} = 5.542$).

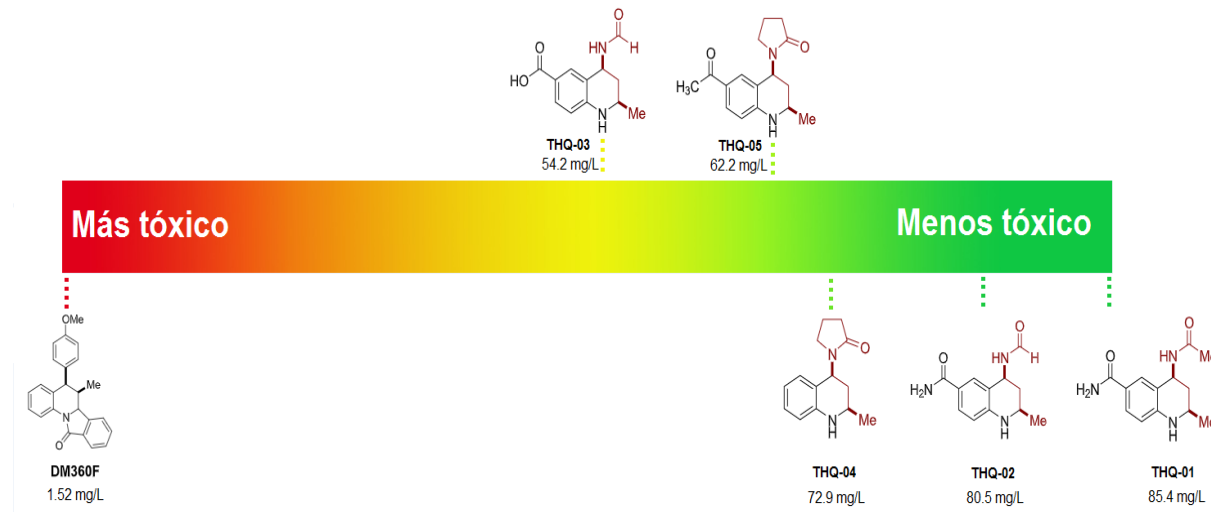


Figura 3. Valores de CL_{50} promedio para las moléculas **THQ** y su comparación con el control positivo (DM360F) tras 96 hpf.

Según la tabla de toxicidad aguda establecida por el servicio de pesca y vida silvestre (FWS, por sus siglas en inglés, Fish and Wildlife Service), las cinco moléculas **THQ** se clasifican como ligeramente tóxicas ya que sus CL_{50} se encuentran en el rango de 10-100 mg/L (Juneidi *et al.*, 2015). Sus toxicidades son semejantes a la del medicamento para la migraña conocido como amitriptilina ($CL_{50} = 81 \text{ mg/L}$) que ha sido evaluado en embriones de pez cebra (Aalders *et al.*

2016). En diferentes estudios diversas **THQ** han evidenciado tener toxicidad leve y una gran capacidad de atrapar radicales libres (Blaszczyk et al. 2013; Pagliero *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta que las **THQ** analizadas comparten los siguientes sustituyentes: el grupo formamida (**THQ-02** y **THQ-03**), la pirrolidina (**THQ-04** y **THQ-05**) en el C-4 y la 6-carboxiamida (**THQ-01** y **THQ-02**) en el C-6, se observó que las moléculas con esta semejanza estructural exhibieron valores de toxicidad similares y sus variaciones podrían ser atribuidas al comportamiento químico del sustituyente diferente, la única **THQ** que no tuvo un valor de CL_{50} cercano a la molécula con la que compartía sustituyente fue **THQ-03**, que mostró la mayor toxicidad, esto indica que el grupo carboxilo y la formamida tuvieron un mayor efecto tóxico que los demás sustituyentes evaluados. Por lo tanto, según los valores de CL_{50} hallados, el grado de toxicidad observado para las moléculas **THQ** está relacionado con las propiedades químicas que confiere cada sustituyente al anillo **THQ**.

Lo anterior ha sido reportado en estudios en los que se observa que la toxicidad de una molécula depende tanto del tipo de sustitución como de las propiedades físico-químicas de cada sustituyente en el anillo **THQ** (Jo *et al.*, 2016), esto ha sido observado en la síntesis de **THQ** con prospección antitumoral que fueron expuestas a diferentes líneas de cáncer humanas, y en las que la actividad tóxica de las moléculas variaba dependiendo del sustituyente que se incorporara en la estructura química (Kouznetsov *et al.*, 2010; Faidallah & Rostom, 2013). Dicho efecto también ha sido observado en las moléculas **THQ** con potencial genotóxico en linfocitos humanos (Blaszczyk & Skolimowski, 2006) o en la adición de grupos aminoácidos en el anillo macrocíclico los cuales tienen un mayor o menor efecto antiangiogénico en embriones de pez cebra (Dasari *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, se removió enzimáticamente el corión, cuya función es actuar como barrera que protege al embrión de agentes externos que puedan causar daño durante las primeras 72 horas de desarrollo (Schreiber *et al.* 2009), con este cambio metodológico se observó una reducción a la mitad de los valores de la CL_{50} y los cambios morfológicos fueron más evidentes comparados con los resultados previamente reportados por el LQOBio para las moléculas **THQ-03**, **THQ-04** y **THQ-05** (Bonilla *et al.*, 2016), lo cual es correspondiente con estudios en los que establecieron que retirar el corión causa mayor impacto en el efecto toxicológico de las moléculas evaluadas (Kim & Tanguay, 2014).

La diferencia entre los valores de la CL_{50} hallados en este trabajo respecto a los previamente reportados, sugieren que la ausencia del corión permite que las sustituyentes de las moléculas **THQ-03**, **THQ-04** y **THQ-05** puedan interactuar con mayor eficiencia con los componentes bioquímicos del embrión, esto se debe a que remover el corión permite tener un mayor grado de precisión a la hora de determinar la toxicidad y la variación fenotípica, evitando de esta forma falsos positivos o negativos (Mandrell *et al.*, 2012) y cambios morfológicos leves o nulos (Feng *et al.*, 2013), ya que la molécula actúa directamente con el embrión y no se ve afectada por la limitada permeabilidad del corión, su atracción electrostática o el tamaño de sus poros (Henn & Braunbeck, 2011).

3.3. Análisis de los cambios fenotípicos.

Se analizaron los cambios fenotípicos mediante el software DanioScopeTM y el análisis estadístico por medio del software IBM SPSS Statistics, entre los cambios morfológicos inducidos tras la exposición a las moléculas **THQ** se encuentran: curvatura del cuerpo, edema en el corazón y cambios significativos en la longitud del cuerpo, tamaño del ojo, mandíbula, pericardio y saco vitelino.

Se observó que las moléculas **THQ-02**, **THQ-03**, **THQ-04** y **THQ-05** tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en el área del ojo, dicho cambio fue observado como la reducción en el área del ojo respecto al embrión control.

Las moléculas **THQ-01**, **THQ-02** y **THQ-04** tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) en la longitud del cuerpo, este cambio fue reportado como la reducción en la longitud total del cuerpo respecto al embrión control.

Las moléculas **THQ-03** y **THQ-04** tuvieron efecto en el desarrollo del pericardio, se observó que el área del pericardio aumentó bajo el efecto de la molécula **THQ-03** y se redujo en el caso de la molécula **THQ-04**. Por otra parte, la molécula **THQ-04** indujo cambios significativos en todos los órganos evaluados, teniendo un mayor efecto en el ojo, pericardio, mandíbula y saco vitelino.

La curvatura del cuerpo (CC) se observó en todas las moléculas, el porcentaje de embriones que presentan el fenotipo de la curvatura del cuerpo y la concentración en la que se evidenció se encuentra en la Tabla 3.

Tabla 3.

Porcentaje de embriones que presentan el fenotipo curvatura del cuerpo.

Molécula/ Concentración (μM)	N ^a	Silvestre ^b	Curvatura Cuerpo ^c	Porcentaje Curvatura del cuerpo
THQ-01 (300 μM)	5	4	1	20%
THQ-02 (300 μM)	5	3	2	40%
THQ-03 (200 μM)	5	2	3	60%
THQ-04 (300 μM)	5	1	4	80%
THQ-04 (225 μM)	5	2	3	60%
THQ-05 (200 μM)	5	3	2	20%

^a Número de embriones analizados. ^b Número de embriones con fenotipo silvestre. ^c Número de embriones con fenotipo Curvatura del cuerpo.

Estos resultados generales han sido observados gracias a los análisis detallados de cada molécula **THQ** con estructura molecular diferente que produjeron los cambios diversos en el desarrollo de los embriones. A continuación, se discuten estos cambios generados por cada molécula.

Los cambios morfológicos producidos por la molécula **THQ-01** son: curvatura del cuerpo (Figura 4) y reducción significativa ($p < 0.05$) de la longitud del embrión ($p < 0.05$) (Figura 5). La curvatura del cuerpo de los embriones se observó en el 20% de los embriones analizados (Tabla 3).

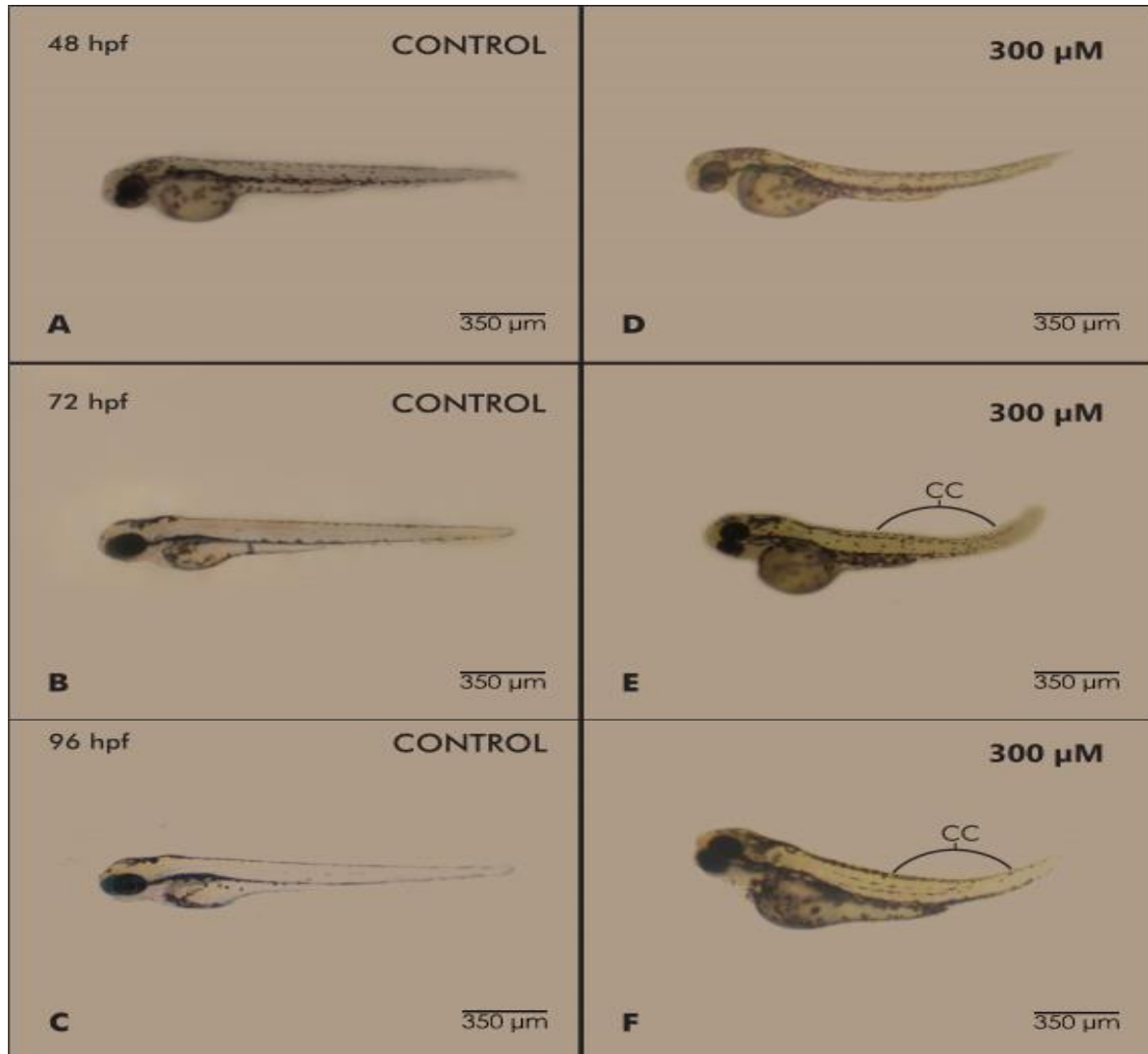
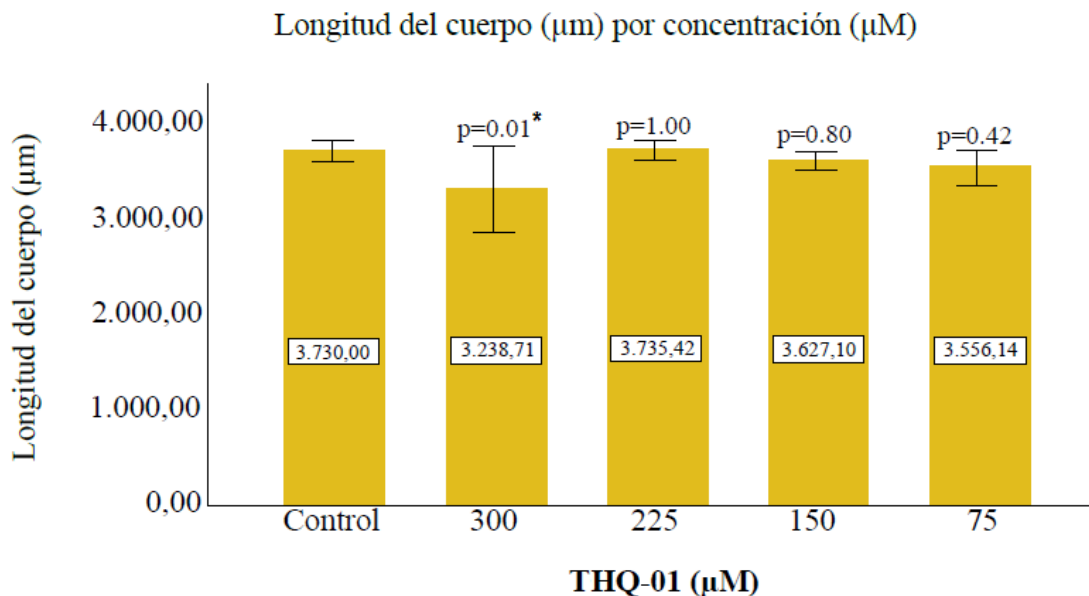


Figura 4. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula **THQ-01** a una concentración de 300 μM. **A.** Embrión control a las 48 hpf. **B.** Embrión control a las 72 hpf. **C.** Embrión control a las 96 hpf. **D.** Embrión a las 48 hpf. **E.** Embriones expuesto que presenta CC a las 72 hpf. **F.** Embriones expuesto que presenta CC a las 96 hpf.



Resultados analizados mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$. El asterisco indica la diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 5. Promedio de la longitud del cuerpo medida en los embriones (96 hpf) expuestos a 300 μM , 225 μM , 150 μM y 75 μM de la molécula **THQ-01** con el error estándar de la media para cinco réplicas ($N = 5$) analizados por el software DanioScopeTM.

La molécula **THQ-01** tuvo la menor toxicidad ($CL_{50} = 85.40 \pm 0.71$ mg/L) y evidenció la menor cantidad de cambios morfológicos, es la molécula con el menor efecto tóxico respecto a las demás **THQ** evaluadas.

Los cambios morfológicos producidos por la molécula **THQ-02** son: curvatura del cuerpo (Figura 6), reducción significativa ($p < 0.05$) del área del ojo y de la longitud del embrión (Figura 7). La curvatura del cuerpo de los embriones se observó en el 40% de los embriones analizados (Tabla 3).

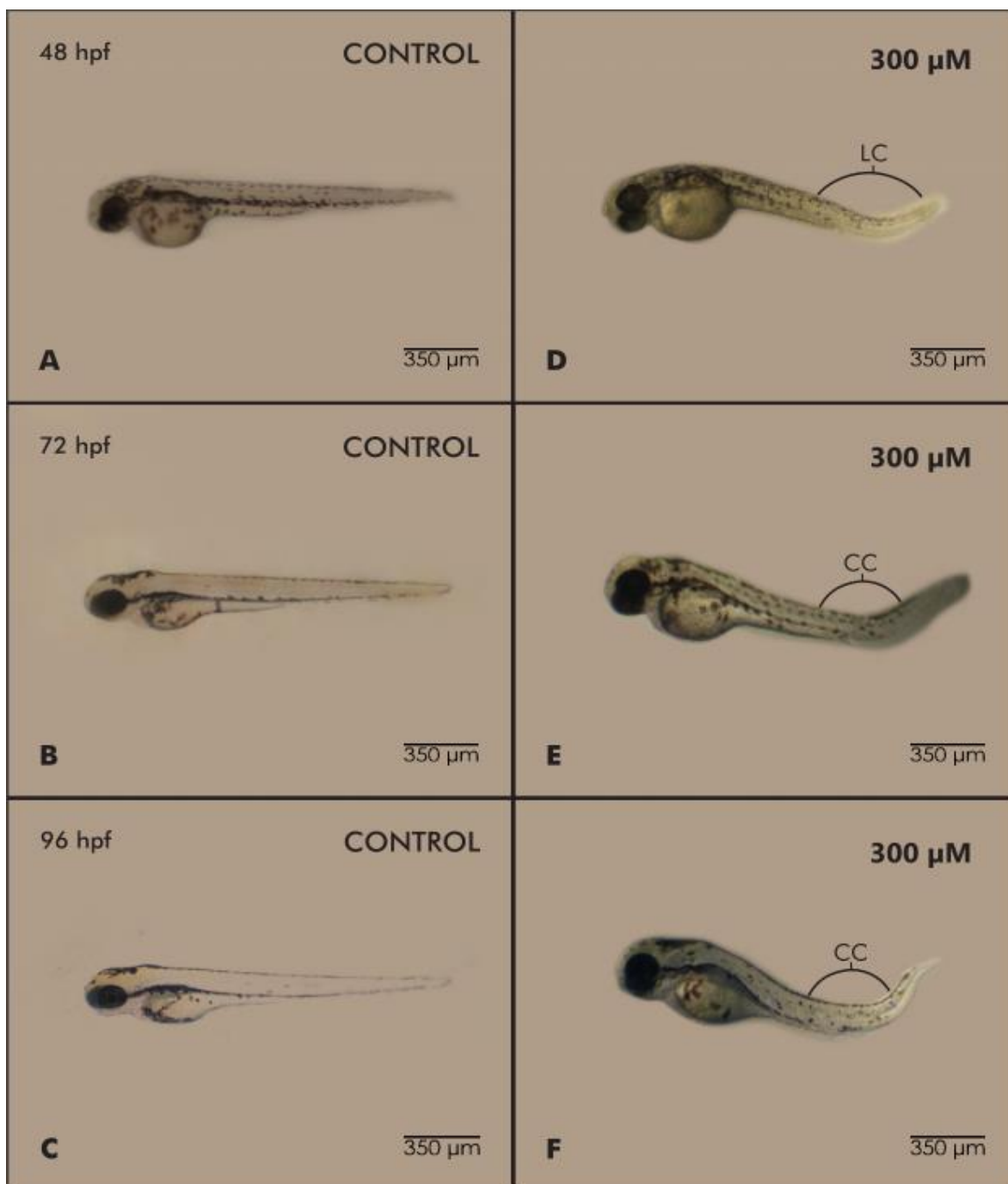
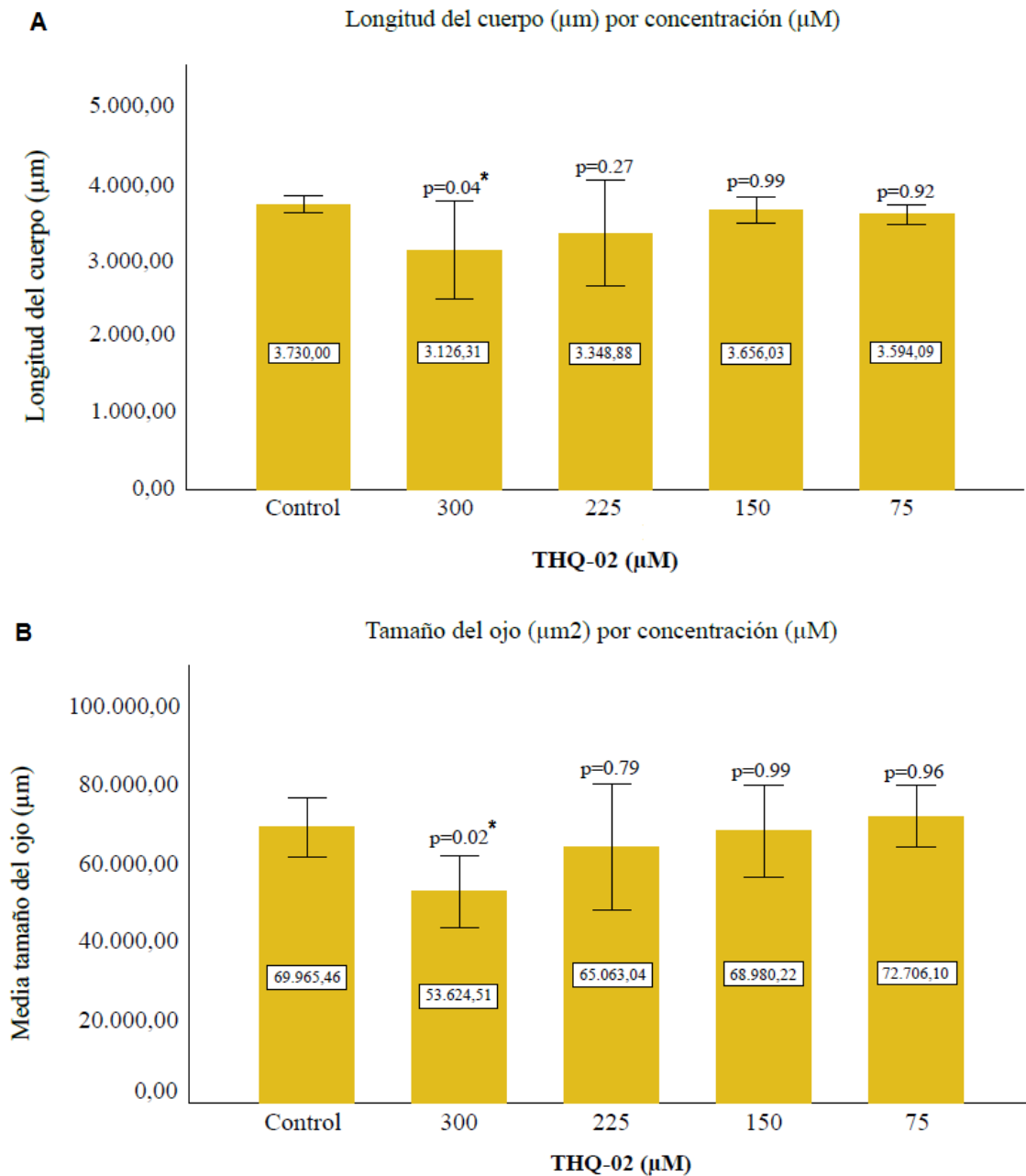


Figura 6. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula **THQ-02** a una concentración de 300 μM . **A.** Embrión control a las 48 hpf. **B.** Embrión control a las 72 hpf. **C.** Embrión control a las 96 hpf. **D.** Embrión que presenta CC a las 48 hpf. **E.** Embrión expuesto que presenta CC a las 72 hpf. **F.** Embrión expuesto que presenta CC a las 96 hpf.



Resultados analizados mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$. El asterisco indica la diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 7. Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 300 μM , 225 μM , 150 μM y 75 μM de la molécula **THQ-02** con el error estándar de la media

para cinco réplicas ($N = 5$) analizados por el software DanioScope™. **A.** Media de la longitud del cuerpo (μm). **B.** Media del área del ojo (μm^2).

La molécula **THQ-02** fue ligeramente más tóxica ($CL_{50} = 80.54 \pm 0.27$ mg/L) que **THQ-01** ($CL_{50} = 85.40 \pm 0.71$ mg/L) e indujo cambios significativos tanto en la longitud del cuerpo como en el área del ojo comparados con la reducción de la longitud del cuerpo generado por la **THQ-01**.

Teniendo en cuenta los resultados hallados para las concentraciones letales CL_{50} de **THQ-01** y **THQ-02**, los cambios morfológicos y las concentraciones en las que fueron registrados estas moléculas presentan una toxicidad baja respecto a las demás.

Puesto que los sustituyentes del C-4 y C-6, presentes en estas moléculas, pueden actuar de forma sinérgica en su actividad biológica, se observó que tanto **THQ-01** y **THQ-02**, que comparten el mismo grupo carboxiamida en la posición C-6, tienen la menor toxicidad y cantidad de cambios morfológicos producidos en los embriones respecto a las demás moléculas (Figura 3).

Sin embargo, la **THQ-01** es menos tóxica que la **THQ-02**. La única discrepancia estructural entra estas moléculas es que el sustituyente en la posición C-4 es diferente: la función 4-acetamida (**THQ-01**) y la función 4-formamida (**THQ-02**). Por consiguiente, el grupo acetamida genera un menor efecto en la actividad biológica de la molécula **THQ-01** en los embriones, mientras que el grupo formamida tiene un mayor efecto en la toxicidad de la molécula **THQ-02** y los cambios morfológicos.

Los cambios morfológicos producto de la exposición a la molécula **THQ-03** son curvatura del cuerpo, edema en el pericardio (EC) (Figura 8), reducción significativa ($p < 0.05$) en el área del

ojo y en el aumento del área del pericardio (Figura 9). La curvatura del cuerpo de los embriones se observó en el 60% de los embriones analizados (Tabla 3).

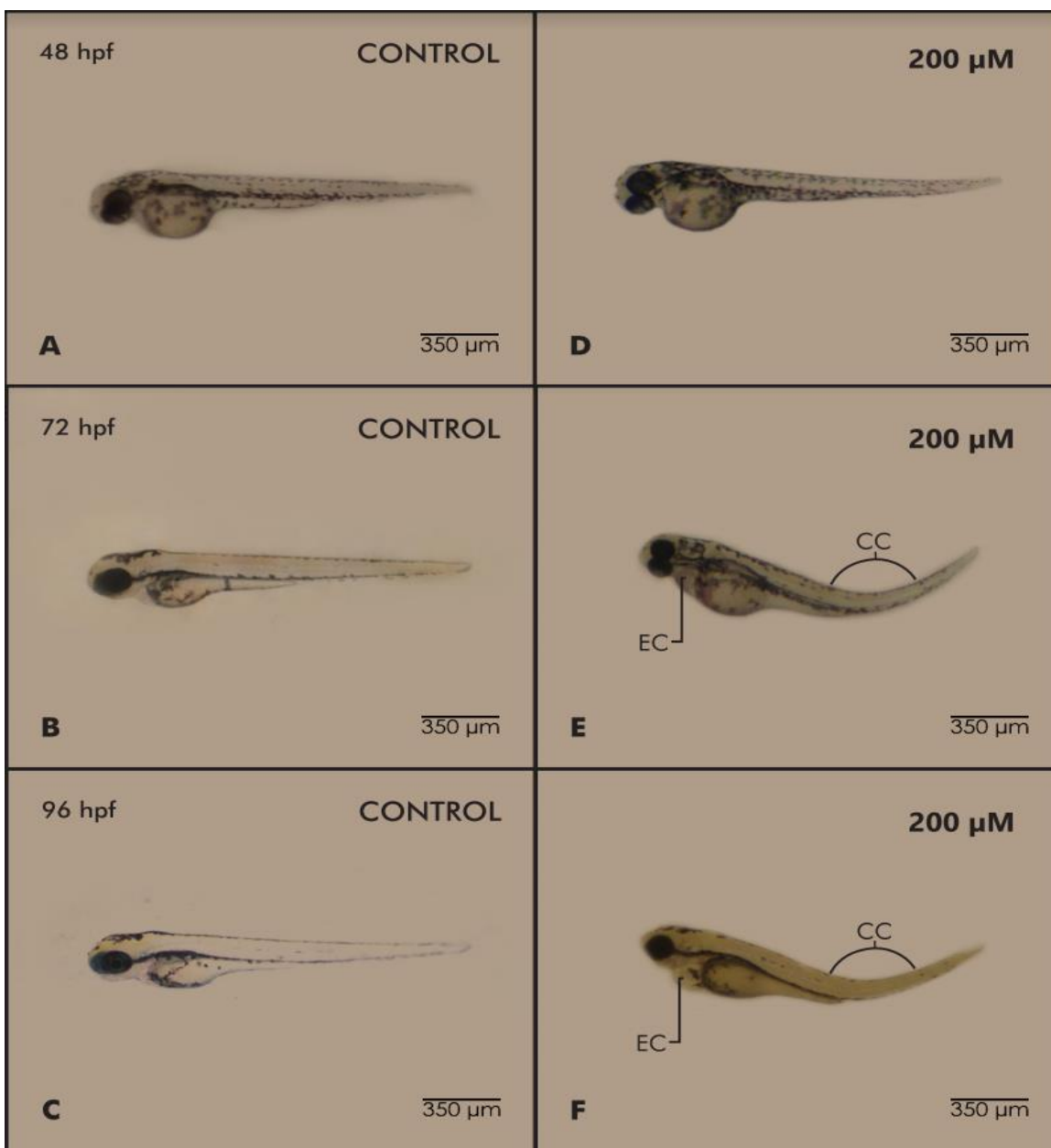
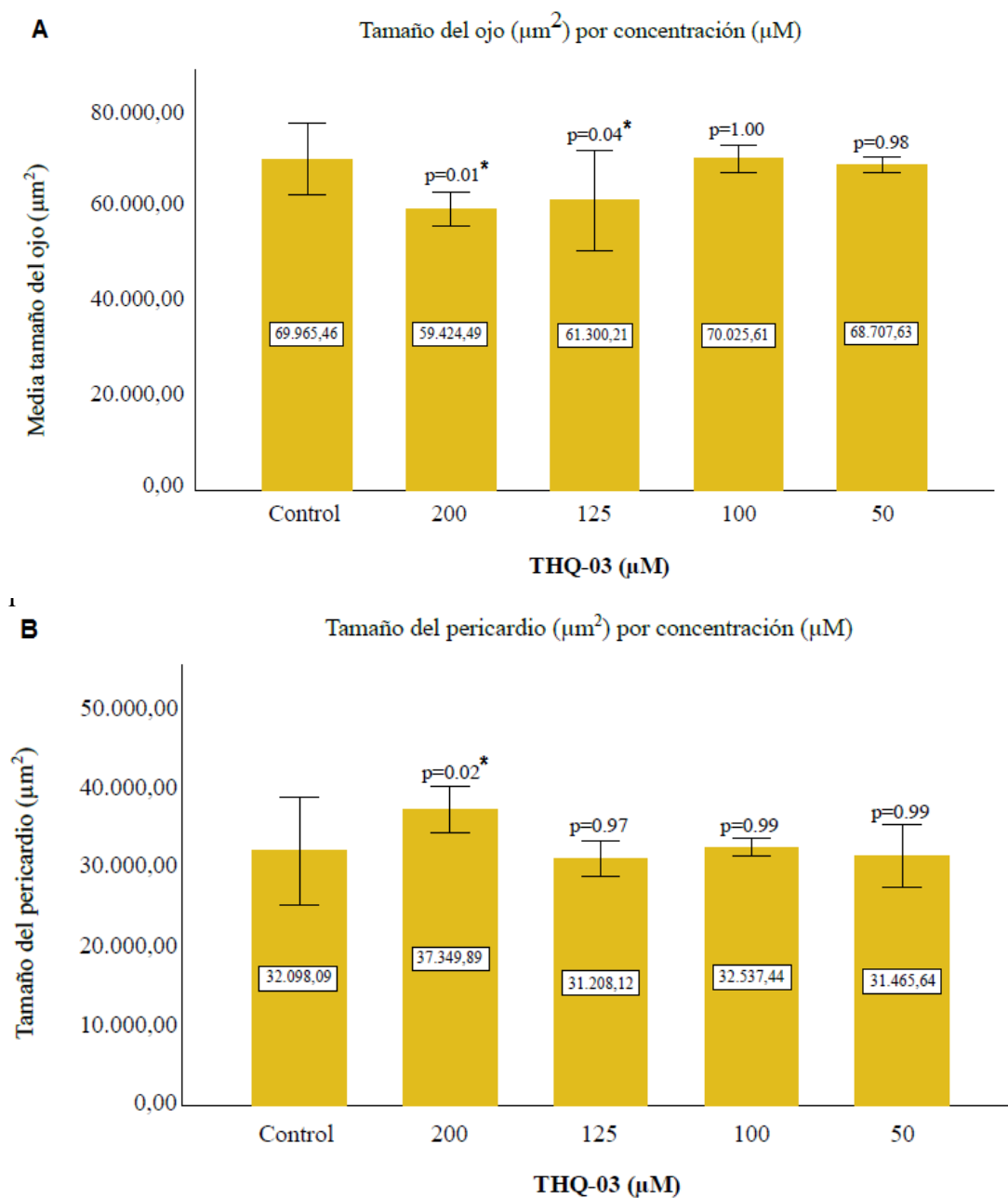


Figura 8. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula **THQ-03** a una concentración de 200 μM. **A.** Embrión control a las 48 hpf. **B.** Embrión control a las 72 hpf. **C.** Embrión control a las 96 hpf. **D.** Embrión sin cambios. **E.** Embrión que presenta EC y CC a las 72 hpf. **F.** Embrión que presenta EC y CC a las 96 hpf.



test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$. El asterisco indica la diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 9. Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 200 μM , 125 μM , 100 μM y 50 μM de la molécula **THQ-03** con el error estándar de la

media para cinco réplicas ($N = 5$) analizados por el software DanioScope™. **A.** Media del área del ojo (μm^2). **B.** Media del área del pericardio (μm^2).

La molécula **THQ-03** fue la molécula más tóxica según los resultados hallados de CL_{50} ($CL_{50} = 54.24 \pm 3.83$ mg/L) y se observaron cambios significativos en el área del ojo y pericardio, teniendo en cuenta estos resultados y las concentraciones en las que se registraron dichos cambios. Es una de las moléculas con la mayor cantidad de efectos subletales siendo precedida por la **THQ-04** (Figura 3).

De igual forma, se observó que las moléculas **THQ-02** y **THQ-03** comparten la misma función formamida en el C-4, pero difieren en el sustituyente del C-6 (carboxiamida vs carboxilo). Como resultado, se notaron la mayor (**THQ-03**, $CL_{50} = 54.24 \pm 3.83$ mg/L) y una de las menores toxicidades (**THQ-02**, $CL_{50} = 80.54 \pm 0.27$ mg/L) y cada una indujo cambios morfológicos significativos en dos órganos (longitud del cuerpo y tamaño del ojo de la **THQ-02**; tamaño del ojo y tamaño del pericardio de la **THQ-03**).

Sin embargo, en el caso de la **THQ-03** se observó que un número mayor de concentraciones inducían los cambios subletales, por lo que se sugiere que el grupo C-6-carboxilo en combinación con el grupo C-4-formamida tiene un mayor efecto en la actividad biológica en los embriones.

Los cambios morfológicos observados tras la exposición a la molécula **THQ-04** son: curvatura del cuerpo en 300 μM (Figura 10) y 225 μM (Figura 11), reducción significativa ($p < 0.05$) en el área de la mandíbula, ojo, pericardio, longitud del embrión y saco vitelino (Figura 12). La curvatura del cuerpo de los embriones se observó en el 80% (300 μM) y 60% (225 μM) de los embriones analizados (Tabla 3).

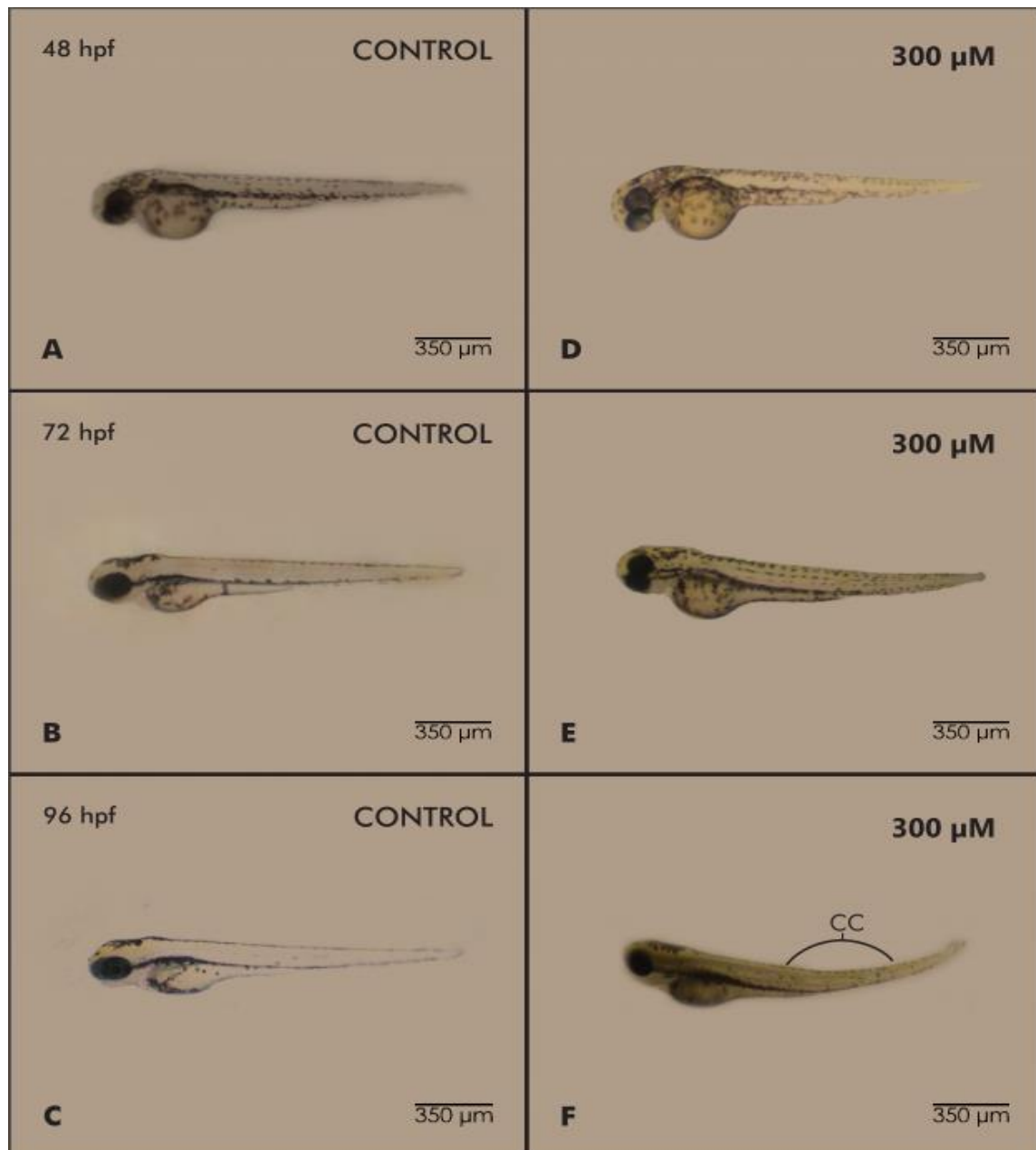


Figura 10. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula **THQ-04** a una concentración de 300 μM. **A.** Embrión control a las 48 hpf. **B.** Embrión control a las 72 hpf. **C.** Embrión control a las 96 hpf. **D.** Embrión sin cambios. **E.** Embrión sin cambios. **F.** Embrión que presenta CC a las 96 hpf.

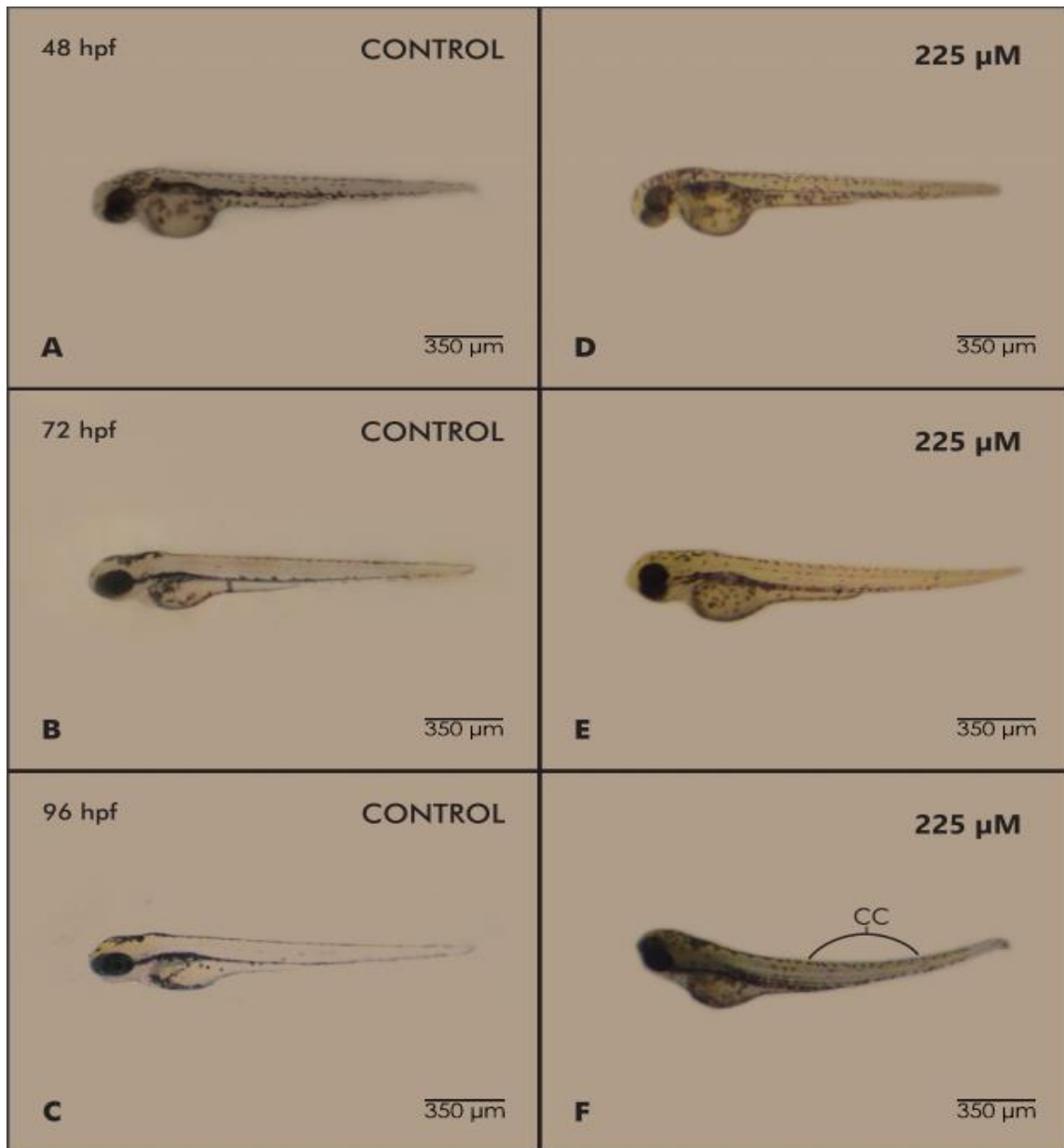
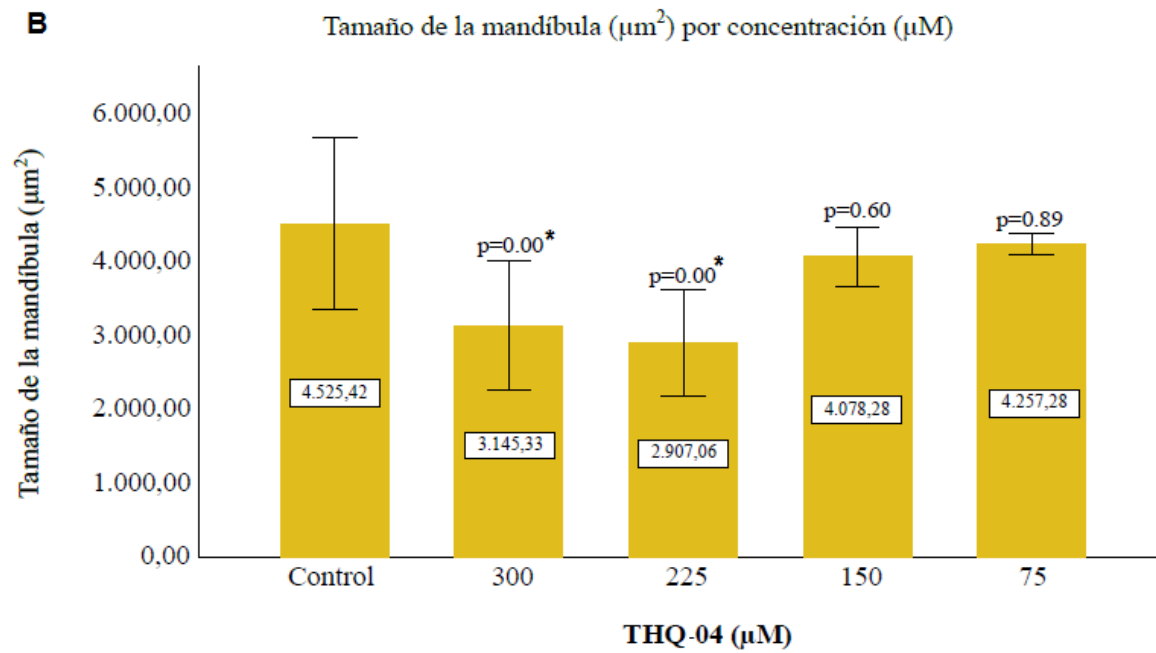
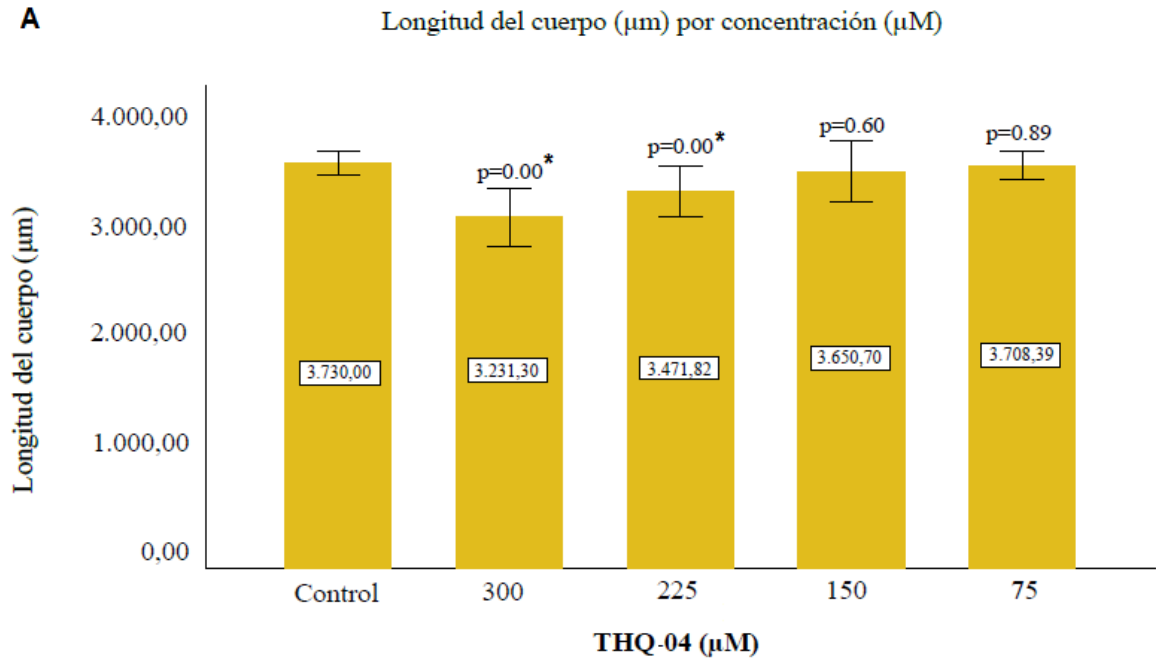
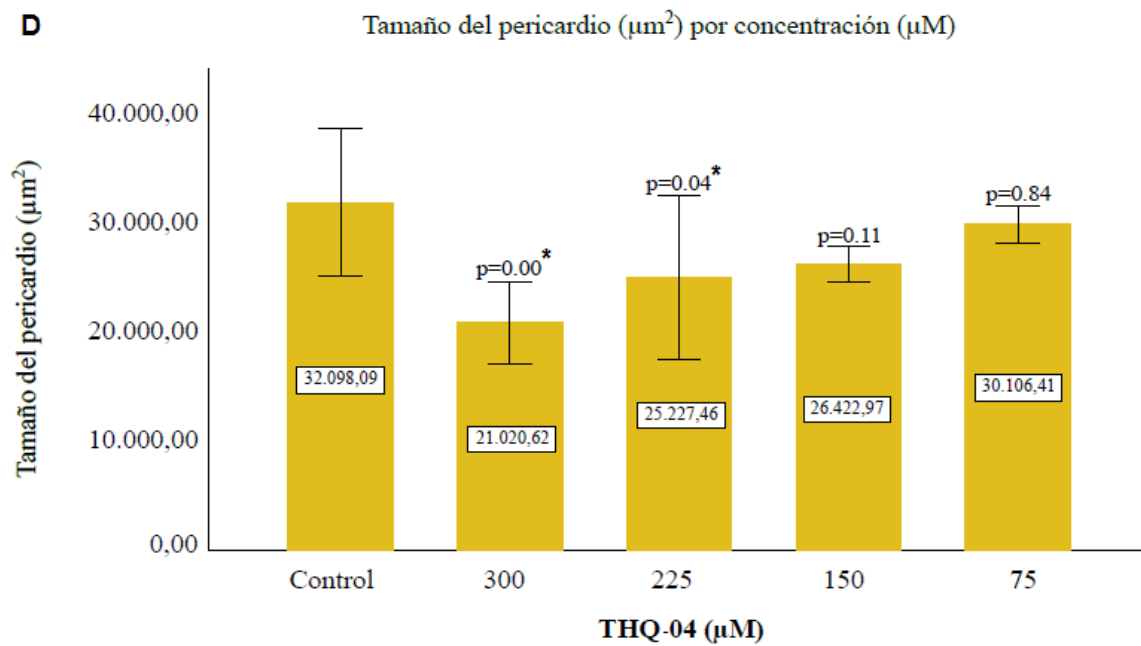
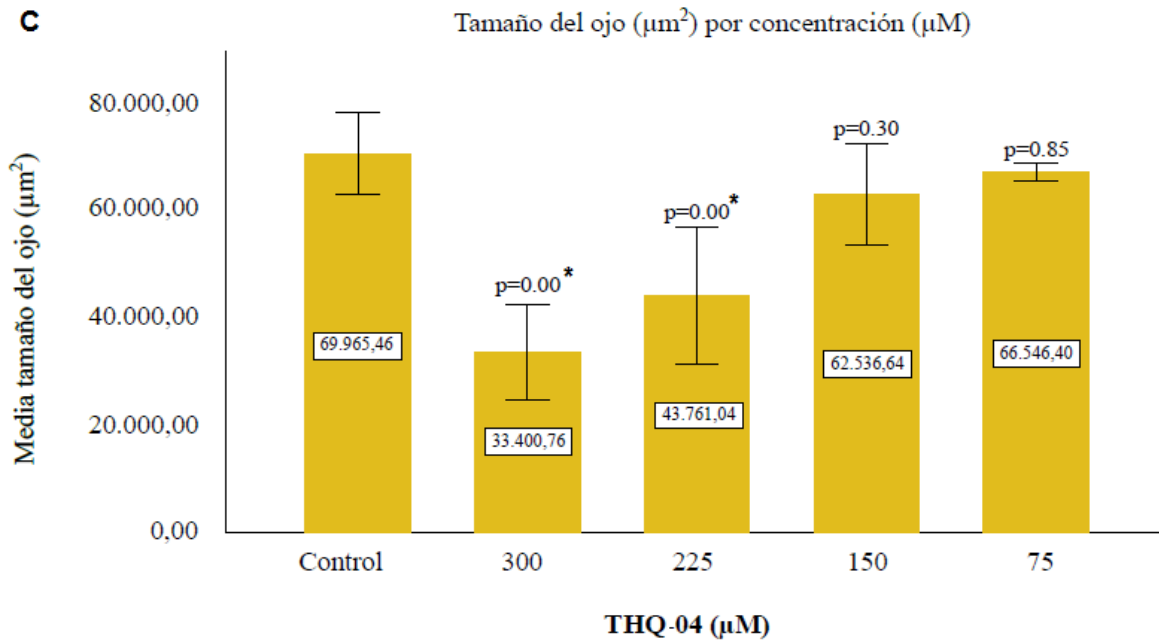
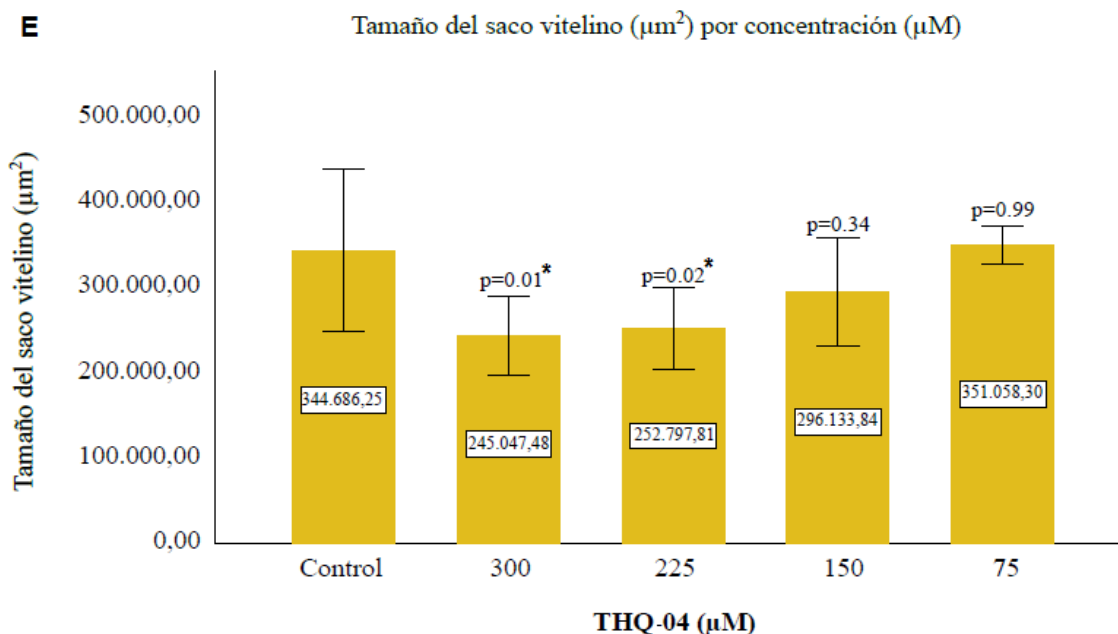


Figura 11. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula **THQ-04** a una concentración de 225 µM. **A.** Embrión control a las 48 hpf. **B.** Embrión control a las 72 hpf. **C.** Embrión control a las 96 hpf. **D.** Embrión sin cambios morfológicos. **E.** Embrión sin cambios morfológicos. **F.** Embrión que presenta CC a las 96 hpf.







Resultados analizados mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$. El asterisco indica la diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 12. Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 300 μM , 225 μM , 150 μM y 75 μM de la molécula **THQ-04** con el error estándar de la media para cinco réplicas ($N = 5$) analizados por el software DanioScopeTM. **A.** Media de la longitud del cuerpo (μm). **B.** Media del área del ojo (μm^2). **C.** Media del área del pericardio (μm^2). **D.** Media del área de la mandíbula (μm^2). **E.** Media del área del saco vitelino (μm^2).

La molécula **THQ-04**, que tiene el ciclo de la pirrolidin-2-ona como sustituyente en el C-4 (el sustituyente C-6 es un átomo de hidrógeno H) y un valor de CL_{50} medio ($\text{CL}_{50} = 72.90 \pm 0.85$ mg/L) respecto a las otras **THQ**, registró la mayor cantidad de cambios morfológicos significativos a diferentes concentraciones en diferentes órganos, entre ellos, saco vitelino, mandíbula, ojos y pericardio, por lo que el ciclo pirrolidin-2-ona en el C-4 tiene el mayor efecto en la actividad biológica sin mostrar alta toxicidad en las **THQ** evaluadas.

Entre los cambios morfológicos producidos por la molécula **THQ-05**, se encuentran curvatura del cuerpo (Figura 13) y la reducción significativa ($p < 0.05$) en el área del ojo (Figura 14). La curvatura del cuerpo de los embriones se observó en el 20% de los embriones analizados (Tabla 3).

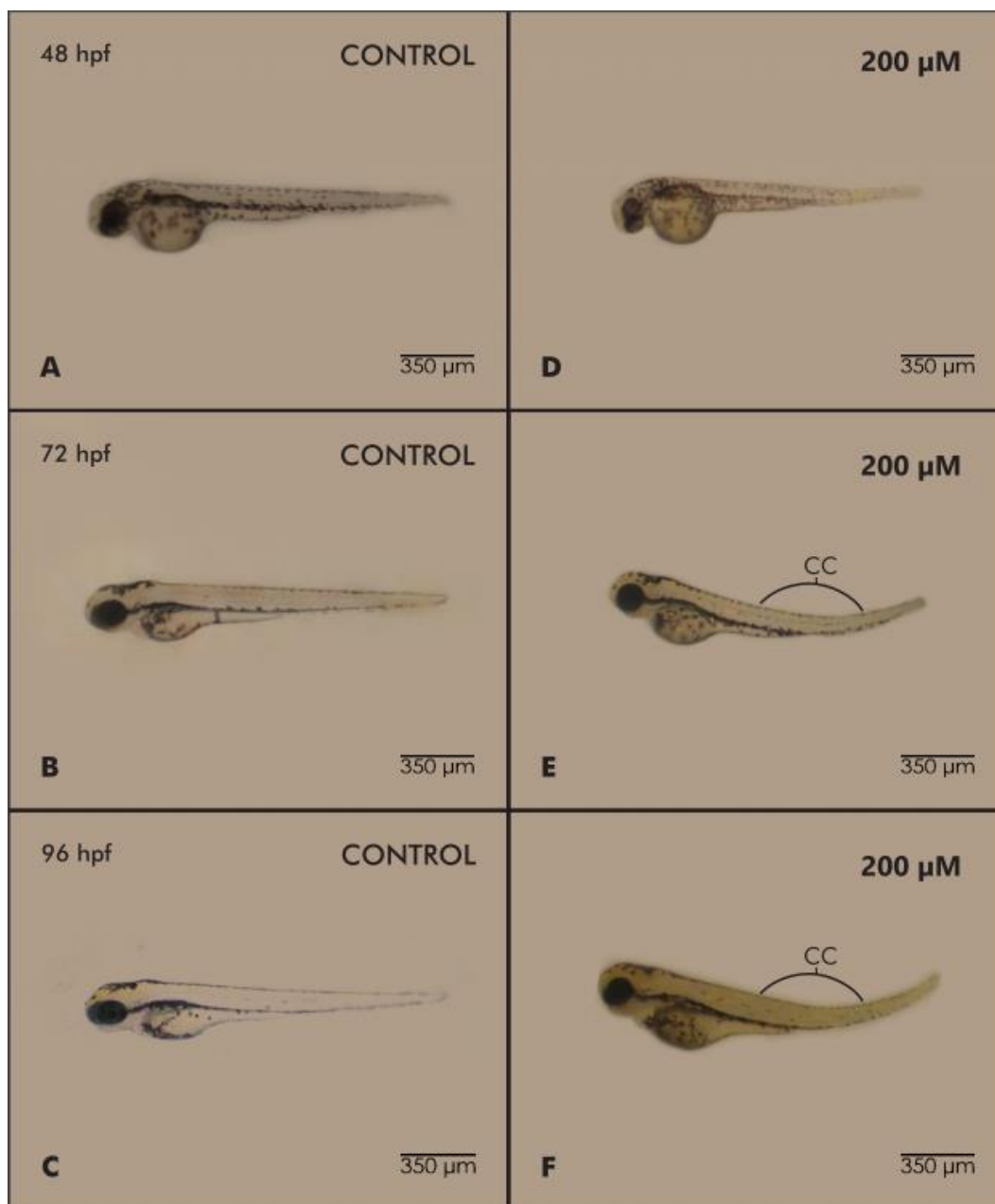
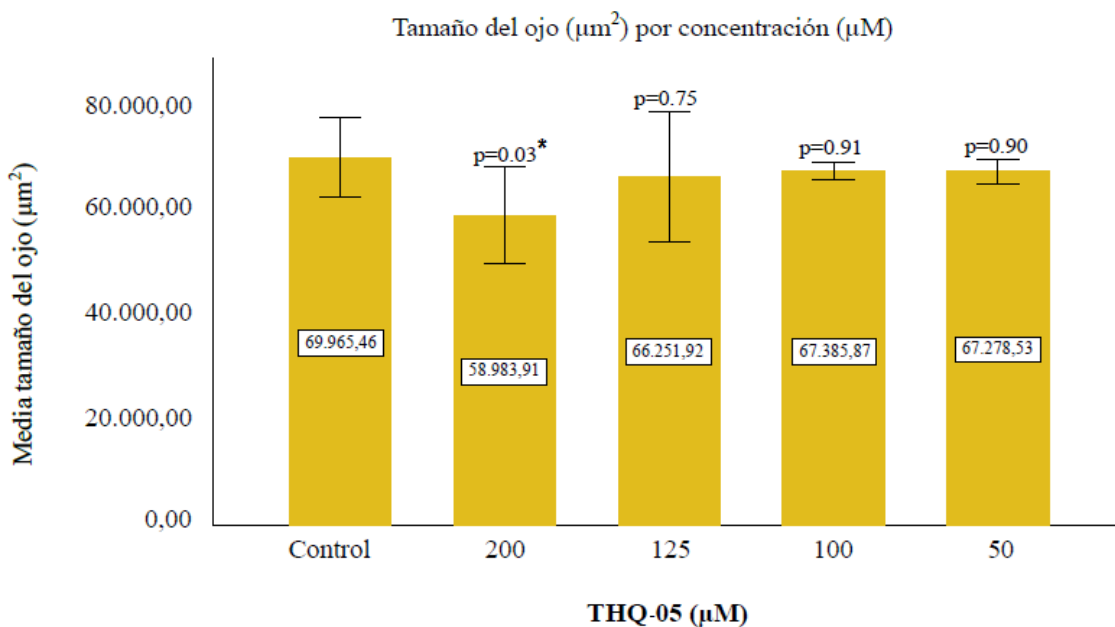


Figura 13. Cambios fenotípicos inducidos por la molécula **THQ-05** a una concentración de 200 μM. **A.** Embrión control a las 48 hpf. **B.** Embrión control a las 72 hpf. **C.** Embrión control a las

96 hpf. **D.** Embrión sin cambios morfológicos. **E.** Embrión que presenta CC a las 72 hpf. **F.** Embrión que presenta CC a las 96 hpf.



Resultados analizados mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$. El asterisco indica la diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 14. Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 200 μM , 125 μM , 100 μM y 50 μM de la molécula **THQ-05** con el error estándar de la media para cinco réplicas ($N = 5$) analizados por el software DanioScopeTM.

Por otra parte, la **THQ-05** que, aunque tuvo uno de los menores valores de CL_{50} ($CL_{50} = 62.18 \pm 2.97$ mg/L), y el núcleo de la pirrolidin-2-ona en el C-4 y el grupo acetilo en el C-6, indujo pocos cambios morfológicos, entre ellos, curvatura en el cuerpo y resultados significativos en el desarrollo del ojo, presentando así junto con la **THQ-01** la menor cantidad de alteraciones morfológicas observadas en las cinco moléculas.

Se observó que en el caso de las moléculas que comparten el ciclo de la pirrolidin-2-ona en el C-4, se registraron la mayor (**THQ-04**) y menor (**THQ-05**) cantidad de cambios morfológicos significativos en los embriones, lo que permite inferir que el ciclo de la pirrolidin-2-ona tiene un

rango de acción amplio respecto a los otros sustituyentes y que el grupo acetilo en el C-6 disminuyó la actividad biológica de la molécula **THQ-05** en los embriones.

El efecto tóxico de las moléculas **THQ-04** y **THQ-05** es correspondiente con estudios previos en los que las pirrolidin-2-onas tienen altos niveles de toxicidad reflejado en cambios letales y subletales como edema cardíaco, hipopigmentación, curvatura del cuerpo, efectos en el desarrollo de los miocitos y defectos en la formación de los vasos sanguíneos (Feula *et al.*, 2013).

Han sido reportadas ciertas anomalías morfológicas recurrentes denominadas efectos subletales, producto de la exposición a diferentes moléculas y que se evidencian en concentraciones por debajo del valor de CL_{50} , tal como edema, curvatura del cuerpo, ausencia de la inflación de la vejiga natatoria y defectos en los ojos, que se encuentran relacionadas con un desarrollo tardío, mortalidad o comportamiento anormal (Horie *et al.*, 2017). Hay que tener en cuenta que los efectos subletales observados dan un indicio del modo de acción de las **THQ** (Osterauer & Köhler, 2008). Este caso, es la molécula **THQ-04** la cual tiene un mayor potencial en la actividad biológica respecto a las demás indicando que su modo de acción podría afectar el desarrollo de varios órganos.

De igual forma, los cambios morfológicos observados, producto de la exposición a las moléculas **THQ**, han sido descritos previamente como indicadores del efecto tóxico que tienen diferentes moléculas en el desarrollo de los embriones de pez cebra, entre ellas, alteraciones en el tamaño del ojo, reducción en la longitud del embrión, curvatura del cuerpo, malformaciones en el pericardio y saco vitelino (Gustafson *et al.*, 2012). La curvatura en el eje del cuerpo, cambio producido por todas las **THQ** está relacionada con malformaciones en el desarrollo del

esqueleto, los músculos o el sistema nervioso (Chen *et al.*, 2012; He *et al.*, 2014), tal y como observaron en una serie de compuestos nitro aromáticos en los cuales la morfología del musculo esquelético se ve interrumpida debido a una reducción en los somitas dorsales del embrión (Buchanan-Kilbey *et al.*, 2013).

Los cambios morfológicos se observaron de una a dos concentraciones por debajo del valor CL_{50} , en las concentraciones restantes no se reportaron cambios significativos (Apéndice C) y la morfología fue correspondiente a la de los embriones control a las 96 hpf, los efectos tóxicos observados tienen un comportamiento dependiente de la concentración como respuesta a un efecto tóxico, este tipo de moléculas activan o reducen la expresión de genes como los que se encuentran involucrados en la metabolización de compuestos potencialmente tóxicos, tal es el caso del ácido perfluorooctanosulfónico y la reducción en la expresión de enzimas P450 (CYP7, CYP19a y CYP19b) (Du *et al.*, 2013). Las concentraciones en las que no se observaron cambios podrían deberse a un efecto homeostático del embrión, como ha sido observado en el análisis de moléculas como el flusilazol (Hermsen *et al.*, 2012).

Todas las moléculas **THQ** excepto **THQ-01**, redujeron significativamente el área total del ojo a las 96 hpf, lo cual indica que el grupo 2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina tiene mayor especificidad con los genes o proteínas involucradas en el desarrollo de este órgano, lo anterior es congruente con estudios en los que observaron que un derivado tetrahidroquinolínico tenía efecto en varios tejidos del ojo en conejos (Pamulapati & Schoenwald, 2012). De igual forma, las moléculas **THQ** evaluadas podrían estar comprometiendo el desarrollo de la retina afectando la visión de los individuos, como es el caso del etanol que reduce el tamaño del ojo afectando la fisiología de la retina y su campo visual (Bilotta *et al.*, 2002).

Los cambios morfológicos observados como la curvatura de la notocorda, reducción del tamaño del saco vitelino, efectos en la formación de la mandíbula y pericardio pueden deberse a que el efecto tóxico de las moléculas **THQ** podrían estar afectando órganos como el riñón, corazón y los precursores esqueléticos de la mandíbula, como ha sido observado en los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) de 2-4 anillos, los cuales tienen un efecto cardiotoxico, y que a una concentración de 56 μM de fenantreno se produce una falla en la circulación que afecta la formación de los riñones generando cambios en la morfología del saco vitelino y la curvatura de la notocorda, esta última debida a una diferencia en el balance de fluidos del tubo neural (Incardona *et al.*, 2004; Incardona *et al.* 2011).

La curvatura del cuerpo es un fenotipo que también ha sido descrito en las ciliopatías y anomalías en el desarrollo de los riñones en los embriones de pez cebra (Choi *et al.*, 2015), este cambio en la morfología puede ser el resultado del efecto tóxico de las moléculas **THQ** que podrían tener impacto en el desarrollo o función renal. La curvatura del cuerpo podría ser consecuencia de un flujo sanguíneo insuficiente en el riñón, ya que las alteraciones en la formación de los vasos sanguíneos pueden generar fallas en la circulación que afectarían la formación de los túbulos renales (Fogelgren *et al.*, 2014).

También se ha reportado que los embriones de pez cebra al ser expuestos a radiación ionizante inducen el fenotipo de la cola curvada debido a que el tejido nervioso, cardiovascular y específicamente la morfología y función renal se ven comprometidos, generando que la curvatura de la notocorda sea más evidente (Daroczi *et al.* 2006; Sorrells *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha descrito que el fenotipo de la curvatura del cuerpo no se expresa si se

protege la función del riñón y el sistema nervioso central de la radiación ionizante (Daroczi *et al.*, 2009). Por lo tanto, las moléculas **THQ** también podrían tener un efecto en del desarrollo del sistema nervioso y circulatorio.

Todas las moléculas indujeron en mayor o menor porcentaje la curvatura de la notocorda, este fenotipo también ha sido descrito como el resultado de la inhibición parcial o total de algunos genes que intervienen en varias vías de desarrollo, las moléculas **THQ** por debajo del valor de CL_{50} tiene un efecto tóxico que podría afectar la expresión de genes como: el gen 2 regulador de cáncer relacionado con la neurogénesis (*cug2*) (Kim *et al.*, 2011), el gen *pkd 2* que interviene en la ciliogenesis (Van der Graaf & Benson, 2011), el gen *terf 2* que participa en la senescencia (Kishi *et al.*, 2008), gen *Notch 3* y el gen *mib* (mind bomb) involucrados en la angiogénesis y la ruta de señalización de Notch (Lawson *et al.*, 2001).

Sin embargo, para poder determinar de qué forma las **THQ** a estas concentraciones están alterando la formación de los tejidos y la expresión de los genes relacionados con el desarrollo de la notocorda, el ojo, corazón o alguno de los órganos analizados en este trabajo, es necesario emplear técnicas histológicas y hacer pruebas con un mayor grado de especificidad como micro ensayos o PCR en tiempo real que permiten obtener información de los mecanismos de acción de las moléculas analizadas (van Dartel *et al.*, 2011).

3.4. Determinación de los valores del área de la superficie polar topológica (TPSA) y coeficiente de partición P (cLogP).

Mediante el programa ChemDraw se dibujaron las estructuras químicas de las moléculas y se calcularon tres parámetros fisicoquímicos de las cinco moléculas **THQ**, como el peso molecular (PM), el área de la superficie polar topológica (TPSA) y el coeficiente de partición P (cLogP). En la tabla 4 se encuentran los valores de PM, TPSA y cLogP (Tabla 4).

Tabla 4.

Determinación de tres parámetros fisicoquímicos de las cinco moléculas THQ mediante el programa ChemDraw.

Molécula	PM ^a	TPSA ^b	CLogP ^c
THQ-01	247.30	84.22	-0.2284
THQ-02	233.27	84.22	-0.3844
THQ-03	234.26	78.43	0.8456
THQ-04	230.31	32.34	0.914
THQ-05	272.35	49.41	0.9038

^a Peso molecular, ^b Área de la superficie polar topológica. ^c Coeficiente de partición P.

Ya que todas las moléculas examinadas son del grupo de 2-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas disustituidas en los C-4 y C-6 y de peso molecular bajo ($230.31 \text{ g/mol} < \text{PM} < 272 \text{ g/mol}$), los cambios de la naturaleza química en los sustituyentes C-4 y C-6 y, por ende, los cambios de las características fisicoquímicas de la molécula **THQ** (peso molecular, lipofilia y área de superficie polar topológica) van a influir en su comportamiento biológico particular incluyendo el efecto tóxico.

Por lo tanto, para las cinco moléculas **THQ** evaluadas los sustituyentes en el C-6 (-H, -COOH, -CONH₂ y -CH₃CO) actúan de forma conjunta con aquellos en el C-4 (-NHCHO, -NHCOCH₃ y -N(CH₂CH₂CH₂CO)), sin embargo dependiendo del tipo de sustituyente en los C-4 y C-6 el efecto tóxico y la actividad biológica de las moléculas aumenta o disminuye, según los resultados obtenidos el carboxilo (-COOH), la formamida (-NHCHO) de la **THQ-03** y el ciclo de la pirrolidin-2-ona (-N(CH₂CH₂CH₂CO)) de la **THQ-04** son aquellos con la mayor toxicidad

y actividad biológica respectivamente, mientras que la 4-acetamida (-NHCOCH₃) y 6-carboxiamida (-CONH₂) de **THQ-01** las de menor efecto tóxico.

Cabe notar que, aunque todas las moléculas **THQ** examinadas son de baja lipofilia (cLogP < 1.0), las moléculas **THQ-04** y **THQ-05** muestran los parámetros de lipofilia más altos (cLogP: 0.914 y 0.903, respectivamente) según los cálculos hechos *in silico* usando el programa ChemDraw (Tabla 4), lo que indicaría un mayor efecto tóxico de estas moléculas respecto a las otras, siendo congruente con la correlación positiva ya descrita entre la cLogP y la toxicidad (Padilla *et al.*, 2012).

En contraste, las moléculas **THQ-01** y **THQ-02** con los valores más altos de CL₅₀ (CL₅₀ = 85.40 ± 0.71 mg/L y 80.54 ± 0.27 mg/L, respectivamente) ambos derivados de 6-carboxiamida-2-metil-tetrahydroquinolina (C-6 = -CONH₂), cuya diferencia estructural está en la naturaleza del grupo C-4: mientras que la **THQ-01** tiene la función acetamida (C-4 = -NHCOCH₃), la **THQ-02** contiene un grupo formamida (C-4 = -NHCHO) lo cual les confiere según sus parámetros de cLogP negativos -0.228 y -0.384 la menor hidrofobicidad respecto a las demás moléculas.

Las **THQ-01** y **THQ-02** presentan los valores cLogP más bajos y los valores de CL₅₀ fueron los más altos en las cinco moléculas **THQ**, este comportamiento ya había sido descrito en algunas moléculas que presentaban pocos efectos subletales con valores de cLogP < 1, pero cuyos valores de CL₅₀ eran mayores, indicando la fuerte relación entre la hidrofobicidad y el valor de la CL₅₀ respecto al efecto y grado tóxico de las moléculas (Leet *et al.*, 2014).

Aún más interesante que la molécula **THQ-03**, la más tóxica según el valor de CL₅₀ (CL₅₀ = 54.24 ± 3.83 mg/L), con el grupo formamida en el C-4 y la función carboxi en el C-6 (C-6 = -COOH) y parámetros de lipofilia (cLogP = 0.84) similares a los de **THQ-04**, tuvo afecto tóxico

en todos los órganos evaluados, no indujera la mayor cantidad de efectos subletales, por lo tanto, con un solo parámetro de lipofilia, no se puede explicar los cambios en la toxicidad, es necesario tener en cuenta indicadores como la TPSA.

Teniendo en consideración que el pez cebra tiene una barrera hematoencefalica similar en su desarrollo y función a otros vertebrados y que puede predecir neurotoxicidad (Lee & Freeman, 2014). Vale la pena mencionar que todas las **THQ** analizadas muestran buenos parámetros del área de superficie polar topológica (TPSA = 32.32 – 84.22) que predicen su excelente capacidad de penetración de la barrera hematoencefálica y que tiene una correlación negativa con el efecto en la toxicidad (Zhang *et al.*, 2013). A partir de eso y teniendo en cuenta el análisis de las propiedades fisicoquímicas que evaluaron en candidatos para el desarrollo de fármacos y en los que hallaron una baja toxicidad en las moléculas con una TPSA > 75 y cLogP < 3 (Wager *et al.*, 2013), la apropiada área de superficie polar y la baja lipofilicidad de la molécula **THQ-03** (TPSA = 78.43 y cLogP = 0.84) explicarían su efecto toxico bajo.

3.5. Fijación material.

Cada embrión fue tratado con formol (4% en PBS) durante 12 horas, lavado tres veces en PBS, almacenado en metanol al 30% durante 24 horas, luego se reemplazó por metanol al 50% durante 24 horas, cada embrión fue dispuesto en un tubo eppendorf en metanol (70%) y etiquetado para su posterior estudio histológico.

Por lo tanto, se fijaron un total de 225 embriones, de los cuales 45 eran embriones control y 180 embriones expuestos a las **THQ**, cada molécula tuvo un total de 36 embriones fijados.

En las etiquetas de rotulación se incluyeron: el nombre de la molécula, la concentración (las cuatro concentraciones previamente descritas para evaluar los cambios fenotípicos), el número de la réplica (R1, R2 o R3) y la hora post fertilización (48, 72 o 96 hpf).

4. Conclusiones

Según los valores de CL_{50} que oscilaron entre 54.24 ± 3.83 mg/L y 85.40 ± 0.71 mg/L, las cinco moléculas **THQ** evaluadas son ligeramente tóxicas en embriones de pez cebra y el grado de toxicidad estuvo relacionado con el tipo de sustituyente, sus propiedades químicas y la posición que ocupaban en la molécula.

Según el ensayo de CL_{50} las moléculas se clasificaron de mayor a menor toxicidad de la siguiente forma: **THQ-03** ($CL_{50} = 54.54 \pm 3.83$ mg/L) > **THQ-05** ($CL_{50} = 62.18 \pm 2.97$ mg/L) > **THQ-04** ($CL_{50} = 72.90 \pm 0.85$ mg/L) > **THQ-02** ($CL_{50} = 80.54 \pm 0.27$ mg/L) > **THQ-01** ($CL_{50} = 85.40 \pm 0.71$ mg/L).

Las moléculas **THQ** evaluadas producen cambios morfológicos dependientes de la concentración que afectaron la formación de varios órganos como el ojo, corazón y notocorda. El efecto de las moléculas **THQ** en estos órganos sugiere que podrían tener un efecto tóxico en varias rutas del desarrollo tales como la angiogénesis, cardiogénesis y nefrogénesis.

Las moléculas **THQ** inducen una curvatura dorsal en el eje del cuerpo y la reducción del área del ojo, por lo que el anillo **THQ** podría tener actividad biológica en el desarrollo y funcionamiento del ojo y el riñón.

La molécula **THQ-04** sin mostrar alta toxicidad (72.90 ± 0.85 mg/L) tiene efectos subletales en el desarrollo del ojo, mandíbula, saco vitelino, pericardio y longitud del embrión, lo que puede ayudar en el diseño de nuevas moléculas con actividad biológica.

La molécula **THQ-03** mostrando su alta toxicidad relativa ($CL_{50} = 54.24 \pm 3.83$ mg/L) y apropiados parámetros fisicoquímicos ($TPSA = 78.43$ y $cLogP = 0.84$) induce selectivamente cambios subletales del pericardio lo que puede favorecer al estudio de la cardiotoxicidad o de nuevas moléculas estructuralmente similares.

5. Recomendaciones

Con el propósito de complementar el estudio realizado y tener un mayor conocimiento del mecanismo de acción y el efecto que tienen las moléculas en los órganos en los que se vieron los cambios significativos, se recomienda realizar técnicas histológicas y hacer pruebas con un mayor grado de especificidad como determinación de apoptosis.

6. Competencias desarrolladas por la pasante

- Se desarrollaron habilidades en el manejo y cuidado de embriones y especímenes adultos de pez cebra en el laboratorio.
- Se adquirió experiencia en el manejo de equipos, preparación de medios de cultivo y soluciones necesarias para el desempeño de cada experimento.
- Se obtuvo práctica en la identificación de los embriones en diferentes estadios de su desarrollo pudiendo determinar los cambios que no eran correspondientes a los mismos.
- Se desarrollaron destrezas en la fijación de los embriones para su posterior estudio y evaluación.
- Se adquirió conocimiento para el desarrollo del análisis estadístico de datos e interpretación de los resultados.

Referencias bibliográficas.

Aalders, J., Ali, S., de Jong, T. J., & Richardson, M. K. (2016). Assessing teratogenicity from the clustering of abnormal phenotypes in individual zebrafish larvae. *Zebrafish*, 13(6), 511-522.

Abe, F. R., Mendonça, J. N., Moraes, L. A., de Oliveira, G. A., Gravato, C., Soares, A. M., & de Oliveira, D. P. (2017). Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. *Chemosphere*, 178, 282-290.

Ali, S., Van Mil, H. G., & Richardson, M. K. (2011). Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *PloS one*, 6(6).

Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., ... & Martins, R. N. (2012). Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (69), e4196.

Bambino, K., & Chu, J. (2017). Zebrafish in toxicology and environmental health. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 124, pp. 331-367). Academic Press.

Bilotta, J., Saszik, S., Givin, C. M., Hardesty, H. R., & Sutherland, S. E. (2002). Effects of embryonic exposure to ethanol on zebrafish visual function. *Neurotoxicology and teratology*, 24(6), 759-766.

Bindu, P. J., Naik, T. R., Mahadevan, K. M., & Krishnamurthy, G. (2019). Synthesis, DNA photocleavage, molecular docking and anticancer studies of 2-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinolines. *Chemical Biology Letters*, 6(1), 8-13.

Błaszcyk, A., Augustyniak, A., & Skolimowski, J. (2013). Ethoxyquin: an antioxidant used in animal feed. *International journal of food science*, 2013.

Błaszcyk, A., & Skolimowski, J. (2006). Comparative analysis of cytotoxic, genotoxic and antioxidant effects of 2,2,4,7-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline and ethoxyquin on human lymphocytes. *Chemico-biological interactions*, 162(1), 70-80.

Bonilla, C. A. M., Galvis, C. E. P., Méndez, L. Y. V., & Kouznetsov, V. V. (2016). Ce(SO₄)₂-catalysed the highly diastereoselective synthesis of tetrahydroquinolines via an imino Diels

Alder ABB' type reaction and their in vivo toxicity and imaging in zebrafish embryos. *RSC advances*, 6(44), 37478-37486.

Buchanan-Kilbey, G., Djumpah, J., Papadopoulou, M. V., Bloomer, W., Hu, L., Wilkinson, S. R., & Ashworth, R. (2013). Evaluating the developmental toxicity of trypanocidal nitroaromatic compounds on zebrafish. *Acta tropica*, 128(3), 701-705.

Busquet, F., Strecker, R., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T., Carr, G. J., ... & Kleensang, A. (2014). OECD validation study to assess intra-and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 69(3), 496-511.

Cardozo, C., Reiber, A., & Akle, V. (2019). Use of a Zebrafish Model to Evaluate Toxicity of Schiff Base Complexes of Copper (II) and Zinc (II) as Possible Antineoplastic Agents. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 22(1), 11.

Chamakuri, S., Guduru, S. K. R., Pamu, S., Chandrasekar, G., Kitambi, S. S., & Arya, P. (2013). A modular approach to build macrocyclic diversity in aminoindoline scaffolds identifies antiangiogenesis agents from a zebrafish assay. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(19), 3959-3964.

Chen, J., Chen, Y., Liu, W., Bai, C., Liu, X., Liu, K., ... & Huang, C. (2012). Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 34(6), 581-586.

Choi, S. Y., Baek, J. I., Zuo, X., Kim, S. H., Dunaief, J. L., & Lipschutz, J. H. (2015). Cdc42 and sec10 are required for normal retinal development in zebrafish. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(5), 3361-3370.

Chlebowski, A. C., Garcia, G. R., La Du, J. K., Bisson, W. H., Truong, L., Massey Simonich, S. L., & Tanguay, R. L. (2017). Mechanistic investigations into the developmental toxicity of nitrated and heterocyclic PAHs. *Toxicological Sciences*, 157(1), 246-259.

Daroczi, B., Kari, G., McAleer, M. F., Wolf, J. C., Rodeck, U., & Dicker, A. P. (2006). In vivo radioprotection by the fullerene nanoparticle DF-1 as assessed in a zebrafish model. *Clinical Cancer Research*, 12(23), 7086-7091.

Daroczi, B., Kari, G., Ren, Q., Dicker, A. P., & Rodeck, U. (2009). Nuclear factor κ B inhibitors alleviate and the proteasome inhibitor PS-341 exacerbates radiation toxicity in zebrafish embryos. *Molecular cancer therapeutics*, 8(9), 2625-2634

Dasari, B., Jogula, S., Borhade, R., Balasubramanian, S., Chandrasekar, G., Kitambi, S. S., & Arya, P. (2013). Macrocyclic glycohybrid toolbox identifies novel antiangiogenesis agents from zebrafish assay. *Organic letters*, 15(3), 432-435

Dix, D. J., Houck, K. A., Martin, M. T., Richard, A. M., Setzer, R. W., & Kavlock, R. J. (2007). The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. *Toxicological sciences*, 95(1), 5-12.

Du, G., Hu, J., Huang, H., Qin, Y., Han, X., Wu, D., ... & Wang, X. (2013). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) affects hormone receptor activity, steroidogenesis, and expression of endocrine-related genes in vitro and in vivo. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(2), 353-360.

Ducharme, N. A., Reif, D. M., Gustafsson, J. A., & Bondesson, M. (2015). Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: implications for chemical testing. *Reproductive Toxicology*, 55, 3-10.

Faidallah, H. M., & Rostom, S. A. (2013). Synthesis, in vitro antitumor evaluation and DNA-binding study of novel tetrahydroquinolines and some derived tricyclic and tetracyclic ring systems. *European journal of medicinal chemistry*, 63, 133-143.

Feng, D. F., Wu, W. X., He, N. N., Chen, D. Y., & Feng, X. Z. (2013). Analysis of chorion changes in developmental toxicity induced by polymer microspheres in Zebrafish embryos. *RSC advances*, 3(39), 17880-17886.

Feula, A., Dhillon, S. S., Byravan, R., Sangha, M., Ebanks, R., Salih, M. A. H., ... & Müller, F. (2013). Synthesis of azetidines and pyrrolidines via iodocyclisation of homoallyl amines and exploration of activity in a zebrafish embryo assay. *Organic & biomolecular chemistry*, 11(31), 5083-5093.

Fischer, A., Wolman, M., Granato, M., Parsons, M., McCallion, A. S., Proescher, J., & English, E. (2015). Carbamate nerve agent prophylactics exhibit distinct toxicological effects in the zebrafish embryo model. *Neurotoxicology and teratology*, *50*, 1-10.

Fogelgren, B., Zuo, X., Buonato, J. M., Vasilyev, A., Baek, J. I., Choi, S. Y., ... & Park, K. M. (2014). Exocyst Sec10 protects renal tubule cells from injury by EGFR/MAPK activation and effects on endocytosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *307*(12), F1334-F1341..

Gamse, J. T., & Gorelick, D. A. (2016). Mixtures, metabolites, and mechanisms: understanding toxicology using zebrafish. *Zebrafish*, *13*(5), 377-378.

Geyer, H. J., Steinberg, C. E., Scheunert, I., Brüggemann, R., Schütz, W., Kettrup, A., & Rozman, K. (1993). A review of the relationship between acute toxicity (LC50) of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH, Lindane) and total lipid content of different fish species. *Toxicology*, *83*(1-3), 169-179.

Gray, C., Packham, I. M., Wurmser, F., Eastley, N. C., Hellewell, P. G., Ingham, P. W., ... & Chico, T. J. (2007). Ischemia is not required for arteriogenesis in zebrafish embryos. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *27*(10), 2135-2141.

Gustafson, A. L., Stedman, D. B., Ball, J., Hillegass, J. M., Flood, A., Zhang, C. X., ... & Tornesi, M. B. (2012). Inter-laboratory assessment of a harmonized zebrafish developmental toxicology assay—Progress report on phase I. *Reproductive Toxicology*, *33*(2), 155-164.

Harper, C., & Lawrence, C. (2016). *The laboratory zebrafish*. Crc Press.

He, J. H., Gao, J. M., Huang, C. J., & Li, C. Q. 2014. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicology and teratology*. *42*, 35-42.

Henn, K., & Braunbeck, T. (2011). Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *153*(1), 91-98.

Hermesen, S. A., Pronk, T. E., van den Brandhof, E. J., van der Ven, L. T., & Piersma, A. H. (2012). Concentration-response analysis of differential gene expression in the zebrafish embryotoxicity test following flusilazole exposure. *Toxicological Sciences*, *127*(1), 303-312.

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences*, *86*(1), 6-19.

Horie, Y., Yamagishi, T., Takahashi, H., Shintaku, Y., Iguchi, T., & Tatarazako, N. (2017). Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *Journal of Applied Toxicology*, *37*(10), 1245-1253.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498-503.

Incardona, J. P., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and applied pharmacology*, *196*(2), 191-205.

Incardona, J. P., Linbo, T. L., & Scholz, N. L. (2011). Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicology and applied pharmacology*, *257*(2), 242-249.

Jo, H., Choi, M., Kumar, A. S., Jung, Y., Kim, S., Yun, J., ... & Cho, J. (2016). Development of novel 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline scaffolds as potent NF- κ B inhibitors and cytotoxic agents. *ACS medicinal chemistry letters*, *7*(4), 385-39.

Juneidi, I., Hayyan, M., & Hashim, M. A. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability for cholinium-based deep eutectic solvents. *RSC Advances*, *5*(102), 83636-83647.

Kim, H. T., So, J. H., Jung, S. H., Ahn, D. G., Koh, W., Kim, N. S., ... & Kim, C. H. (2011). Cug2 is essential for normal mitotic control and CNS development in zebrafish. *BMC developmental biology*, *11*(1), 49.

Kim, K. T., & Tanguay, R. L. (2014). The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryonic zebrafish assay. *Environmental health and toxicology*, *29*.

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.

Kishi, S., Bayliss, P. E., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Qi, J., Nanjappa, P., ... & Roberts, T. M. (2008). The identification of zebrafish mutants showing alterations in senescence-associated biomarkers. *PLoS Genet*, *4*(8), e1000152.

Knöbel, M., Busser, F. J., Rico-Rico, A., Kramer, N. I., Hermens, J. L., Hafner, C., ... & Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environmental science & technology*, *46*(17), 9690-9700.

Kokel, D., Bryan, J., Laggner, C., White, R., Cheung, C. Y. J., Mateus, R., ... & MacRae, C. A. (2010). Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nature chemical biology*, *6*(3), 231-237.

Kouznetsov, V.V., Merchan Arenas, R. D., Arvelo, F., Bello Forero, J. S., Sojo, F., & Muñoz, A. (2010). 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline derivatives obtained through imino diels-alder reactions as potential antitumoral agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, *7*(9), 632-639.

Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., & Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *149*(2), 196-209.

Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A., & Weinstein, B. M. (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, *128*(19), 3675-3683.

Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture*, *269*(1-4), 1-20.

Lee, J., & Freeman, J. L. (2014). Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review. *Neurotoxicology*, *43*, 57-64

Lee, J., Willer, J. R., Willer, G. B., Smith, K., Gregg, R. G., & Gross, J. M. (2008). Zebrafish blowout provides genetic evidence for Patched1-mediated negative regulation of Hedgehog

signaling within the proximal optic vesicle of the vertebrate eye. *Developmental biology*, 319(1), 10-22.

Leet, J. K., Lindberg, C. D., Bassett, L. A., Isales, G. M., Yozzo, K. L., Raftery, T. D., & Volz, D. C. (2014). High-content screening in zebrafish embryos identifies butafenacil as a potent inducer of anemia. *PloS one*, 9(8).

Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353.

Mandrell, D., Truong, L., Jephson, C., Sarker, M. R., Moore, A., Lang, C., ... & Tanguay, R. L. (2012). Automated zebrafish chorion removal and single embryo placement: optimizing throughput of zebrafish developmental toxicity screens. *Journal of laboratory automation*, 17(1), 66-74.

Martinez, S. R., Pavani, C. C., Baptista, M. S., Becerra, M. C., Quevedo, M. A., & Ribone, S. R. (2019). Identification of the potential biological target of N-benzenesulfonyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline compounds active against gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-10.

Matthews, M., Trevarrow, B., & Matthews, J. (2002). A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Resource*, 31, 34-40.

Merchan-Arenas, D. M., Puerto-Galvis, C., Kouznetsov, V., & Vargas, C. (2018). LC 50 Determination and Phenotypic Analysis of Three C 6-C 1 and C 6-C 3 Bio-phenols Using Zebrafish (*Danio rerio*) Model. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 301-306.

Muñoz-Acevedo, A., Carlos, E., Rodríguez, J. D., Aristizábal-Córdoba, S., & Kouznetsov, V. V. (2014). Estudio químico-biológico de los aceites esenciales de *Croton malambo* H. Karst y su componente mayoritario, metileugenol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(4), 336-343.

Nishimura, Y., Inoue, A., Sasagawa, S., Koiwa, J., Kawaguchi, K., Kawase, R., ... & Tanaka, T. (2016). Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenital Anomalies*, 56(1), 18-27.

OECD (2013). *Test No. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test*. OECD Publishing.

Ossa-López, P. A., Castaño-Villa, G. J., & Rivera-Páez, F. A. (2017). Genotoxic effects and gene expression in *Danio rerio* (Hamilton 1822)(Cypriniformes: Cyprinidae) exposed to mining-impacted tributaries in Manizales, Colombia. *Environmental monitoring and assessment*, 189(10), 520.

Osterauer, R., & Köhler, H. R. (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 86(4), 485-494.

Padilla, S., Corum, D., Padnos, B., Hunter, D. L., Beam, A., Houck, K. A., Sipes, N., Kleinstreuer, N., Knudsen, T., Dix, D. J., et al. (2012). Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reprod. Toxicol.* 33, 174–187. doi:10.1016/j.reprotox.2011.10.018.

Pagliero, R. J., Lusvardi, S., Pierini, A. B., Brun, R., & Mazzieri, M. R. (2010). Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinolines. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(1), 142-150.

Pamulapati, C. R., & Schoenwald, R. D. (2012). Ocular pharmacokinetics of a novel tetrahydroquinoline analog in rabbit: Compartmental analysis and PK–PD evaluation. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(1), 414-423.

Parng, C. (2005). In vivo zebrafish assays for toxicity testing. *Current opinion in drug discovery & development*, 8(1), 100-106.

Parsons, M. J., Campos, I., Hirst, E. M., & Stemple, D. L. (2002). Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development*, 129(14), 3505-3512.

Pinheiro, L. C., Maria de Lourdes, G. F., Silveira, F. F., Feitosa, L. M., & Boechat, N. (2019). Synthetic compounds with sulfonamide moiety against Leishmaniasis: an overview. *Medicinal Chemistry Research*, 1-11.

Puerto-Galvis, C. E., & V Kouznetsov, V. (2012). Modelo de pez cebra y pequeñas moléculas heterocíclicas actualidades y futuro. *Actualidades Biológicas*, 34(96), 126-127.

Redfern, W. S., Waldron, G., Winter, M. J., Butler, P., Holbrook, M., Wallis, R., & Valentin, J. P. (2008). Zebrafish assays as early safety pharmacology screens: paradigm shift or red herring?. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 58(2), 110-117.

Reddy Guduru, S. K., Chama kuri, S., Chandrasekar, G., Kitambi, S. S., & Arya, P. (2013). Tetrahydroquinoline-Derived Macrocyclic Toolbox: The Discovery of Antiangiogenesis Agents in Zebrafish Assay. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(7), 666-670.

Ren, L., Lei, T., Ye, J. X., & Gong, L. Z. (2012). Step-Economical Synthesis of Tetrahydroquinolines by Asymmetric Relay Catalytic Friedländer Condensation/Transfer Hydrogenation. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(3), 771-774.

Roper, C., & Tanguay, R. L. (2018). Zebrafish as a model for developmental biology and toxicology. In *Handbook of Developmental Neurotoxicology* (pp. 143-151). Academic press.

Rosado-Solano, D. N., Restrepo-Manrique, R., Jaramillo-Pérez, V. M., Puerto-Galvis, C. E., Kouznetsov, V. V., & Vargas-Méndez, L. Y. (2018). Larvicidal activity of essential oils and extracts of Colombian plants against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Iteckne*, 15(2), 79-87.

Santos, D., Vieira, R., Luzio, A., & Félix, L. (2018). Zebrafish Early Life Stages for Toxicological Screening: Insights From Molecular and Biochemical Markers. In *Advances in Molecular Toxicology* (Vol. 12, pp. 151-179). Elsevier.

Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future microbiology*, 7(8), 979-990.

Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Schüürmann, G., & Küster, E. (2009). A novel in vitro system for the determination of bioconcentration factors and the internal dose in zebrafish (*Danio rerio*) eggs. *Chemosphere*, 77(7), 928-933.

Selderslaghs, I. W., Van Rompay, A. R., De Coen, W., & Witters, H. E. (2009). Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive toxicology*, 28(3), 308-320.

Shang, S., & Tan, D. S. (2005). Advancing chemistry and biology through diversity-oriented synthesis of natural product-like libraries. *Current opinion in chemical biology*, 9(3), 248-258.

Sorrells, S., Carbonneau, S., Harrington, E., Chen, A. T., Hast, B., Milash, B., ... & Stewart, R. A. (2012). Ccdc94 protects cells from ionizing radiation by inhibiting the expression of p53. *PLoS genetics*, 8(8).

Spandl, R. J., Bender, A., & Spring, D. R. (2008). Diversity-oriented synthesis; a spectrum of approaches and results. *Organic & biomolecular chemistry*, 6(7), 1149-1158.

Sriramurthy, V., & Kwon, O. (2010). Diphosphine-catalyzed mixed double-Michael reaction: A unified synthesis of indolines, dihydropyrrolopyridines, benzimidazolines, tetrahydroquinolines, tetrahydroisoquinolines, dihydrobenzo-1, 4-oxazines, and dihydrobenzo-3, 1-oxazines. *Organic letters*, 12(5), 1084-1087.

Sridharan, V., Suryavanshi, P. A., & Menendez, J. C. (2011). Advances in the chemistry of tetrahydroquinolines. *Chemical reviews*, 111(11), 7157-7259.

Stockwell, B. R. (2004). Exploring biology with small organic molecules. *Nature*, 432(7019), 846-854.

Streisinger, G., Coale, F., Taggart, C., Walker, C., & Grunwald, D. J. (1989). Clonal origins of cells in the pigmented retina of the zebrafish eye. *Developmental biology*, 131(1), 60-69.

Su, D. S., Lim, J. J., Tinney, E., Wan, B. L., Young, M. B., Anderson, K. D., ... & Lu, M. (2009). Substituted tetrahydroquinolines as potent allosteric inhibitors of reverse transcriptase and its key mutants. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(17), 5119-5123.

Teraoka H, Dong W, Hiraga T (2003) Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenit Anom (Kyoto)* 43: 123–132.

Truong, L., Reif, D. M., St Mary, L., Geier, M. C., Truong, H. D., & Tanguay, R. L. (2014). Multidimensional in vivo hazard assessment using zebrafish. *Toxicological Sciences*, 137(1), 212-233.

van Dartel, D.A., Pennings, J.L., de la Fonteyne, L.J., Brauers, K.J., Claessen, S., van Delft, J.H., Kleinjans, J.C., Piersma, A.H. (2011). Concentration-dependent gene expression responses to flusilazole in embryonic stem cell differentiation cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 251, 110–118.

Van der Graaf, P. H., & Benson, N. (2011). Systems pharmacology: bridging systems biology and pharmacokinetics-pharmacodynamics (PKPD) in drug discovery and development. *Pharmaceutical research*, 28(7), 1460-1464.

van der Sar, A. M., Appelmelk, B. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Bitter, W. (2004). A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends in microbiology*, 12(10), 451-457.

Varga, Z. M. (2011). Aquaculture and husbandry at the zebrafish international resource center. In *Methods in cell biology* (Vol. 104, pp. 453-478). Academic Press.

Vargas, R., & Vásquez, I. C. (2017). Effects of overfeeding and high-fat diet on cardiosomatic parameters and cardiac structures in young and adult zebrafish. *Fish physiology and biochemistry*, 43(6), 1761-1773.

Wager, T. T., Kormos, B. L., Brady, J. T., Will, Y., Aleo, M. D., Stedman, D. B., ... & Chandrasekaran, R. Y. (2013). Improving the odds of success in drug discovery: choosing the best compounds for in vivo toxicology studies. *Journal of medicinal chemistry*, 56(23), 9771-9779.

Wullimann, M. F., & Puelles, L. (1999). Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. *Anatomy and embryology*, 199(4), 329-348.

Yu, J., Shi, F., & Gong, L. Z. (2011). Brønsted-acid-catalyzed asymmetric multicomponent reactions for the facile synthesis of highly enantioenriched structurally diverse nitrogenous heterocycles. *Accounts of chemical research*, 44(11), 1156-1171.

Zhang, J., Qian, J., Tong, J., Zhang, D., & Hu, C. (2013). Toxic effects of cephalosporins with specific functional groups as indicated by zebrafish embryo toxicity testing. *Chemical research in toxicology*, 26(8), 1168-1181.

Ziv, L., Muto, A., Schoonheim, P. J., Meijnsing, S. H., Strasser, D., Ingraham, H. A., ... & Baier, H. (2013). An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. *Molecular psychiatry*, 18(6), 681-691.

Apéndices

Apéndice A. Protocolo para medir las variables del agua.

1. Medición de la temperatura: cada acuario contó con su propio termómetro, el registro de la temperatura se hizo una vez al día en la mañana diariamente durante cuatro meses.
2. Medición del pH: se tomaron 5 mL de agua del acuario, se adicionaron 5 gotas de la solución de prueba para el pH. Se taparon los tubos de ensayo, se agitaron vigorosamente y después de 5 minutos los resultados se compararon con la tabla colorimétrica para el pH.
3. Medición del amoníaco: se tomaron 5 mL de agua del acuario, se adicionaron 8 gotas del frasco número 1 ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) y 8 gotas del frasco número dos ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). Se taparon los tubos de ensayo, se agitaron vigorosamente y después de 5 minutos los resultados se compararon con la tabla colorimétrica de la concentración de amoníaco.
4. Medición de nitritos: se tomaron 5 mL de agua del acuario, se adicionaron 5 gotas para la prueba de nitrito (NO_2^-) y 10 gotas del frasco número 1 (NO_3^-). Se taparon los tubos de ensayo, se agitaron vigorosamente y después de 5 minutos los resultados se compararon con la tabla colorimétrica de la concentración de nitritos.
5. Medición de nitratos: se tomaron 5 mL de agua del acuario, se adicionaron 5 gotas para la prueba de nitrito (NO_2^-) se adicionaron 10 gotas del frasco número 1 (NO_3^-) y 10 gotas del frasco número 2 (NO_3^-) para la prueba de nitratos. Se taparon los tubos de ensayo, se agitaron vigorosamente y después de 5 minutos los resultados se compararon con la tabla colorimétrica de la concentración de nitratos.

Apéndice B. Guía para la limpieza de los acuarios.**Materiales:**

- Manguera.

- Esponjas.

-Guata.

Reactivos:

-Sal.

-Anticloro.

-Azul de metileno.

-Carbón activado.

-Freshwater master test kit.

Procedimiento:

1. Sacar los peces de cada acuario con cuidado de no lastimarlos en el proceso, no olvidar que están separados por sexo y disponerlos en contenedores con agua que debe estar oxigenada desde el día anterior.
2. Desconectar cada uno de los sistemas de filtración.

3. Introducir la manguera al acuario que se está limpiando, revolver el fondo para que los desechos suban y sean aspirados por la manguera.
4. Sacar el agua de las peceras con la manguera, ya que el mantenimiento se hace cada mes se debe sacar menos de la mitad del agua de cada acuario.
5. Una vez la manguera ha sido usada se debe limpiar con alcohol para evitar cualquier tipo de contaminación entre acuarios.
6. Limpiar las paredes de los acuarios frotándolas con esponjas, cada acuario debe tener su propia esponja evitando contaminación entre acuarios.
7. Sacar la guata del sistema de filtración y cambiarla por una nueva que tendrá una dimensión de 1 metro por 10 centímetros.
8. Conectar el acuario y revisar que el flujo de agua de cada acuario sea constante y fuerte, si no llega a ser así revisar la guata y volverla a acomodar.
9. Agregar 30 g de carbono activado cuyo principio activo durará un mes.
10. Agregar el agua hasta completar el nivel necesario para que el sistema de filtración funcione correctamente.

11. Agregar 20 mL de anticloro a cada acuario mientras se va llenando.
12. Agregar 5 gotas de azul de metileno y 2 cucharadas de sal.
13. Conectar el sistema de filtración y revisar que funcione adecuadamente.
14. Observar que el sistema funcione durante 10 minutos, mediante el Freshwater master test kit comprobar que las variables de temperatura, pH, amoníaco, nitritos y nitratos estén en los niveles viables para los peces.
15. Pasar los peces a cada uno de los acuarios, revisando durante 15 minutos que no presenten ningún cambio de comportamiento.

Apéndice C. Análisis fenotípico moléculas THQ

1. Análisis fenotípico molécula THQ-01.

Tabla 1.

Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 300 μ M, 225 μ M, 150 μ M y 75 μ M de la molécula THQ-01 con el error estándar de la media para cinco réplicas (N = 5) analizados por el software DanioScope TM.

Área (μm^2)	Concentración (μM)				
	Promedio del control	300	225	150	75
Mandíbula	4.525,42	3.913,76	4.427,01	4.496,76	4.516,32
p	-	0.09	0.99	1.00	1.00
Ojo	69.965,46	64.797,27	66.243,42	67.818,18	66.547,69
p	-	0.49	0.74	0.94	0.79
Pericardio	32.089,09	33.193,60	30.825,72	31.016,00	32.018,09
p	-	0.92	0.87	0.92	1.00

Resultados analizados mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$.

2. Análisis fenotípico molécula **THQ-02**.

Tabla 2.

*Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 300 μM , 225 μM , 150 μM y 75 μM de la molécula **THQ-02** con el error estándar de la media para cinco réplicas ($N = 5$) analizados por el software DanioScope TM.*

Área (μm^2)	Concentración (μM)				
	Promedio del control	300	225	150	75
Mandíbula	4.525,42	4.642,94	4.294,22	4.400,29	4.383,79
p	-	0.98	0.86	0.98	0.97
Pericardio	32.089,09	36.416,61	31.836,76	31.191,03	32.223,92
p	-	0.17	1.00	0.98	1.00
Saco vitelino	344.686,25	266.969,09	284.517,35	309.909,06	333.200,91
p	-	0.08	0.22	0.67	0.98

Resultados analizados mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$.

3. Análisis fenotípico molécula **THQ-03**.

Tabla 3.

*Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 200 μM , 125 μM , 100 μM y 50 μM de la molécula **THQ-03** con el error estándar de la media para cinco réplicas ($N = 5$) analizados por el software DanioScope TM.*

	Concentración (μM)				
	Promedio del control	200	125	100	50
Longitud del cuerpo (μm)	3.730,00	3651,99	3.960,46	3.900,95	3.886,41
p	-	0.86	0.11	0.31	0.38
Área de la mandíbula (μm^2)	4.525,42	4.115,35	4.263,23	4.183,31	4.443,48
p	-	0.52	0.82	0.66	0.99

Tamaño del saco vitelino (μm^2)	344.686,25	305.106,22	333.355,63	343.136,73	319.535,61
p	-	0.45	0.98	1.00	0.79

Resultados analizados mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$.

4. Análisis fenotípico molécula **THQ-05**.

Tabla 4.

*Promedio de las estructuras medidas en los embriones (96 hpf) expuestos a 200 μM , 125 μM , 100 μM y 50 μM de la molécula **THQ-05** con el error estándar de la media para cinco réplicas ($N = 5$) analizados por el software *DanioScope TM*.*

	Concentración (μM)				
	Promedio del control	200	125	100	50
Longitud del cuerpo (μm)	3.730,00	3.668,34	3.759,42	3.703,34	3649,64
p	-	0.92	0.99	0.99	0.83
Área de la mandíbula (μm^2)	4.525,42	3.858,51	4.241,11	4.306,62	4.382,83
p	-	0.30	0.88	0.94	0.98
Área del pericardio (μm^2)	32.089,09	33.048,01	32.560,81	30.568,37	31.045,07
p	-	0.94	0.99	0.78	0.92
Tamaño del saco vitelino (μm^2)	344.686,25	354.659,20	349.795,10	345.665,36	355.948,53
p	-	0.98	0.99	1.00	0.97

Resultados analizados mediante el test ANOVA (una vía) y mediante el test de Dunnett (2 colas) comparando cada concentración con el grupo control y considerando una diferencia significativa $p < 0.05$.