



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# **Toxicidad de nanotransportadores basados en ácido hialurónico en embriones de pez cebra**

**Toxicidade de nanotransportadores baseados en ácido hialurónico  
en embrións de peixe cebra**

**Toxicity of hyaluronan-based drug nanocarriers on zebrafish  
embryos**

Elena Santidrián Yebra-Pimentel

**Trabajo fin de Máster**

Fecha de presentación: 24 Julio 2014

Dra. Laura Sánchez Piñón

Dra. Ana González Tizón

# **Toxicidad de nanotransportadores basados en ácido hialurónico en embriones de pez cebra**

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de peces cebra LU-003 del Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria, Campus de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela.

# INDICE

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1. El pez cebrá como organismo modelo en biomedicina	4
1.2. La biomedicina	7
1.3. Ácido hialurónico	9
1.4. Toxicodinamia y parámetros toxicológicos	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALE Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1. Mantenimiento del núcleo reproductor	11
3.2. Preparación de nanosistemas	13
3.3. Exposición de los embriones a los nanosistemas	14
3.4. Estudios de internalización de los nanosistemas	16
3.5. Análisis de datos	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>18</b>
4.1. Caracterización de los nanosistemas	18
4.2. Toxicidad de los nanosistemas	19
4.3. Internalización de las nanocápsulas	23
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>28</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>29</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

El uso del pez cebra (*Danio rerio*) en investigación comenzó hace 40 años en la Universidad de Oregon, cuando George Streisinger reconoció el potencial de este vertebrado para la realización de análisis genéticos y estudios de desarrollo, basándose en sus numerosas ventajas (Streisinger *et al.*, 1981).

Los descubrimientos de Streisinger estimularon a un gran número de laboratorios que comenzaron a utilizar el pez cebra en sus estudios. Así, durante la pasada década el pez cebra se convirtió en un importante modelo animal para la investigación biomédica, sustituyendo a los modelos animales utilizados con anterioridad.

En 2001 el Instituto Sanger de la Universidad de Cambridge inició un proyecto de secuenciación del genoma del pez cebra, haciendo público su primer borrador el año siguiente. En la actualidad, la secuenciación del genoma se encuentra en un estadio muy avanzado (*Zebrafish Genome Project, Version 9*).

Es importante destacar que los embriones de pez cebra no son considerados animales desde el punto de vista legal. Así, el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el cual se establecen las normas básicas aplicables a la protección de los animales utilizados en experimentación, mantiene la definición de animal dada en el artículo 3 del Real Decreto 1201/2005 al cual deroga, definiendo como animal de experimentación a todo vertebrado no humano, incluyendo larvas de vida libre pero excluyendo las formas embrionadas, tales como los embriones de pez cebra hasta el quinto día de vida.

## 1.1 El pez cebra como organismo modelo en biomedicina

Como ocurre en todas las ramas de la ciencia, la biomedicina también necesita de organismos modelo que nos permitan entender fenómenos biológicos concretos y que pueden darnos una aproximación de cómo funcionan esos procesos en otros organismos.

El pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton 1822) es un pequeño pez vertebrado de agua dulce nativo de los ríos y arroyos del sudeste asiático (Liu & Leach, 2011). Su uso como organismo modelo de enfermedades se ha extendido en los últimos años en detrimento del uso del ratón. Esto se debe a que ofrece frente a éste una serie de ventajas, fundamentalmente:

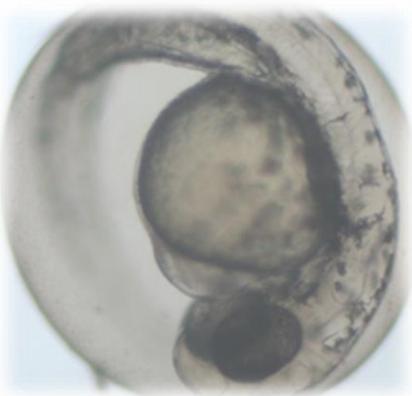
- Facilidad de manutención y alimentación a bajo coste. Su pequeño tamaño permite mantener grandes poblaciones en un acuario de dimensiones reducidas, por un coste entre 100 y 1000 veces inferior al del mantenimiento del ratón (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007).
- Ciclo reproductivo rápido y número elevado de huevos por puesta. El tiempo de generación es de 3-4 meses.
- Fecundación externa. Este fenómeno, junto con la transparencia del embrión, que posee un desarrollo rápido y ampliamente documentado (Kimmel *et al.*, 1995), hacen posible la monitorización de la embriogénesis y las posibles alteraciones presentes en la misma.
- El sistema inmunitario no está completamente activo hasta los 28-42 días post-fecundación (dpf) (Lam *et al.*, 2004).
- Los embriones pueden metabolizar pequeñas moléculas disueltas en el medio acuoso donde se encuentran, lo que permite evaluar la toxicidad de compuestos solubles en el mismo (Henn & Braunbeck, 2010).
- Los huevos son lo suficientemente resistentes como para ser manipulados de forma sencilla en procedimientos de mutagénesis, xenotrasplantes y transgénesis.
- La secuenciación de su genoma (entre  $1,5$  y  $1,63 \times 10^9$  pb, 23.500 genes y 25 pares de cromosomas) está muy avanzada y se encuentra disponible en la base de datos de ZFIN (*ZebraFish Information Network*, [www.zfin.org](http://www.zfin.org)). Además, el 70% de los genes codificantes del ser humano tienen ortólogos en pez cebra ([www.zfin.org](http://www.zfin.org), versión 9).
- Ofrecen un sistema multicelular que integran la interacción de varios tejidos y procesos de diferenciación, lo que supone una ventaja comparado con los experimentos con líneas celulares.
- Presentan muchos órganos y tipos celulares similares a los de los mamíferos.

La línea de pez cebra utilizada para el presente estudio de toxicidad es la salvaje (*wild-type*), cuyo adulto posee un patrón de pigmentación con cinco bandas horizontales en ambos lados del cuerpo que se extienden hasta la aleta caudal, lo que le da nombre a la especie al recordar el patrón de una cebra.

Además de la línea salvaje, existen multitud de líneas de pez cebra mutantes o transgénicas, ya sea para características fenotípicas (White *et al.*, 2008) o genotípicas, cada una de las cuales es más o menos adecuada para un ensayo en particular.

A pesar de que existen algunos análisis de toxicidad publicados en modelos adultos de pez cebra (Sisman & Türkez, 2010; Rocco *et al.*, 2011), las formas embrionarias suponen una alternativa prometedora no sólo debido a la ausencia de restricciones legales sino también por la reducción de costes y residuos, al poder ser expuestos a productos químicos en placas de 24 pocillos con un volumen de 2 mL e incluso de 96 pocillos con 100  $\mu$ L de medio (Braunbeck *et al.*, 2005). Además, el análisis de toxicidad en embriones de pez cebra debe considerarse como un método de refinamiento (Russell & Burch, 1959), al reducir el dolor y la angustia de los animales substituyendo adultos por formas embrionadas con una menor percepción del dolor. Así, el desarrollo temprano del pez cebra es generalmente considerado como el estado más sensible en el ciclo de vida de un teleosteo, siendo particularmente sensible a a bajas concentraciones (Cunningham, *et al.*, 2013).

La fecundación de los ovocitos de pez cebra ocurre en el medio externo y las etapas del



**Figura 1.** Embrión de pez cebra 46 horas post-fecundación (hpf) en el interior del corion.

desarrollo embrionario se suceden rápidamente en el interior de una membrana externa acelular denominada corion (Figura 1). La función principal de esta membrana es proteger al embrión, durante las primeras 48 horas post-fecundación (hpf), de los agentes físicos, químicos y biológicos externos, y participar en el intercambio gaseoso por difusión pasiva a través de multitud de poros presentes en el mismo. Tras 48hpf, debido a la acción simultánea de enzimas que provocan el “reblandecimiento del corion” (Schoots *et al.*, 1983; Deok-Ho *et al.*, 2005) y los movimientos espontáneos de la cola, el embrión

se libera del interior del corion, mediante un proceso denominado eclosión.

El corion posee un espesor de entre 1,5 y 2,5  $\mu\text{m}$  y está constituido por tres capas: una capa externa de 0,2-0,3  $\mu\text{m}$  y una capa interna de 1-1,6  $\mu\text{m}$  separadas por una capa intermedia de 0,3-0,6  $\mu\text{m}$ . La capas media e interna están atravesadas por multitud de canales de entre 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que la capa externa posee una superficie externa granular con proyecciones de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro que ofuscan los poros (Rawson *et al.*, 2000). La presencia de estos poros puede resultar un factor limitante para la internalización y posterior metabolización de sustancias cuya toxicidad se pretende estudiar.

Sin embargo, el corion no es la única membrana protectora del embrión, sino que este está dotado también de una membrana vitelina interna de entre 1 y 4  $\mu\text{m}$  de grosor, separada del corión por el espacio perivitelino, que se encuentra ocupado por un líquido perivitelino viscoso, que protege al embrión frente a impactos (Donovan & Hart, 1986).

## **1.2 La nanomedicina**

La nanotecnología es una ciencia reciente, nacida en el inicio del siglo XXI, que consiste en la utilización de estructuras que poseen al menos una de sus dimensiones dentro de la escala nanométrica (nanoestructuras) y pueden transportar sustancias en su interior, proporcionando una mejor interacción con los sistemas biológicos diana (Lin *et al.*, 2012).

Existe un amplio abanico de aplicaciones de estos nanotransportadores o *nanocarriers*, ya sean con fines alimentarios (transporte de nutrientes), diagnósticos o terapéuticos (transporte de vacunas, genes, fármacos...).

El uso de nanotransportadores en terapia oncológica posee numerosas ventajas en relación al tratamiento con formas farmacológicas libre, principalmente un incremento en la solubilidad, aumento de la especificidad para los tejidos tumorales y posibilidad de regular su liberación (Gou *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción más habitual de los fármacos utilizados en oncología consiste en la inhibición de la mitosis celular, limitando el crecimiento del tejido tumoral. El principal inconveniente de estos fármacos es su baja especificidad para los tejidos tumorales, actuando tanto en células cancerígenas, que se encuentran en división activa, como en células sanas con alto índice mitótico (como las inmunitarias, pilosas, cutáneas y mucosas). Sin embargo, los

nanotransportadores se encuentran selectivamente acumulados en el foco tumoral, incrementando significativamente la efectividad terapéutica de los fármacos asociados, reduciendo a su vez la aparición de efectos adversos (Byrne *et al.*, 2008). El direccionamiento de los nanotransportadores a su diana terapéutica se puede realizar mediante métodos pasivos o activos.

El direccionamiento pasivo se debe a un aumento en la permeabilidad del endotelio de los capilares generados por angiogénesis, junto con el aumento de la acumulación en los mismos debido a la pobre circulación linfática (Maeda *et al.*, 2009). Mientras tanto, el direccionamiento activo se debe a un aumento de la especificidad del nanotransportador.

Mientras tanto, el direccionamiento activo se debe a una incrementada especificidad de la nanoestructura hacia las células diana a través de procesos de reconocimiento celular, aprovechando la sobreexpresión de varios tipos de receptores en la superficie de las células tumorales (Vila-Jato, 2009).

Sin embargo, los nanotransportadores pueden suponer un riesgo para la salud humana y el ambiente, que debe ser evaluado. En los últimos años ha aumentado exponencialmente la bibliografía que documenta la toxicidad de un amplio rango de nanomateriales. Los modelos de toxicología utilizados en los estudios publicados van desde cultivos celulares hasta análisis más complejos, realizados *in vivo* con modelos biológicos como el ratón o el pez cebra.

La bibliografía existente acerca de estudios de toxicidad de nanomateriales en embriones de peces cebra es muy reciente y consiste fundamentalmente en el análisis de toxicidad de nanopartículas metálicas, principalmente de oro y plata (Asharani *et al.*, 2008; Cunningham *et al.*, 2013).

El estudio o caracterización de las nanoestructuras se lleva a cabo en función de las características físico-químicas, algunas de las cuales son la solubilidad, tamaño, índice de polidispersión, potencial Z ( $\zeta$ ) y espesor de la cubierta.

- Solubilidad. Los nanosistemas hidrofílicos poseen un núcleo hidrofóbico oleoso en el que transportan fármacos insolubles en agua, mientras que los nanosistemas hidrofóbicos (menos comunes en oncología) poseen un núcleo hidrofílico acuoso en el que transportan fármacos solubles en agua.

- Tamaño. Estudios realizados en pez cebra sugieren una relación indirecta entre el tamaño y la toxicidad (Ispas *et al.*, 2009). Reduciendo el tamaño de partícula aumenta el *ratio* área/volumen, resultando en una mayor biodisponibilidad pero también en una mayor superficie de reactividad de los materiales que puedan ser tóxicos (Lee *et al.*, 2012).
- Índice de polidispersión (PI). La polidispersidad mide el grado de variación entre los tamaños de los elementos de un nanosistema, y se encuentra en un rango entre 0 y 1, acercándose a 0 cuanto más homogéneo es el nanosistema.
- Potencial Z ( $\zeta$ ). Con el objetivo de generar nanosistemas estables, estos poseen una carga superficial (positiva o negativa) que provoca la repulsión de unas partículas a otras, impidiendo fenómenos de agregación y posterior precipitación. El naturaleza aniónica o catiónica de un nanosistema supone un factor clave para la interacción con las diferentes membranas biológicas.
- Espesor de la cubierta. En el caso de las nanocápsulas, la cubierta tiene un papel muy importante en la estabilidad del nanosistema, proporcionando además protección a los principios activos vehiculizados y pudiendo afectar la tasa de liberación de los mismos.

### 1.3 Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un heteropolisacárido de elevado peso molecular constituido por unidades de ácido D-glucurónico unidos por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  o-glucosídicos y por residuos 2-acetamido-2deoxi- $\beta$ -D-glucosa enlazadas de acuerdo a un patrón  $\beta(1\rightarrow3)$  (Fraser *et al.*, 1997).

En este caso particular nos interesa conocer su estructura y propiedades por ser utilizado como polímero formador de la cubierta de las nanocápsulas cuya toxicidad vamos a analizar en el presente experimento.

Una de las ventajas que posee el HA es su origen endógeno (matriz extracelular y tejido conectivo de vertebrados), lo que lo convierte en un polímero biocompatible para su uso en medicina (Al-Qadi *et al.*, 2011).

Las nanoestructuras se pueden dirigir a su diana terapéutica mediante un direccionamiento activo o pasivo, siendo el primero el más eficiente debido a su alta especificidad. El

direccionamiento activo se realiza mediante la modificación de la superficie de los nanosistemas con diferentes tipos de moléculas o ligandos que se unen a receptores que se encuentran sobreexpresados en células tumorales (Wang & Thanou, 2010).

Algunos ejemplos de receptores sobreexpresados en diferentes tejidos tumorales son el folato, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y el receptor CD44, que se une al HA.

A pesar de que la presencia del receptor CD-44 en la membrana celular sea normal en células sanas, durante la carcinogénesis de algunos tipos celulares (ovario, estómago, colon, células linfocitarias) se produce una sobreexpresión del mismo (Mizrahy *et al.*, 2011) que puede ser utilizada como fundamento para dirigir selectivamente nanotransportadores de fármacos antitumorales (Hervella *et al.*, 2008). Así, los nanotransportadores con cubierta polimérica de HA se liberarán mayoritariamente en las células tumorales.

#### **1.4 Toxicodinamia y parámetros toxicológicos**

La toxicodinamia estudia los mecanismos de acción de los tóxicos y la relación entre su concentración en su diana de acción y los efectos que producen en los sistemas biológicos. Para que se produzca una respuesta tóxica en un organismo es necesario que el tóxico sea absorbido, lo que implica su ingreso en la circulación sanguínea a través de las barreras biológicas.

En el caso de los organismos acuáticos, una sustancia puede atravesar dichas barreras cuando se encuentra en disolución en el medio o mediante una introducción directa (por ejemplo, por inyección).

Cuando un compuesto se encuentra disuelto, la cantidad del mismo, expresado en masa o moles por unidad de volumen del medio en el que se encuentra se denomina concentración y suele expresarse en g/L o  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, cuando éste es administrado mediante introducción directa en el individuo se utiliza el término dosis, que es la cantidad de dicho compuesto administrado en proporción a la masa o volumen corporal del sujeto y suele expresarse en mg/Kg.

Para caracterizar la toxicidad de un compuesto químico es necesario determinar la concentración letal media (*medium lethal concentration*, LC<sub>50</sub>) o dosis letal media (*medium lethal dose*, LD<sub>50</sub>) y la concentración máxima sin efectos (*no observed effect concentration*, NOEC).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo del trabajo es evaluar la toxicidad en embriones de pez cebra de una nanoemulsión (NE) libre de HA y dos prototipos de nanocápsulas con HA: el primero, HA-NC (*hyaluronan nanocapsules*), posee un tensioactivo catiónico y el segundo, PrHA-NC (*protamine hyaluronan nanocapsules*), evita la utilización de dicho tensioactivo mediante la introducción de una segunda cubierta polimérica de protamina (Pr).

Así, se analizará si la presencia de HA en la cubierta polimérica es beneficiosa para disminuir la toxicidad del nanosistema, y podremos también comparar entre sí la toxicidad e internalización de las nanocápsulas con el objetivo de seleccionar la más adecuada para futuros experimentos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Mantenimiento del núcleo reproductor

Para la realización de estudios de toxicidad en embriones de pez cebra, se dispone de un núcleo de individuos adultos reproductores mantenido, en el interior de una cámara isoterma,

en un sistema de peceras con agua recirculante a 28°C. Los machos y las hembras se alojan constantemente juntos en proporciones 1:2 en una densidad máxima de 1 adulto/litro de agua y con un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad que optimiza la actividad gonadal (Brand *et al.*, 2002; Matthews *et al.*, 2002).

El agua de las peceras procede de la traída tras un proceso de dechloración y limpieza mediante una membrana de ósmosis inversa, un filtro físico y otro de carbón activo y se ajusta a los parámetros óptimos de concentración de cloro, dureza, pH, oxígeno disuelto y conductividad para esta especie (Westerfield, 2007).

Los adultos son alimentados tres veces al día con escamas comerciales (TetraMin®) y *Artemia spp*, que se comercializa en forma de quistes secos de los que eclosiona una larva cuando se incuban en agua salada (30g/L) a 28°C con gran aireación durante 48 horas.

Los reproductores utilizados deben estar libres de síntomas aparentes de enfermedad y no deben haber sido expuestos a un tratamiento farmacológico (curativo o profiláctico) durante los dos meses anteriores a la puesta.

La puesta de los huevos ocurre en la primera hora del encendido de la luz del laboratorio y se recoge en parideras previamente dispuestas en el fondo de la pecera. Éstas son unas estructuras plásticas con canicas en su interior, que imitan el entorno natural de los cantos rodados de los ríos donde depositan los huevos en el entorno natural a la vez que actúan de barrera física entre los adultos y los embriones, que pueden suponer un alimento muy nutritivo.

Tras la puesta, se retiran las parideras del interior de las peceras y su contenido es filtrado, con el objetivo de obtener los embriones. Éstos son transferidos a una placa Petri con agua de la traída dechlorada estéril (SDTW, *sterile dechlorinated tap water*) hasta su exposición a los nanosistemas de estudio. En general, la gran mayoría de publicaciones relacionadas con estudios de toxicidad en embriones de pez cebra utilizan como medio de cultivo de embriones una solución salina, denominada E3, con una composición precisa, definida en el año 1992 por la OCDE en el documento 203 Anexo 2 como: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 294 mg/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 123,25 mg/L; NaHCO<sub>3</sub>: 64,75 mg/L; KCl: 5,75 mg/L. Sin embargo, los parámetros físico-químicos del medio SDTW son igualmente adecuados para este propósito.

### 3.2 Preparación de nanosistemas

Los prototipos HA-NC y PrHA-NC y NE han sido preparados en el grupo Nanobiofar del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) liderado por María José Alonso Fernández.

- **Síntesis de HA-NC**

Las nanocápsulas HA-NC se sintetizan utilizando el método del desplazamiento del solvente, con un proceso de emulsificación de un solo paso (Fessi *et al.*, 1989). En primer lugar, la fase acuosa se prepara disolviendo 2,5 mg de HA en agua, y la fase orgánica se prepara mezclando en acetona 15,6 µL de miglyol 812®, 3,75 mg de lecitina y 0,75 mg de bromuro acético de cetiltrimetilamonio (CTAB). La fase orgánica se vierte gota a gota en la fase acuosa en agitación magnética continua. Finalmente, el solvente orgánico (acetona) se elimina por evaporación en condiciones de vacío, dando lugar a nanocápsulas con una cavidad interna hidrofóbica de miglyol 812® con una cubierta polimérica de HA unidos por un agente estabilizante ó tensioactivo constituido por el complejo lecitina + CTAB.

- **Síntesis de PrHA-NC**

Se preparan mediante el mismo método que las HA-NC, pero en este caso la emulsificación se produce en 2 pasos, dada la presencia de dos cubiertas poliméricas. La cubierta extra está formada por un compuesto denominado protamina (Pr) que, se supone, le confiere a la nanocápsula una mayor capacidad de dispersión en el organismo. Primero, la fase acuosa se ha preparado disolviendo 1,25 mg de Pr en agua y la fase orgánica se ha preparado mezclando en acetona 15 mg de vitamina E y 6 mg de esterato de polietilenglicol (PEG-st). La fase orgánica se vierte gota a gota en la fase acuosa bajo agitación magnética continua seguida de una evaporación del a acetona en condiciones de vacío. Finalmente, las nanocápsulas de protamina se incuban en una disolución con 8 mg de HA, dando lugar a una nanocápsula con una cavidad interna oleosa de vitamina E con dos cubiertas poliméricas de HA y Pr unidas entre sí y al aceite por un tensioactivo (PEG-st).

- **Síntesis de NE**

La nanoemulsión está compuesta únicamente por una fase orgánica que se prepara mezclando acetona con 15,6 mL de Miglyol 812®, 0,75mg de CTAB y 3,75 mg de lecitina bajo agitación magnética. Finalmente la acetona se elimina por evaporación en condiciones de vacío, dando lugar a una nanoemulsión con miglyol como aceite transportador estabilizado con el medio acuoso circundante con dos tensioactivos (lecitina y CTAB).

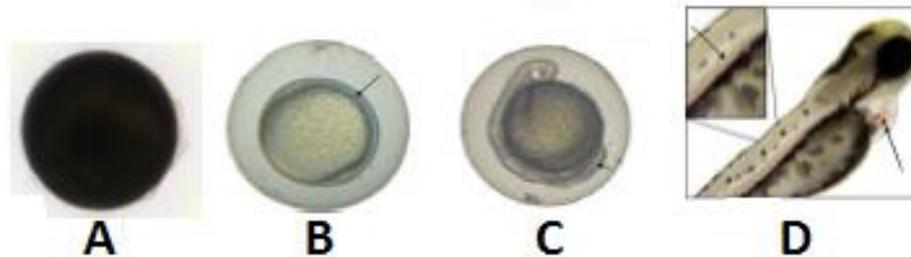
### **3.3 Exposición de los embriones a los nanosistemas**

En un principio se realizó un ensayo de toxicidad con embriones de 4-5 hpf que se expusieron durante 96 horas a la suspensión de diferentes concentraciones de nanosistemas en SDTW a 26°C, basándose en la capacidad del embrión para metabolizar pequeñas sustancias disueltas en el medio.

El diseño experimental se ha realizado basándose en el protocolo de la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico) para el estudio de toxicidad en embriones de peces (*Fish embryo acute toxicity test*, FET) (OCDE, 2012). En resumen, 96 embriones se han transferido a 4 placas de 24 pocillos, con un embrión por pocillo. 20 pocillos de cada placa se han rellenado con 2 mL de suspensiones con concentración creciente de los nanosistemas a estudio (30, 60, 90 y 120 µg/mL) y los 4 pocillos restantes de cada placa actúan como control negativo, conteniendo únicamente SDTW. Las placas problema se acompañan de una placa de control negativo, que contiene únicamente SDTW, y una placa de control positivo con 10 µg/mL de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP, *zinc oxide nanoparticles*) con un tamaño inferior 50 nm, cuya letalidad en embriones de pez cebra ha sido confirmada (Zhu. *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2010).

Cada 24 horas, hasta el final del ensayo, se monitoriza en un microscopio invertido la aparición de 4 caracteres letales (Figura 2): i) coagulación del embrión. ii) ausencia de formación de somitos. iii) ausencia de separación de la cola del saco vitelino. vi) ausencia de latido cardíaco. La aparición de cualquiera de estos caracteres implica la muerte del embrión.

Para considerar válidos los experimentos, la exposición a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ZnO-NP debe resultar en una tasa de mortalidad  $\geq 80\%$ , y en el control negativo debe haber una tasa de mortalidad  $\leq 10\%$  con una tasa de eclosión  $> 80\%$  al final del test (96 hpf).



**Figura 2.** Caracteres letales durante la embriogénesis del pez cebra. **A:** Coagulación del embrión. **B:** Ausencia de formación de somitos. **C:** Ausencia de separación de la cola del saco vitelino. **D:** Ausencia de latido cardíaco.

Con el objetivo de investigar el papel del corion como barrera protectora que impida la internalización de los nanosistemas (Henn & Braunbeck, 2010), el protocolo de la OCDE ha sido también aplicado en embriones decorionados prematuramente. Para ello, la decorionación mecánica se ha realizado con pinzas finas (Dumont No.5) tras 24 hpf, ya que esta es la edad más temprana a la cual se puede garantizar una decorionación con una mortalidad menor del 10% exigido por la OCDE. Para evitar el posible daño que puede sufrir el embrión “desnudo” al contacto directo con materiales plásticos, el fondo de los pocillos se ha recubierto con agarosa de bajo punto de fusión al 2% (Henn & Braunbeck, 2010).

Posteriormente, se realizó un segundo ensayo de toxicidad de los nanosistemas mediante la microinyección de los mismos en el vitelo del embrión durante la embriogénesis. Para ello, embriones de 0, 24 y 48 hpf fueron anestesiados con metasulfonato de tricaina (Westerfield, 2007) y 10 nL de suspensiones de concentración creciente de nanocápsulas fueron introducidas en el vitelo usando un microinyector (Narishige-IM-31). Las microagujas (Harvard Apparatus®) se han realizado con un *puller* (Narishige PC-10), resultando en una apertura final de 25  $\mu\text{m}$ . Las condiciones de inyección fueron de 12 kPa de presión durante 10 mS.

Para realizar la microinyección se ha cargado una microaguja con 1  $\mu\text{L}$  de 2 disoluciones de nanocápsulas en SDTW a concentraciones 15 y 30 mg/mL. Con un volumen inicial de 1  $\mu\text{L}$  se han inyectado 100 individuos (10 nL/individuo), por lo que se puede inferir que cada uno de ellos ha sido inyectado con 0,15 y 0,30  $\mu\text{g}$ . El experimento fue acompañado de un control negativo, inyectado con SDTW. Los embriones muertos fueron eliminados del experimento

dos horas después de la inyección, considerando esta mortalidad temprana como inherente a la inyección, que resulta un método invasivo, y no debido a la acción tóxica de la sustancia inyectada.

En la bibliografía existente relativa a estudios de toxicidad de nanopartículas, sólo Sharif *et al.*, 2012 realizan microinyección (aunque únicamente en embriones de 48 hpf) y ninguno comprueba la internalización de las nanoestructuras en el embrión.

Las observaciones del experimento se han realizado mediante un microscopio invertido cada 24 horas post-inyección (hpi) hasta llegar al final del análisis, a las 96 hpi, monitorizando los caracteres letales descritos con anterioridad.

### **3.4 Estudios de internalización de nanocápsulas**

Para que un compuesto produzca un efecto tóxico es necesario que se produzca la absorción del mismo por parte del embrión, seguida de una distribución y metabolización por parte del organismo, que puede resultar en una eliminación o en la muerte del organismo.

Con el objetivo de monitorizar la internalización y localización de las nanocápsulas en el embrión, cada tensioactivo ha sido marcado con un fluoróforo durante el proceso de preparación, resultando en nanocápsulas fluorescentes.

El prototipo HA-NC ha sido marcado con DiD (1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindodicarbonocianina) con una eficiencia de encapsulación del fluoróforo del 60%. El espectro del DiD se encuentra en el rango de longitud de onda del rojo lejano, y posee picos de excitación y emisión de 644 y 655 nm respectivamente. Dada la incapacidad del PEG-st presente en el prototipo PrHA-NC para captar el DiD, este se ha marcado con rodamina 6G (Rho-6G) con una eficiencia del 40% y picos de excitación y emisión de 525 y 565 nm respectivamente.

Embriones seleccionados al azar se han analizado mediante microscopía confocal (Leica TC5 SPSX) para estudiar la internalización de las nanocápsulas en embriones expuestos a las nanocápsulas suspendidas en el medio y la distribución de las mismas en embriones inyectados. Los embriones no expuestos se han observado también como control negativo

para discernir entre la autofluorescencia típica del pez cebra, con picos de 570 y 630 nm (Shi *et al.*, 2009; Billinton & Knight, 2001).

### 3.5 Análisis de datos

Estudios previos han demostrado que ignorar la mortalidad ocurrida en el control negativo, incluso aunque esta sea menor del 10% requerido por la OCDE, provoca una subestimación de la concentración letal media (LC<sub>50</sub>) (Hoekstra, 1987). Para evitar este error los datos han sido pre-tratados y corregidos con respecto a la mortalidad en el control negativo mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1987):

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \frac{X - Y}{100 - Y} \times 100$$

Donde X es el porcentaje de mortalidad en los embriones sometidos al producto químico en las placas problema e Y es el porcentaje de mortalidad en la placa de control negativo.

Posteriormente se ha realizado un análisis mediante el método Probit (Finney, 1952) usando la regresión de máxima verosimilitud seguido de un test binomial de Fisher con corrección de Bonferroni. Los resultados se muestran en términos de media ± desviación estándar.

Los datos han sido analizados mediante el software de análisis TOXRAT® SOLUTIONS GMBH (*Toxicity Response Analysis and Testing*) cedido por Thomas Braunbeck de la Universidad de Heidelberg (Alemania) y Microsoft Excel (v 2013, Microsoft, Inc, Redmond, WA).

Con el objetivo de aportar resultados estadísticamente significativos, el experimento se ha realizado por triplicado.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de los nanosistemas

Tras la síntesis de los nanosistemas se procedió a su caracterización mediante el equipo Zetasizer (Nano ZS®, Malvern Instrument, Malvern, UK), ya que las propiedades físico-químicas de las nanopartículas (tamaño, forma, carga, composición...) deben tenerse en cuenta en análisis de toxicidad (Bai *et al.*, 2010). Este equipo utiliza la espectroscopía de correlación fotónica (PCS), haciendo pasar las partículas a través de un haz de luz y un campo eléctrico. Mediante las fluctuaciones en el haz de luz cuando las partículas lo atraviesan se puede determinar el tamaño medio de los nanosistemas, la distribución del mismo (índice de polidispersión, PI), mientras que someténdolas a un campo eléctrico se puede determinar tanto su movilidad como el signo de su carga superficial o potencial Z, directamente relacionado con la estabilidad del nanosistema (Tabla 1).

**Tabla 1.** Caracterización físico-química de los nanosistemas.

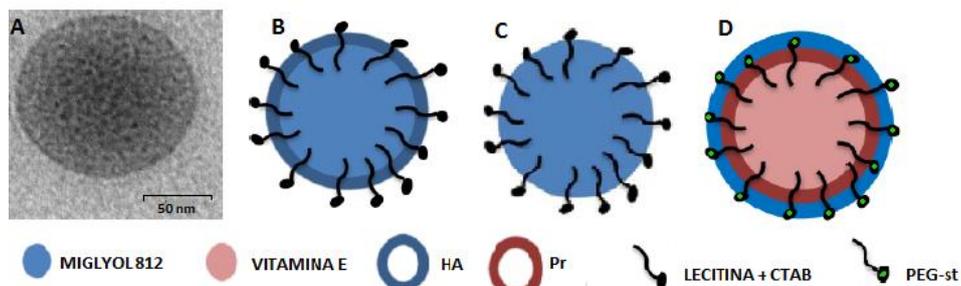
	Tamaño (nm)	PI	$\zeta$ (mV)
HA-NC	112	0,2	-53
PrHA-NC	157	0,1	-30
NE	103	0,1	+52

nm: nanómetros; P.I: índice de polidispersión.  $\zeta$ : potencial Z; mV: miliVoltios

La toxicidad de nanosistemas en especies acuáticas como el pez cebra depende de un elevado número de factores como el potencial Z (Cunningham *et al.*, 2013), el tamaño y la forma (Ispas *et al.*, 2009), que pueden aumentar el tiempo de retención, incrementando los efectos tóxicos.

La elevada carga aniónica del HA aporta a las nanocápsulas un valor de potencial Z negativo en contraste con la carga de la NE, carente de cubierta polimérica. El prototipo PrHA-NC posee a mayores una segunda cubierta polimérica interna de protamina, un péptido catiónico rico en arginina, lo que explica la disminución de su carga superficial.

Los fenómenos de agregación de los nanosistemas en agua son un factor importante en la determinación de su toxicidad, pues provocan cambios en el tamaño, polidispersión y potencial Z. Es por ello que para asegurar la correcta elección del medio de cultivo de embriones para el estudio de toxicidad, se ha estudiado la estabilidad de las nanoestructuras en el medio E3 (propuesto por la OCDE) y SDTW. Para ello, se han resuspendido los nanosistemas en una pequeña cantidad de dichos medios y se han analizado los cambios producidos, tras 96 horas, en los valores de tamaño, PI y  $\zeta$ . Los resultados han demostrado no sólo su estabilidad en medio SDTW (ausencia de cambios en los parámetros) sino su inestabilidad en E3, medio de uso extendido en la bibliografía referente a evaluación de toxicidad de nanosistemas en pez cebra. La agregación de los nanosistemas en medio E3 se puede atribuir a que es un medio formado por sales inorgánicas multivalentes, pudiendo reaccionar con el tensioactivo y cubierta polimérica responsables de su estabilidad (Bai *et al.*, 2010).



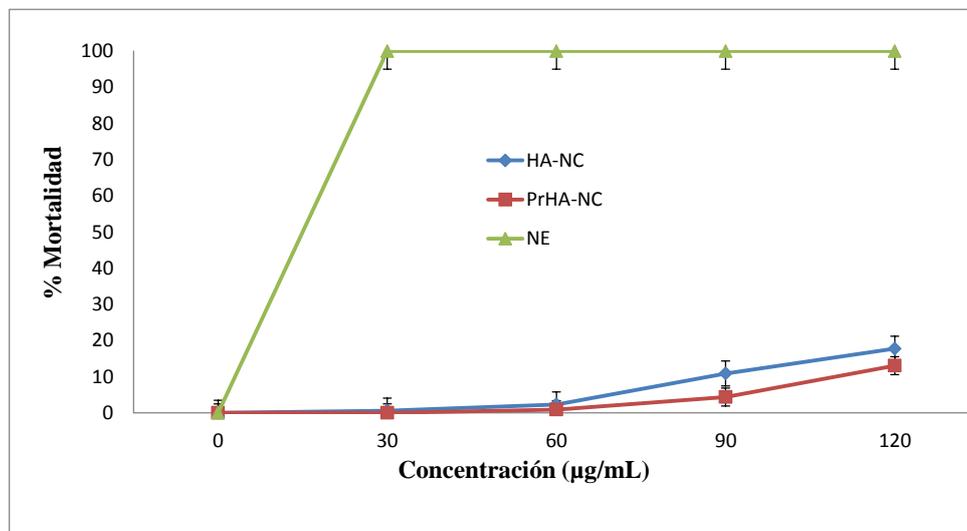
**Figura 3.** Estructura de los nanosistemas. **A:** Imagen de microscopía electrónica de transmisión del HA-NC. **B:** HA-NC. **C:** PrHA-NC; **D:** NE.

Por último, para analizar la distribución de los elementos que forman parte de cada sistema y determinar la forma de las nanoestructuras, éstas han sido liofilizadas y procesadas para su observación en microscopía electrónica de transmisión (TEM). Hasta el momento, sólo se han obtenido imágenes del prototipo HA-NC, resultando en una forma esférica, y se esperan los mismos resultados para los restantes nanosistemas (Figura 3).

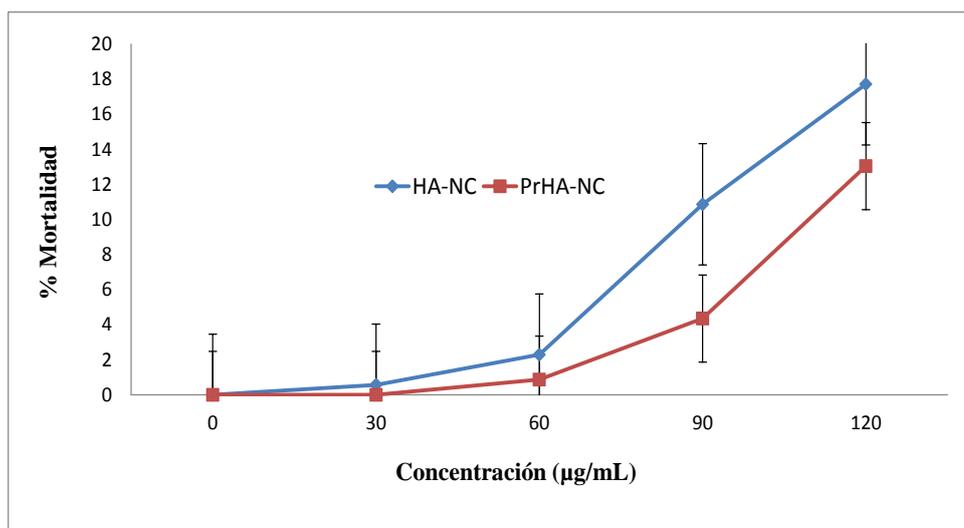
## 4.2 Toxicidad de los nanosistemas

Basándose en la bibliografía existente relativa a ensayos de toxicidad de nanocápsulas con cubierta polimérica en embriones de pez cebra (Fako & Furgeson, 2009; Yu-Lan *et al.*, 2011), las concentraciones utilizadas para el ensayo de toxicidad fueron 30, 60, 90 y 120  $\mu\text{g/mL}$ .

Los resultados del análisis de toxicidad de nanosistemas resuspendidos en SDTW (Figura 4) indican que la exposición a NE provoca un porcentaje de mortalidad significativamente mayor al de los prototipos con HA. Mientras que la NE provoca una porcentaje de mortalidad de 100% tras 96 hpf incluso a la concentración más baja ensayada (30  $\mu\text{g/mL}$ ), el porcentaje de mortalidad alcanzado al final del análisis por los prototipos con HA (Figura 5) es de  $17,71 \pm 4,56 \%$  y  $13,04 \pm 4,05 \%$  para HA-NC y PrHA-NC respectivamente a la concentración más elevada (120  $\mu\text{g/mL}$ ). Así, la  $LC_{50}$  para ambos prototipos con HA es muy superior a 120  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 4.** % Mortalidad / Concentración de nanosistemas resuspendidos en SDTW al final del análisis (96 hpf).



**Figura 5.** % Mortalidad / Concentración de nanocápsulas resuspendidos en SDTW al final del análisis (96 hpf).

En el caso del prototipo HA-NC la NOEC tiene un valor de  $25,12 \pm 23,95 \mu\text{mL}$  mientras que la del prototipo con Pr es de  $3,45 \pm 11,53 \mu\text{g/mL}$  y  $\pm \mu\text{g/mL}$ , con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Teniendo en cuenta los rangos solapantes de valores de NOEC para ambos prototipos, no se puede afirmar que existan diferencias significativas entre ellos.

En el caso de la NE ninguno de los parámetros toxicológicos ha sido determinado ya que la concentración más baja empleada ha resultado en una mortalidad del 100%.

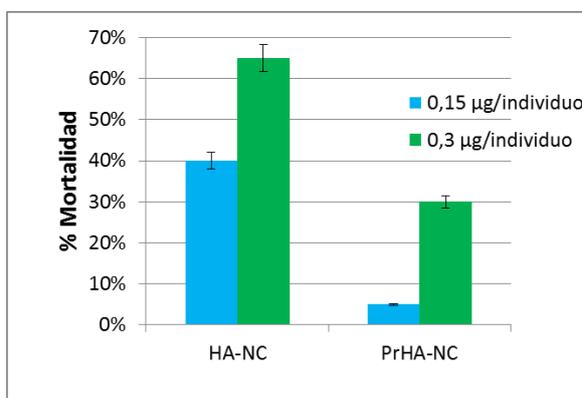
La mortalidad en el control negativo con SDTW al final del test ha sido  $\leq 10\%$  y la tasa de eclosión  $\geq 80\%$ . La mortalidad en el control positivo ( $10 \mu\text{g/mL ZnO-NP}$ ) ha sido  $\geq 80\%$  incluso en la primera observación (24 hpf), lo que no resulta un hallazgo extraño debido a la ya documentada sensibilidad de los organismos acuáticos (especialmente en formas embrionadas) al Zn (Wolfensohn & Lloyd, 2003). Además, la caracterización físico-química de estas NP se ha llevado a cabo y los resultados indican un potencial Z positivo (+26,5 mV), como en el caso de NE, y un índice de polidispersión elevado ( $> 0.8$ ) debido a la formación de agregados de diferentes tamaños, algunos de ellos superiores a  $1 \mu\text{m}$ . Así, a pesar de que los agregados de mayor tamaño no consigan difundir libremente a través del corion e internalizarse en el embrión, la liberación por parte de los mismos de pequeñas cantidades de iones  $\text{Zn}^{2+}$  es suficiente para provocar la mortalidad observada (Zhu *et al.*, 2009).

Así, la incrementada mortalidad provocada por la exposición a la NE se debe a su elevada carga positiva y la presencia de CTAB, cuya toxicidad ha sido demostrada tanto en cultivos celulares y algas como en organismos superiores como la rata (Ray *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2013). Sin embargo, HA-NC también posee CTAB en su composición, pero su toxicidad es mucho menor debido a la presencia de una cubierta polimérica de HA que contribuye a disminuir la toxicidad al ser un material endógeno, biocompatible (Kogan *et al.*, 2007) y altamente aniónico que cambia el signo de la carga superficial del nanosistema.

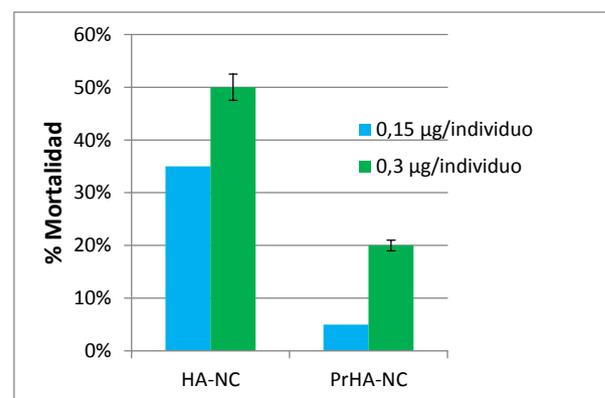
Modificando la vía de administración de las nanocápsulas, mediante microinyección, los resultados de toxicidad de ambos prototipos son estadísticamente diferentes entre sí (Gráficas 3 y 4). En el caso de los nanosistemas resuspendidos en SDTW la vía de administración no está totalmente clara, pero se espera que sea transdérmica o tranbranquial, excluyendo la vía oral al no ocurrir la apertura de la boca del embrión hasta las 72 hpf (Kimmel *et al.*, 1995).

Sin embargo, mediante la microinyección en el saco vitelino del embrión, la vía de administración se espera que sea intravenosa, alcanzando el torrente circulatorio a través de la vena cardinal común ó ducto de Cuvier, un ancho canal de circulación sanguínea presente en el saco vitelino que conecta el corazón con la vasculatura del tronco (Benard *et al.*, 2012).

La microinyección de nanocápsulas en el saco vitelino del embrión provoca una mortalidad dependiente de la dosis y de la edad del embrión inyectado, pero la incrementada mortalidad provocada por el prototipo exento de protamina y con CTAB en relación al prototipo PrHA-NC ha sido demostrada para todos los tiempos de inyección ensayados (Figuras 6 y 7).



**Figura 6.** % Mortalidad/ Dosis de nanocápsulas inyectadas a las 0 hpf.



**Figura 7.** % Mortalidad/ Dosis de nanocápsulas inyectadas a las 24 hpf.

En la inyección a las 0 hpf la mortalidad provocada por el prototipo HA-NC es del 40 y 65% para las dosis 0,15 y 0,30 µg/individuo respectivamente, mientras que se observa una reducción importante con respecto a estos resultados para el prototipo PrHA-NC (5 y 30%).

Retrasando la inyección 24 horas, la mortalidad en embriones inyectados con el prototipo PrHA-NC es de 5 y 20% para las dosis 0,15 y 0,30 µg/individuo respectivamente, que es nuevamente sobrepasada por la del prototipo HA-NC (35 y 50% respectivamente).

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativamente con respecto al control en aquellos embriones inyectados con nanocápsulas a la edad de 48 hpf.

La inyección del control negativo con SDTW genera una mortalidad elevada al final del test (96 hpi), con mortalidades del 33,3% y 20,8% cuando es inyectado en embriones de 0 y 24 hpf respectivamente. En el caso de la inyección a las 48 hpf no se ha observado mortalidad.

Teniendo en cuenta que los aceites que forman la cavidad interna de los nanosistemas ensayados (Myglyol en el prototipo HA-NC y Vitamina E en el prototipo PrHA-NC) son neutros y de baja densidad, la incrementada mortalidad del prototipo HA-NC frente al PrHA-NC se achaca a la naturaleza del agente tensioactivo y su potencial Z.

Comparado con el prototipo HA-NC, el PrHA-NC utiliza como agente estabilizante el PEG-st, un compuesto biodegradable y no tóxico, que hidrata la cubierta polimérica mejorando su biodistribución (Mosqueira *et al.*, 2001; Prego *et al.*, 2006).

Podemos concluir que los prototipos PrHA-NC y HA-NC diseñados por el grupo Nanobiofar provocan una mortalidad reducida en embriones de pez cebra, comparativamente con la toxicidad provocada por la NE, cuando son resuspendidos en medio SDTW.

Sin embargo, la mortalidad de los embriones se encuentra incrementada, especialmente en el prototipo HA-NC, en el caso de utilizar como metodología la microinyección, al ser éste un método invasivo, especialmente en los estadios iniciales del desarrollo. Además, la microinyección supone un método de análisis de toxicidad excesivamente tedioso para ser realizado de forma rutinaria, posee una reproducibilidad baja y altamente dependiente de la experiencia del manipulador y la estabilidad de las nanocápsulas en un medio oleoso como es el saco vitelino no está probada ni se puede analizar en el equipo Zetasizer disponible, que no está adaptado a tomar mediciones en medios de tan elevada viscosidad como son los medios aceitosos.

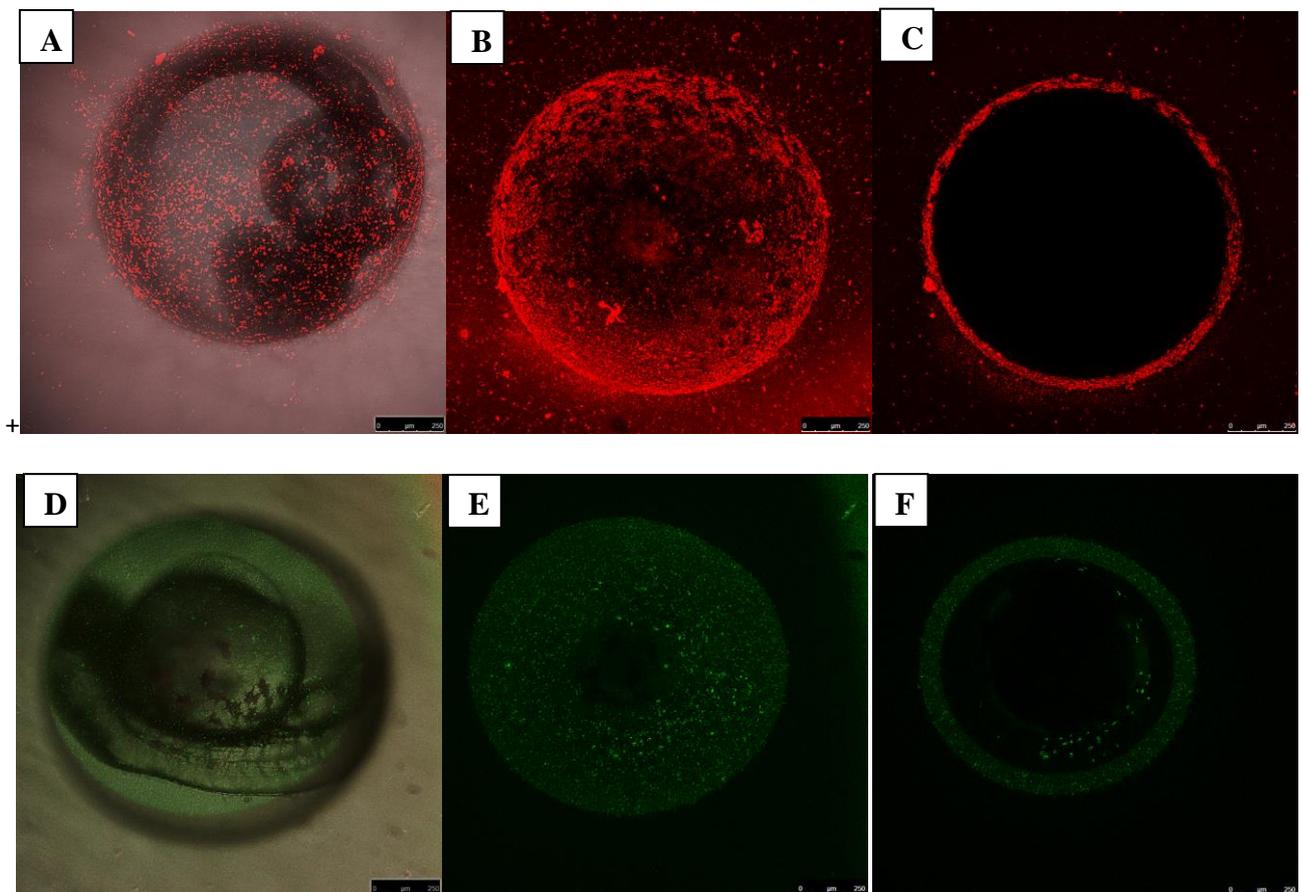
### **4.3 Internalización de nanocápsulas**

Los nanosistemas han sido marcados con un fluoróforo y se han resuspendido en SDTW a una concentración de 120 µg/mL con el objetivo de estudiar su internalización, capacidad de atravesar el corion y distribución en embriones de pez cebra tras 48 y 96 horas de exposición.

El análisis de imagen transmitida mediante microscopía confocal sugiere un comportamiento diferencial de ambos prototipos de nanocápsulas, mientras que en el caso de la NE no ha sido

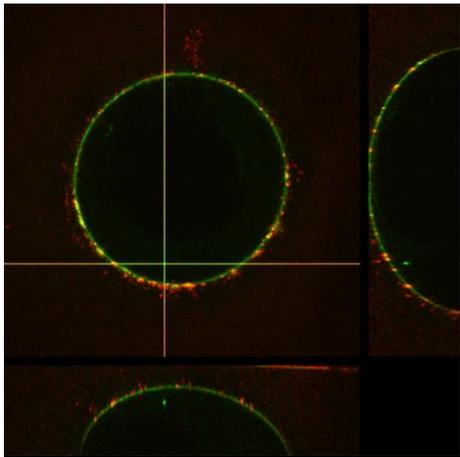
posible evaluar los resultados debido a que la concentración empleada provoca la muerte de los embriones y la consecuente aparición de fenómenos de autofluorescencia de amplio espectro de emisión, imposibles de discernir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo asociado a la nanoemulsión.

En el caso de estudios de internalización en embriones de 48 hpf (Figura 8), se han observado acúmulos de HA-NC en la superficie externa del corion (Figuras 8 A y B), pero mediante el análisis de los planos de corte centrales se ha descartado su presencia tanto en el espacio perivitelino como en el interior del embrión (Figura 8 C).



**Figura 8.** Embriones de pez cebra de 48hpf tras la exposición durante 48 horas a nanocápsulas resuspendidas en SDTW a concentración 120 $\mu$ g/m. **A:** Proyección máxima de planos en blanco y negro y fluorescencia del prototipo HA-NC 10x; **B:** Proyección máxima de planos en fluorescencia de HA-NC 10x; **C:** Suma de los planos z46 a z55 del prototipo HA-NC 10x. **D:** Proyección máxima de planos en blanco y negro y fluorescencia del prototipo PrHA-NC 10x. **E:** Proyección máxima de planos en fluorescencia del prototipo PrHA-NC 10x. **F:** Suma de los planos de z16 a z25 del prototipo PrHA-NC 10x.

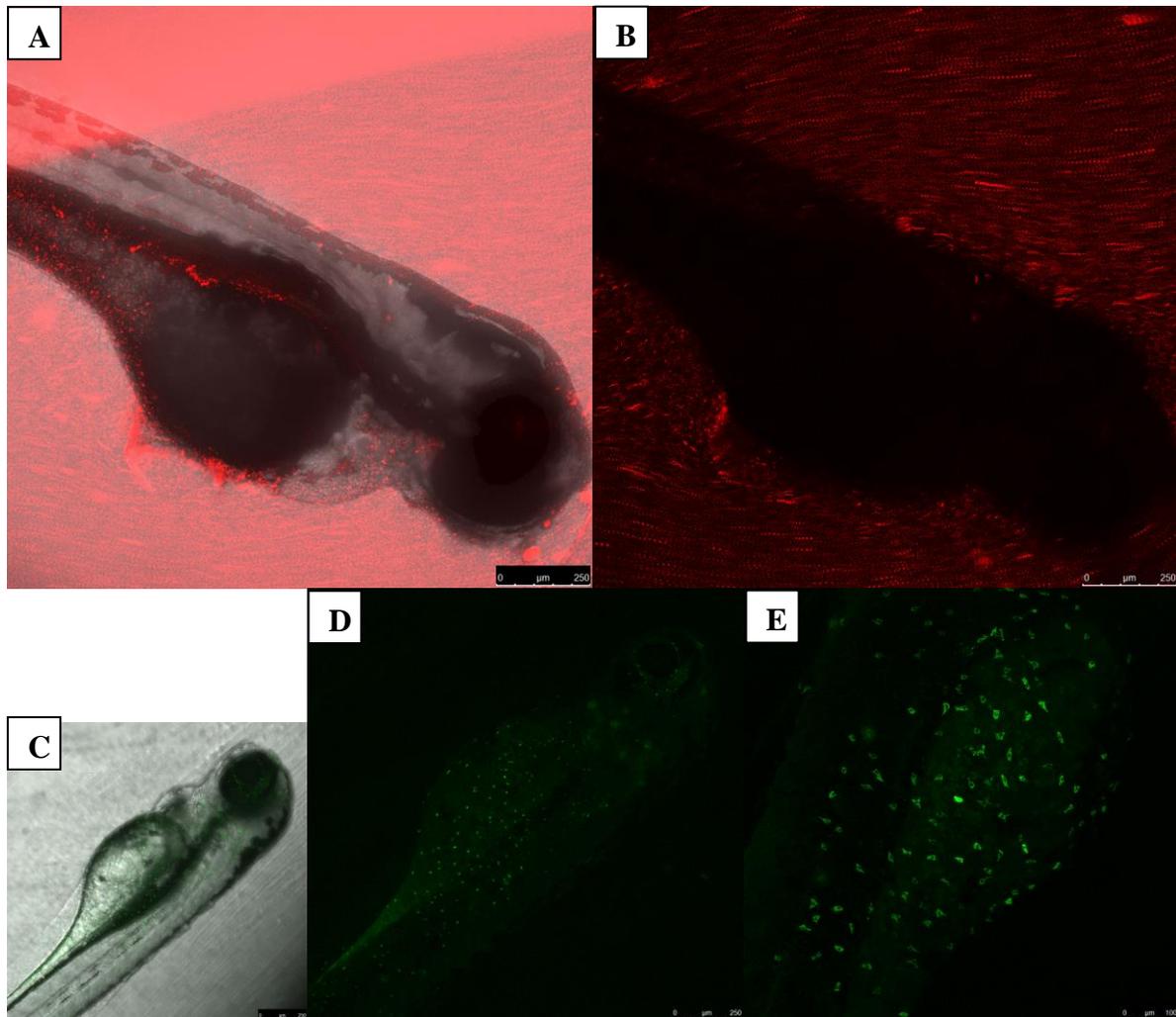
En el caso del prototipo PrHA-NC se observan también algunas nanocápsulas adheridas al corion (Figuras 8 D y E), sin embargo, en su mayoría han atravesado el corion y se encuentran difundiendo por el líquido del espacio perivitelino e internalizados en las células



superficiales del embrión, tal como se confirma con el estudio de los planos centrales (Figura 8 F).

Mediante la disolución de una mezcla de ambos prototipos marcados en SDTW y exposición de embriones durante 48 horas a esta suspensión, se ha encontrado el mismo hallazgo, pudiendo observar las PrHA-NC en la parte interna del corion y las HA-NC en la parte externa (Figura 9).

**Figura 9.** Embrión de pez cebra de 48hpf expuesto a HA-NC + PrHA-NC resuspendidas en SDTW 120 µg/mL 10x.



**Figura 10.** Embriones de pez cebra de 96 hpf tras la exposición durante 96 horas a nanocápsulas resuspendidas en SDTW a concentración 120µg/mL. **A:** Proyección máxima de planos en blanco y negro y fluorescencia del prototipo HA-NC 10x; **B:** Proyección máxima de planos en fluorescencia de HA-NC 10x; **C:** Proyección máxima de planos en blanco y negro y fluorescencia del prototipo PrHA-NC 10x. **E:** Proyección máxima de planos en fluorescencia del prototipo PrHA-NC 10x. **F:** Proyección máxima de planos en fluorescencia del prototipo PrHA-NC 20x.

Prolongando la exposición hasta estadíos de 96 hpf, en los que los embriones ya se encuentran eclosionados, se ha observado nuevamente la ausencia de absorción o penetración del prototipo HA-NC, mientras que el prototipo PrHA-NC se observa en el interior de las células de la dermis (Figura 10).

A pesar de que la decorionación artificial del embrión no es procedimiento de rutina en estudios de toxicidad, teniendo en cuenta que la presencia de poros en su superficie restringe la entrada de ciertos compuestos dependiendo de su tamaño (Creton, 2004), se ha eliminado prematuramente para repetir el estudio de internalización.

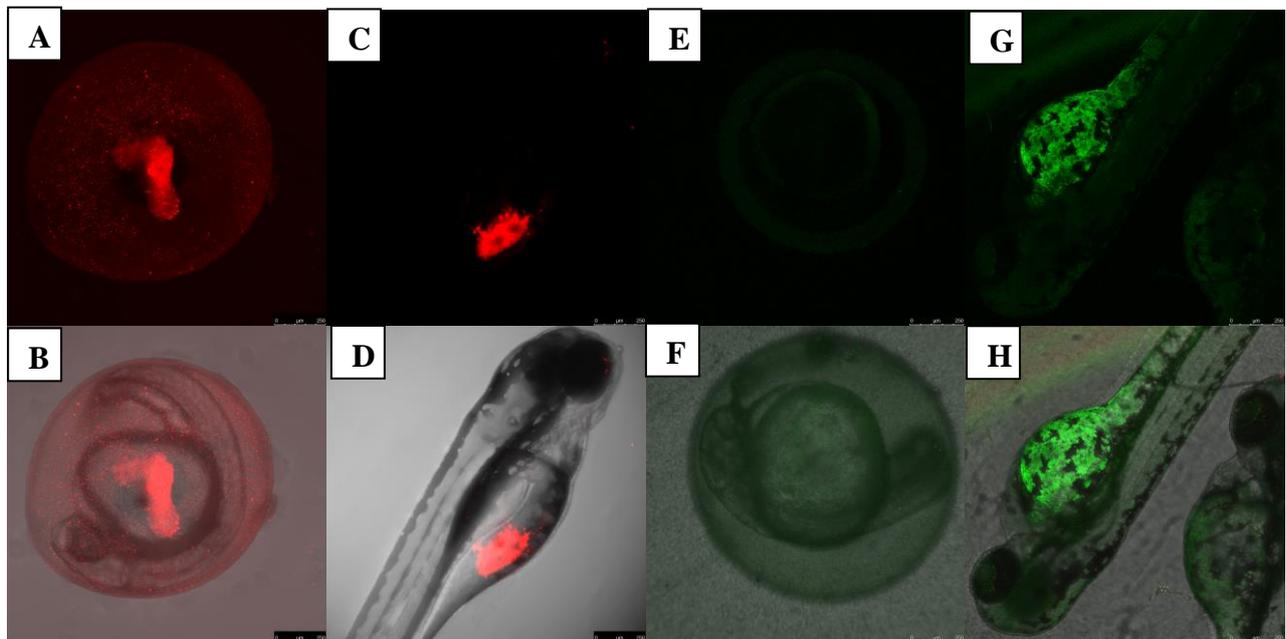
Análisis previos sobre la eliminación del corion como método de mejora de los estudios de toxicidad en embriones de pez cebra revelan que los porcentajes de mortalidad cuando se elimina el corion de forma mecánica en embriones de 4, 6 y 8 hpf son respectivamente 46, 38 y 20%. Dicho porcentaje disminuye progresivamente al aumentar el número de horas post-fecundación del embrión decorionado, hasta llegar a un 10% en el caso de la eliminación a las 24 hpf, compatible con los criterios de aceptación que establece el protocolo de análisis de toxicidad de la OCDE para el control negativo. La decorionación enzimática con proteasas como la pronasa, que digieren el corion, no ofrece una tasa de supervivencia reproducible y puede dañar los embriones de forma indetectable a la observación microscópica, por lo que no supone un método adecuado de decorionación de embriones para análisis de toxicidad (Henn & Braunbeck, 2010).

Así, embriones cuyo corion ha sido eliminado manualmente a las 24 hpf se han introducido en una disolución de SDTW con una concentración de 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de HA-NC se han observado mediante microscopía confocal tras 48 horas de exposición. El objetivo de este experimento ha sido facilitar la internalización del prototipo HA-NC en los embriones, al aumentar el tiempo de contacto directo del embrión con las mismas, pero los hallazgos de microscopía confocal nuevamente confirman la ausencia de internalización en el embrión (imágenes no mostradas).

Es posible que las HA-NC no atraviesen el corion debido a su elevado peso molecular. El HA tiene un peso molecular de 50 kDa, lo suficientemente alto como para sospechar que no pueda atravesar los poros del corion ya que estudios previos han demostrado que sustancias con un peso molecular muy inferior a ese no lo atraviesan (Creton 2004). Además, esto explica que no ocurra la internalización de las HA-NC y sí de la Pr-HA-NC. Tal como se indica en la

especificaciones del producto, el peso molecular de la protamina (5,1 kDa) es 10 veces inferior al del HA, lo que contribuye a que el peso molecular medi de la cubierta polimerica final sea inferior en el caso de las PrHA-NC.

Debido a la incapacidad del embrión de internalizar las HA-NC, se hace necesario recurrir a la microinyección para analizar su toxicidad, y se realizará también un estudio de PrHA-NC para comparar los resultados entre ambas. Para realizar la microinyección se ha cargado una microaguja con 1  $\mu$ L de 2 disoluciones de nanocápsulas en SDTW a concentraciones 15 y 30 mg/mL. Con un volumen inicial de 1  $\mu$ L se han inyectado 100 individuos, por lo que s puede inferir que cada uno de ellos ha sido inyectado con 10 nL, por lo que las dosis inyectadas en los embriones han sido de 0,15 y 0,30  $\mu$ g/individuo y posteriormente se han observado algunos embriones mediante microscopía confocal (Figura 11).



**Figura 11.** Embriones de pez cebra. **A y B:** Inyectado con HA-NC a las 0 hpf, tras 24 horas. Proyección máxima de planos en fluorescencia (A) y blanco y negro + fluorescencia (B). **C y D:** Inyectado con HA-NC a las 24 hpf, tras 48 horas. Proyección máxima de planos en fluorescencia (C) y en blanco y negro + fluorescencia (D). **E y F:** Inyectado a las 0 hpf con PrHA-NC tras 24 hpf. Proyección máxima de planos en fluorescencia (E) y blanco y negro + fluorescencia (F). **G y H:** Inyectado a las 24 hpf con PrHA-NC tras 48 horas. Proyección máxima de planos en fluorescencia (G) y en blanco y negro + fluorescencia (H).

La microinyección supone un avance en el reconocimiento de la aplicabilidad de estas nanocápsulas en el ser humano, al ser la vía intravenosa la forma de administración de los fármacos antitumorales que éstas nanocápsulas pueden vehicular. Sin embargo, los embriones microinyectados observados presentan una masa fluorescente en el lugar de inyección pero

una ausencia de migración de nanocápsulas a los tejidos vecinos. Además, la microinyección supone una tarea tediosa cuando es aplicada sobre individuos con edades inferiores a 48 hpf, y la naturaleza aceitosa del saco vitelino puede no ser el mejor ambiente para la estabilidad de las nanocápsulas que han sido sintetizadas para ser utilizadas en ambientes hidrofílicos como la sangre.

## 5. CONCLUSIONES

La comparación entre la mortalidad de la NE y del prototipo HA-NC resuspendido en STDW permite concluir que la presencia de la cubierta de hialurónico está relacionada con una disminución de la toxicidad. La adición a la NE de una cubierta polimérica de HA (HA-NC) contribuye a la reducción de la toxicidad de la misma, incluso sin evitar la utilización del tensioactivo CTAB.

Ambos prototipos con HA presentan menor toxicidad que la NE, sin existir diferencias significativas entre ellas en embriones expuestos mediante resuspensión en SDTW. Sin embargo, cuando son inyectadas en el saco vitelino, probablemente debido a la desestabilización de las nanocápsulas y liberación del CTAB de la estructura, el prototipo HA-NC resulta significativamente más tóxico.

Los estudios de internalización sugieren que el prototipo PrHA-NC es fácilmente internalizable en el embrión debido al efecto positivo de penetración celular atribuible a la protamina, mientras que el prototipo HA-NC no es absorbido por el embrión incluso cuando este es prematuramente decorionado.

Así, el prototipo PrHA-NC, internalizable mediante su resuspensión en SDTW y con porcentajes de mortalidad reducidos, es un nanotransportador muy prometedor para su uso en oncología, especialmente para la administración en pacientes en los que los fármacos de elección ofrecen dificultades para atravesar las barreras biológicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott WS. (1987). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2: 302-303.

Al-Qadi S, Grenha A & Remuñán-López C. (2011). Microspheres loaded with polysaccharide nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis. *Carbohydrate Polymers*. 86: 25-34.

Asharani PV, Yi- Lian W, Zhiyuan G & Suresh V. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*. 19: 95-102.

Bai W, Zhang Z, Tian W, He X, Ma Y, Zhao Y & Chai Z. (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticles Research*. 12: 1645-1654.

Benard EL, Van der Sar AM, Ellett F, Lieschke GJ, Spaink HP, Meijer AH. (2012). Infection of zebrafish with intracellular bacterial pathogens. *Journal of visual Experiments*. 61: e3781.

Billinton N & Knight AW. (2001). Seeing the Wood through the trees: A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Analytical Biochemistry*. 291: 175-197.

Brand M, Granato M & Nüsslein-Volhard C. (2002). Keeping and raising zebrafish in Nüsslein-Volhard & Dahm. *Zebrafish Practical Approach: Oxford University Press*, Oxford, UK.

Braunbeck T, Böttcher M, Hollert H, Kösmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M & Seitz N. (2005). Towards an alternative for the Acute Fish LC<sub>50</sub> Test in Chemical Assessment: The Fish Embryo Toxicity Test Goes Multi-species-an Update. *Altex* 22: 87-102.

Byrne JD, Betancourt T & Brannon-Peppas L. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 1615-1626.

Creton R. (2004). The calcium pump of the endoplasmic reticulum plays a role in midline signaling during early zebrafish development. *Developmental Brain Research*. 51:33-41.

Cunningham S, Brennan-Fournet ME, Ledwith D, Byrness L & Joshi L. (2013). Effect of Nanoparticle Stabilization and Physicochemical Properties on Exposure Outcome: Acute Toxicity of Silver Nanoparticle Preparations in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*. 47: 3883-3892.

Deok-Ho K, Yu S, Seok Y, Sang HL & Byungkyu K. (2005). Investigating chorion softening of zebrafish embryos with a microrobotic force sensing system. *Journal of Biomechanics*. 38: 1359-1363.

Donovan MJ & Hart NH. (1986). Comparative ultrastructures of the fertilized egg envelopes in golden severum, convic cichlid and discus, Cichlidae, teleost. *Korean Journal of Microscopy*. 27: 417-432.

Fako VE & Furgeson DY.(2009). Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61: 478-486

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet N, Ammoury N & Benita S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 55: R1-R4.

Finney DJ. (1952). Probit Analysis. *Cambridge, England. Cambridge University Press*.

Fraser JRE, Laurent TC & Laurent EBG. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*. 242: 27-33.

Gou MI, Shi H, Guo G, Zhang J, Zheng L, Li ZY, Luo F, Qian ZY, Zhao X & Wei YQ. (2011). Improving anticancer activity and reducing systemic toxicity of doxorubicin by self-assembled polymeric micelles. *Nanotechnology*. 22: 92-102.

Henn K & Braunbeck T. (2010). Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 153: 91-98.

Hervella P, Lozano V, García-Fuentes M & Alonso M J. (2008) Nanomedicine: New Challenges and Opportunities in Cancer Therapy. *Biomedical Nanotechnology*. 4: 1-17.

Hoekstra, J. A. (1987). Acute bioassays with control mortality. *Water Air Soil Pollution*. 35: 311-317.

Ispas C, Andreescu D, Patel A, Goia D, Andreescu S & Wallace KN. (2009). Toxicity and Developmental Defects of Different Sizes and Shape Nickel Nanoparticles in Zebrafish. *Environmental Science & Technology*. 43: 6349-6356.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B & Schilling TF. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203: 253-310.

Kogan G, Ladislav S, Stern R & Gemeiner P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 29: 17-25.

Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ & Sin YM. (2004). Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental & Comparative Immunology*. 28: 9-28.

Lee KJ, Browning LM, Nallathamby PD, Desai T, Cherukuri PK & Xiao-Hong NX. (2012). In vivo quantitative study of sized-dependent transport and Toxicity of Single Silver Nanoparticles Using Zebrafish Embryos. *Chemical Research Toxicology*. 25: 1029-1046.

Liang ZJ, Ge F, Zeng H, Xu Y, Peng F & Wong MH. (2013). Influence of cetyltrimethyl ammonium bromide on nutrient uptake and cell responses of *Chlorella vulgaris*. *Aquatic toxicology*. 138: 81-87.

Lin S, Zhao Y, Nel AE & Lin S. (2012). Zebrafish: An In Vivo Model of Nano EHS Studies. *Small*. 9: 1608-1618.

Liu S & Leach S. (2011). Zebrafish Models of Cancer. *The Annual Review of Pathology. Mechanisms of Disease*. 6: 71-93.

Maeda H, Bharate GY & Darawalla J. (2009). Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 71: 409-419.

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

Mizrahy S, Raz SR, Hasgaard M, Liu H, Soffer-Tsur N, Cohen K, Dvash R, Landsman-Milo D, Bremer MG, Moghimi SM & Peer D. (2011). Hyaluronan-coated nanoparticles: The influence of the molecular weight on CD-44-hyaluronan interactions and on the immune response. *Journal of Controlled Release*. 156: 321-328.

Mosqueira VCF, Legrand F, Morgat JL, Vert M, Mysiakine E, Gref R, Devissaguet JP & Barrat G. (2001). *Pharmaceutical Research*. 18: 1411-1419

OCDE (2012) Guideline for the testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Guideline. Fish Embryo Toxicity (FET) Test.

Prego C, Torres D, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quiñoá E & Alonso MJ. (2006). Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree. *Journal of Controlled Release*. 11: 299-308.

Rawson DM, Zhang T, Kalicharan D & Jongebloed JL. (2000). Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Research*. 31: 325-336.

Ray PC, Yu H & Fu PP (2009). Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. 27:1-35.

Rocco L, Izzo A, Peluso G & Stingo V. (2011). Genotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to two pharmacological products from an impacted Italian river. *Journal of Environmental Analytical Toxicology*. 1: 103-109.

Rojas-Muñoz A, Miana AB & Izpisua-Belmonte JC. (2007). El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia*. 366: 62-69.

Russel WMS & Burch RL. (1959). *The Principles of Human Experimentation Technique*. 238 pp. London. Methuen.

Schoots AF, Meijer RC & Denuce JM. (1983). Dopaminergic regulation of hatching in fish embryos. *Developmental Biology*. 100: 59-63.

Sharif F, Porta F, Meijer AH, Kros A & Richardson MK. (2012). Mesoporous silica nanoparticles as a compound delivery system in zebrafish embryos. *Journal of Nanomedicine*. 7: 1875-1890.

Shi X, Teo LS, Pan X, Chong SW, Kraut R, Korzh V & Wohland T. (2009). Probing events with single molecule sensitivity in zebrafish and *Drosophila* embryos by fluorescence correlation spectroscopy. *Developmental Dynamics*. 238: 3156-3167.

Sisman T & Türkez H. 2010. Toxicologic evaluation of imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials. *Toxicology and industrial health*. 26: 646-648.

Streisinger G, Walker C, Downer N, Knauber D & Singer F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*. 291: 293- 296.

Vila-Jato JL. (2009). Nanotecnología farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Monografías, Madrid, España. *Real Academia Nacional de Farmacia*. 409.

Wang M & Thanou M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*. 62: 90-99.

Westerfield M. (2007). The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4<sup>th</sup> ed. *University of Oregon Press, Eugene*.

White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, Bourque C, Dovey M, Goessing W, Brns CE & Zon, LI. (2008). Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell*. 2: 183-189.

Wolfensohn S & Lloyd M. (2003). Handbook of laboratory animal management and welfare. 3<sup>rd</sup> edition. Blackwell Science, Oxford.

Yu-Lan H, Qi W, Han F, Shao JZ & Gao, JQ. (2011). Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using zebrafish embryo model. *International Journal of Nanomedicine*. 6: 3351-3359.

Zhu X, Wang J, Zhang X, Chang Y & Chen Y. (2009). The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology*. 20: 95- 103.