



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la toxicidad y las propiedades ópticas de sondas luminiscentes en cultivos celulares y el pez cebra

Estudo da toxicidade e as propiedades ópticas de sondas luminiscentes en cultivos celulares e no peixe cebra

Study of the toxicity and optical properties of luminiscent probes in cell culture and in zebrafish



Antía Freire García

Curso: 2020 - 2021. Convocatoria: Julio

Directoras: *Mónica Folgueira Otero*
Tamara Hermida Gómez

TRABAJO DE FIN DE GRADO

La Dra. Mónica Folgueira Otero y la Dra. Tamara Hermida Gómez autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Grado *Estudio de la toxicidad y las propiedades ópticas de sondas luminiscentes en cultivos celulares y el pez cebra* presentado por Antía Freire García para a su defensa ante el tribunal cualificador.

HERMIDA
GOMEZ,
TAMARA
(FIRMA)

Firmado digitalmente por HERMIDA
GOMEZ, TAMARA (FIRMA)
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=47355722X,
sn=HERMIDA,
givenName=TAMARA, cn=HERMIDA
GOMEZ, TAMARA (FIRMA)
Fecha: 2021.07.22 16:12:00 +02'00'

Asdo: Mónica Folgueira Otero

Asdo: Tamara Hermida Gómez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras, la Dra. Mónica Folgueira Otero y la Dra. Tamara Hermida Gómez, por haberme guiado y apoyado en este proyecto. Además, me gustaría dar las gracias al Dr. David Esteban Gómez por su implicación en la parte química de este trabajo. Gracias también a Anabel y a Sara, por la ayuda, las risas y los cafés.

Por otro lado, quiero agradecer a mi familia por todo el apoyo, cariño y paciencia durante estos años. En especial a Mauro, por estar siempre a mi lado, llenando de buenos momentos esta etapa de mi vida.

Finalmente, quiero dar las gracias a mis compañeras y compañeros por todo lo compartido durante estos largos 6 años.

ABREVIATURAS

S1:	Sonda 1 (N-hexil-7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-amino)
S2:	Sonda 2 ((6-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il) amino) hexil) trifenilfosfonio)
TPP⁺	Catión trifenilfosfonio
FET	<i>Fish Embryo Toxicity Test</i>
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
SFB	Suero fetal bovino
P/E	Penicilina/Estreptomicina
hpf	Horas post-fecundación
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión

RESUMEN

La bioimagen es una herramienta fundamental para muchas áreas de la biología y la biomedicina, habiendo grandes avances en este campo en los últimos años. Una de las técnicas más usadas en bioimagen es la microscopía de fluorescencia, haciendo uso de sondas luminiscentes que funcionan como marcadores. En este trabajo se evaluó la biocompatibilidad y las propiedades fluorescentes de dos sondas orgánicas: S1 y S2. Para testar la biocompatibilidad, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de viabilidad celular con fibroblastos de la línea *HFF-1* y estudios de toxicidad *in vivo* en embriones de pez cebra (*Danio rerio*). Las propiedades fluorescentes se analizaron mediante microscopía de fluorescencia convencional y de barrido láser confocal, obteniendo imágenes de la distribución de ambas sondas en embriones y larvas de pez cebra. Los ensayos de viabilidad celular mostraron que ninguna de las sondas produce un efecto citotóxico en la línea *HFF-1*. Sin embargo, en los estudios *in vivo*, S1 provocó un signo de toxicidad aguda (edemas) en los embriones expuestos. En cuanto a la fluorescencia de estas sondas, la señal de S1 se observó exclusivamente en el vitelo, mientras que para S2 se concentró en el corion, en células aisladas de la superficie de los embriones y en células del epitelio olfativo. Estos resultados permitieron descartar S1 como potencial sonda luminiscente, a la vez que resaltaron las propiedades prometedoras de S2 para su aplicación en bioimagen.

Palabras clave: bioimagen, sondas luminiscentes, biocompatibilidad, viabilidad celular, pez cebra, microscopía de fluorescencia.

RESUMO

A bioimaxe é unha ferramenta fundamental para moitas áreas da bioloxía e a biomedicina, habendo grandes avances neste campo nos últimos anos. Unha das técnicas máis empregadas en bioimaxe é a microscopía de fluorescencia, facendo uso de sondas luminiscentes que funcionan como marcadores. Neste traballo avaliáronse a biocompatibilidade e as propiedades fluorescentes de dúas sondas orgánicas: S1 e S2. Para probar a biocompatibilidade, leváronse a cabo probas de viabilidade celular *in vitro* con fibroblastos da liña *HFF-1* e estudos de toxicidade *in vivo* en embrións de peixe

cebra (*Danio rerio*). As propiedades fluorescentes analizáronse mediante microscopía de fluorescencia convencional e de varrido láser confocal, obtendo imaxes da distribución de ambas sondas en embrións e larvas de peixe cebrá. Os ensaios de viabilidade celular mostraron que ningunha das sondas produce un efecto citotóxico na liña *HFF-1*. Non obstante, en estudos *in vivo*, S1 causou un signo de toxicidade aguda (edema) en embrións expostos. En canto á fluorescencia destas sondas, o sinal de S1 observouse exclusivamente na xema, mentres que para S2 se concentrou no corion, en células illadas da superficie dos embrións e nas células do epitelio olfactivo. Estes resultados permitiron descartar S1 como potencial sonda luminiscente, ao tempo que destacaron as propiedades prometedoras de S2 para a súa aplicación en bioimaxe.

Palabras chave: bioimaxe, sondas luminiscentes, biocompatibilidade, viabilidade celular, peixe cebrá, microscopía de fluorescencia.

ABSTRACT

Bioimaging is a fundamental tool for many areas of biology and biomedicine, having undergone great advances in recent years. One of the most used techniques in bioimaging is fluorescence microscopy, making use of luminescent probes that function as markers. In this work, biocompatibility and fluorescent properties of two organic probes were evaluated: S1 and S2. For testing biocompatibility, *in vitro* cell viability tests were performed with fibroblasts of the *HFF-1*, as well as *in vivo* toxicity studies with zebrafish embryos (*Danio rerio*). For testing the fluorescence properties, conventional and confocal laser scanning fluorescence microscopy was used to obtain images of the distribution of both probes in zebrafish embryos and larvae. Cell viability assays showed that none of the probes produced a cytotoxic effect on the *HFF-1* line. However, *in vivo* studies showed that S1 caused acute toxicity (edema) in exposed embryos. Regarding the fluorescence of these probes, it was determined that S1 signal is located exclusively in the yolk, while S2 was concentrated in the chorion, in isolated cells from the surface of the embryos and in cells of the olfactory epithelium. All these results led to excluding S1 as a

potential luminescent probe, while highlighting the promising properties of S2 for its application in bioimaging.

Keywords: bioimaging, luminescent probes, biocompatibility, cell viability, zebrafish, fluorescence microscopy.

CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sondas luminiscentes en bioimagen	1
1.2. Estudios de citotoxicidad <i>in vitro</i>	3
1.3. Pez cebra (<i>Danio rerio</i>) como modelo animal para estudios de toxicidad <i>in vivo</i>	4
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
3.1. Estudios de citotoxicidad <i>in vitro</i>	6
3.1.1. Cultivo de línea celular.....	6
3.1.2. Ensayo de viabilidad celular	7
3.2. Estudios <i>in vivo</i> en embriones y larvas de pez cebra	9
3.2.1. Obtención de los huevos fecundados.....	9
3.2.2. Ensayo preliminar de toxicidad y fluorescencia	10
3.2.3. Ensayo de toxicidad de S1 en embriones de pez cebra	10
3.2.4. Estudio de las propiedades fluorescentes de S2	11
3.3. Análisis de los datos obtenidos	12
4. RESULTADOS.....	13
4.1. Ensayos de viabilidad celular en cultivos <i>in vitro</i>	13
4.2. Estudios <i>in vivo</i> en embriones y larvas de pez cebra	14
4.2.1. Ensayos preliminares de toxicidad y fluorescencia.....	14
4.2.2. Estudio de toxicidad de S1	16
4.2.3. Estudio de la fluorescencia de S2.....	17
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES	21
7. BIBLIOGRAFÍA	23
8. ANEXOS	26
8.1. Ensayo de viabilidad celular	26
8.2. Estudios de toxicidad de S1 en pez cebra.....	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sondas luminiscentes en bioimagen

El estudio de diferentes procesos biológicos, trastornos metabólicos y otras enfermedades son áreas de especial importancia dentro de la biomedicina. Un mayor entendimiento de los fenómenos moleculares implicados en ellos es clave para el desarrollo de nuevas estrategias y fármacos que permitan combatir de manera efectiva estas enfermedades. Para conseguir esto, una herramienta fundamental es la bioimagen (Gao *et al.*, 2019). Gracias a ella se puede realizar el seguimiento a tiempo real de procesos moleculares y celulares, cuantificar la presencia de un metabolito, estudiar diversas interacciones a nivel molecular, etc. (Fritzen *et al.*, 2020). El concepto de bioimagen engloba varias técnicas de visualización, que idealmente no deberían ser invasivas ni interferir con los diferentes procesos vitales. Entre estas destacan la microscopía de fluorescencia (en especial la microscopía confocal de barrido láser), la imagen por resonancia magnética (IRM) y la difracción de rayos-X (Chauvin, 2021).

Existen diferentes tipos de compuestos que se pueden emplear como marcadores en bioimagen, dependiendo del método de visualización empleado. Este trabajo se centra en las sondas luminiscentes, que han ganado mucha importancia gracias al desarrollo y mejoras en la microscopía de fluorescencia. Se pueden definir estas sondas como sistemas moleculares con grupos cromóforos capaces de detectar e indicar diversos factores, como por ejemplo la cantidad de un tipo celular específico, de una molécula implicada en un determinado proceso fisiológico, etc (Dutta *et al.*, 2020). De esta forma es posible recopilar información desde niveles celulares o subcelulares, hasta tejidos y organismos pluricelulares. Las propiedades fotoquímicas más importantes a tener en cuenta en este tipo de compuestos son: a) las longitudes de onda de excitación y de emisión máximas; b) la intensidad de la fluorescencia, que viene dada por su rendimiento cuántico y su coeficiente de extinción molar; c) el tiempo de vida del estado excitado. Estas propiedades, junto con otros factores como la sensibilidad y la especificidad, serán las que determinen la calidad y aplicaciones de una sonda (Kasten, 1999).

Las sondas luminiscentes se pueden clasificar de manera general en función de su naturaleza orgánica o inorgánica (con metales presentes en su estructura). Las orgánicas fueron las primeras en ser estudiadas y aplicadas en imagen óptica, ya que muchas están presentes de forma natural en diferentes organismos. Actualmente, la mayor parte de sondas empleadas siguen perteneciendo a esta categoría (Niu *et al.*, 2020). Dentro de este grupo se encuentran también las dos sondas estudiadas en este trabajo (sonda 1 o S1 y sonda 2 o S2), cuyas estructuras se indican en la *Figura 1*.

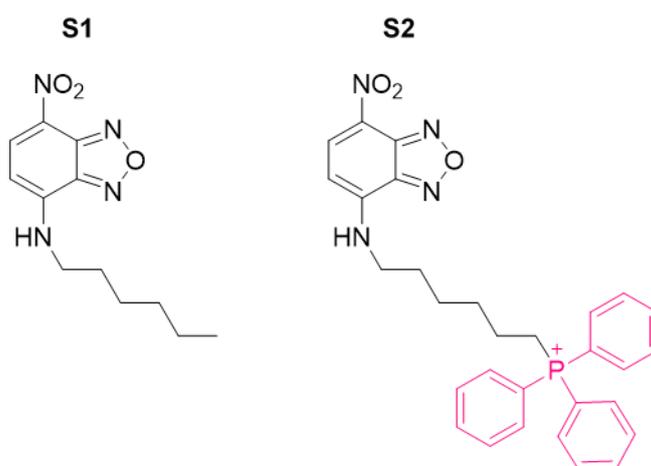


Figura 1: Estructura molecular de la sonda 1 (S1; N-hexil-7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-amino) y de la sonda 2 (S2; (6-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)amino)hexil)trifenilfosfonio), con el grupo TPP⁺ resaltado en rosa.

Las sondas utilizadas en el presente trabajo tienen una estructura muy similar (*Figura 1*), con un grupo aromático responsable de la fluorescencia de estos compuestos y una cadena alifática de 6 carbonos. Se diferencian entre sí únicamente en el grupo trifenilfosfonio (TPP⁺) presente en S2. Ambas fueron sintetizadas como parte del Trabajo de Fin de Grado de Química coordinado con el presente trabajo. En el planteamiento inicial de la síntesis se optó por incorporar el grupo TPP⁺ por sus interesantes aplicaciones en estudios mitocondriales, ampliamente reportadas en bibliografía (Murphy, 2008). Tanto la membrana plasmática como la membrana mitocondrial interna presentan un potencial negativo en su interior, lo que favorece la internalización de compuestos catiónicos lipófilos de pequeño tamaño a favor de gradiente electroquímico. Uno de los cationes lipófilos más empleados en el transporte mitocondrial es precisamente el TPP⁺, gracias a su elevada estabilidad en

sistemas biológicos y su baja reactividad en sistemas celulares, lo que favorece una citotoxicidad baja (Zielonka *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2011).

En un futuro, ambas sondas podrían incorporarse a la estructura de nuevas sondas inorgánicas con metales, mejorando así sus propiedades fotoquímicas. Estas sondas luminiscentes inorgánicas consistirían en complejos de coordinación, donde un átomo metálico central se enlaza con ligandos de naturaleza orgánica a su alrededor. Entre estos compuestos destacan los complejos con metales lantanoides, especialmente aquellos con elementos como el europio o el terbio (Chauvin, 2021). Las ventajas de usar estos metales en sondas luminiscentes son sus excepcionales propiedades ópticas: a) bandas de emisión intensas y estrechas; b) tiempos de vida del estado excitado elevados, que permiten suprimir el efecto de la autofluorescencia de fondo; c) una alta fotoestabilidad a lo largo del tiempo (Yongsheng Liu *et al.*, 2013). Otro aspecto interesante de estas sondas es la posibilidad de alterar sus propiedades químicas modificando los ligandos que las conforman, pudiendo así diseñar complejos que presenten un comportamiento determinado (Hamon *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2017).

1.2. Estudios de citotoxicidad *in vitro*

El primer paso para evaluar la biocompatibilidad de cualquier compuesto con potencial uso en sistemas biológicos son los estudios de citotoxicidad o viabilidad celular *in vitro*. Estos permiten determinar si un compuesto de interés tiene efectos citotóxicos que puedan producir la muerte o dañar a un cultivo celular. Para llevar a cabo estos estudios de viabilidad celular se puede recurrir a diferentes métodos, entre los que se pueden destacar: a) el recuento de células con colorantes vitales; b) la detección de enzimas señaladoras de estrés o de ciertos productos metabólicos; c) la citometría de flujo; d) el seguimiento de la transformación de sustratos enzimáticos (Riss *et al.*, 2016).

En la actualidad, los métodos más utilizados se basan en medir la transformación de un reactivo añadido al medio de cultivo, que tiene lugar como consecuencia de la actividad metabólica de las células viables. Normalmente se emplean reactivos que dan lugar a productos fluorescentes o coloreados. Los dos métodos de este tipo más destacados son los ensayos de reducción de sales de tetrazolio, como por ejemplo los MTT y WST, y los de

reducción de la resazurina (Präbst *et al.*, 2017). Este último fue el empleado en el presente trabajo (kit comercial *PrestoBlue*®).

1.3. Pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal para estudios de toxicidad *in vivo*

En muchas áreas de la biomedicina los ensayos *in vivo* son un componente crucial en gran parte de los estudios realizados. En estos ensayos se recurre a diferentes modelos animales, entre los que destaca el pez cebra (*Danio rerio*; *Figura 2*).



Figura 2: Fotografía de dos individuos de *Danio rerio*.

Este modelo presenta una serie de ventajas que lo convierten en una alternativa viable a los modelos de roedores usados en pruebas de toxicidad y otras investigaciones biológicas en vertebrados. El mantenimiento de los peces cebra es más sencillo y económico, y además presentan un desarrollo más rápido y tasas de reproducción mayores que los roedores. A mayores, se trata de uno de los modelos de vertebrados más fácilmente modificables genéticamente (Garcia *et al.*, 2016). Sin embargo, gran parte del éxito de este modelo animal proviene de su desarrollo embrionario, ilustrado en la *Figura 3*.

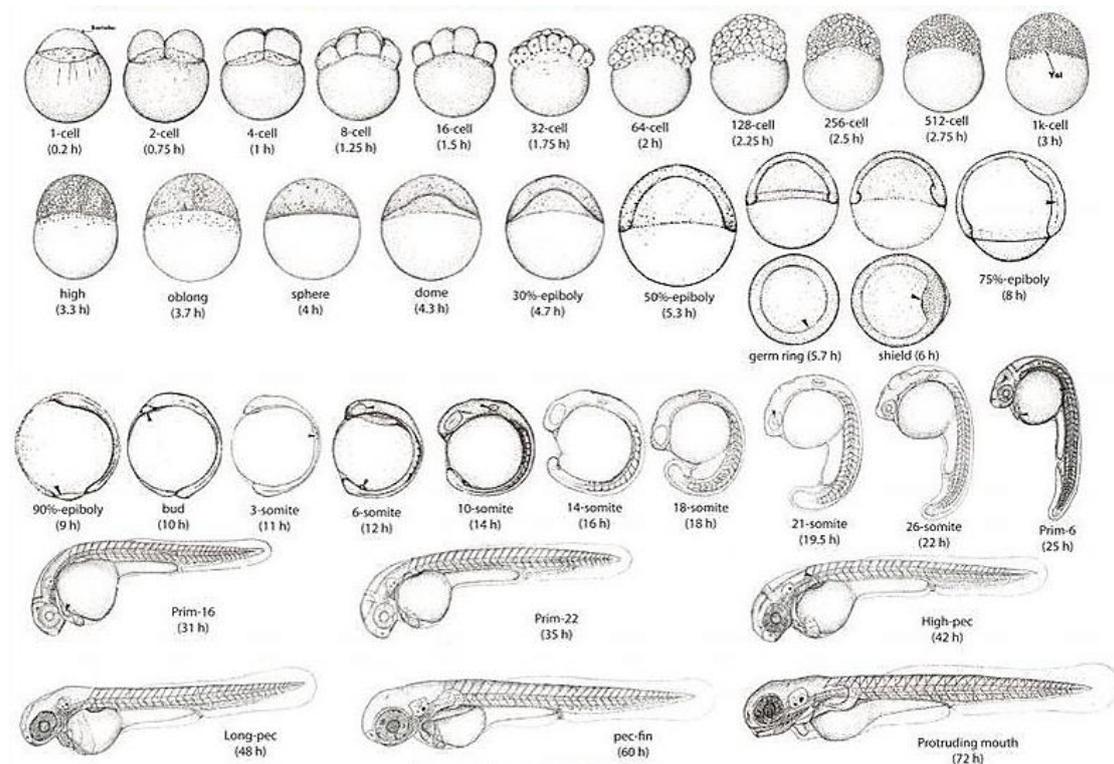


Figura 3: Estadios del desarrollo embrionario de *Danio rerio* (Kimmel *et al.*, 1995).

Los embriones de pez cebra son transparentes y se desarrollan externamente de forma rápida. Esto facilita la realización de observaciones morfológicas y el uso de técnicas no invasivas de bioimagen para estudiar las consecuencias de tratamientos químicos o manipulaciones genéticas (MacRae *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2011). Además, como vertebrado, el genoma del pez cebra tiene un elevado grado de conservación con el de mamíferos, y varias de las características anatómicas y fisiológicas de estos peces son altamente homólogas a las de humanos. Es más, muchos de los fármacos empleados en el tratamiento de enfermedades en humanos tienen efectos comparables en los embriones de pez cebra (Strähle y Grabher, 2010).

Para el análisis de compuestos químicos se recurre habitualmente a los test de toxicidad aguda en embriones (FET; (OECD, 2013), igual de efectivos que los test de toxicidad aguda en peces adultos, pero sin los problemas y complicaciones derivadas de las normativas de experimentación animal (Lammer *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

En este trabajo se pretende llevar a cabo una evaluación preliminar del comportamiento como sondas luminiscentes de los dos compuestos sintetizados (S1 y S2), y así determinar su posible utilidad. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Evaluar la citotoxicidad de ambos compuestos *in vitro* en cultivos de la línea celular *HFF-1*.
2. Determinar la toxicidad de las dos sondas *in vivo* realizando ensayos con embriones de pez cebra (*Danio rerio*).
3. Analizar las propiedades fluorescentes de ambas sondas, junto con su internalización y distribución en embriones de pez cebra.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Estudios de citotoxicidad *in vitro*

3.1.1. Cultivo de línea celular

Para evaluar la citotoxicidad de las sondas 1 y 2 se empleó una línea celular inmortalizada comercial *HFF-1* (*Human Foreskin Fibroblasts*; ATCC SCRC-1041) de fibroblastos de prepucio humano (*Figura 4*). Esta línea celular fue cultivada en medio *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Lonza, España) suplementado con un 20% de suero fetal bovino (SFB; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, EE. UU.) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/E; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, EE. UU.), y mantenida en condiciones estándar a 37°C y 5% de CO₂ en una estufa de cultivo (*Steri-Cult CO₂ Incubator HEPA Class 100*, *Termo Electron Corporation*, Madrid).

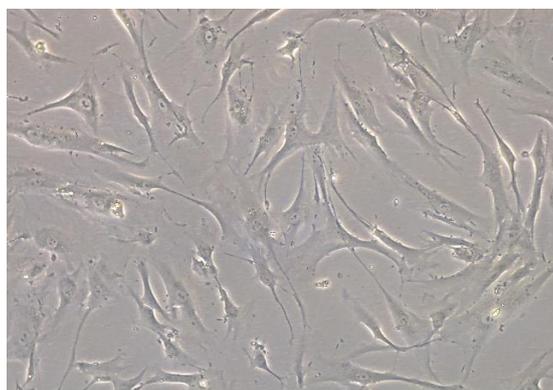


Figura 4: Fibroblastos de la línea celular *HFF-1* ATCC SCRC-1041.

Las células para llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular se obtuvieron mediante un protocolo estándar de subcultivo celular. En primer lugar se eliminó el medio de cultivo y se realizó un lavado con suero salino (*Fresenius Kabi*, España). A continuación se añadió tripsina (2X, 37°C durante 3-5min; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, EE. UU.), una enzima que permite eliminar las adhesiones de las células a la placa de cultivo, desprendiéndolas de su superficie. Posteriormente se inactivó esta enzima empleando suero Ringer Lactato (*Grifols*, España) y se centrifugó esta suspensión a 800 xg durante 10min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en 10mL de Ringer Lactato para proceder al recuento celular en la cámara de conteo Neubauer (*Marienfeld*, Alemania). Finalmente, se centrifugó de nuevo y se resuspendió el precipitado celular en medio de cultivo *DMEM* 20% de SFB y 1% P/E en una proporción de un millón de células por mililitro de medio.

Las células se sembraron en una placa de 48 pocillos (*Corning Incorporated*, EE. UU.) a razón de 20.000 células por pocillo, con un volumen final de 500 μ L de medio en cada uno. Se sembraron dos pocillos por cada concentración a testar y por cada una de las sondas, así como uno de control negativo por réplica al que no se añade la sonda. Se incubaron durante un período de 24h a 37°C, transcurrido el cual se procedió a iniciar el ensayo de viabilidad celular.

3.1.2. Ensayo de viabilidad celular

En base a la bibliografía encontrada (*Guo et al.*, 2018; *Jiang et al.*, 2017) se decidió testar el efecto de 5 concentraciones diferentes para ambas sondas: 1, 2, 5, 10 y 20 μ M. Se realizaron dos réplicas de cada concentración y un control negativo por réplica, al que no se le añadió ningún compuesto (únicamente contiene los fibroblastos con el medio de cultivo). Una vez más, se incubaron durante 24h a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se añadió en cada pocillo 180 μ L de medio de cultivo y 20 μ L del reactivo *PrestoBlue® Viability Reagent* (*ThermoFisher Scientific*, EE. UU.). Este reactivo es una solución de resazurina (de color azul), que se reduce a resorufina (de color rojo) en el entorno reductor

citosólico de las células viables debido a su actividad metabólica (*Figura 5*). Como resultado se produce un cambio en la absorbancia de las muestras.

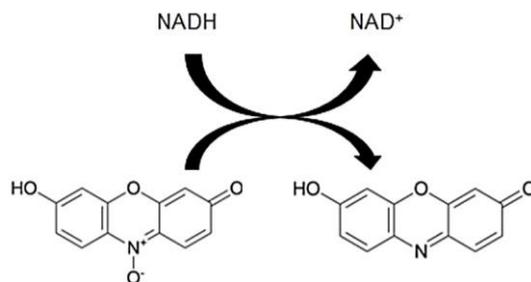


Figura 5: Esquema de la reducción de la resazurina a resorufina en células viables (Riss *et al.*, 2016).

Gracias a esto se puede emplear como un indicador de viabilidad celular detectable mediante medidas espectrofotométricas. Unos valores altos de absorbancia se corresponderán con una elevada viabilidad celular, que se puede determinar siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial (*Product Sheet: PrestoBlue Cell Viability Reagent*, 2019)

Se preparó además un blanco por réplica, añadiendo en cada pocillo únicamente medio de cultivo y el *PrestoBlue*[®], sin fibroblastos, y se incubó la placa durante 1h en oscuridad a 37°C. La distribución de los distintos tratamientos en la placa se representa en la *Figura 6*.

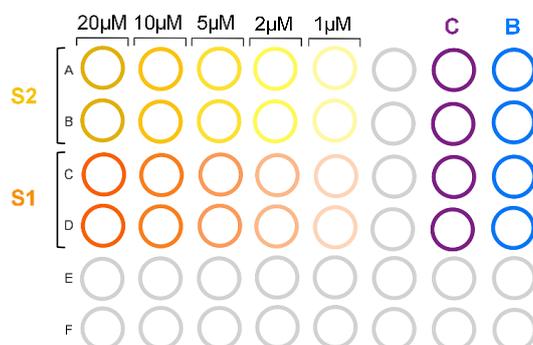


Figura 6: Esquema de la distribución de la placa original de cultivo de 48 pocillos para los ensayos con *PrestoBlue*[®], en el que se indican las posiciones de las disoluciones de distintas concentraciones de la sonda 1 (S1) y la sonda 2 (S2), así como los controles negativos (C) y los blancos (B).

Transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo un traspaso a una placa de 96 pocillos, dividiendo el contenido de cada pocillo de la placa original (de 48 pocillos) entre dos pocillos (100 µL por pocillo). De esta forma se

obtuvieron dos duplicados por cada pocillo de la placa original, tal y como se indica en la *Figura 7*.

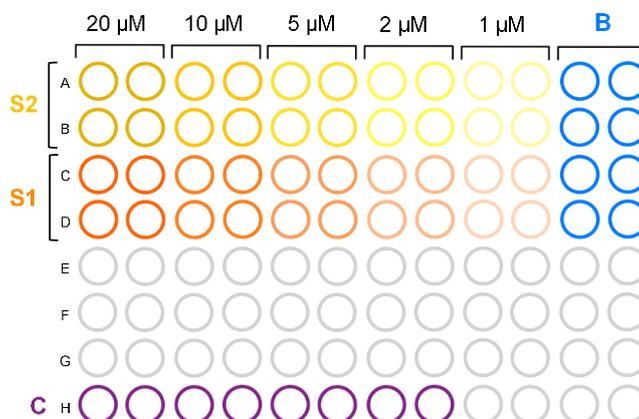


Figura 7: Esquema de la placa de 96 pocillos empleada para los ensayos con *PrestoBlue*[®], en el que se ilustra la disposición de las distintas concentraciones de las dos sondas (S1 y S2), junto con los blancos (B) y los controles negativos (C).

Finalmente, se mide la absorbancia a 570nm y 600nm (según indica el fabricante) de cada pocillo con un lector espectrofotométrico de placas SinergyHTX (*Biotek*, EE. UU.). Para la lectura y procesamiento de los valores obtenidos se emplea el programa informático *Gen5*.

3.2. Estudios *in vivo* en embriones y larvas de pez cebra

3.2.1. Obtención de los huevos fecundados

Todos los experimentos en este trabajo se llevaron a cabo conforme a la normativa de experimentación animal recogida en el RD 53/2013 y la Directiva 10/63/UE. Los ensayos *in vivo* se realizaron en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) de la línea salvaje *Tupfel long fin* (TL) mantenidos en un sistema de acuarios comercial (Aquanearing) en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) bajo condiciones estándar de 28°C de temperatura y ciclo de luz (14 horas de luz/ 10 horas oscuridad).

La tarde anterior a la puesta se trasladaron a peceras de cría ejemplares adultos hembras y machos en una proporción 2:1, respectivamente. Estas peceras se llenaron con el agua del sistema de acuarios donde se mantienen a estos individuos. A la mañana siguiente, tras el período de oscuridad, el estímulo luminoso desencadena la liberación de los oocitos y del espermatozoides, y tiene lugar la fecundación. Los huevos fueron recogidos con un tamiz de malla

y depositados en placas Petri (una placa por puesta) con agua del acuario, para ser examinados con un estereomicroscopio (Nikon SMZ 1500). De esta forma se seleccionaron aquellos que hayan sido fecundados.

3.2.2. Ensayo preliminar de toxicidad y fluorescencia

Se realizó una prueba inicial para evaluar el carácter tóxico de las dos sondas en los embriones, así como sus propiedades fluorescentes. Para ello, en base a los ensayos de citotoxicidad *in vitro* previamente realizados, se decidió testar la concentración más elevada para ambas sondas (20 μM) junto con un control negativo con agua desclorada autoclavada (pH= 7.2, κ = 470 μS). Se emplearon placas de 4 pocillos (*Nuclon™ Delta Surface; ThermoFisher Scientific*, EE. UU.), donde se colocaron 12 embriones por pocillo en estadios de segmentación entre las 64 y las 256 células.

Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad y se examinó el estado de los embriones bajo el estereomicroscopio cada 24h hasta las 96h, para identificar los 5 signos indicativos de toxicidad aguda según las directrices del *Fish Embryo Toxicity Test (FET)* de la OECD (OECD, 2013). Estos son: 1) coagulación de huevos fecundados; 2) ausencia de la formación de somitas; 3) la falta de separación entre el vitelo y la cola del embrión; 4) aparición de edemas; 5) la falta de latido del corazón a partir de la 48 horas post-fecundación (hpf). Además, se empleó un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600FN; λ_{ex} = 450-490 nm, filtro para la emisión de 520 nm) para observar el carácter fluorescente de cada sonda, así como su localización en el embrión. Tras las 96h de ensayo, los individuos se eutanasiaron sometiéndolos a una dosis elevada del anestésico tricaina metanosulfonato (MS-222, 150mg/mL; *Sigma-Aldrich*, EE. UU.) y a un periodo a -20°C.

3.2.3. Ensayo de toxicidad de S1 en embriones de pez cebra

Se evaluó la toxicidad de cuatro de las concentraciones empleadas en el ensayo de viabilidad celular de S1 (2, 5, 10 y 20 μM) siguiendo una modificación del FET de la OECD (OECD, 2013). Al igual que en el estudio preliminar anterior, se utilizaron placas de 4 pocillos con un volumen final de 500 μL y 12 embriones por pocillo (estadios iniciales de 8-64 células). Se prepararon 4 réplicas para cada tratamiento, junto con 4 controles negativos

(cada réplica procedente de una puesta distinta). Las placas fueron incubadas a 28°C en oscuridad y cada 24h se contabilizaron los individuos que presentaban algún signo de toxicidad aguda, hasta las 96hpf. Transcurrido este período, se eutanasiaron de nuevo con tricáína, seguida de congelación.

El porcentaje de mortalidad en cada caso se calculó según la *Ecuación 1*.

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{n^{\circ} \text{ indiv. muertos}}{n^{\circ} \text{ total indiv.}} \cdot 100 \quad (1)$$

3.2.4. Estudio de las propiedades fluorescentes de S2

Se testó únicamente la concentración de 20 μM con el objetivo de analizar tanto la distribución como la fluorescencia de S2 en los estadios del desarrollo de los embriones entre 24 y 96 horas post-fecundación (hpf). Para ello, se repitió el procedimiento de los ensayos anteriores, preparando 4 pocillos a esta concentración junto con un control negativo. Cada uno de los pocillos contaba con 12 embriones (estadios iniciales de 8-64 células) y un volumen final de 500μL. Fueron incubados a 28°C en oscuridad hasta un total de 96h, tras las que fueron eutanasiados.

Los individuos se observaron cada 24 horas bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600FN; λ_{ex} = 450-490 nm, filtro para la emisión de 520 nm) equipado con un objetivo Nikon Plan Fluor 10x. Además, embriones de 24hpf y 48hpf se trasladaron a la Facultad de Ciencias, donde se traspasaron a portaobjetos excavados y se anestesiaron con tricáína para facilitar su estudio. Allí se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i; λ_{ex} = 465-500 nm, λ_{em} = 515-555 nm), equipado con una cámara digital (Olympus) y objetivos Nikon Plan Fluor 4x y 10x. Por último, se montaron embriones de 96hpf en pocillos en placas Petri para microscopía (*Glass Bottom Dish* 35mm, Ibidi) con agarosa de bajo punto de fusión (A9045, Sigma) al 1% y agua del sistema. Estos embriones fueron estudiados utilizando un microscopio confocal de barrido láser NIKON A1R (Servicios de Apoyo a la Investigación o SAI), obteniendo imágenes en campo claro y de emisión de fluorescencia. Las muestras se sometieron a longitudes de onda de excitación láser de 402, 488 y 561 nm. La emisión de fluorescencia se detectó seleccionando los rangos de longitudes de onda que son recogidas en cada

fotomultiplicador (λ_{em} de 425-475 nm, 500-550 nm y 570-620 nm, respectivamente), correspondiéndose cada uno a un canal. Se realizaron secciones ópticas de los embriones que fueron procesadas posteriormente mediante el software ImageJ (Fiji; Schindelin *et al.*, 2012).

3.3. Análisis de los datos obtenidos

Una vez calculados los porcentajes de viabilidad celular y de mortalidad en pez cebra, se identificaron y eliminaron los datos anómalos presentes empleando un test de Grubbs al 95% de confianza (Miller *et al.*, 2002), utilizando el software Microsoft Excel.

A continuación, se comprobó que los datos anteriores perteneciesen a una población con distribución normal mediante un test de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965), realizado en la interfaz *R Commander* empleando el paquete *MASS 7.3-51.4*. Este es un requisito para poder utilizar los test estadísticos aplicados posteriormente.

En el caso de los ensayos *in vitro*, se llevó a cabo un análisis estadístico para evaluar si los valores de viabilidad celular asociados a las concentraciones estudiadas de cada sonda presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Para esto, se empleó el test paramétrico de análisis de la varianza (ANOVA). Este test se realizó según lo sugerido en la bibliografía (Miller *et al.*, 2002) con el paquete de herramientas para análisis de datos de Microsoft Excel. Finalmente, para comparar los resultados de ambas sondas entre sí se recurrió a la prueba t-Student de comparación de medias, unilateral y para muestras independientes de varianzas homogéneas (Miller *et al.*, 2002), trabajando a un nivel de confianza del 95%. Para este test se empleó también el software Microsoft Excel.

En los ensayos *in vivo* se aplicó también el mismo test t-Student para evaluar las diferencias de mortalidad entre las distintas concentraciones estudiadas. Además, a partir los datos obtenidos se determinó la LC50, es decir, la concentración que provoca la muerte del 50% de los embriones trascurrido el período total de exposición (96hpf). Para calcularlo se emplearon los métodos de regresión logística binaria Logit (Minja *et al.*, 1993) y Probit (Green *et al.*, 2018).

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos de viabilidad celular en cultivos *in vitro*

Se calculó el porcentaje de viabilidad celular para cada uno de los tratamientos a partir de las medidas de absorbancia realizadas, tal y como se indica el protocolo comercial (*Product Sheet: PrestoBlue Cell Viability Reagent*, 2019). Como se realizaron réplicas de cada condición ensayada, se calcularon también los valores de viabilidad celular promedio para cada una, junto con sus desviaciones estándar.

En la *Figura 8* se muestran las representaciones gráficas de los resultados obtenidos para S1 y S2. Ninguna de las dos sondas presentó una toxicidad significativa para ninguna de las concentraciones ensayadas. Además, no parece haber diferencias importantes entre los distintos tratamientos tanto con S1 como con S2. Esto se vio confirmado con los test ANOVA realizados (*Tablas 5 y 6, Anexos*), que concluyeron que no había diferencias estadísticamente significativas entre los valores de viabilidad obtenidos para cada sonda.

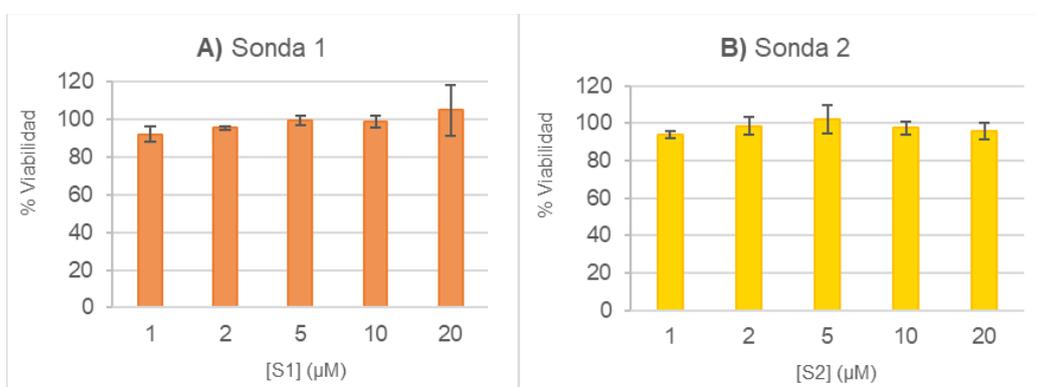


Figura 8: Efecto promedio sobre la viabilidad de las células *HFF-1* de las distintas concentraciones de S1 (A) y de S2 (B), determinado mediante el ensayo con *PrestoBlue®*. Las barras de error representan la desviación estándar de los cuatro replicados realizados para cada tratamiento.

Tampoco se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular para ambas sondas (*Figura 9*), tal y como confirman las pruebas t-Student aplicadas. Todos los p-valores calculados (*Tabla 7, Anexos*) superan el nivel de significancia fijado ($\alpha > 0,05$).

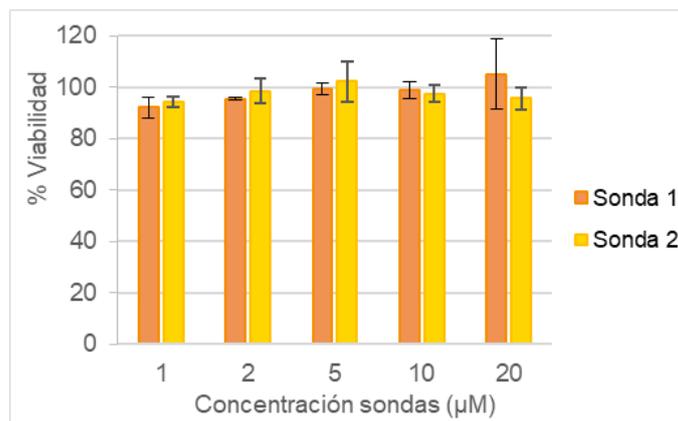


Figura 9: Comparación del efecto en la viabilidad de las células *HFF-1* de las dos sondas estudiadas (**S1** y **S2**). Las barras de error representan las desviaciones estándar correspondientes a los replicados realizados para cada tratamiento.

Los resultados numéricos correspondientes a las gráficas anteriores (*Figuras 8 y 9*) y al análisis estadístico realizado se encuentran en las *Tablas 2-7* del apartado Anexos.

4.2. Estudios *in vivo* en embriones y larvas de pez cebra

4.2.1. Ensayos preliminares de toxicidad y fluorescencia

En el tratamiento con la sonda S1 (20 µM) no se encontraron signos de toxicidad aguda durante las primeras 24hpf. Sin embargo, se identificó la aparición de edemas en la región pericárdica a partir de las 48hpf, incrementándose su incidencia y tamaño con el transcurso del tiempo (*Figura 10*). Este fue el único signo de toxicidad aguda observado, si bien también se detectó un retraso de la eclosión en comparación con los embriones del control negativo. En base a estos resultados, se procedió a testar la toxicidad de varias concentraciones de S1 (apartado 4.2.2).

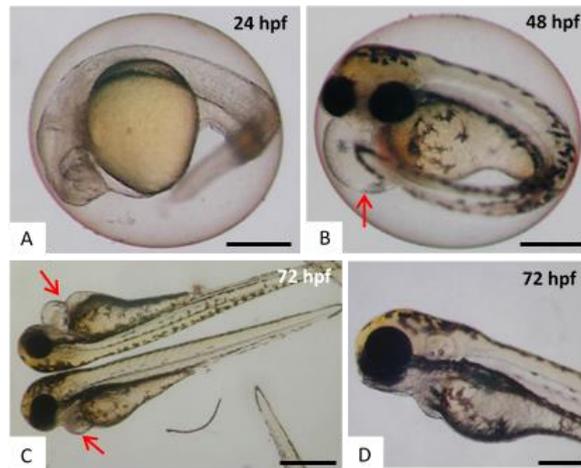


Figura 10: Fotografías de embriones de pez cebra (*Danio rerio*) en distintos estadios observados en el estereomicroscopio. A) 24hpf en disolución de S1 20 μ M. B) 48hpf en disolución de S1 20 μ M. C) 72hpf en disolución de S1 20 μ M. D) Control negativo a 72hpf. Las flechas rojas señalan los edemas. Barras de escala: 250 μ m (A, B), 400 μ m (C), 200 μ m (D).

Al estudiar los embriones expuestos a S1 a las 24hpf bajo el microscopio de fluorescencia, estos presentaban una fluorescencia verde intensa en el saco vitelino, que persistió durante toda la duración del experimento (*Figura 11*).



Figura 11: Imagen tomada en un microscopio de fluorescencia de embriones de *Danio rerio* (48hpf) sometidos al tratamiento con S1 (20 μ M). Barra de escala: 200 μ m.

Por otro lado, en el ensayo con S2 (20 μ M) no se identificaron signos de toxicidad aguda en los embriones expuestos, en comparación con el control negativo, durante el transcurso del estudio (*Figura 12*).

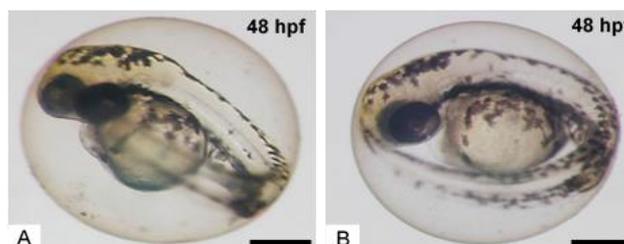


Figura 12: Fotografías de embriones de *Danio rerio* a las 48hpf, observados en el estereomicroscopio. A) Expuesto a S2 (20 μ M). B) Control negativo. Barras de escala: 250 μ m

En cuanto a la fluorescencia, al observar estos embriones a las 24hpf en el microscopio de fluorescencia solamente se encontró fluorescencia verde en el corion que envuelve al embrión. A partir de las 48hpf, además de en la superficie del corion, se observó que la fluorescencia se concentraba también en células aisladas de la superficie corporal y en células del epitelio olfativo. En base a estos resultados, se llevó a cabo una caracterización más detallada de la expresión de la fluorescencia de esta sonda (ver apartado 4.2.3).

4.2.2. Estudio de toxicidad de S1

Se llevó a cabo un recuento cada 24h de los embriones que presentaban signos agudos de toxicidad (contabilizados como muertos) en cada concentración ensayada y en el control negativo. En la *Figura 13* se representan gráficamente los porcentajes de mortalidad calculados (sumando todas las réplicas) para cada concentración estudiada y en función del tiempo, y sus correspondientes datos numéricos se recogen en la *Tabla 8* (Anexos).

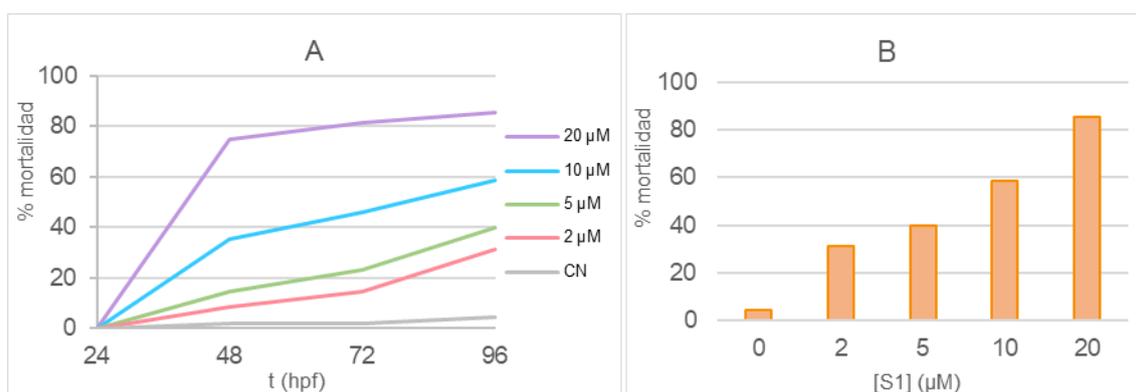


Figura 13: A) Evolución de la tasa de mortalidad a lo largo de la duración del experimento para cada una de las concentraciones de S1 estudiadas (20, 10, 5 y 2 μM) y el control negativo (CN). B) Porcentajes de mortalidad para cada tratamiento a las 96hpf.

Se observó un incremento de la mortalidad con el tiempo de exposición a S1 (*Figura 13*). Así mismo, el impacto de S1 sobre la mortalidad de los embriones de pez cebra aumentó con la concentración de sonda a la que fueron sometidos. Las diferencias en cuanto al porcentaje de mortalidad provocado por cada concentración de S1 son estadísticamente significativas, tal y como demuestran los test t-Student aplicados (p-valores < 0,05; *Tabla 10* en Anexos).

Los datos obtenidos se normalizaron con respecto a los controles negativos, y se determinó la LC50 (ver *Tabla 11* y *Figura 16* en Anexos). De esta forma se obtuvieron los valores de LC50 que se muestran en la *Tabla 1*.

Tabla 1: Valores de LC50 calculados mediante los métodos de regresión Logit y Probit.

	Logit	Probit
LC50 (μM)	7,24	7,47

4.2.3. Estudio de la fluorescencia de S2

Los embriones expuestos a una concentración 20 μM de S2 se examinaron a las 24 y 48hpf en el microscopio de fluorescencia, obteniendo las imágenes de la *Figura 14*.

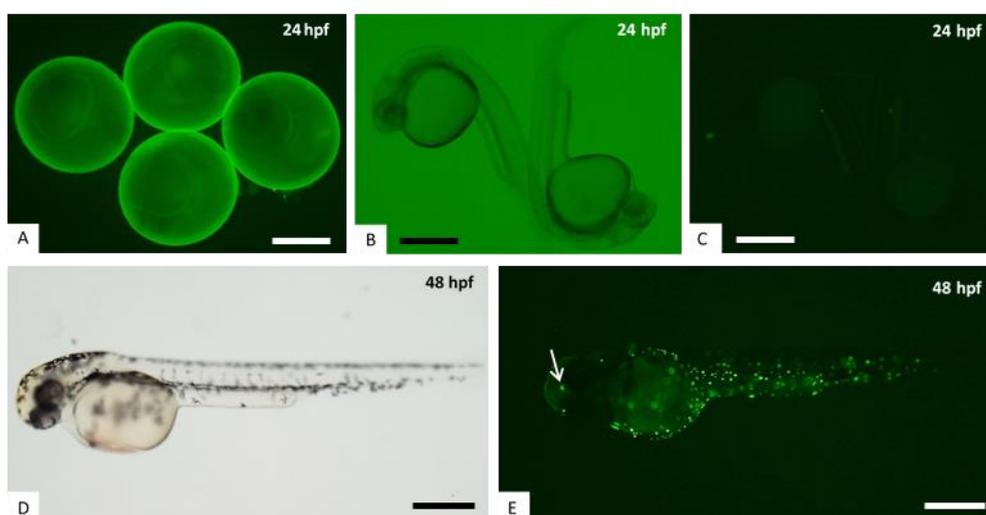


Figura 14: Imágenes tomadas en un microscopio de fluorescencia de embriones de *Danio rerio* expuestos a S2 (20 μM). A) Fluorescencia a las 24hpf. B) Campo claro con fluorescencia a las 24hpf tras retirar el corion, mostrando que no se observa fluorescencia en los embriones. C) Imagen de fluorescencia a las 24hpf tras retirar el corion. D) Imagen de campo claro a las 48hpf. E) Imagen de fluorescencia del mismo embrión mostrado en D, donde se observa células fluorescentes en la superficie corporal y en el epitelio olfativo (flecha). Barras de escala: 500 μm (A), 200 μm (B, C), 400 μm (D, E).

A las 24hpf únicamente se observa fluorescencia el corion (*Figura 14A*). Tras provocar manualmente la eclosión rompiendo el corion bajo un estereomicroscopio con ayuda de pinzas de disección, se observó que los embriones no mostraron ninguna fluorescencia (*Figura 14B-C*). A las 48hpf ya se pueden observar células aisladas con fluorescencia intensa en la superficie

corporal del embrión y en el epitelio olfativo (*Figura 14E*). En los controles negativos no se encontró fluorescencia.

Tras 96hpf se estudió la fluorescencia en los embriones expuestos empleando el microscopio confocal de barrido láser. Se recogió la emisión en los canales azul, verde y rojo, detectándose fluorescencia únicamente en el verde ($\lambda_{em}= 500-550nm$), y se tomaron las imágenes de la *Figura 15*.

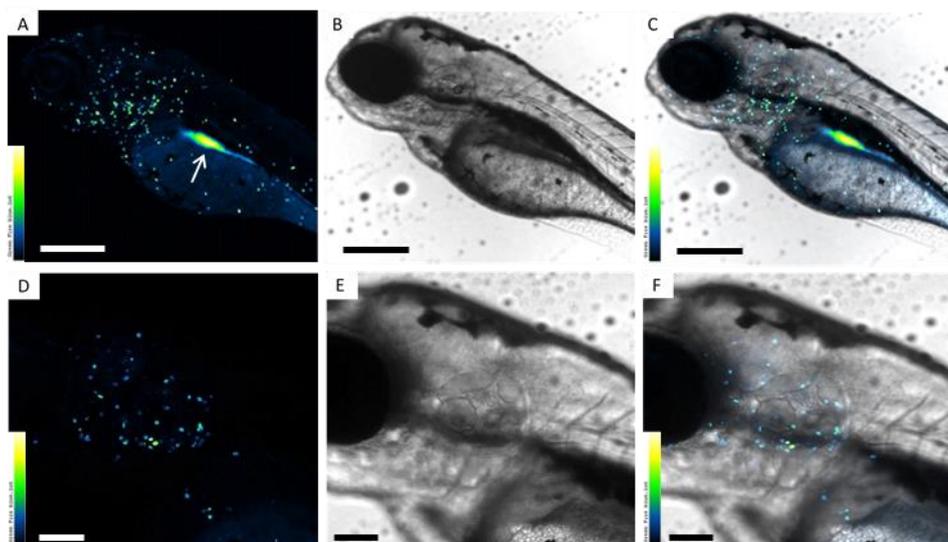


Figura 15: Fotografías tomadas con el microscopio confocal de larvas de pez cebra a las 96hpf. A) Fluorescencia de las células marcadas y del tracto digestivo (flecha). B) Campo claro. C) Superposición de fluorescencia y fondo claro. D) Detalle de células marcadas fluorescentes al nivel del oído interno. E) Detalle en campo claro. F) Detalle de células marcadas en superposición con fondo claro. A la izquierda escala de *Look Up Table* o *LUT* utilizada para la intensidad de la fluorescencia. Barras de escala: 300 μm (A-C), 150 μm (D-F).

Las imágenes de microscopía confocal muestran de forma mucho más nítida y precisa las células marcadas por S2 en la superficie corporal de la larva (*Figura 15*). Además, se observa también una fluorescencia intensa en el tracto digestivo.

5. DISCUSIÓN

La biocompatibilidad es un requisito indispensable para todo aquel compuesto con una potencial aplicación en cualquier ámbito de la biomedicina. Si bien este es un término muy amplio que puede hacer referencia a varias propiedades de una sustancia, en este trabajo se seleccionaron como pruebas

preliminares de la biocompatibilidad un estudio de citotoxicidad *in vitro* y un ensayo de toxicidad *in vivo* en embriones de pez cebra.

En el estudio de citotoxicidad llevado a cabo para las dos sondas (S1 y S2) en fibroblastos *HFF-1*, se pudo demostrar que ninguna de ellas mostró valores de viabilidad inferiores al 90%. En base a estos resultados, se puede determinar que ninguna de las sondas presenta un efecto citotóxico según la normativa ISO para la evaluación biológica de dispositivos médicos (ISO 10993-5, 2009). Esta normativa determina que se puede considerar a una sustancia como citotóxica cuando provoca una reducción en la viabilidad celular de más del 30%.

Los resultados obtenidos para S1 están acorde a los resultados previos descritos en la bibliografía para otras líneas celulares. En un estudio previo (Guo *et al.*, 2018) se evaluó la citotoxicidad de este compuesto, junto con otros análogos, en la línea celular tumoral HeLa. Para todas las concentraciones ensayadas (del mismo orden de las empleadas en este trabajo) se establecieron valores de viabilidad celular superiores al 80%. Las ligeras diferencias entre estos resultados y los descritos en el presente trabajo pueden deberse al uso de distintas líneas celulares, así como a los diferentes kits comerciales empleados para determinar la viabilidad celular de las muestras. En el caso de S2, no se han encontrado precedentes en bibliografía. Aún así, no es de extrañar que esta muestre resultados parecidos a los de S1 dadas las similitudes estructurales de ambos compuestos y la estabilidad biológica aportada por el grupo TPP⁺ (Zielonka *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2011).

En el futuro sería interesante llevar a cabo un estudio *in vitro* de la fluorescencia de estas sondas, que no se ha podido realizar en este trabajo por no disponer de las placas necesarias para microscopía de fluorescencia. Con este estudio se podrían analizar las posibles diferencias en cuanto a la internalización y localización subcelular de ambos compuestos, análogamente a lo realizado en estudios previos (Dutta *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2018). Esto permitiría evaluar si la presencia del grupo trifenilfosfonio (TPP⁺) en S2 supone algún cambio en sus propiedades biológicas, pudiendo por ejemplo facilitar su internalización en las mitocondrias.

En los ensayos *in vivo* con embriones de pez cebra se obtuvieron resultados muy diferentes a los del estudio de citotoxicidad *in vitro*, sobre todo en el caso de S1. Se comprobó que mientras la sonda S2 era inocua a la concentración más elevada, S1 provocaba uno de los signos claros de toxicidad aguda (edemas). Esto no se observó únicamente a la concentración máxima de S1, sino que presentó cierto nivel de toxicidad en todas las concentraciones ensayadas, así como un LC50 relativamente bajo (en torno a 7 μM). Las diferencias entre ambas sondas probablemente sean debidas a la presencia del grupo catiónico TPP⁺ en S2, que podría permitir que esta sonda interaccionase con el organismo de manera distinta a S1. Además, el mayor tamaño de S2 puede estar influyendo en su transporte.

Estas diferencias de comportamiento entre ambas sondas se ven reflejadas en los resultados de los estudios de fluorescencia llevados a cabo, donde se pudo determinar la distribución de ambas sondas en los embriones de pez cebra. Mientras que la sonda S1 se concentraba exclusivamente en el vitelo, S2 se localizaba primero en el corion, y luego también en células aisladas de la superficie corporal y en células del epitelio olfativo. A mayores, a las 96hpf se encontró también S2 en el tracto digestivo de las larvas, debido a la ingestión de la sonda disuelta en el medio. El hecho de que a las 24hpf solo se detectase S2 en el corion, mientras que S1 ya había penetrado en el vitelo, parece indicar un efecto barrera del corion que estaría retrasando el transporte de S2 a través de él (Kais *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2007). Esto puede ser debido a la diferencia de tamaño entre las dos sondas, que favorecería el paso de S1 frente a S2 a través de los poros del corion (Pelka *et al.*, 2017). Por otro lado, la acumulación de S1 en el vitelo puede deberse a su elevado contenido en proteínas y grasas, que interaccionarían con la sonda. En cuanto a S2, una opción sería que estuviese marcando células quimiosensoriales solitarias y células del epitelio olfativo. Otra posibilidad es que esté señalizando algún proceso o mecanismo celular, como es el caso de los marcadores de apoptosis. Si se tratase de esto último, el tegumento de la larva podría estar provocando un efecto barrera, puesto que si la sonda penetrase en el organismo se esperaría encontrar más células en apoptosis marcadas en el

interior. Para analizar esto se podría realizar un estudio de colocación, combinando S2 con otros marcadores fluorescentes específicos.

En base a todo lo anterior, se podría descartar a S1 como potencial sonda luminiscente con aplicaciones en bioimagen. La sonda S2, por otro lado, muestra unas perspectivas prometedoras, gracias a su aparente biocompatibilidad y su especificidad en el marcaje fluorescente, que deberá ser caracterizada en más detalle. Las potenciales aplicaciones de S2 podrían además incrementarse al emplearla en la síntesis de nuevas sondas de complejos de coordinación de lantanoides. Algunos complejos con metales como el europio han demostrado presentar cualidades idóneas para su uso como sondas luminiscentes (Hamon *et al.*, 2020). Tras la síntesis de estos compuestos sería necesario evaluar de nuevo su biocompatibilidad, así como sus propiedades fluorescentes.

6. CONCLUSIONES

La evaluación preliminar de la biocompatibilidad y propiedades fluorescentes de las sondas S1 y S2 permitió establecer las siguientes conclusiones:

1. Ninguna de las dos sondas manifestó un comportamiento citotóxico en los ensayos de viabilidad celular *in vitro* con fibroblastos *HFF-1*.
2. Las pruebas de toxicidad *in vivo* llevados a cabo en embriones de pez cebra desvelaron grandes diferencias en los efectos de ambas sondas. Mientras que S2 no desencadenó ningún signo de toxicidad aguda, S1 provocó la aparición de edemas pericárdicos en los embriones expuestos a esta sonda, incluso a las concentraciones más bajas ensayadas.
3. El estudio *in vivo* de las propiedades fluorescentes de las dos sondas permitió determinar su distribución en los embriones de pez cebra. S1 se concentró únicamente en el vitelo, mientras que S2 se localizó en el corion, en células del epitelio olfativo y en células aisladas de la superficie corporal de los embriones.
4. En vista de todos los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo descartar a S1 como potencial sonda luminiscente. Por el contrario,

S2 presentó propiedades muy prometedoras para su aplicación en bioimagen, tanto por su biocompatibilidad como por su especificidad como marcador fluorescente.

CONCLUSIONES

A avaliación preliminar da biocompatibilidade e propiedades fluorescentes das sondas S1 e S2 permitiu establecer as seguintes conclusións:

1. Ningunha das dúas sondas manifestou un comportamento citotóxico nos ensaios de viabilidade celular *in vitro* con fibroblastos *HFF-1*.
2. As probas de toxicidade *in vivo* levados a cabo en embrións de peixe cebra desvelaron grandes diferenzas nos efectos de ambas sondas. Mentres que S2 non desencadeou ningún signo de toxicidade aguda, S1 provocou a aparición de edemas pericárdicos nos embrións expostos a esta sonda, incluso ás concentracións máis baixas ensaiadas.
3. O estudo *in vivo* das propiedades fluorescentes das dúas sondas permitiu determinar a súa distribución nos embrións de peixe cebra. S1 concentrouse únicamente no vitelo, mentres que S2 se localizou no corion, en células do epitelio olfativo e en células illadas da superficie corporal dos embrións.
4. Á vista de todos os resultados obtidos neste traballo, foi posible desbotar a S1 como potencial sonda luminiscente. Pola contra, S2 presentou propiedades moi prometedoras para a súa aplicación en bioimaxe, tanto pola súa biocompatibilidade como pola súa especificidade como marcador fluorescente.

CONCLUSIONS

The preliminary evaluation of the biocompatibility and fluorescent properties of probes S1 and S2 led to the following conclusions:

1. Neither of the two probes showed any cytotoxic behavior in the *in vitro* cell viability assays done with *HFF-1* fibroblasts.

2. *In vivo* toxicity tests carried out in zebrafish embryos revealed large differences in the effects of both probes. While S2 did not cause any signs of acute toxicity, S1 led to the appearance of pericardial edema in embryos exposed to this probe, even at the lowest tested concentrations.
3. The *in vivo* study of the fluorescent properties of the two probes made it possible to determine their distribution in zebrafish embryos. S1 was focused only in the yolk, while S2 was localized in the chorion, in cells of the olfactory epithelium and in isolated cells from the body surface of embryos.
4. In view of all the results obtained in this project, S1 could be ruled out as a potential luminescent probe. On the contrary, S2 showed very promising properties for its application in bioimaging, both for its biocompatibility and for its specificity as a fluorescent marker.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P., & Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 93(2), 115–133.
- Chauvin, A.-S. (2021). Visible Emitting Lanthanide Ions in Bioimaging *Springer, Cham*. 1–45.
- Dutta, T., Pal, K., & Koner, A. L. (2020). Cellular metabolic activity marker via selective turn-ON detection of transporter protein using nitrobenzoxadiazole-based fluorescent reporter. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–9.
- Fritzen, D. L., Giordano, L., Rodrigues, L. C. V., & Monteiro, J. H. S. K. (2020). Opportunities for persistent luminescent nanoparticles in luminescence imaging of biological systems and photodynamic therapy. In *Nanomaterials* 10(10), 1–38.
- Gao, P., Pan, W., Li, N., & Tang, B. (2019). Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging. *Chemical Science*, 10(24), 6035–6071.
- Garcia, G. R., Noyes, P. D., & Tanguay, R. L. (2016). Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacology & Therapeutics*, 161, 11–21.
- Green, J. W., Springer, T. A., & Holbech, H. (2018). Analysis of Quantal Data. *Statistical Analysis of Ecotoxicity Studies*, 181–217.
- Guo, L., Tian, M., Feng, R., Zhang, G., Zhang, R., Li, X., Liu, Z., He, X., Sun, J. Z., & Yu, X. (2018). Interface-Targeting Strategy Enables Two-Photon Fluorescent

- Lipid Droplet Probes for High-Fidelity Imaging of Turbid Tissues and Detecting Fatty Liver. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(13), 10706–10717.
- Hamon, N., Roux, A., Beyler, M., Mulatier, J.-C., Andraud, C., Nguyen, C., Maynadier, M., Bettache, N., Duperray, A., Grichine, A., Brasselet, S., Gary-Bobo, M., Maury, O., & Tripier, R. (2020). Pyclyen-Based Ln(III) Complexes as Highly Luminescent Bioprobes for In Vitro and In Vivo One- and Two-Photon Bioimaging Applications. *Journal of the American Chemical Society*, 142(22), 10184–10197.
- International Standard ISO 10993-5 (2009). Biological evaluation of medical devices: Test for *in vitro* cytotoxicity.
- Jiang, Y., Zheng, G., Cai, N., Zhang, H., Tan, Y., Huang, M., He, Y., He, J., & Sun, H. (2017). A fast-response fluorescent probe for hypochlorous acid detection and its application in exogenous and endogenous HOCl imaging of living cells. *Chemical Communications*, 53(91), 12349–12352.
- Kais, B., Schneider, K. E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., & Braunbeck, T. (2013). DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion—Implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic Toxicology*, 140–141, 229–238.
- Kasten, F. H. (1999). Introduction to Fluorescent Probes: Properties, History and Applications. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, 17–39.
- 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.
- 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.
- Lee, K., Nallathamby, P., Browning, L., Osgood, C., & Xu, X. (2007). In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*, 1(2), 133–143.
- Ma, H., Song, B., Wang, Y., Liu, C., Wang, X., & Yuan, J. (2017). Development of organelle-targetable europium complex probes for time-gated luminescence imaging of hypochlorous acid in live cells and animals. *Dyes and Pigments*, 140, 407–416.
- MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015 14:10, 14(10), 721–731.
- Miller, J. N., Miller, J. C., Maté Jiménez, C., & Izquierdo Hornillos, R. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Prentice Hall.
- Minja, R. D. R., Choe, K., & Wiley, J. (1993). *Statistical models for causal analysis*. John Wiley & Sons, Inc.

- Murphy, M. (2008). Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777(7–8), 1028–1031.
- Niu, G., Zhang, R., Shi, X., Park, H., Xie, S., Kwok, R. T. K., Lam, J. W. Y., & Tang, B. Z. (2020). AIE luminogens as fluorescent bioprobes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 123, 115769.
- OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*, OECD Publishing, July, 1–22. <http://www.oecd-ilibrary.org>
- Pelka, K. E., Henn, K., Keck, A., Sapel, B., & Braunbeck, T. (2017). Size does matter – Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 185, 1–10.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in Molecular Biology*, 1601, 1–17.
- Product Sheet: PrestoBlue Cell Viability Reagent*. (2019). Retrieved July 18, 2021, from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018370-PrestoBlueCellViabilityReagent-PI.pdf>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. In S. Markossian *et al.*, *Assay Guidance Manual*. Retrieved July 15, 2021, from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/pdf/Bookshelf_NBK53196.pdf.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 676–682.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591.
- Smith, R., Hartley, R., & Murphy, M. (2011). Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(12), 3021–3038.
- Strähle, U., & Grabher, C. (2010). The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects. *Disease Models & Mechanisms*, 3(11–12), 689–692.
- Yongsheng Liu, Datao Tu, Haomiao Zhu, En Ma, & Xueyuan Chen. (2013). Lanthanide-doped luminescent nano-bioprobes: from fundamentals to biodetection. *Nanoscale*, 5(4), 1369–1384.
- Zielonka, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., & Kalyanaraman, B. (2017). Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chemical Reviews*, 117(15), 10043.

8. ANEXOS

8.1. Ensayo de viabilidad celular

- **Resultados cuantitativos**

a) S1

Tabla 2: Valores de viabilidad promedio con su desviación estándar calculados para las distintas concentraciones de S1.

[S1] (μM)	% viabilidad promedio	SD
1	92,04	4,08
2	95,48	0,71
5	99,51	2,28
10	98,66	3,20
20	104,95	13,62

b) S2

Tabla 3: Valores de viabilidad promedio con su desviación estándar calculados para las distintas concentraciones de S2.

[S2] (μM)	% viabilidad promedio	SD
1	94,14	1,91
2	98,43	4,70
5	102,24	7,74
10	97,54	3,54
20	95,54	4,44

- **Análisis estadístico**

Test de normalidad Shapiro-Wilk

- H_0 : los datos pertenecen a una población con una distribución de datos normal.
- p-valor crítico= 0,05

Tabla 4: Valores calculados para cada concentración ensayada (de S1 y S2) del estadístico SW, junto con sus correspondientes valores tabulados (SWt) y el p-valor asociado para un nivel de confianza del 95% ($\alpha= 0,05$).

Conc. (μM)	S1			S2		
	SW	SWt (95%)	p-valor	SW	SWt (95%)	p-valor
1	0,869	0,748	0,315	0,936	0,748	0,505
2	0,907	0,748	0,423	0,772	0,767	0,061
5	0,873	0,748	0,327	0,887	0,767	0,332
10	0,817	0,748	0,169	0,852	0,748	0,267
20	0,882	0,748	0,351	0,920	0,748	0,457

- Conclusión: se acepta la H_0 . Todos los datos se ajustan a una distribución normal ($p\text{-valor} > p\text{-valor}_{\text{crítico}}$).

Análisis de la varianza (ANOVA)

- H_0 : las medias muestrales difieren significativamente.

a) S1

Tabla 5: Resultados del test ANOVA realizado para evaluar las diferencias entre los valores promedio de viabilidad celular para cada concentración estudiada de S1.

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
20 μM	4	419,799575	104,949894	185,567566
10 μM	4	394,655329	98,6638324	10,2140854
5 μM	4	398,056483	99,5141209	5,20725313
2 μM	4	381,901002	95,4752505	0,50166689
1 μM	4	368,174916	92,0437291	16,686572

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	371,208415	4	92,8021038	2,12676044	0,12781002	3,05556828
Dentro de los grupos	654,531431	15	43,6354287			
Total	1025,73985	19				

- Conclusión: Se rechaza la H_0 . No hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias muestrales ($F < F_{\text{crit}}$, a un $p\text{-valor} > 0,05$).

b) S2

Tabla 6: Resultados del test ANOVA realizado para evaluar las diferencias entre los valores promedio de viabilidad celular para cada concentración estudiada de S2.

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
20 μ M	4	382,143942	95,5359854	19,6879663
10 μ M	4	390,160947	97,5402369	12,521999
5 μ M	3	306,711206	102,237069	59,8508273
2 μ M	3	295,293046	98,4310153	22,0930164
1 μ M	4	376,556332	94,1390829	3,65921731

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	129,589083	4	32,3972707	1,55127775	0,24535917	3,17911705
Dentro de los grupos	271,495235	13	20,8842489			
Total	401,084318	17				

- **Conclusión:** Se rechaza la H_0 . No hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias muestrales ($F < F_{crit}$, a un p -valor $> 0,05$).

Test t-Student

- H_0 : Hay diferencias significativas entre las viabilidades promedio de ambas sondas.

Tabla 7: Comparación de los valores promedios de viabilidad celular de S1 y S2 entre si mediante el test t-Student, a un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

	<i>1 μM</i>	<i>2 μM</i>	<i>5 μM</i>	<i>10 μM</i>	<i>20 μM</i>
<i>p-valor S1/S2</i>	0,2497	0,1519	0,1780	0,2353	0,1203

- **Conclusión:** Se acepta la H_0 . Todos los p -valores calculados son superiores al p -valor_{crit} (0,05).

8.2. Estudios de toxicidad de S1 en pez cebra

- **Resultados cuantitativos**

Tabla 8: Porcentajes de mortalidad calculados para el total de embriones muestreados, por tratamiento y por tiempo de ensayo. (CN: Control negativo).

<i>t</i> (hpf)	% Mortalidad				
	CN	2 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
24	0	0	0	0	0
48	2,08	8,33	14,58	35,42	75,00
72	2,08	14,58	22,92	45,83	81,25
96	4,17	31,25	39,58	58,33	85,42

- **Análisis estadístico**

Test de normalidad Shapiro-Wilk

- H_0 : los datos pertenecen a una población con una distribución de datos normal.
- p-valor crítico= 0,05

Tabla 9: Valores calculados para cada concentración ensayada (de S1) del estadístico SW, junto con sus correspondientes valores tabulados (SWt) y el p-valor asociado para un nivel de confianza del 95% ($\alpha= 0,05$).

	CN	2 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
SW	0,790	0,759	0,865	1,000	0,895
SWt 95%	0,748	0,748	0,748	0,748	0,748
p-valor	0,098	0,063	0,304	0,950	0,387

- Conclusión: se acepta la H_0 . Todos los datos se ajustan a una distribución normal (p-valor > p-valor_{crítico}).

Test t-Student

- H_0 : Hay diferencias significativas entre los porcentajes de mortalidad promedio de cada concentración de S1 ensayada.

Tabla 10: Comparación de los valores de mortalidad obtenidos para cada pareja de concentraciones de S1 ensayadas, a un 95% de confianza ($\alpha= 0,05$).

	20 μ M / 10 μ M	10 μ M / 5 μ M	5 μ M / 2 μ M	2 μ M / CN
p-valor	0,0049	0,0471	0,0459	0,0033

- Conclusión: Se rechaza la H_0 . Todos los p-valores calculados son inferiores al p-valor_{crit} (0,05).

- **Determinación del LC50**

Tabla 11: Cálculo de las regresiones Logit y Probit a partir de las proporciones corregidas de individuos muertos.

Concentración (μM)	Prop. Corr.	Logit (P)	Probit (P)
0	0,000		
2	0,283		
5	0,370	-0,492	4,667
10	0,630	0,577	5,333
20	0,848	1,760	6,027

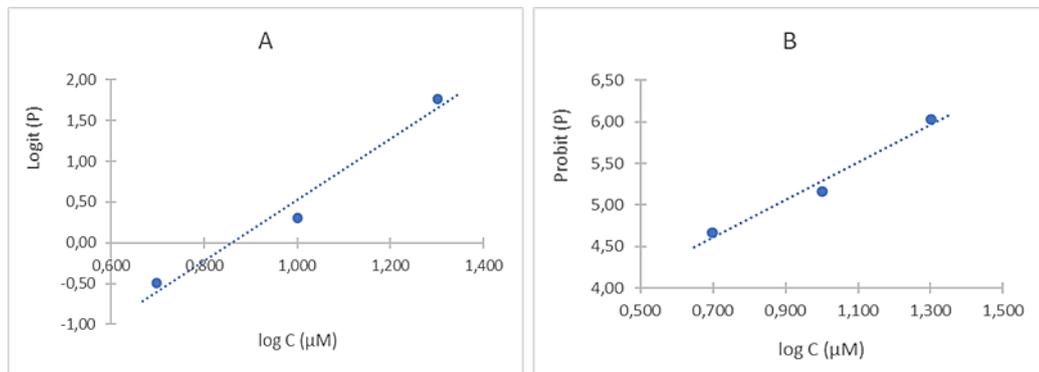


Figura 16: Representaciones gráficas de los métodos de regresión Logit (A) y Probit (B).