

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Evaluación toxicológica de nanopartículas metálicas en etapas
tempranas del desarrollo y en la regeneración de la aleta
caudal de *Danio rerio***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Maria Fernanda Espinosa Villalpando

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Maria Fernanda Espinosa Villalpando

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Ulises Gregorio III Pachecho Bardullas



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **María Fernanda Espinosa Villalpando** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Evaluación toxicológica de nanopartículas metálicas en etapas tempranas del desarrollo y en la regeneración de la aleta caudal de *Danio rerio*

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

Las fracturas óseas severas o aquellas que se presentan en huesos largos usualmente requieren operaciones quirúrgicas, lo cual conlleva procesos largos de curación, muchas veces con resultados insatisfactorios en cuanto a la calidad del hueso se refiere. Debido a esto surge una necesidad de descubrir nuevas sustancias que promuevan la regeneración ósea. Entre las potenciales alternativas que actualmente se encuentran en desarrollo, están aquellas basadas en nanotecnología. Debido a su potencial en imagenología, las nanopartículas de óxido de gadolinio surgen como una potencial alternativa para ser utilizadas como esqueleto de sistemas de entrega de sustancias activas en la regeneración ósea. Por otra parte, los organismos modelo actualmente usados en investigación ortopédica tales como ratón, rata, oveja o perro, a pesar de poseer múltiples ventajas, presentan desventajas considerables, tales como el alto costo de realizar estudios con ellos, así como un muestreo de un número limitado de sustancias de interés biomédico. Debido a esto, el pez cebra (*Danio rerio*) surge como una alternativa de organismos pequeños modelo para su uso en estudios de regeneración de la aleta caudal. Adicionalmente, el modelo de nanotoxicidad en embriones y larvas de pez cebra ofrece información valiosa sobre la biocompatibilidad de los nanomateriales *in vivo*. Este estudio se presentan los resultados derivados del establecimiento de dos modelos de pez cebra y de la evaluación biológica de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio. El primer modelo se centra en la nanotoxicidad durante las primeras etapas del desarrollo del pez cebra, mientras que el segundo modelo examina la regeneración de la aleta caudal en ejemplares adultos. Los hallazgos revelan una biocompatibilidad limitada y una remodelación disminuida de la aleta caudal tras la exposición constante con las nanopartículas.

Palabras clave: pez cebra, nanopartículas metálicas, evaluación toxicológica, regeneración de la aleta caudal

Abstract of the thesis presented by **Maria Fernanda Espinosa Villalpando** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences.

Toxicological assessment of metallic nanoparticles in early stages of development and in the regeneration of the caudal fin of *Danio rerio*.

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Thesis Director

Severe bone fractures or those occurring in long bones usually require surgical operations, which involve lengthy healing processes, often with unsatisfactory outcomes in terms of bone quality. Because of this, there is a need to discover new substances that promote bone regeneration. Among the potential alternatives currently under development are those based on nanotechnology. Due to their potential in imaging, gadolinium oxide nanoparticles emerge as a potential alternative to be used as a scaffold for active substance delivery systems in bone regeneration. On the other hand, the model organisms currently used in orthopedic research such as mice, rats, sheep, or dogs, despite having multiple advantages, present considerable disadvantages, such as the high cost of conducting studies with them, as well as sampling a limited number of substances of biomedical interest. Because of this, the zebrafish (*Danio rerio*) emerges as an alternative small model organism alternative for use in studies of caudal fin regeneration. Additionally, the zebrafish embryo and larval nanotoxicity model provide valuable information on the in vivo biocompatibility of nanomaterials. This study shows the results derived from the establishment of two zebrafish models and the biological evaluation of gadolinium oxide nanoparticles doped with europium ions. The first model focuses on nanotoxicity during the early stages of zebrafish development, while the second model examines the regeneration of the caudal fin in adult specimens. Findings reveal limited biocompatibility and decreased remodeling of the caudal fin after constant exposure to the nanoparticles.

Keywords: zebrafish, metallic nanoparticles, toxicological assessment, caudal fin regeneration

Dedicatoria

A mi mamá, mi Gordita, por ser el amor más grande mi vida, mi mejor amiga, por escucharme, amarme infinitamente y comprenderme.

A mi papá, mi Fathersin, por apoyarme incondicional en la búsqueda de mis metas y sueños.

A mis hermanos, Aldo y Luis Angel, por creer en mí.

Al resto de mi familia, incluyendo a mi tía Rosy, tía Conchis, mis primas Kissy, Claudia, Lolis, mis sobrinos Ailene, Aldito, Nahomy, Hannia, Karlita, Diego, Monse, Betito, Miguelito, Sofía, Arleth, Santino y Max, por siempre hacerme sentir bienvenida en mi ranchito y recordarme que a pesar de estar lejos, mi casa siempre será en Tepic.

A Khaled por acompañarme emocionalmente en todo este proceso y por haber estado conmigo incluso en mis momentos más oscuros.

A mí, por creer en mi potencial, por ser determinada, por seguir aunque sintiera que todo se me venía abajo y por luchar por mis sueños.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente al Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, por brindarme la oportunidad de continuar mi trayectoria en las ciencias y por permitirme obtener mi grado de Maestría Ciencias en Ciencias de la Vida. También quiero expresar mi gratitud al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por su apoyo financiero en la consecución de esta meta profesional.

Agradezco a mi Directora de tesis, la Dra. Patricia Juárez Camacho, por compartir sus vastos conocimientos y experiencia conmigo, por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su tutela y por confiarme este importante proyecto de investigación. Su orientación y apoyo han sido fundamentales para mi crecimiento académico y profesional.

Agradezco a los miembros de mi comité, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt, la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua y el Dr. Ulises Gregorio III Pacheco por sus valiosos comentarios y sugerencias hacia el proyecto. Su experiencia y conocimientos aportaron una perspectiva invaluable que enriqueció significativamente los resultados de mi investigación.

Agradezco al grupo de investigación PnP por darme la oportunidad de formar parte de un equipo que promueve la colaboración y la comunicación abierta y crítica entre estudiantes. Estoy agradecida por el ambiente de aprendizaje enriquecedor y la oportunidad de trabajar junto a colegas comprometidos con la excelencia académica.

Agradezco a la M.C. Claudia Alcira Espinoza por compartir sus conocimientos conmigo y por brindarme apoyo en la síntesis de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio. Su orientación y experiencia fueron fundamentales para el éxito de este proyecto y estoy verdaderamente agradecida por su generosidad y dedicación.

Agradezco a la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua, por tan amablemente haberme abierto las puertas de sus instalaciones y por haberme permitido utilizar sus equipos. Además, su invaluable contribución fue fundamental en la construcción del acuario. Estoy profundamente agradecida por su generosidad y apoyo.

Agradezco al Dr. Salvador Villasuso por su invaluable ayuda en el diseño, construcción y estandarización de las condiciones del acuario de pez cebra. Su experiencia y dedicación fueron fundamentales para asegurar un ambiente adecuado y óptimo para el desarrollo de los peces.

Agradezco al Dr. Ricardo González por su apoyo en la construcción del acuario, en las reproducciones y crianza del pez cebra. Estoy profundamente agradecido por su colaboración y compromiso, los cuales fueron indispensables para alcanzar nuestros objetivos.

Agradezco al Dr. Jorge Cáceres Martínez del Departamento de Acuicultura y la Dra. Janeth Guerrero Rentería por su invaluable colaboración en la realización de la histopatología de los animales, lo que nos ha permitido obtener un conocimiento detallado sobre su estado de salud.

Agradezco al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por haberme brindado la oportunidad de utilizar las instalaciones del Departamento de Bionanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México para llevar a cabo el aislamiento de las partículas tipo virus provenientes del virus del mosaico del bromo. Su generosidad y apoyo fueron fundamentales para el desarrollo exitoso de esta parte de mi investigación.

Agradezco al Dr. Pedro Antonio Gama por sus consejos y apoyo en el aislamiento de las partículas tipo virus.

Agradezco al Dr. Ulises Gregorio III Pacheco por compartirme de su invaluable experiencia y consejos en el uso del pez cebra como organismos modelo para investigación toxicológica.

Agradezco a mi familia, en especial a mi mamá, por siempre escucharme incluso en mis momentos más difíciles.

Agradezco a todas las personas que conocí durante este tiempo que estuve en la maestría, agradezco su tiempo que me dieron al escucharme y los momentos que compartimos, los llevo en el corazón.

Agradezco a mi determinación y por nunca darme por vencida a pesar de que las situaciones cambiaran.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1 Hueso y regeneración ósea.....	3
1.1.2 Regeneración ósea, curación de fracturas y nuevos tratamientos.....	4
1.1.3 Nanotecnología y regeneración ósea.....	5
1.1.4 Modelos animales y pez cebra en la investigación ortopédica.....	8
1.1.5 Estructura de la aleta caudal en pez cebra.....	10
1.1.6 Evaluación toxicológica de nanopartículas en embriones y larvas de pez cebra.....	13
1.1.7 Efecto de nanopartículas en la regeneración de la aleta caudal en pez cebra.....	14
1.2 Justificación.....	17
1.3 Hipótesis.....	18
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Objetivo general.....	18
1.4.2 Objetivos específicos.....	18
Capítulo 2. Metodología.....	19
2.1 Optimización y monitoreo de la calidad de agua del acuario de <i>Danio rerio</i>	19

2.2	Histología de peces cebra adultos.....	20
2.3	Eclosión de nauplios de <i>Artemia salina</i> y mantenimiento	22
2.4	Alimentación de los peces cebra.....	23
2.5	Reproducción de adultos de <i>Danio rerio</i> y obtención de embriones para experimentación ..	23
2.6	Crianza de peces cebra desde el estadio embrionario hasta la adultez	24
2.7	Síntesis de nanopartículas.....	26
2.7.1	Síntesis de las nanopartículas tipo virus aisladas del virus del mosaico del bromo	26
2.7.2	Síntesis de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio	29
2.8	Caracterización de las nanopartículas.....	30
2.8.1	Caracterización de partículas tipo virus a partir del virus del mosaico del bromo	30
2.8.2	Caracterización de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio.....	30
2.9	Evaluación del efecto toxicológico de las nanopartículas en estadio embrionario y larval de <i>Danio rerio</i>	31
2.10	Evaluación del efecto de nanopartículas en la regeneración de la aleta caudal en adultos de <i>Danio rerio</i>	35
2.11	Presentación de resultados y análisis estadístico	38
Capítulo 3. Resultados.....		40
3.1	Optimización de la calidad de agua del acuario de pez cebra	40
3.2	Estado de salud de los peces adultos	42
3.3	Cultivo de <i>Artemia salina</i> y mantenimiento.....	44
3.4	Reproducción de peces cebra	46
3.5	Crianza de peces cebra desde el estadio embrionario hasta la adultez	47
3.6	Caracterización de las nanopartículas.....	48
3.6.1	Caracterización de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio	48
3.6.2	Caracterización de partículas tipo virus	49
3.7	Efecto toxicológico de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en etapas tempranas del desarrollo en <i>Danio rerio</i>	50

3.7.1	Exposición acumulativa de Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ NPs.....	51
3.7.1.1	Mortalidad.....	51
3.7.1.2	Eclosión.....	52
3.7.1.3	Ritmo cardíaco.....	52
3.7.2	Exposición no acumulativa de Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ NPs.....	53
3.7.2.1	Mortalidad.....	53
3.7.2.2	Eclosión.....	55
3.7.2.3	Cardiotoxicidad.....	56
3.7.2.4	Análisis de malformaciones.....	56
3.8	Evaluación del efecto toxicológico de nanopartículas metálicas en la regeneración de la aleta caudal en peces cebra adultos	61
3.8.1	Longitud de los peces	63
3.8.2	Área de las aletas caudales regeneradas	64
3.8.3	Peso de los peces cebra.....	65
Capítulo 4.	Discusión	66
4.1	Optimización de la calidad de agua del acuario de pez cebra	66
4.2	Estado de salud de peces adultos	70
4.3	Reproducciones de peces adultos.....	72
4.4	Crianza de alevines de pez cebra	73
4.5	Evaluación de la nanotoxicidad de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en estadios embrionario y larval de <i>Danio rerio</i>	75
4.6	Efecto toxicológico de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en la regeneración de la aleta caudal de <i>Danio rerio</i>	81
Capítulo 5.	Conclusiones	86
	Literatura citada	88

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Ventajas del uso del pez cebra en el modelo de nanotoxicidad y el modelo de regeneración de la aleta caudal. Modificado de Tonelli <i>et al.</i> , 2020.	2
Figura 2. Proceso de regeneración de la aleta caudal de un ejemplar adulto de <i>Danio rerio</i>. A) Pre y B) post amputación, C) 3 días después, d) 6 días después y e) 9 días después de la amputación. Modificado de Pfeferli <i>et al.</i> , 2015.	3
Figura 3. Aplicaciones de nanopartículas en distintas aplicaciones de la investigación ortopédica. Modificado de Tautzenberger <i>et al.</i> , 2012.	7
Figura 4. Apéndices en el pez cebra: aleta caudal, anal, dorsal, pélvica y pectoral. Otras estructuras también son destacadas como: ojo, opérculo, nostril y boca. Modificado de Cartner <i>et al.</i> , 2020.....	9
Figura 5. Estructura del esqueleto de la aleta caudal de un pez cebra adulto con tinción de azul de alción y rojo de alizarina. A) Estructura lobulada de la aleta caudal, se observa la presencia de 18 rayos óseos, también conocidos como lepidotricias, de los cuales algunos de ellos presentan bifurcación. B) Segmentación de los rayos óseos. C) Actinotricias. D) Acercamiento de los segmentos óseos. Escala: A) 1000 μm y (B-D) 100 μm . Modificado de Pfefferli & Jaźwińska, 2015.....	10
Figura 6. Características estructurales observadas en los estadios pre y post amputación de los rayos óseos presentes en la aleta caudal de <i>Danio rerio</i>. A) Representación esquemática de un grupo de lepidotricias. B) Plano del corte histológico de una lepidotricia. C) Plano del corte histológico de la zona de las interrayas. D) Formación del blastema a las 30 hpa. En líneas punteadas se indica el plano de amputación. E) Blastema a las 72 hpf. F) Extremo distal y G) zona proximal al plano de amputación a las 72 hpf. Tinción con hematoxilina y eosina. Abreviaturas e=epidermis, b=hueso, m= tejido mesenquimal, a= arteria, bl= blastema, we=epidermis de la herida, ob= osteoblastos, bwe= capa basal de la epidermis de la herida. Escala 50 μm . Modificado de Pfefferli & Jaźwińska, 2015.....	12
Figura 7. Principales vías de señalización que coordinan la regeneración epimórfica de las aletas caudales en pez cebra. Modificado de Tal <i>et al.</i> , 2010.	13
Figura 8. Tasa de regeneración de aletas caudales en proceso de regeneración tratadas con nanopartículas y nanotubos de óxido de titanio. A) Longitud media de las aletas caudales de individuos de <i>Danio rerio</i> expuestas a 1 mg/L de nanopartículas (TiO_2 -NPs) y nanotubos de dióxido de titanio (TiO_2 -NTs). *** $P > 0.001$, n=6 peces por grupo. Modificado de Park <i>et al.</i> , 2013.....	15
Figura 9. Protocolo diseñado por Pang <i>et al.</i>, 2020 para la exposición a los peces amputados con nanopartículas de plata. Los peces fueron amputados y posteriormente de 12 horas post amputación, las aletas caudales de los animales fueron expuestas a los nanomateriales. Posteriormente de esto, los animales fueron devueltos a sus tanques de recuperación. El experimento abarcó los 7.5 días post amputación. Modificado de Pang <i>et al.</i> , 2020.	16

- Figura 10. Cuadro de resultados colorimétricos del Freshwater Master Test Kit de API para análisis de concentraciones de especies nitrogenadas.** Esta escala permite el análisis de nitrógeno amoniacal total, nitrito y nitratos. 20
- Figura 11. Esquema de alimentación durante los diferentes estadios del desarrollo del pez cebra.** La alimentación varió dependiendo del estadio del desarrollo del animal, se distinguen tres estadios: embrión, larva, juvenil y adulto (Lawrence, 2011; Varga, 2011). 25
- Figura 12. Proceso de obtención del extracto que contenía los viriones del virus del mosaico del bromo.** A) Hojas de cebada infectadas con el virus cortadas en pedazos. B) Mezcla obtenida tras la filtración del macerado. B) Fases obtenidas tras la primera centrifugación. B) Mezcla homogénea obtenida tras la segunda centrifugación. 27
- Figura 17. Colchón de sacarosa para la centrifugación de gradiente de densidad para el aislamiento de partículas virales.** Acercamiento de un tubo de ultracentrifuga en donde la parte inferior corresponde al colchón de sacarosa y la superior corresponde al extracto del cual se obtuvo el virus del mosaico del bromo. 27
- Figura 14. Representación visual del diseño experimental de la evaluación toxicológica de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en fases tempranas del desarrollo del pez cebra.** Se destacan los tiempos de evaluación de los parámetros toxicológicos registrados (Ansharani *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2009; Bar-Ilan *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2008). 32
- Figura 15. Descripción del procedimiento en Image J mediante el cual se determinó la afectación que las NPs metálicas ejercieron en el desarrollo de los ojos de las larvas de 96 hpf de *Danio rerio*.** Para llevar a cabo la cuantificación de las áreas de los ojos de las larvas tratadas con los nanomateriales, se requirió emplear la herramienta de selección poligonal. 33
- Figura 16. Escala de malformaciones de larvas tratadas con agentes toxicológicos propuesta por Ba-Ilan *et al.*, 2009.** La escala abarcaba un puntaje que abarcaba desde el 0 correspondiendo a ningún efecto toxicológico observado hasta el 4, el cual representaba la muerte del animal. YND: yema opaca y no agotada, SH: cabeza pequeña, SG: retraso en el crecimiento, CM: malformaciones circulatorias, TM: malformaciones de la cola, BD: degradación del cuerpo, PE: edema pericárdico, BS: columna doblada, OH: tejido opaco de la cabeza, YSE: edema del saco vitelino, OY: yema opaca, OH: tejido opaco de la cabeza y YSE: edema del saco vitelino. Modificado de Ba-Ilan *et al.*, 2009. 34
- Figura 17. Descripción gráfica del diseño experimental de la evaluación del efecto de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en la regeneración de la aleta caudal en adultos de pez cebra.** Se destacan los parámetros monitoreados, así como los tiempos de amputación, exposición y registro de parámetros. 37
- Figura 18. Herramienta de selección poligonal en Image J para el cálculo del área de las aletas caudales regeneradas.** A) Imagen en Image J antes de seleccionar la herramienta de selección poligonal. B) Área de la aleta caudal tomada en cuenta por dicha herramienta de análisis digital. 38
- Figura 19. Monitoreo de la calidad de agua tras la integración de un biofiltro.** La medición de los parámetros se realizó por 12 semanas. 41

- Figura 20. Trematodos en el lumen del estómago.** A) Agrupación de quistes y estadios larvales de un trematodo en el lumen del estómago. B) Acercamiento de quistes. C) Obstrucción intestinal ocasionada por los quistes. D) Quiste vacío (Q) y un estadio larval (El) de un trematodo. 43
- Figura 21. Microsporidios de la especie *Pseudoloma neurophilla* en el cordón espinal de un individuo de pez cebra.** A) Agrupación de microsporidios y B) Acercamiento de la agrupación de parásitos dentro de un axoma..... 43
- Figura 22. Nematodos en el epitelio intestinal de un individuo adulto de pez cebra, presuntamente de la especie *Pseudocapillaria tomentosa*.** Distintos aumentos (A y B). 44
- Figura 23. Resultados de Artemia alimentada por 25 días post eclosión con diferentes dietas.** A) Easy Reef EasyBooster 25, Market DHA Gold , Lomas Spirulina Boost. Aumento con 4X..... 45
- Figura 24. Rendimiento de las reproducciones de peces cebra adultos al ser puestos a reproducción en peceras con diferentes volúmenes de agua.** Los resultados correspondieron a un triplicado experimental y se reporta la media junto con la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t de Student..... 47
- Figura 25. Micrografías de TEM de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio sin sonicación.** Escala: 200 nm. 48
- Figura 26. Histograma de frecuencias con los tamaños de las NPs metálicas.** Rango de diámetros de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio. 49
- Figura 27. Dispersión dinámica de la luz de viriones y partículas tipo virus.** Este análisis permite determinar el radio hidrodinámico de los viriones (A) y partículas tipo virus (B) aisladas del virus del mosaico del bromo. 50
- Figura 28. Exposición acumulativa: mortalidad de larvas tratadas con distintas concentraciones de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs a las 96 hpf.** Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40..... 51
- Figura 29. Exposición acumulativa: eclosión de larvas tratadas con distintas concentraciones de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs a las 96 hpf.** Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40..... 52
- Figura 30. Exposición acumulativa: ritmo cardíaco a distintas horas de larvas tratadas con $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs.** A) 72 y B) 96 hpf. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40..... 53
- Figura 31. Supervivencia de larvas tratadas con distintas concentraciones de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ nanopartículas a diferentes tiempos.** A las 24 (A), 48 (B), 72 (C), y 96 (D) hpf. La exposición se considera no acumulativa. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40..... 54

- Figura 32. Comparación de supervivencia de embriones y larvas de *Danio rerio* tratados con nanopartículas de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ a diferentes tiempos.** Se muestran las tendencias de todos los grupos y todos los tiempos considerados..... 54
- Figura 33. Tasa de eclosión reportada a las 72 y 96 hpf de los grupos tratados con $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ nanopartícula.** Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40. 55
- Figura 34. Tasa de eclosión a distintos tiempos de larvas expuestas a distintas concentraciones de nanopartículas metálicas.** Se reporta la tasa de eclosión de larvas a distintos tiempos..... 55
- Figura 35. Cardiotoxicidad de las nanopartículas metálicas ($Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs) en embriones y larvas a diferentes tiempos.** Se reporta la frecuencia cardíaca por minuto de alevines tratados con diferentes concentraciones de nanopartículas metálicas. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=20. . 56
- Figura 36. Malformaciones de larvas de pez cebra tratadas con distintas concentraciones de nanopartículas de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$.** Se agregan imágenes representativas de larvas de 96 hpf de los distintos grupos de tratamiento. Escala: 1 μm 58
- Figura 37. Longitud de larvas de 96 hpf tratados con diferentes concentraciones de nanopartículas metálicas.** Se reporta la longitud de larvas desde el inicio de la mandíbula hasta el extremo distal de su aleta caudal. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar. Para dicha medición se consideraron 12-15 sujetos experimentales por grupo. 59
- Figura 38. Evaluación del impacto de la exposición con nanopartículas de óxido de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ en el desarrollo ocular de larvas de pez cebra de 96 hpf.** Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar. Para dicha medición se consideraron 12-15 sujetos experimentales por grupo..... 59
- Figura 39. Escala de malformaciones a las 96 hpf de larvas tratadas con distintas concentraciones de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs basada en la escala propuesta por Bar-Ilan *et al.*, 2009.** Las larvas de 96 hpf se les otorgó un puntaje dependiendo de la severidad de sus malformaciones. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar. Para dicha medición se consideraron 12-15 sujetos experimentales por grupo. 60
- Figura 40. Número de malformaciones por larvas tras una exposición con nanopartículas metálicas desde el estadio de blástula hasta las 96 hpf.** Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar. Para dicha medición se consideraron 12-15 sujetos experimentales por grupo. 61
- Figura 41. Fotografías del proceso de regeneración de la aleta caudal de peces cebra adultos tratados con diferentes estímulos durante un lapso de 11 días post amputación (dpa).** Se incluyen las imágenes representativas de los grupos contro, tracolimus 0.1 $\mu g/ml$ y los grupos referentes a la exposición con $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs a diferentes concentraciones (0.1, 4 y 40 $\mu g/mL$). 62

- Figura 42. Longitud de los peces amputados de su aleta caudal y tratados con diferentes estímulos durante un periodo de 11 días post amputación.** Se compara la longitud de los peces considerando los diferentes estadios de la regeneración. Los animales se midieron desde el inicio de su mandíbula hasta uno de los extremos distales de la aleta caudal en proceso de regeneración. Se muestra la desviación estándar. N=5..... 64
- Figura 43 Áreas de las aletas caudales regeneradas tras la exposición con diferentes tratamientos.** Se midió el área de las aletas regeneradas en un periodo de 11 días post amputación. Se muestra la desviación estándar. N=5. 64
- Figura 44. Peso de peces cebra amputados de su aleta caudal y tratados durante un periodo de 11 dpa con diferentes tratamientos.** Se muestra la desviación estándar. N=5..... 65
- Figura 45. Ciclo del nitrógeno.** Modificado de Limbo, 2009. 67
- Figura 46. Proceso de filtración de agua municipal utilizado en una acuario de investigación de pez cebra.** Modificado de Lawrence, 2007. 69
- Figura 47. Imagen representativa de un pez cebra enfermo con una infección severa de *Pseudoloma neurophilia*, un tipo de microsporidio.** Modificado de Kent *et al.* 2020. 71
- Figura 48. La frecuencia de alimentación recomendada para los peces *Danio rerio* a través de los distintos estadios del desarrollo.** Modificado de Lawrence, 2011. 74
- Figura 49. Estructuras diferenciadas de un embrión de pez cebra. Se observa la presencia de corión y de los poros coriónicos.** Modificado de Hamm *et al.*, 2019..... 77
- Figura 50. Imágenes representativas de larvas de pez cebra tratadas con nanopartículas de titanio desde el estadio de blástula hasta las 96 hpf.** Grupos A) no tratadas, B) 50 µg/mL y C) 200 µg/mL. HD: malformación craneal, TM: malformación en la cola, YSE: edema del saco vitelino, PE: edema pericárdico. Modificado de Duan *et al.*, 2013..... 78
- Figura 51. Imágenes representativas del proceso de regeneración de aletas caudales de peces cebra tratadas de manera continua durante 28 dpa con DMSO y tracolimus.** Modificado de Kujawski *et al.* (2014)..... 84

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Histopatología de peces cebra adultos escogidos aleatoriamente. Se mencionan los tipos de patógenos encontrados en distintos órganos y tejidos de tres peces cebra adultos a los cuales se les realizó histopatología con tinción de hematoxilina y eosina.	42
Tabla 2. Condiciones óptimas de calidad de agua para la crianza de <i>Danio rerio</i> en el ZIRC. Modificado de Varga, 2011.	66
Tabla 3. Factores abióticos y bióticos que impactan el rendimiento y éxito reproductivo del pez cebra. Modificado de Kolb <i>et al.</i> , 2018.	73

Capítulo 1. Introducción

El esqueleto humano adulto, compuesto por 206 huesos divididos en largos, cortos, planos e irregulares, es un órgano metabólicamente activo. El tejido óseo, un tipo de tejido conectivo mineralizado, experimenta constantes procesos de remodelado a lo largo de la vida. Los huesos contienen cuatro tipos principales de células: osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y células osteogénicas. La remodelación ósea, crucial para la curación de fracturas, involucra la reabsorción por los osteoclastos y la formación por los osteoblastos. Un desequilibrio en este proceso puede resultar en enfermedades óseas graves como la osteoporosis y la osteopetrosis, y en condiciones patológicas como la metástasis ósea y la artritis inflamatoria (Ansari, 2019; Clarke, 2008; Florencio-Silva *et al.*, 2015).

La regeneración ósea, también conocida como remodelado óseo, es un proceso organizado que involucra diversos tipos de células y vías de señalización. Es esencial para restaurar la función esquelética, especialmente en la curación de fracturas y la reconstrucción de grandes defectos óseos causados por traumatismos, infecciones o resección de tumores. Las fracturas, principalmente debidas a traumas, requieren a menudo intervenciones ortopédicas, especialmente en pacientes con enfermedades óseas que comprometen la regeneración. Los tratamientos comunes incluyen operaciones quirúrgicas, xenoinjertos y aloinjertos, aunque pueden tener consecuencias como dolor crónico y debilidad muscular. No obstante, estos tratamientos están asociados a la presencia de secuelas una vez el hueso ha sanado (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

Las investigaciones ortopédicas buscan desarrollar nuevos materiales que promuevan la regeneración ósea. En este sentido, las terapias basadas en nanotecnología han mostrado resultados prometedores. Los nanomateriales, debido a sus propiedades únicas, han mostrado gran potencial como agentes terapéuticos. La evaluación de estos materiales en el campo ortopédico requiere de pruebas exhaustivas en modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En la investigación *in vivo*, los organismos modelo preferidos son animales como ratones y ratas, seguidos de animales más grandes como ovejas y perros. Estos animales ofrecen ventajas debido a su mayor similitud ósea con los humanos y un alto grado de homología genética. Sin embargo, también presentan desventajas significativas, como los altos costos asociados con su investigación (Dimitriou *et al.*, 2011; Sommer *et al.*, 2019).

El pez cebra (*Danio rerio*) ha surgido como un modelo versátil y popular en la investigación ortopédica, especialmente en estudios de nanotoxicidad y regeneración de la aleta caudal (**Figura 1**). Este organismo

permite evaluar la biocompatibilidad y el potencial terapéutico de los nanomateriales. En particular, los estudios de nanotoxicidad en fases embrionaria y larval permiten observar los efectos toxicológicos de los nanomateriales durante las etapas tempranas de desarrollo. Por otro lado, el modelo de regeneración de la aleta caudal es útil para investigar la capacidad regenerativa inducida por nanopartículas metálicas, que pueden actuar como andamios para sustancias terapéuticas (Sehring & Weidinger, 2019; Tonelli *et al.*, 2020; Uemoto *et al.*, 2020).

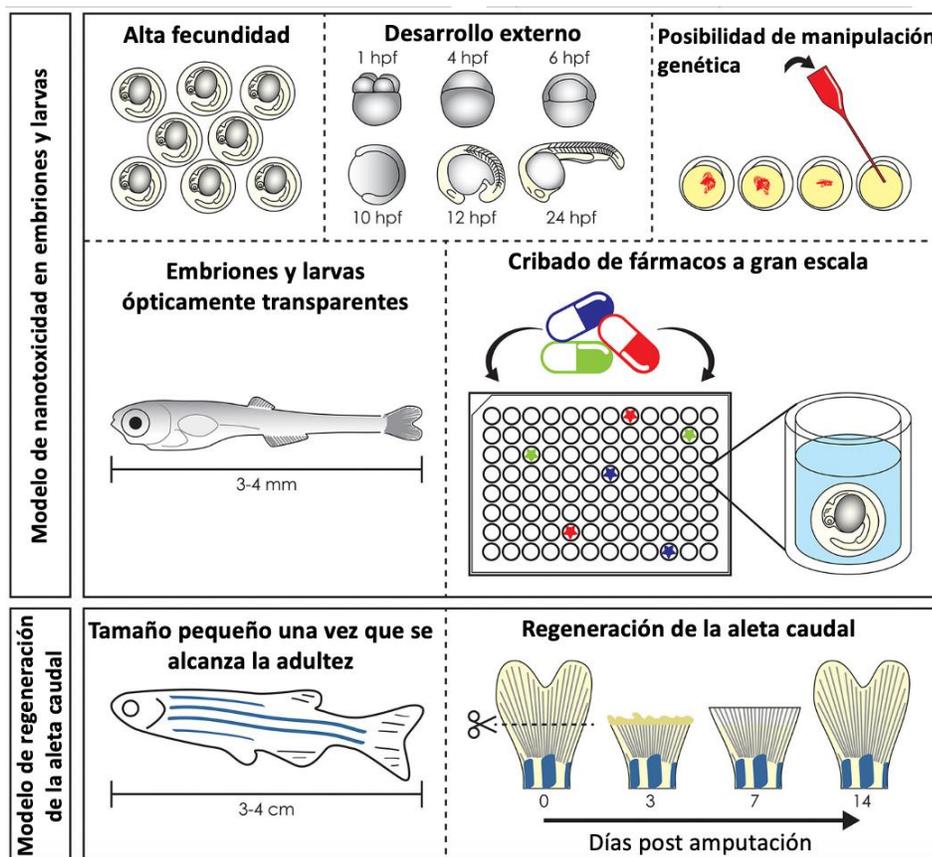


Figura 1. Ventajas del uso del pez cebra en el modelo de nanotoxicidad y el modelo de regeneración de la aleta caudal. Modificado de Tonelli *et al.*, 2020.

El modelo de nanotoxicidad en fases embrionaria y larval del pez cebra evalúa los efectos toxicológicos de nanomateriales durante las etapas tempranas de desarrollo. Los parámetros toxicológicos pueden incluir desde la observación de malformaciones, mortalidad y cambios en el comportamiento, ayudando a comprender los riesgos asociados con la exposición a nanomateriales en etapas críticas del desarrollo (Hacke *et al.*, 2018).

Por otra parte, el modelo de regeneración de la aleta caudal del pez cebra permitiría evaluar el efecto en la regeneración ósea de moléculas bioactivas, dado que el pez cebra puede regenerar su aleta caudal tras

la amputación, involucrando procesos biológicos complejos como la proliferación celular y la reorganización tisular, completando la regeneración en 8 a 12 días (**Figura 2**) (Meyers 2018; Pang *et al.*, 2020).

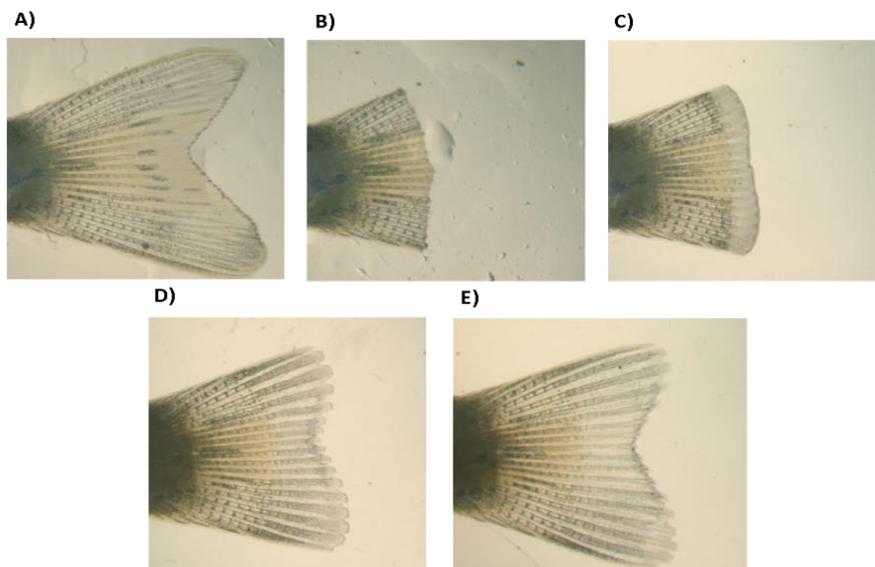


Figura 2. Proceso de regeneración de la aleta caudal de un ejemplar adulto de *Danio rerio*. A) Pre y B) post amputación, C) 3 días después, d) 6 días después y e) 9 días después de la amputación. Modificado de Pferli *et al.*, 2015.

En el presente trabajo, se evaluó la toxicidad y la capacidad de regeneración de la aleta caudal del pez cebra tras la exposición con nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio. Aunque estos materiales tienen potencial en aplicaciones biomédicas, los resultados mostraron una biocompatibilidad reducida y un decremento en la regeneración de la aleta caudal, limitando su aplicabilidad (Hacke *et al.*, 2018; Meyers 2018; Pang *et al.*, 2020).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Hueso y regeneración ósea

El hueso ejerce distintas funciones en el cuerpo de los vertebrados, entre ellas el dar forma y soporte, permitir el movimiento y la locomoción por medio del anclaje de los músculos, tendones y ligamentos, proveer protección a órganos vitales, servir de reservorio de calcio y fosfato, ayudar en el mantenimiento

de la homeostasis mineral y el equilibrio ácido-base además de servir como reservorio de factores de crecimiento y citocinas, y proporcionar el ambiente para la hematopoyesis dentro de los espacios de la médula (Clarke, 2008; Florencio-Silva, *et al.*, 2015).

El hueso está compuesto en un 70% de componentes inorgánicos y en un 30% de segmentos orgánicos. El material inorgánico del hueso consiste en su mayoría de iones de fosfato y de calcio. Por otra parte, la matriz orgánica contiene un 90% de proteínas colágenas, predominantemente colágeno tipo I y proteínas no colagenosas tales como osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina y sialoproteína ósea II, proteínas morfogenéticas óseas así como factores de crecimiento. En la matriz extracelular también se distinguen pequeños proteoglicanos ricos en leucina que incluyen decorina, biglicano, lumicano y proteínas séricas (Ansari, 2019; Florencio-Silva *et al.*, 2015).

La matriz ósea constituye una red compleja y organizada que proporciona soporte mecánico y que a la vez juega un papel fundamental en la homeostasis ósea. Bajo ciertas circunstancias, la matriz ósea puede liberar varias moléculas que interfieren en la actividad de las distintas células presentes en el hueso, las cuales tienen una participación importante en procesos como el remodelado óseo. Asimismo, se ha demostrado que existen diferencias en la concentración de proteínas de la matriz, dependiendo de distintos factores, incluyendo la edad, nutrición y exposición a tratamientos antiosteoporóticos (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

La matriz ósea, así como otros componentes del hueso, son estructuras conservadas en los vertebrados, desde mamíferos hasta peces. Adicionalmente, los sistemas esqueléticos de teleósteos y mamíferos comparten tipos de células similares (Tonelli *et al.*, 2020).

1.1.2 Regeneración ósea, curación de fracturas y nuevos tratamientos

Cuando el hueso es fracturado, comienza un sangrado que a su vez resulta en inflamación y en la coagulación *in situ* de la sangre. El proceso de inflamación puede extenderse por varios días, mientras que la generación del hueso comienza una vez que la sangre coagulada del hematoma es sustituida por tejido fibrosos y cartílago el cual recibe el nombre de callo blando. Este callo es paulatinamente sustituido por hueso duro denominado callo duro. Por último, en la fase de remodelación ósea es en donde el hueso se regenera abarcando varios meses (Ansari, 2019). Las fracturas suelen ser tratadas mediante diversos métodos según su gravedad. El enfoque convencional para tratar una fractura puede implicar el uso de

autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos óseos, biomateriales sustitutos o intervenciones quirúrgicas. Los materiales actualmente utilizados en la práctica clínica incluyen metales, cerámicas, polímeros y sus compuestos. A pesar de su amplia historia y uso generalizado, estos materiales presentan inconvenientes como baja biocompatibilidad, formación ósea deficiente y falta de coincidencia en las propiedades mecánicas con el hueso nativo adyacente (Hajiali et al., 2021).

Si bien estas terapias son eficaces para el tratamiento de fracturas en huesos cortos, su eficacia y capacidad de regeneración ósea disminuyen cuando la fractura es más grave y afecta a un hueso largo (Giannoudis & Einhorn, 2005; Aronson, 1997). No obstante, debido a los largos y dolorosos procesos de curación, así como las secuelas presentes en el hueso una vez que éste ha sanado particularmente para el caso de fracturas en huesos largos o fracturas severas, existe la necesidad de la creación de nuevas terapias que promuevan la regeneración ósea (Babuska, *et al.*, 2022).

Con el fin de brindar alternativas ante esto, se han diseñado distintas alternativas para el tratamiento de fracturas, como lo son: los sustitutos sintéticos, andamios combinados con moléculas activas, productos basados en células, fibras biomiméticas y sustitutos no fibrosos, sustitutos de impresión celular 3D basados en biomateriales, polímero poroso bioactivo y nanoandamios con células madre y campo magnético y terapias basadas en nanotecnología y nanomedicina (Ansari, 2019).

1.1.3 Nanotecnología y regeneración ósea

Las nanopartículas a diferencia del material a la macroescala presentan un incremento en la razón área superficial-volumen lo cual a su vez influye en la reactividad del material. De igual manera, los efectos cuánticos debido al tamaño del nanomaterial tiene una influencia en el comportamiento de éste, llegando a en algunos casos, a otorgarle ciertas características innovadoras como capacidades fluorescentes, magnéticas y eléctricas (Savage, *et al.*, 2016).

El uso de nanopartículas en la investigación ortopédica ha experimentado avances significativos en los últimos años. Estos nanomateriales comparten un tamaño similar al de componentes clave del hueso natural, como los cristales de hidroxapatita y los compartimentos celulares. Esta similitud dimensional los convierte en candidatos prometedores para aplicaciones locales en el tejido óseo. Asimismo, se ha observado que el emplear nanopartículas como andamios para sistemas de transporte de medicamentos podría mejorar la solubilidad de fármacos con baja solubilidad, así como modular su vida media en la

circulación sanguínea (Nuñez-Rivera *et al.*, 2020).

El avance del campo de las terapias basadas en nanotecnología con fines ortopédicos, orientadas a promover la regeneración ósea, ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años. Este progreso ha resultado en la síntesis de una amplia gama de nanomateriales con diversas aplicaciones, entre las cuales se destacan las nanopartículas. Estas últimas se caracterizan por tener sus tres dimensiones dentro del rango nanométrico (Najahi-Missaoui *et al.*, 2021).

Las nanopartículas destinadas a servir como andamios en sistemas nanoparticulados para promover la regeneración ósea deben cumplir con una serie de características específicas. En primer lugar, es fundamental que sean biocompatibles y biodegradables, garantizando así su seguridad y eliminación del organismo. Además, deben ser capaces de transportar eficazmente las moléculas de interés, como agentes marcadores o fármacos, hacia su destino específico en el cuerpo. Es esencial que estas nanopartículas actúen de manera selectiva en su objetivo, evitando efectos secundarios no deseados en otros tejidos, así como que éstas sean biocompatibles. Por otro lado, las propiedades mecánicas, la biocompatibilidad y la capacidad osteoinductiva de los materiales son criterios cruciales que influyen significativamente en la regeneración ósea y, por lo tanto, deben ser cuidadosamente considerados en el diseño y desarrollo de nanopartículas para este fin (Hajiali *et al.*, 2021; Tautzenberg *et al.*, 2012).

Las nanopartículas dopadas con tierras raras representan materiales prometedores para el etiquetado fluorescente. Esto gracias a su alto cambio de Stokes, a sus espectros de emisión estrechos, a su alta estabilidad química, su fotoblanqueo minimizado y a la baja toxicidad observada de manera *in vitro*. En este sentido, las nanopartículas de óxido de gadolinio representan un candidato prometedor para aplicaciones en imagenología gracias a sus propiedades ópticas como material luminiscente (Chaudhary, *et al.*, 2017; Goldys, *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, las terapias dirigidas a promover la regeneración ósea basadas en nanotecnología han mostrado resultados prometedores. En la **Figura 3** se muestra una vista general de las distintas áreas en donde la nanotecnología presenta aplicaciones en el campo de investigación ósea, incluyendo enfoques tales como: 1) etiquetado celular a través del uso de puntos cuánticos, nanopartículas metálicas, nanopartículas superparamagnéticas; 2) entrega de fármacos o de osteomoduladores y agentes osteoactivos y 3) terapia génica para la entrega de siRNA y plásmidos (Tautzenberger, *et al.*, 2012).

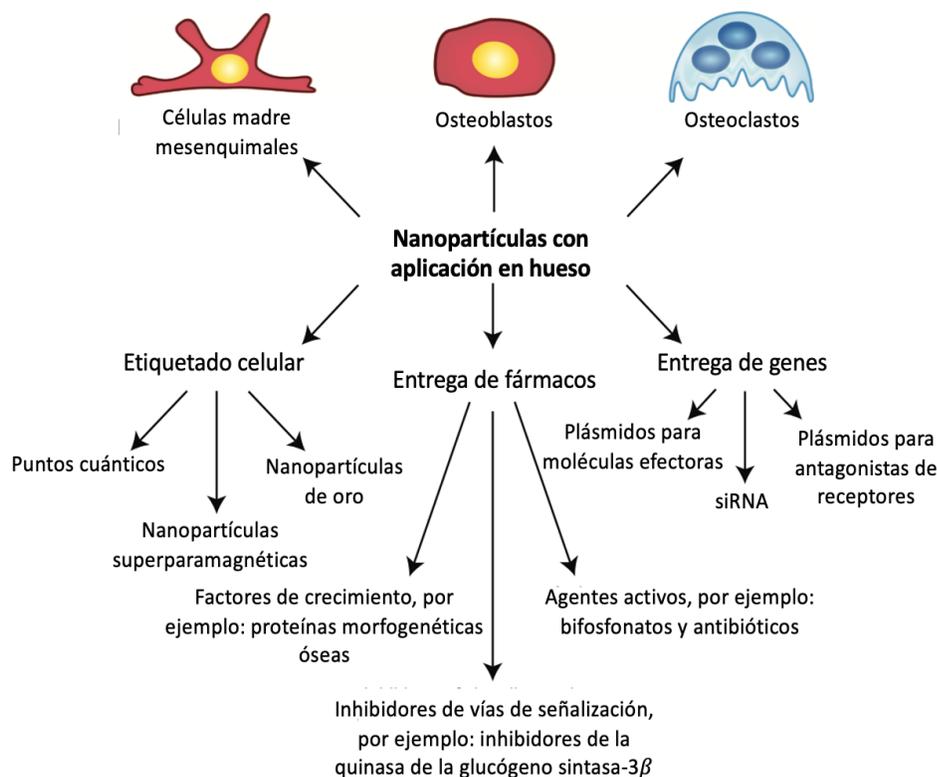


Figura 3. Aplicaciones de nanopartículas en distintas aplicaciones de la investigación ortopédica. Modificado de Tautzenberger *et al.*, 2012.

En este sentido, Yao *et al.* (2019) sintetizaron un hidrogel cargado con nanoclusters de fosfato de calcio como un material de regeneración ósea inyectable. El hidrogel fue biocompatible y estabilizó a los nanoclusters de fosfato de calcio para que éstos pudieran infiltrarse de manera eficiente en las fibrillas de colágeno, lo que condujo a la mineralización intrafibrilar de los nanocristales de hidroxiapatita. Los resultados *ex vivo* revelaron que el hidrogel cargado con los nanoclusters poseía una excelente afinidad ósea, además de que proporciona un entorno adecuado para la proliferación y diferenciación de las células óseas. Por otra parte, los resultados *in vivo* usando un modelo de rata, mostraron que el hidrogel sintetizado podía generar rellenos en defectos óseos, los cuales tuvieron una unión perfecta al tejido circundante y un rendimiento mecánico comparable con el hueso nativo.

En un ejemplo más reciente, Liu, *et al.*, 2020 sintetizaron hidrogeles multifuncionales modificados con nanopartículas de marco-9 de imidazolato zeolítico (ZIF-8 NPs) con la finalidad de estabilizar el entorno del injerto óseo, garantizar el suministro de sangre, promover la diferenciación osteogénica y acelerar la reconstrucción ósea. Los resultados *in vivo* mostraron que la terapia sintetizada promovió la osteogénesis vascularizada en el área de la herida al dar estabilidad a los materiales de injerto ósea y acelerar en gran medida la velocidad y la cicatrización de la reconstrucción ósea.

1.1.4 Modelos animales y pez cebra en la investigación ortopédica

Los modelos animales son indispensables no sólo para investigar condiciones patológicas óseas, sino también para explorar la respuesta tisular, evaluar la biocompatibilidad, descubrir terapias y replicar las complejas interacciones multicelulares que ocurren en el organismo (Busse, *et al.*, 2019; Sommer, *et al.*, 2019).

Existen diferentes factores que influyen en la elección del animal modelo, tales como longitud del experimento, costos de alimentación y mantenimiento, tipos de experimentos y tipos de mediciones que se realizan. Los animales modelos pequeños frente a los grandes exhiben ventajas adicionales, incluyendo un fácil manejo, bajos costos y rápida experimentación debido a su madurez y crecimiento acelerado, expectativa de vida y metabolismo incrementado (Sommer, *et al.*, 2019; Busse, *et al.*, 2019).

Para el caso del uso del pez cebra como organismo modelo, distintas características clave han favorecido su uso como modelo de investigación, tales como su tamaño pequeño, rápido desarrollo, facilidad de manipulación y de mantenimiento. El pez cebra tiene varias ventajas en comparación con los modelos de mamíferos. Su alta fecundidad y fertilización y desarrollo externos permiten una manipulación genómica fácil, sus etapas tempranas de vida transparentes permiten diversos estudios de imagenología, y su permeabilidad cutánea los hace adecuados para el cribado de fármacos a gran escala. Los peces cebra adultos alcanzan un tamaño máximo de 3-4 cm, lo que facilita y abarata su mantenimiento en grandes cantidades, reduciendo el costo de crianza. Además, el pez cebra se utiliza como modelo vertebrado para estudiar la regeneración, debido a su capacidad para regenerar diferentes órganos, como la aleta caudal.

Otra ventaja que hacen del pez cebra un candidato viable para estudios sobre la toxicidad de nanomateriales en fases tempranas del desarrollo se encuentra su alta tasa de fecundidad, ya que una sola hembra puede producir hasta 300 embriones en un solo ciclo reproductivo. Además, el alto porcentaje de homología entre el genoma del pez cebra y el humano, que se estima en aproximadamente un 70%, respalda esta elección. Asimismo, la alta conservación de los procesos fisiológicos y de desarrollo, junto con la similitud de los sistemas de órganos clave como el digestivo, nervioso y cardiovascular con los de los humanos, contribuyen a establecer una equivalencia significativa en la respuesta a la exposición a nanopartículas entre ambas especies (Tonelli, *et al.*, 2020).

Con relación al modelo de regeneración de la aleta caudal, éste aprovecha la característica que presentan algunos peces y anfibios la cual es la regeneración de sus apéndices. Esta capacidad regenerativa ofrece

una oportunidad única para estudiar los mecanismos subyacentes a la regeneración ósea y cartilaginosa, así como para explorar enfoques terapéuticos dirigidos a promover la curación de fracturas, lesiones articulares y otras afecciones ortopédicas en humanos. Al comprender los procesos celulares y moleculares que subyacen a la regeneración en el pez cebra, los investigadores pueden identificar nuevas estrategias para mejorar la cicatrización de heridas y promover la reparación de tejidos en el contexto clínico.

En comparación con otros apéndices (**Figura 4**), como la aleta dorsal, anal, pectoral y pélvica, la aleta caudal del pez cebra presenta varias ventajas distintivas. Es el apéndice más grande ubicado en la parte posterior del cuerpo del pez, lo que facilita los procedimientos experimentales. Su morfología bilobulada permite medir tasas de crecimiento diferenciales, y su anatomía simple, sin tejidos como músculo o cartílago, simplifica el análisis. Estas características hacen que el modelo de la aleta caudal sea ideal para estudios de regeneración ósea después del estímulo con distintos tipos de nanopartículas. Anatómicamente, la aleta caudal es un apéndice no muscularizado estabilizado por entre 16 y 18 rayas, también conocidas como lepidotricias, que tienen una estructura segmentada. La robustez de la aleta caudal depende principalmente de la matriz ósea colágena depositada por los osteoblastos debajo de la epidermis. La parte proximal principal de las lepidotricias está mantenida por una matriz ósea calcificada, mientras que la parte distal carece de mineralización. Por lo tanto, el gradiente de mineralización de las rayas indica la transición entre la parte proximal y distal de la aleta (Pfefferli *et al.*, 2015; Sehring *et al.*, 2019).

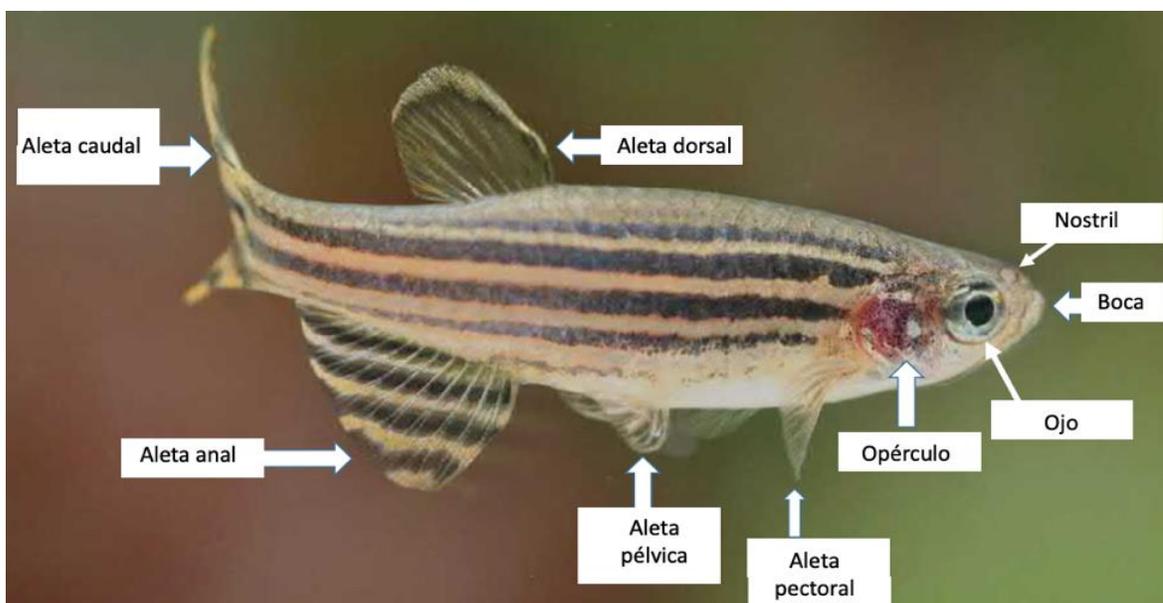


Figura 4. Apéndices en el pez cebra: aleta caudal, anal, dorsal, pélvica y pectoral. Otras estructuras también son destacadas como: ojo, opérculo, nostril y boca. Modificado de Cartner *et al.*, 2020.

1.1.5 Estructura de la aleta caudal en pez cebra

Estructuralmente, la aleta caudal (**Figura 5a**) consta de entre 16 y 18 rayos óseos o también denominados como lepidotricias, los cuales son elementos exoesqueléticos de origen dérmico, es decir, que se forman directamente a partir de osteoblastos sin una plantilla de cartílago. Cada rayo consiste en una sucesión de unidades óseas repetitivas, los segmentos, que están conectados entre sí por ligamentos colagenosos. Los segmentos más proximales al cuerpo del pez están conectados a los huesos endocondrales y a los músculos estriados de la base de la aleta. En la parte distal de los rayos, se observa la presencia de elementos esqueléticos no mineralizados, los cuales reciben el nombre de actinotricias. En la **Figura 5**, se observa con más detalle la estructura de la aleta caudal y gracias a una tinción con azul de alcian y rojo alizarina, es posible distinguir la mineralización de las lepidotricias y de las actinotricias (Seng *et al.*, 2020).

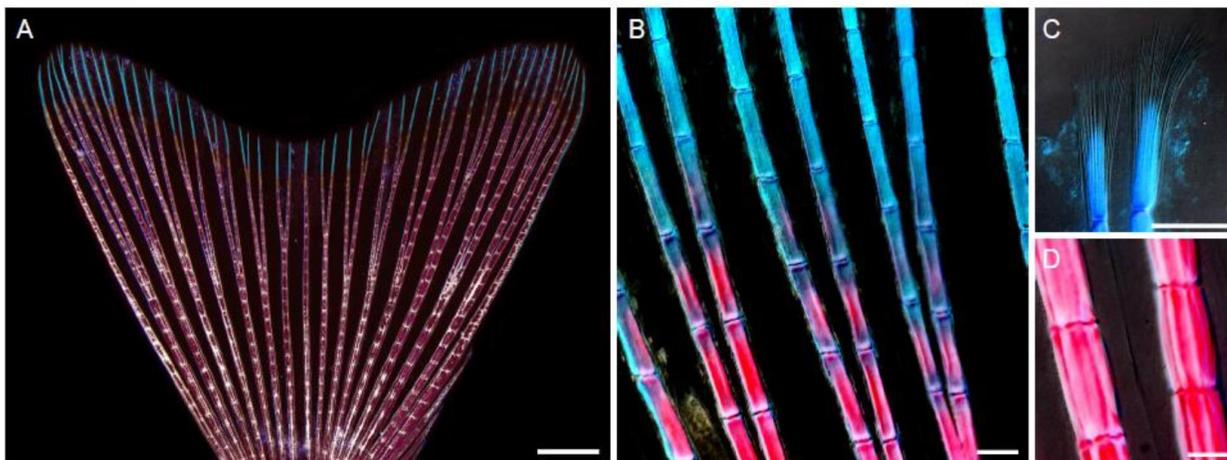


Figura 5. Estructura del esqueleto de la aleta caudal de un pez cebra adulto con tinción de azul de alcian y rojo de alizarina. A) Estructura lobulada de la aleta caudal, se observa la presencia de 18 rayos óseos, también conocidos como lepidotricias, de los cuales algunos de ellos presentan bifurcación. B) Segmentación de los rayos óseos. C) Actinotricias. D) Acercamiento de los segmentos óseos. Escala: A) 1000 μm y (B-D) 100 μm . Modificado de Pfefferli & Jaźwińska, 2015.

Cada lepidotricia está compuesta por dos hemirrayos cóncavos opuesto (**Figura 6a**). Estos hemirrayos están revestidos por una capa de osteoblastos que se encargan de depositar la matriz ósea. A diferencia de otros huesos, las lepidotricias no contienen osteocitos, es decir, las células formadoras de hueso que quedan embebidas en la matriz ósea. En el centro del espacio formado por las dos hemirrayos, es posible distinguir la presencia de nervios, capilares arteriales y de tejido conectivo (**Figura 6b**). El tejido mesenquimal entre los huesos está compuesto de tejido conectivo que contiene fibroblastos densamente interconectados, nervios y arterias. Por otra parte, el tejido interrays carece de elementos esqueléticos y

está conformado por tejido conectivo blando cubierto por epidermis y por vasos capilares (**Figura 6c**) (Pfefferli & Jazwińska, 2015; Sehring *et al.*, 2019).

Posteriormente a la amputación, todos los elementos esqueléticos previamente descritos sufren modificaciones considerables. A las 30 horas post amputación (hpa), aparece el blastema, el cual consiste en un grupo de células mesenquimatosas indiferenciadas cubiertas por una epidermis de herida por encima del plano de amputación (**Figura 6d**). La formación del blastema genera la desdiferenciación de las células previamente ya diferenciadas, lo cual promueve su proliferación y migración hacia el extremo distal de la aleta amputada. Posteriormente, a las 72 hpa (**Figura 6e**), el blastema muestra una organización espacial del tejido regenerado. En el extremo distal (**Figura 6f**), las células mesenquimales se elongan perpendicularmente al eje de crecimiento. Mientras tanto, en la parte cercana al plano de amputación (**Figura 6g**), es posible observar la presencia de osteoblastos desdiferenciados los cuales permanecen alineados debajo de la epidermis de la herida.

Posterior de la amputación de la aleta caudal, se inicia una serie notable de etapas regenerativas que resultan en la completa restauración del hueso perdido, la epidermis, los vasos sanguíneos, los nervios, el tejido conectivo y la pigmentación. En el modelo adulto, tras la amputación de la aleta caudal, se inicia un proceso de cicatrización de heridas que pasa por varias etapas. Primero, se observa migración de células epiteliales y formación de la tapa epidérmica apical (AEC). Luego, el tejido mesenquimal cercano se desorganiza debido a factores de crecimiento. En la tercera etapa, se forman blastemas. Estos eventos distinguen la regeneración del desarrollo del miembro. Aunque se cree que las células mesenquimales y las células madre contribuyen al proceso, aún se requieren más estudios para confirmarlo.

Desde el punto de vista molecular, la literatura destaca varias vías de señalización que se activan durante el proceso de regeneración de la aleta caudal en el pez cebra. Entre estas, se destacan la vía de Wnt, el factor de crecimiento de fibroblastos, activina-A, ácido retinoico y hedgehog como las principales involucradas en este proceso.

En la **Figura 7** se detalla el proceso de regeneración de la aleta caudal teniendo en cuenta cómo influyen las distintas vías de señalización. En la **Figura 7a** se muestra una lepidotricia previo a la amputación, una vez realizado este proceso (**Figura 7b**), las células epiteliales (color azul) migran lateralmente sobre la herida formando el AEC. Tanto la señalización Wnt/ β -catenina como la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) están involucradas en la especificación celular durante la cicatrización de la herida. Una vez que se formó la AEC así como el blastema inmaduro, las células blastemales son

segregadas en el blastema distal (púrpura) y el blastema proximal altamente proliferativo (rojo). Dichos procesos requieren de la señalización de Wnt/ β -catenina y FGF. Por otra parte, estas vías de señalización son reguladas negativamente por miR-203 y miR-133. Aunado a esto, la sobreexpresión de *wnt5b* inhibe la formación de la blastema (**Figura 7c**). Esta última proteína actúa como un regulador negativo de la señalización Wnt canónica. Con respecto al patrón de la aleta, la activina-A influye en dicho proceso, mientras que la deposición ósea durante la regeneración está regida por las vías de señalización del ácido retinoico, hedgehog y la señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP) (**Figura 7d**). Finalmente, una vez que se alcanzó un estadio avanzado de la regeneración, la señalización por FGF influye en la memoria posicional y la terminación del regenerado (**Figura 7e**) (Tal *et al.*, 2010).

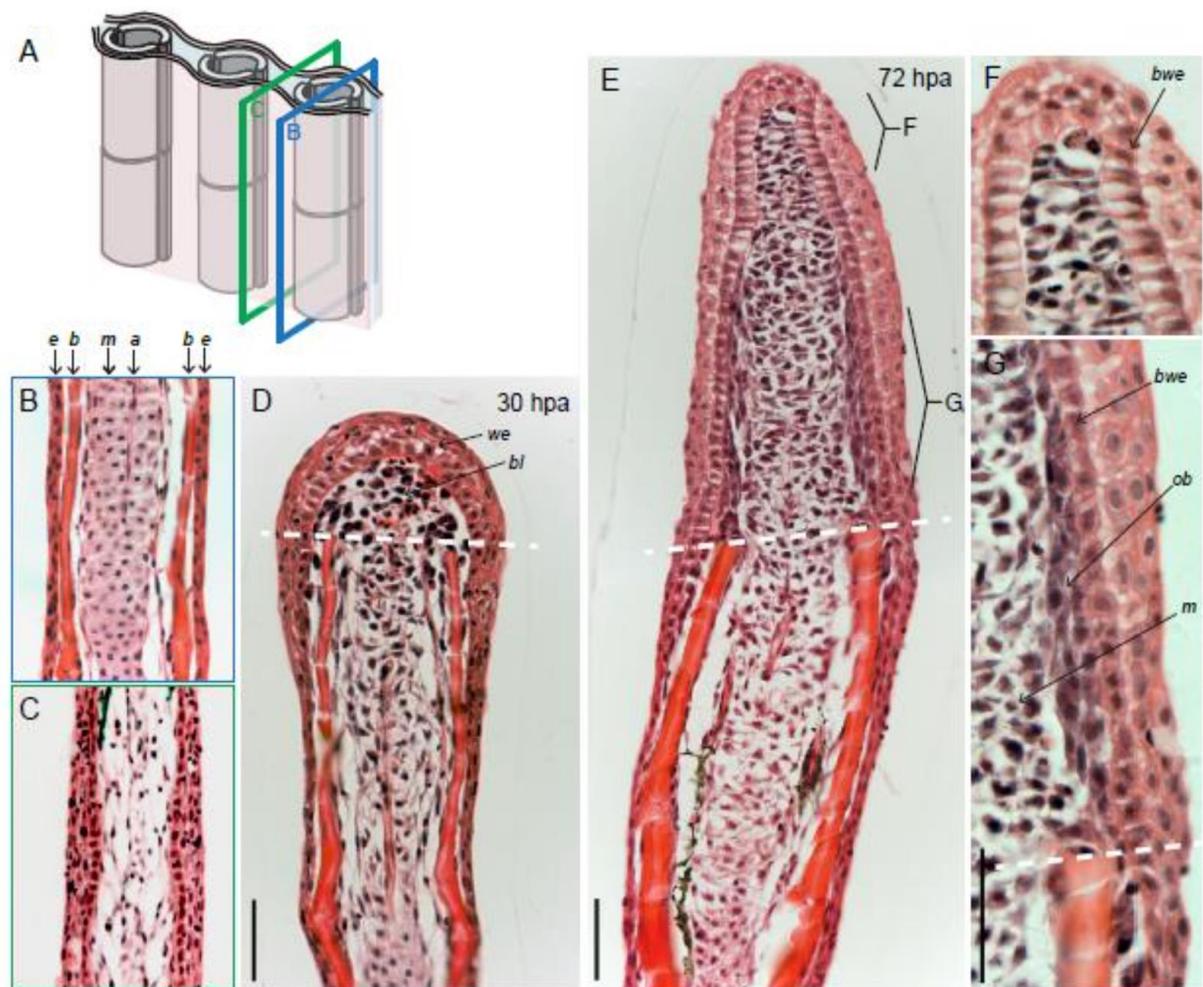


Figura 6. Características estructurales observadas en los estadios pre y post amputación de los rayos óseos presentes en la aleta caudal de *Danio rerio*. A) Representación esquemática de un grupo de lepidotricias. B) Plano del corte histológico de una lepidotricia. C) Plano del corte histológico de la zona de las interrayas. D) Formación del blastema a las 30 hpa. En líneas punteadas se indica el plano de amputación. E) Blastema a las 72 hpf. F) Extremo distal y G) zona proximal al plano de amputación a las 72 hpf. Tinción con hematoxilina y eosina. Abreviaturas e=epidermis, b=hueso, m= tejido mesenquimal, a= arteria, bl= blastema, we=epidermis de la herida, ob= osteoblastos, bwe= capa basal de la epidermis de la herida. Escala 50 μ m. Modificado de Pfefferli & Jaźwińska, 2015.

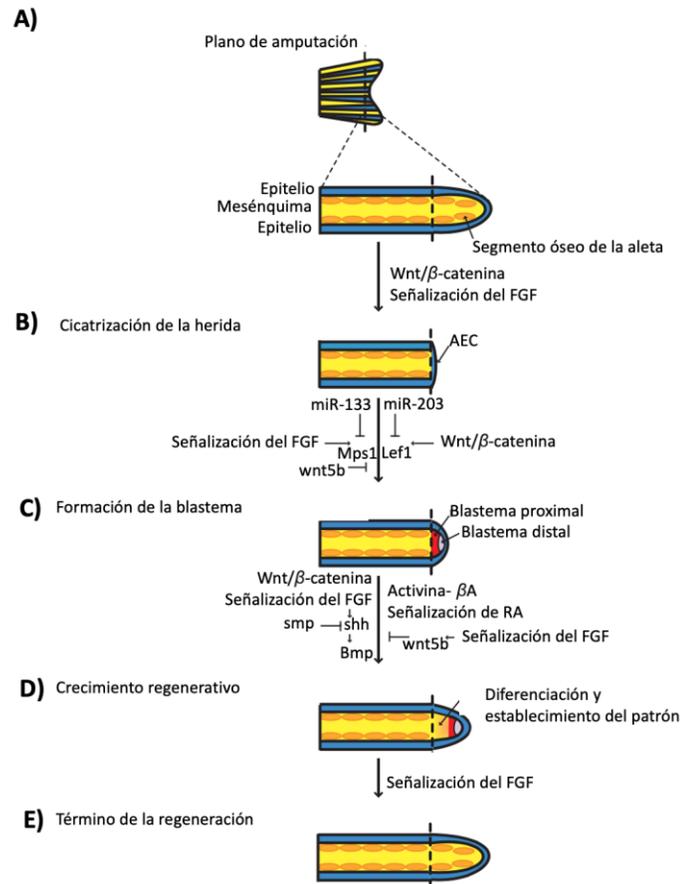


Figura 7. Principales vías de señalización que coordinan la regeneración epimórfica de las aletas caudales en pez cebra. Modificado de Tal *et al.*, 2010.

1.1.6 Evaluación toxicológica de nanopartículas en embriones y larvas de pez cebra

Las nanopartículas diseñadas (ENPs), de las cuales nanopartículas de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ forman parte, abarcan una gran cantidad de nanomateriales, incluyendo nanomateriales basados en metales y óxidos metálicos, puntos cuánticos, nanomateriales basados en carbono y nanomateriales poliméricos. En los últimos años, las nanopartículas derivadas de tierras raras han sido aplicadas como agentes de imagenología y terapias antitumorales. En especial, las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio han sido usadas como nanosondas bimodales para imágenes de resonancia magnética y fluorescencia. Debido a esto, existe la posibilidad de que dichos materiales atraviesen las barreras biológicas y entren al cuerpo humano, a través del sistema respiratorio o la cadena alimenticia (Bai *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2014).

Respecto a la nanotoxicidad en general de las nanopartículas de óxido de gadolinio, existen algunos informes; sin embargo, hasta la fecha no se ha publicado ningún artículo científico que evalúe la toxicidad de estas nanopartículas cuando están dopadas con iones europio, ya sea en otros organismos modelos en

fase *in vitro* o *in vivo*. A través de dichos artículos se podría tener una referencia previa de los efectos toxicológicos observados en sistemas biológicos. Con respecto a la evaluación de la toxicidad de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio en embriones y larvas de pez cebra, no existe ningún reporte previo a la realización de este estudio, por lo tanto, esta investigación se vuelve pionera en esta rama de la investigación toxicológica.

No obstante, Akhtar *et al.* (2020) publicaron un reporte en donde se evaluaba la toxicidad *in vitro* de nanopartículas de óxido de gadolinio sin dopaje alguno en células endoteliales de la vena umbilical (HUVECs). Ellos observaron un efecto citotóxico dependiente de la concentración después de una exposición por 48 h. Se identificaron a las NPs como causantes de peroxidación lipídica, especies reactivas de oxígeno y vesículas autofágicas.

Por otra parte, Setyawati *et al.* (2013) caracterizaron el efecto citotóxico y genotóxico de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con terbio en fibroblastos de piel humana. En su caso, la concentración menor a la que se pudieron observar efectos citotóxicos fue de 750 µg/mL, mientras que la concentración menor a la que se observaron los efectos genotóxicos fue de 1000 µg/mL.

Algunos estudios han encontrado que nanopartículas derivadas de tierras raras, tal como las nanopartículas de óxido de neodimio reducen significativamente la supervivencia y eclosión de larvas de pez cebra tras una exposición que abarcaba un periodo de 120 hpf. Causando, además de esto, cardiotoxicidad y toxicidad cerebrovascular (Chen *et al.*, 2020). Con respecto a la evaluación de la toxicidad de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio en embriones y larvas de pez cebra, no existe ningún reporte previo a la realización de este estudio, por lo tanto, esta investigación se vuelve pionera en esta rama de la investigación toxicológica.

1.1.7 Efecto de nanopartículas en la regeneración de la aleta caudal en pez cebra

Como se resaltó previamente, el desarrollo de terapias basadas en nanopartículas que puedan actuar como agentes osteomoduladores requiere el llevar a cabo ensayos *in vivo* utilizando distintos organismos modelo. El pez cebra con el modelo de regeneración de la aleta caudal surge como un modelo alternativo para la investigación de sustancias que promuevan la regeneración ósea (Gemberling *et al.*, 2013).

Después de revisar la literatura, se ha constatado que hay escasos estudios que investiguen la interacción fisiológica entre diversos tipos de nanomateriales y el proceso de regeneración ósea y tisular, utilizando como organismo modelo a *Danio rerio*. En uno de los trabajos pioneros en esta área de investigación, se puede mencionar el trabajo de Park & Yeo, 2013. Dichos investigadores recurrieron a este modelo con la finalidad de conocer el efecto en la regeneración de la aleta caudal del pez después de haber sido expuesta a nanopartículas y nanotubos de dióxido de titanio. Estos nanomateriales fueron elegidos debido a su potencial uso como andamios para el acarreamiento de fármacos. Sus resultados mostraron que ambos tipos de nanomateriales redujeron la regeneración del apéndice, así como también indujeron una regeneración asimétrica de las aletas a una concentración de 1 mg/L de los nanomateriales (**Figura 8**). De igual forma, se observó el fenómeno de bioacumulación en órganos importantes en los adultos tras la exposición a los nanomateriales. Por otra parte, a una concentración de 20 ng/L se observó apoptosis cuando se expusieron a embriones de *Danio rerio* a dichos estímulos.

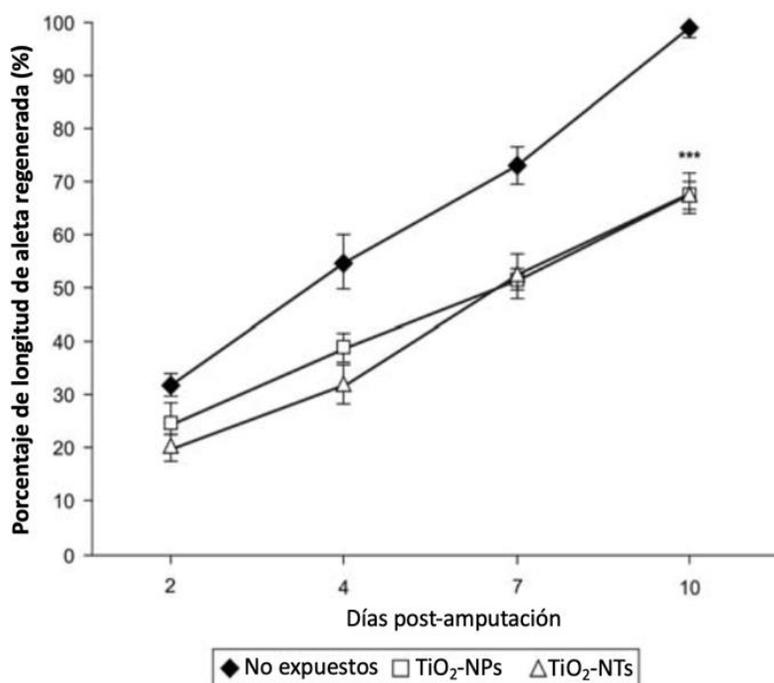


Figura 8. Tasa de regeneración de aletas caudales en proceso de regeneración tratadas con nanopartículas y nanotubos de óxido de titanio. A) Longitud media de las aletas caudales de individuos de *Danio rerio* expuestas a 1 mg/L de nanopartículas (TiO₂-NPs) y nanotubos de dióxido de titanio (TiO₂-NTs). ***P>0.001, n=6 peces por grupo. Modificado de Park *et al.*, 2013.

Posteriormente Li *et al.* (2018) exploraron los efectos a largo plazo de la exposición a nanopartículas de dióxido de titanio utilizando para ello el modelo de la aleta caudal en *Danio rerio*. Los resultados obtenidos mostraron que una exposición de 100 µg/mL de las nanopartículas retrasó significativamente la tasa de

regeneración del apéndice. Previos estudios habían reportado que la vía de señalización del TGF- β era activada entre las 24 y 72 horas post amputación, lo cual era esencial para la regeneración de la aleta. Por medio de la actividad transcripcional de la vía de señalización del TGF- β en la aleta caudal durante ese periodo se observó que la amputación causaba la expresión de la integrina- β 5, un gen blanco de la vía de señalización del TGF- β . Este fenómeno fue inhibido una vez que se realizó la exposición con los nanomateriales, indicando que las nanopartículas de dióxido de titanio perjudicaba la regeneración de la aleta caudal por medio de la atenuación de la vía de señalización del TGF- β .

En años recientes, Pang *et al.* (2020) emplearon el modelo de regeneración de la aleta caudal del pez cebra para investigar los efectos de la exposición a nanopartículas en las primeras etapas de curación de heridas. Es importante señalar que los protocolos de exposición de peces con aletas amputadas a nanopartículas varían significativamente entre estudios. El protocolo debe ser diseñado de acuerdo con las necesidades específicas de cada proyecto de investigación y la naturaleza del material a probar. En su estudio, ellos anestesiaron peces cebra adultos de 3 meses de edad y amputaron un lóbulo inferior de la aleta caudal. Doce horas después de la amputación, los peces fueron colocados en un recipiente que permitía la exposición exclusiva de las aletas a nanopartículas de plata, minimizando así la exposición sistémica. Tras la exposición, los peces fueron devueltos a sus tanques de recuperación hasta 7.5 días post-amputación, momento en el cual concluyó el experimento (**Figura 9**). El estudio mostró que la tasa de regeneración de la aleta se redujo significativamente tras la exposición a las nanopartículas de plata, sugiriendo que se debe considerar cuidadosamente el uso de estos nanomateriales en las primeras etapas de cicatrización de heridas.

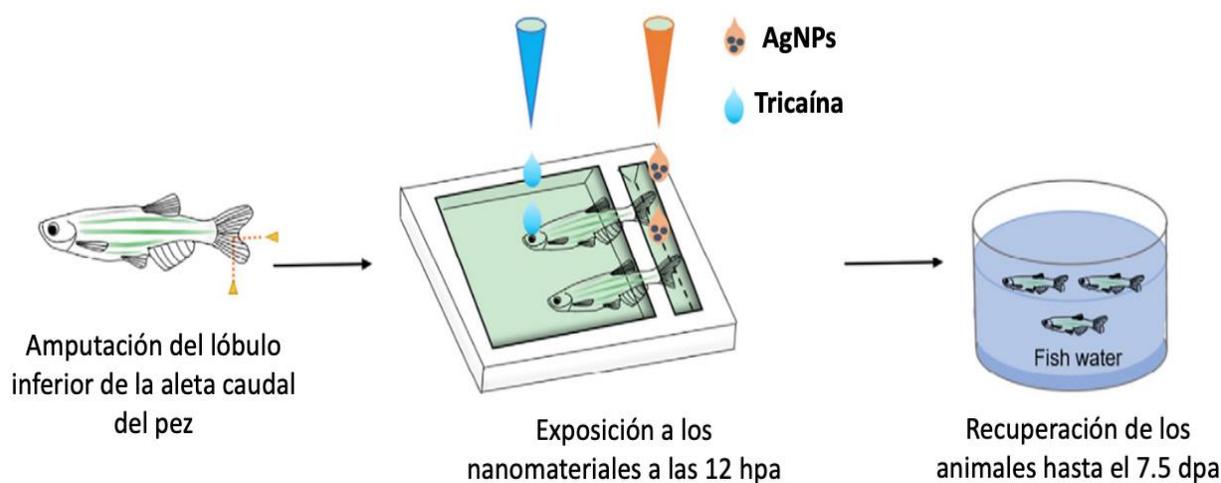


Figura 9. Protocolo diseñado por Pang *et al.*, 2020 para la exposición a los peces amputados con nanopartículas de plata. Los peces fueron amputados y posteriormente de 12 horas post amputación, las aletas caudales de los animales fueron expuestas a los nanomateriales. Posteriormente de esto, los animales fueron devueltos a sus tanques de recuperación. El experimento abarcó los 7.5 días post amputación. Modificado de Pang *et al.*, 2020.

1.2 Justificación

A diferencia de otros tejidos, la mayoría de las fracturas sanan sin la formación de tejido cicatricial y el hueso se regenera recuperando en gran medida sus propiedades preexistentes. Como resultado, el hueso recién formado es indistinguible del hueso adyacente ileso. Sin embargo, en determinados casos, como en las fracturas graves, la consolidación de esta afección junto con el proceso de regeneración ósea asociado a éste se ve afectada, teniendo consecuencias importantes una vez que el hueso ha cicatrizado. Estas fracturas generalmente requieren tratamiento mediante cirugía, autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y biomateriales sustitutos. Sin embargo, los efectos adversos sobre el hueso curado son sustanciales, lo que destaca la necesidad de crear terapias innovadoras que faciliten la regeneración ósea. En los últimos años, se ha investigado distintas terapias alternativas tales como: sustitutos sintéticos, andamios con moléculas inmovilizadas, polímeros porosos bioactivos y terapias basadas en nanotecnología (Dimitriou *et al.*, 2011).

Las terapias basadas en nanotecnología, requieren una caracterización biológica *in vivo* empleando organismos modelo. Los organismos modelos convencionales para la investigación ortopédica suelen ser roedores, perros, ovejas, cerdos, etc. A pesar de que el uso de estos animales trae consigo importantes ventajas para la investigación, de igual manera, presentan desventajas considerables tales como: el considerable costo asociado a su mantenimiento y a su uso, así como la dificultad de realizar un cribado de terapias o moléculas activas que promuevan la regeneración ósea. No obstante, el pez cebra (*Danio rerio*) presenta características que lo convierten en una opción atractiva como organismo modelo para el estudio de la regeneración ósea, debido principalmente a su habilidad de regenerar por completo sus apéndices amputados, llegando a restaurar el color, la forma y el patrón tisular. Esto a través del uso del modelo de la regeneración de la aleta caudal.

Además, es crucial evaluar la biocompatibilidad de los materiales sintetizados para asegurar que su exposición no provoque enfermedades ni efectos adversos para la salud. Una ventaja adicional del pez cebra como organismo modelo en investigación biomédica es su idoneidad para estudios toxicológicos. En este contexto, el modelo de nanotoxicidad en embriones y larvas proporciona información valiosa sobre la biocompatibilidad de los materiales.

En este trabajo, se establecieron dos modelos: el modelo de nanotoxicidad y el modelo de regeneración de la aleta caudal en pez cebra. Estos modelos permitieron estudiar el perfil toxicológico de nanopartículas

metálicas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio. Estos modelos permitieron evaluar su potencial como vehículos para la entrega de fármacos y su capacidad para estimular la regeneración ósea.

1.3 Hipótesis

Los modelos de nanotoxicidad en las primeras etapas del desarrollo del pez cebra, junto con el modelo de regeneración de la aleta caudal en peces adultos de esta especie, son herramientas valiosas y eficaces para caracterizar los efectos toxicológicos de nanopartículas metálicas, incluyendo específicamente a las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio ($Gd_2O_3:Ce^{3+}$).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto toxicológico de nanopartículas metálicas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio ($Gd_2O_3:Ce^{3+}$) en la fase embrionaria y larval del desarrollo y en la regeneración de la aleta caudal de peces cebra.

1.4.2 Objetivos específicos

- Optimizar el acuario de pez cebra, así como los parámetros referentes a calidad de agua del mismo.
- Optimizar el protocolo de reproducción y en el protocolo de crianza de peces cebra.
- Realizar la caracterización fisicoquímica de los nanomateriales a utilizar en el estudio.
- Establecer el modelo de nanotoxicidad en estadio embrionario y larval de *Danio rerio*.
- Establecer el modelo de regeneración de la aleta caudal en adultos.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Optimización y monitoreo de la calidad de agua del acuario de *Danio rerio*

El acuario de investigación del pez cebrá de la Dra. Patricia Juárez Camacho, del Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, fue modificado estructuralmente en colaboración con el Dr. Salvador Villasuso y la Dra. Carmen Paniagua. Mediante su apoyo, se diseñó un sistema que permitiera el mantener 16 peceras bajo un sistema de recirculación, además de estar diseñado considerando una zona de cuarentena para animales en ensayos y otra zona para el mantenimiento de Artemia en eclosión y mantenimiento.

En adición a esto, se integró al sistema un biofiltro Bubble Bead Filter que permitiera realizar el proceso de desnitrificación del agua, así como el de remover al 100% partículas mayores a 50 μm . Para la integración de este biofiltro se lavaron exclusivamente con agua municipal 7 kilos de medio Bubble Bead Media, los cuales fueron posteriormente depositados en el biofiltro (Lawrence, 2011).

Para la maduración del biofiltro y estandarización de las condiciones del acuario se monitorearon, por un lapso de 12 semanas, los distintos parámetros de calidad de agua: pH, temperatura, nitrógeno amoniacal total ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), dureza general (GH) y dureza carbonatada (KH).

Las concentraciones del nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos y nitratos fueron monitoreadas con el kit Freshwater Master Test Kit de API. Para cada de estas especies nitrogenadas, se tomaron 5 mL de agua de acuario en tres tubos de ensayos con tapón y se agregaron las soluciones necesarias siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez agregado el volumen respectivo de la solución de prueba debida, los tubos de ensayos fueron cerrados y agitados vigorosamente por al menos 30 segundos. Las reacciones reposaron por 5 minutos. La concentración de analito de interés se estimó a partir de la comparación del color con el cuadro de resultados colorimétricos proporcionada por el fabricante (**Figura 10**) (Matthews *et al.*, 2002; Aleström *et al.*, 2020; Avdesh *et al.*, 2012; Hammer 2020; Lawrence *et al.*, 2012).

Para la evaluación de la dureza general (GH) y la dureza carbonatada (KH), se utilizó el kit de prueba API para la medición de GH & KH. Para realizar estas mediciones se tomaron 5 mL de agua del acuario. Manteniendo el frasco en posición vertical, se añadió gota a gota la solución de prueba adecuada para

cada tipo de dureza hasta observar un cambio colorimétrico. Para el monitoreo de KH, el análisis concluyó cuando el agua en el tubo de ensayo cambió de azul a amarillo y para el monitoreo de GH, el análisis terminó cuando éste cambió de naranja a verde. Además, diariamente se monitoreó la temperatura y el pH utilizando un medidor portátil de pH y temperatura Hannah Instruments.

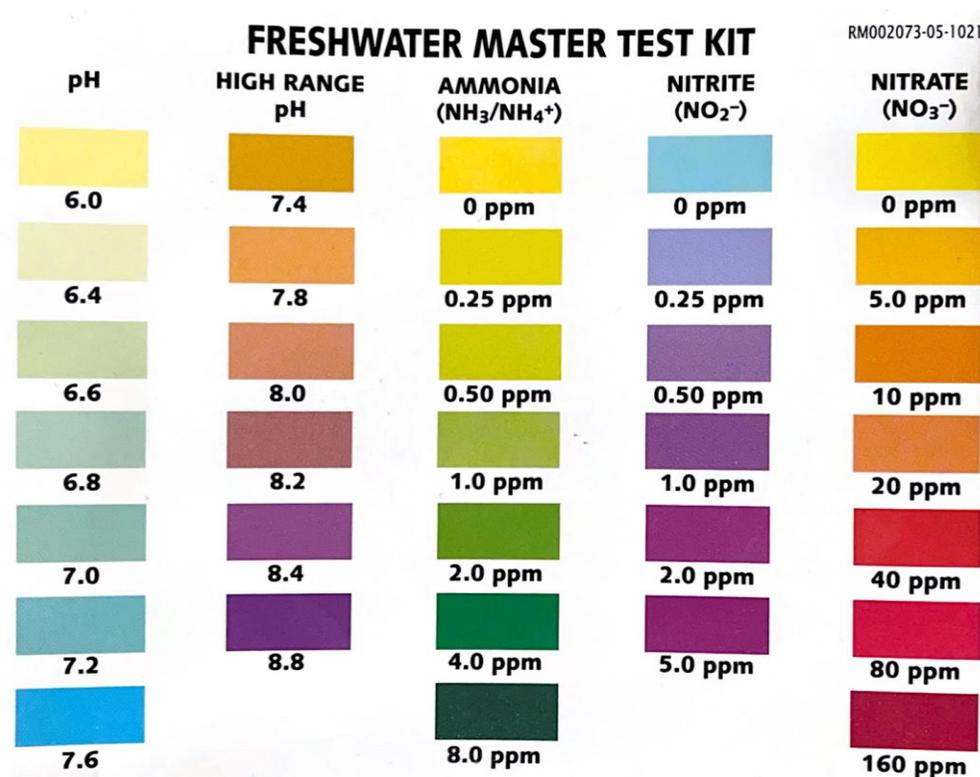


Figura 10. Cuadro de resultados colorimétricos del Freshwater Master Test Kit de API para análisis de concentraciones de especies nitrogenadas. Esta escala permite el análisis de nitrógeno amoniacal total, nitrito y nitratos.

Después de 12 semanas de monitoreo, la calidad del agua del acuario se continuó registrando semanalmente. El objetivo fue aproximar dichos valores a los valores recomendados por Vargas (2011) y Hammer (2020), es decir, NAT, nitritos y nitratos cercanos a 0 ppm, temperatura de 28°C ± 1°C, dureza general y dureza carbonata en un rango de dureza baja, es decir de 100-200 ppm.

2.2 Histología de peces cebra adultos

Se llevó a cabo la histopatología de tres peces cebra adultos, seleccionados al azar del acuario y con una edad aproximada de 12 meses. Para esto, se empleó la técnica de tinción de hematoxilina y eosina.

Los animales fueron capturados con una red y transferidos a una caja Petri sin agua, la cual fue colocada en el congelador a -20°C durante 5 minutos. Posteriormente, se procedió a inyectar a los animales con solución fijadora de formalina neutra al 10%, utilizando una jeringa BD® Ultra-Fine para insulina de 0.3 mL. Los peces fueron inyectados manteniendo una posición horizontal de su cuerpo, evitando la perforación de los órganos. Los sitios de inyección fueron la boca, el ano y el lomo. Una vez completada la inyección, los animales fueron envueltos en gasa y depositados en un recipiente con solución fijadora durante 2 días.

Después de transcurrido ese período, se procedió a realizar el proceso de descalcificación. Para ello, se retiraron las gasas que envolvían a los peces y se transfirieron a un recipiente plástico, donde fueron lavados con abundante agua destilada. Los peces fueron colocados individualmente en otro recipiente plástico y se les agregaron 100 mL de ácido nítrico al 5%. La exposición de los peces a esta solución fue de 20 minutos. Al término, los peces fueron retirados de la solución y cortados con una navaja por la mitad en un plano sagital y un plano transversal. Las secciones fueron colocadas en casetes previamente etiquetados para su desecación y deshidratación.

Las muestras fueron desecadas y deshidratadas en un procesador automático de tejidos LEICA TP 1040 donde las muestras fueron sumergidas progresivamente en concentraciones crecientes de alcohol de 70, 80, 95 y 100 %. Las muestras se aclararon en benceno seguido de una infiltración en parafina líquida. Este proceso se realizó en un incluidor automático de tejidos LEICA EG 1160.

Los bloques de tejido incluidos, fueron posteriormente cortados con un micrótopo LEICA RM2255 y se obtuvieron secciones de tejido de $5\ \mu\text{m}$. Los cortes fueron extendidos en una baño de agua destilada, grenetina y alcohol a 40°C , lo cual permitió su montaje en portaobjetos. Las laminillas fueron secadas en una estufa Precision Scientific Co modelo 4 durante 24 h a 65°C , seguido de un proceso de desparafinización en xilol.

Posteriormente los tejidos se hidrataron sumergiendo las laminillas en soluciones con concentración de alcoholes decrecientes (100, 95 y 70%), finalizando con agua destilada. Una vez hidratados los tejidos, se procedió con la tinción de hematoxilina y eosina. Las laminillas se sumergieron en una solución de hematoxilina de Harris durante 5 minutos seguido de un lavado con agua corriente. Enseguida, las laminillas se sumergieron en una solución de eosina por 5 minutos.

Completada la tinción, las secciones de tejido se deshidrataron pasándolas por una serie de alcoholes de concentración creciente, luego se montaron con resina Thermo Scientific Cytoseal 60 y se dejaron secar

antes de la observación al microscopio. Finalmente, las laminillas se observaron en un microscopio Zeiss Primo Star y se fotografiaron con un microscopio Zeiss Axioplan 2 imaging, Zeiss acoplado a una cámara digital Zeiss AxioCam HRc (Collymore *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2020; Trejo-Ramos *et al.*, 2022).

2.3 Eclosión de nauplios de *Artemia salina* y mantenimiento

Quistes de *Artemia salina* Golden Sun O.S.I. Pro 80 anillo verde fueron eclosionados y utilizados como alimento. Para llevar a cabo la eclosión, se disolvieron 35 gr de sal marina Oceanic de Lomas en 1 L de agua corriente, para con ello obtener una salinidad aproximada de 35 ppm. El agua se colocó en un eclosionador, el cual consistía de un recipiente plástico cónico, que contenía aeración vigorosa y se agregaron 5 gr de quistes. Una vez conseguida la eclosión (24 h después), los nauplios fueron separados por filtración de los restos de cáscaras y quistes sin eclosionar. Los quistes no eclosionados fueron depositados nuevamente en el eclosionador por otras 24 h para obtener el mayor número de nauplios posibles. Una vez recuperados los nauplios, éstos eran usados para alimentar a los peces cebra. La artemia restante después de cada proceso de filtración fue transferida a un recipiente plástico negro de 70 L que contenía un volumen de agua de mar (35 ppm) de 45 L. 1

Para determinar qué tipo de alimento favorecía el crecimiento de los nauplios de *Artemia* hasta alcanzar el estadio adulto se realizó un experimento para evaluar el efecto de tres dietas diferentes en el crecimiento de la *Artemia*. Las dietas fueron: 1) EasyRees EasyBooster 25, un alimento a base de fitoplancton; 2) Market DHA Gold basado en ácido docosahexaenoico y 3) Lomas Spirulina Boost basado en el alga *Arthrospira platensis*. Para dicho experimento, se eclosionaron los quistes de artemia como previamente se describió. No obstante, para este caso se utilizaron tres eclosionadores, en donde en cada uno se eclosionaron 3.5 g en 2 L de agua de mar (35 ppm). La alteración se mantuvo vigorosa durante 48 h.

Los nauplios de 2 días post eclosión (dpe) fueron alimentados con las dietas antes mencionadas, agregando 1.0 gr de cada uno de los alimentos por recipiente cada 4 días. El experimento duró 25 dpe, tiempo estimado para que la *Artemia salina* alcanzara su estado de adultez. El recambio de agua se realizó cada 7 días, para evitar la acumulación de desechos. Al término del experimento, de cada una de los grupos se tomaron muestras aleatorias de 5 mL, las cuales se colocaron en cajas petri. Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio invertido de contraste de relieve Olympus IX71/Modulación

Hoffman. Los organismos fueron inmovilizados agregando 4 gotas de aceite de clavo al volumen de la muestra y se procedió a la toma de imágenes (Varga, 2016).

2.4 Alimentación de los peces cebra

El régimen alimentario de los organismos silvestres de pez cebra tuvo ajustes significativos debido principalmente a la incorporación de Artemia en su dieta. Estos cambios se llevaron a cabo con el propósito de alinear este esquema de alimentación con investigaciones previas realizadas por otros grupos dedicados al estudio del pez cebra, como lo documentaron Lawrence (2007) y Markovich *et al.* (2007).

Inicialmente, los peces eran alimentados con Lomas Hojuelas Básicas para Peces Tropicales (43% de proteína, 5% de grasa, 3% de fibra cruda, adicionado con vitamina C y ácido ascórbico). Si bien esta dieta continuó siendo la base de su alimentación, ésta se mejoró con la adición de Zeigler Adult Zebrafish Diet, un alimento comercial especialmente formulado para *Danio Rerio* (55 % de proteína, 15 % de grasa y 12 % de fibra cruda, junto con un 1,5% de fósforo). Además, la Artemia se introdujo como alimento vivo y como fuente de enriquecimiento para el desarrollo de los peces.

Los peces fueron alimentados dos veces al día con la dieta previamente descrita. Una vez al día se realizaba un sifoneo que permitiera la remoción de desechos sólidos de las peceras (Kolb *et al.*, 2018; Lawrence, 2007; Markovich *et al.*, 2007).

2.5 Reproducción de adultos de *Danio rerio* y obtención de embriones para experimentación

Con el objetivo de optimizar el protocolo de reproducción de adultos de *Danio rerio* comerciales, se evaluó el efecto de distintas peceras con volúmenes diferentes en el rendimiento de las oviposiciones. Se evaluaron peceras con los siguientes volúmenes: 1.5, 2.5, 5, 8 y 10 L. A cada una de estas peceras se le diseñó una reja plástica que permitiera la rápida separación de machos y hembras de los huevos fertilizados (Goolish *et al.*, 2014).

Estas peceras de reproducción fueron separadas del sistema de recirculación y colocadas en la zona de cuarentena del acuario de pez cebra a las 4 pm. A cada una de estas peceras se les colocó un calefactor

con termómetro Lomas EcoThermal 25 W programado a 28°C y fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad. En cuanto al fotoperiodo. A cada una de las peceras se le colocó en el medio un separador plástico el cual separaba a los machos de la hembra. Adicionalmente, se agregaron plantas plásticas que simularan el ambiente abiótico del pez cebra.

Por pecera de reproducción se agregaron una hembra y dos machos (10 meses de edad). A la mañana siguiente (8 am), este separador fue retirado, permitiendo la reproducción de los animales durante 30 min.

Una vez transcurridos los 30 min, los peces fueron tomados con una red y regresados a su tanque respectivo. Posteriormente, los embriones fecundados fueron recuperados e incubados en medio E3. Este medio fue preparado a partir de una solución 60X, la cual contenía 34.8 g NaCl, 1.6 g de KCl, 5.8 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 9.78 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1.95 L de agua destilada desionizada, pH 7.2. El medio E3 1X se preparó diluyendo 16.5 mL de la solución madre 60X en 1 L de agua desionizada. Para una concentración 1x se diluyeron 16.5 mL de la solución madre 60x en 1 L de agua desionizada. A dicho volumen se le añadieron 100 μL de azul de metileno al 1% (Williams & Renquist, 2016). El medio E3 1X se mantuvo en refrigeración a 4°C.

Basados en los resultados obtenidos del experimento anterior, se determinó utilizar peceras de 1.5 L para las reproducciones destinadas a los experimentos del modelo de nanotoxicidad. El protocolo diseñado se aplicó de manera similar al descrito anteriormente. Sin embargo, se realizó una modificación con el fin de reducir el tiempo de manipulación y limpieza de los embriones. Esta modificación consistió en colocar las peceras de reproducción en una incubadora con un ciclo de luz de 10 horas de oscuridad y 14 horas de luz, programado para encenderse a las 8 am y apagarse a las 10 pm (Castranova & Wang, 2020; Nasiadka, *et al.*, 2012; Parichy & Postlethwait, 2020; Villamizar, *et al.*, 2014; Zhu, *et al.*, 2012).

2.6 Crianza de peces cebra desde el estadio embrionario hasta la adultez

Se llevó a cabo el protocolo de reproducción previamente descrito, utilizando peceras de 1.5 L de capacidad. Una vez recuperados y limpiados los embriones fueron transferidos a una pecera de reproducción previamente preparada. Esta pecera estaba conectada al sistema recirculante del acuario de pez cebra. Esta nueva pecera contaba con un tubo de desagüe cubierto de una malla con un diámetro de 1 mm, así como de un calefactor con termoregulador el cual mantendría la temperatura en $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. El

flujo de agua fue parcialmente abierto para evitar la acumulación de especies nitrogenadas y mantener el agua en circulación. El flujo de agua fue incrementándose conforme los alevines aumentaban de tamaño. Posterior a los 21 días post fertilización (dpf), el calefactor sumergible fue removido.

El tubo de desagüe se modificó según el tamaño de los alevines. Desde el primer día después del 1 dpf hasta las seis primeras semanas de vida de los peces, se utilizó un tubo de rejilla plástica cubierto con malla de poros de 1 mm de diámetro como previamente se describió. A las 6 semanas post fertilización, este tubo fue reemplazado por una malla con poros de 4 mm. En las peceras que albergaban peces mayores de 3 meses de edad, se colocó la rejilla plástica sin la presencia de la malla.

Los alevines fueron alimentados con alimento comercial liofilizado y nauplios de *Artemia* recién eclosionada dos veces al día. En la **Figura 11** se muestra el esquema de alimentación dependiendo de los días post-fertilización de los alevines (McMenamin *et al.*, 2016; Osborne *et al.*, 2016; Varga *et al.*, 2011).

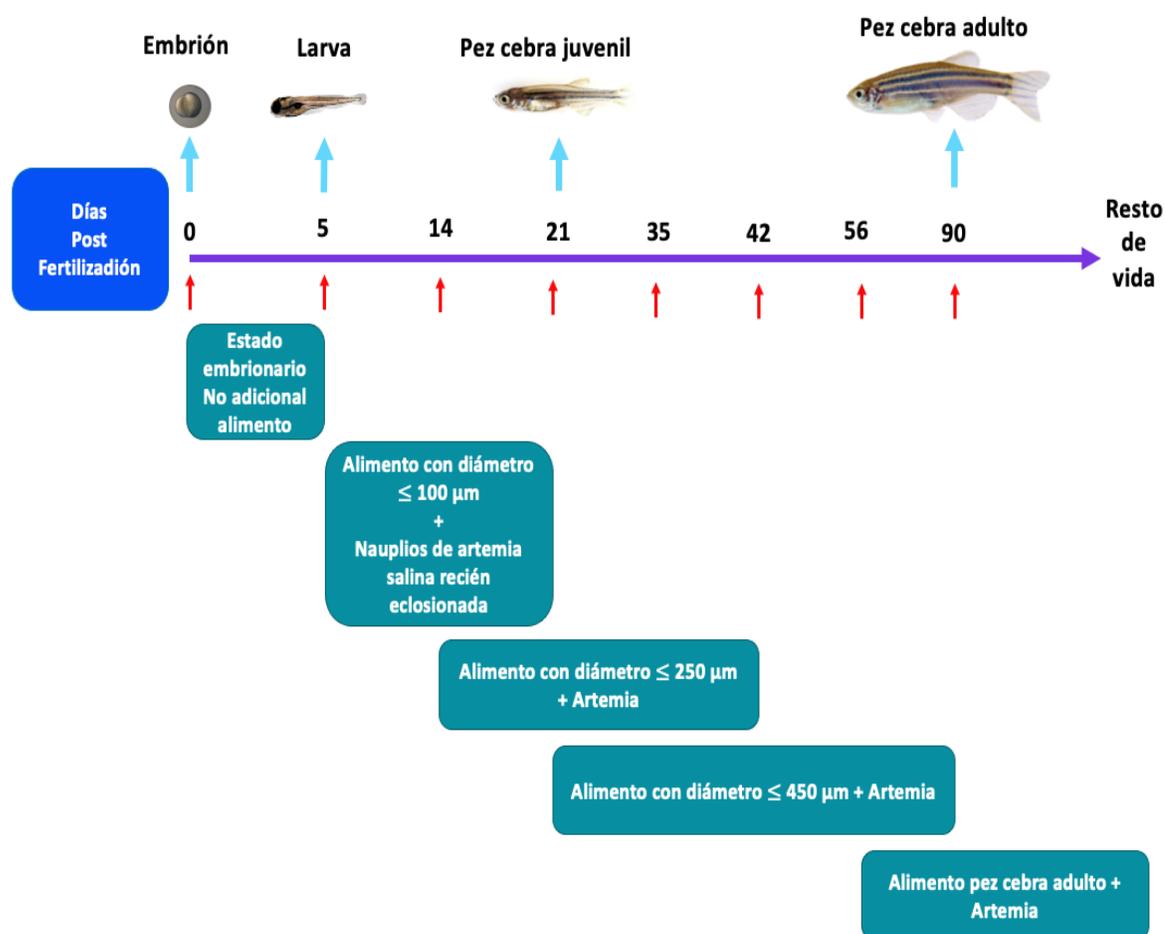


Figura 11. Esquema de alimentación durante los diferentes estadios del desarrollo del pez cebra. La alimentación varió dependiendo del estadio del desarrollo del animal, se distinguen tres estadios: embrión, larva, juvenil y adulto (Lawrence, 2011; Varga, 2011).

2.7 Síntesis de nanopartículas

2.7.1 Síntesis de las nanopartículas tipo virus aisladas del virus del mosaico del bromo

En resumen, se cultivaron plantas de cebada (*Hordeum vulgare*). Para esto, se sembraron semillas en un invernadero bajo condiciones controladas y dos semanas después de su germinación se infectaron con el virus del mosaico del bromo. Mediante el uso de una fibra metálica se realizó una ligera fricción en la superficie adaxial de las hojas, las cuales fueron posteriormente expuestas a 20 μ L de suspensión de viriones de una solución de BMV a una concentración de 0.2 mg/mL usando como diluyente solución amortiguadora de inoculación (fosfato de potasio 100 mM, pH 7, ajustado con HCl). Dicho procedimiento se realizó cuando las hojas alcanzaron una longitud de aproximadamente 10 cm.

El virus se dejó incubar hasta que las hojas mostraron el característico signo de infección, la clorosis, lo cual implicó manchas con coloración amarillenta en las hojas. Una vez que la clorosis fuera claramente evidente en las hojas, se comenzó con la cosecha de las mismas. Las hojas se cortaron y se colocaron en bolsas de plástico selladas previamente etiquetadas, las cuales se congelaron a -20°C .

Para el proceso de aislamiento de VLPs, se emplearon 144 gramos de hojas de planta de cebada previamente congeladas. Inicialmente, las hojas fueron cortadas en pequeños trozos utilizando tijeras (**Figura 12a**). Luego, estos fragmentos se trituraron en una licuadora Osterizer junto con una solución amortiguadora para la extracción de viriones (acetato de sodio 0.5 M, acetato de magnesio 80 mM en agua desionizada a pH 4.5, ajustado con ácido acético glaciar). Se utilizó un volumen adecuado de la solución para garantizar una molienda efectiva sin agregar un exceso de líquido. El macerado resultante se filtró mediante gasas, aplicando presión para eliminar cualquier residuo sólido y obtener una mezcla líquida homogénea. Una vez obtenido el extracto líquido, éste fue depositado en un vaso de precipitado de 1 L. Dentro de una campana de extracción, el extracto se diluyó a una razón de 1:1 con cloroformo puro y esta nueva mezcla se depositó en botellas de centrífuga de copolímero de polipropileno de 250 mL (**Figura 12b**). La mezcla fue centrifugada a 15 000 rpm durante 15 min a 4°C . Se obtuvieron dos fases claramente visibles, una de ellas de color amarillo y otra de color café (**Figura 12c**). La fase acuosa (color amarillo), fue recuperada por decantación. Empleando las mismas condiciones de la anterior centrifugación, se volvió a centrifugar nuevamente con el fin de eliminar cualquier residuo de la fase

orgánica. A partir de esto, se obtuvo un extracto libre de cualquier residuo del proceso de molienda (**Figura 12d**). La fase orgánica oscura fue descartada.

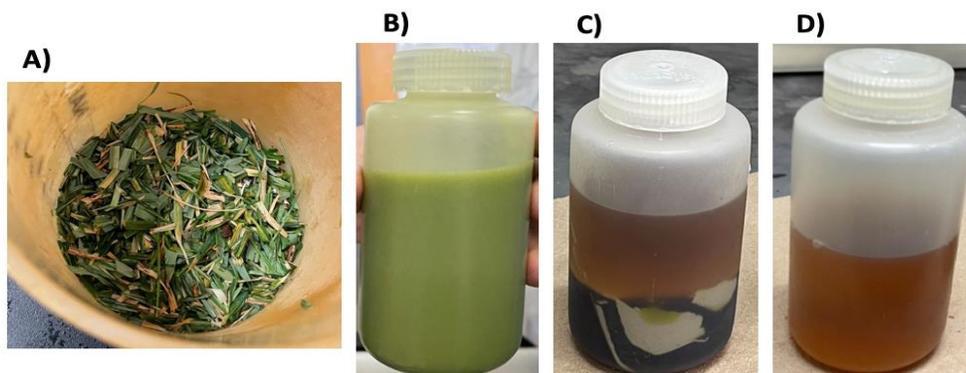


Figura 12. Proceso de obtención del extracto que contenía los viriones del virus del mosaico del bromo. A) Hojas de cebada infectadas con el virus cortadas en pedazos. B) Mezcla obtenida tras la filtración del macerado. C) Fases obtenidas tras la primera centrifugación. D) Mezcla homogénea obtenida tras la segunda centrifugación.

El extracto fue colocado en un vaso de precipitado con un agitador magnético en agitación constante durante 12 h a 4 °C, con el fin de promover la evaporación de los restos de cloroformo. Transcurrido este tiempo, se procedió con la preparación de un colchón de sacarosa. Para ello, se colocaron tubos de ultracentrifuga en un soporte universal y se les vertió a cada uno de los tubos 5 mL de una solución de sacarosa al 10% (m:v) usando como diluyente buffer de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, pH 4.5, ajustado con ácido acético). Sobre dicho colchón de sacarosa, se vertió cuidadosamente por las paredes y haciendo uso de una pipeta pasteur, el extracto previamente obtenido (**Figura 13**). Los tubos fueron centrifugados a 32 000 rpm usando el rotor SW-32Ti Beckman durante 2 h a 4 °C.



Figura 17. Colchón de sacarosa para la centrifugación de gradiente de densidad para el aislamiento de partículas virales. Acercamiento de un tubo de ultracentrifuga en donde la parte inferior corresponde al colchón de sacarosa y la superior corresponde al extracto del cual se obtuvo el virus del mosaico del bromo.

Una vez finalizado el proceso de ultracentrifugación, se obtuvo un precipitado en forma de pellet. El sobrenadante fue descartado. Los pellets fueron homogeneizados con 150 μ L de solución amortiguadora de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, ajustado a pH 4.5 con ácido acético glacial). Dicha suspensión de viriones fue almacenada a 4 °C.

Para el siguiente paso en el aislamiento de los viriones, se procedió con la centrifugación en gradiente de 10-40%. El gradiente de sacarosa fue previamente preparado mediante ciclos de congelación. Para esto, en tubos de ultracentrifugación con capacidad de 33 mL, se vertieron 20 mL de solución de sacarosa al 25% (m:v) diluida en solución amortiguadora de virus. Estos tubos se les sometió a ciclos de congelado a -80°C. y descongelado a 4°C. Este proceso cíclico promovió la formación de un gradiente de concentración de sacarosa en el tubo. La suspensión de viriones previamente obtenida fue colocada cuidadosamente en la superficie del gradiente de sacarosa y se realizó un proceso de centrifugación a 32 000 rpm con rotor SW-32Ti Beckman a 4°C durante dos horas.

Transcurrido el tiempo de centrifugación, los tubos fueron llevados a un cuarto oscuro y colocados en un soporte universal. Se les hizo incidir luz desde abajo utilizando una linterna de luz blanca. Esta iluminación permitió visualizar la presencia de una banda de color azul. Dicha banda fue recuperada utilizando una pipeta pasteur de vidrio de punta larga.

Con el propósito de reducir la concentración de sacarosa, la fase azul aislada se diluyó con la solución amortiguadora de virus previamente preparada. Para eliminar este medio, la mezcla se centrifugó nuevamente a 32,000 rpm durante 3 horas a 4°C. Una vez completado este proceso, el sobrenadante se desechó y el pellet resultante se resuspendió en 200 μ L de solución amortiguadora de suspensión de virus. Posteriormente, el pellet se resuspendió adecuadamente mediante sonicación.

Una vez aislados los viriones de BMV, se procedió con el procedimiento del desensamble de los mismos, para con ello obtener las partículas tipo virus (VLPs), las cuales carecen de material genético infeccioso. Se colocó muestra de la muestra previamente obtenida de viriones aislados de BMV en una membrana de diálisis Sigma de corte de peso molecular 14,000 Da. La diálisis se realizó utilizando solución de desensamble (cloruro de calcio 0.5 M, tris-HCl 50 mM, pH 7.4, ajustado con HCl) durante 5 h en agitación a una temperatura de 4°C. Transcurrida la diálisis, la muestra que contenía los viriones desensamblados fue recuperada y posteriormente centrifugada a 50,000 rpm utilizando un rotor 90Ti Beckman durante 4 h a 4°C. Se recuperó el sobrenadante el cual contenía la proteína de cápside de las VLPs y éste se depositó en alícuotas de 500 μ L, teniendo precaución de no resuspender el pellet mientras se recuperaba el

volumen. Hasta este punto, se contaba con las proteínas de cápside del virus del mosaico del bromo desensambladas y sin la presencia de material genético infeccioso.

Las proteínas de la cápside de las VLPs fueron nuevamente sometidas a un proceso de diálisis usando solución amortiguadora de autoensamblaje (acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0.75 M, acetato de magnesio 8 mM, pH 5.1, ajustado con ácido acético a 4°C por 4 h. Pasado este tiempo, la muestra fue recuperada y almacenada en volúmenes de 500 µL en tubos eppendorf previamente etiquetados a -80°C. En este punto ya se contaba con las VLPs ensambladas y sin ningún tipo de funcionalización.

2.7.2 Síntesis de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio

La síntesis de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio se realizó teniendo como base la metodología propuesta y optimizada por la M.C. Claudia Alcira Espinoza González. Para la síntesis de los nanomateriales se usó el método sol-gel. Se pesaron 4.7383 g de $Gd(NO_3)_3$ y 0.2464 gr de $Eu(NO_3)_3$. Dentro de una campana de extracción de vapores y usando una plancha de calentamiento VWR, estos precursores se mezclaron con 50 mL de ácido nítrico en un vaso de precipitado de 250 mL, en agitación constante y vigorosa por una hora. Pasado este tiempo, se agregaron 2.3856 gr de ácido tartárico y 20 mL de agua destilada. La mezcla se transfirió a un vaso de precipitado de 200 mL y la reacción se dejó en agitación por 24 horas.

Posteriormente, la temperatura se incrementó gradualmente hasta llegar a 80°C. Una vez alcanzado este valor, fue necesario realizar un monitoreo constante de la misma. La reacción se mantuvo a 80°C \pm 5°C por 2 h con agitación constante en una plancha VWR. Posteriormente se incrementó la temperatura de manera paulatina hasta que todo el líquido de la mezcla se evaporó. Una vez frío el polvo, éste se molió en un mortero de ágata, removiendo con ello los grumos.

De manera simultánea a lo anterior, se preparó un crisol de porcelana lavándolo con agua rejia (ácido clorhídrico y ácido nítrico concentrados en una razón de 1:3 v/v). El líquido se removió y el crisol se dejó dentro de una campana de extracción para que los residuos de dicha mezcla se evaporaran.

La muestra total se dividió en lotes de 0.3 mg, los cuales fueron depositados en el crisol previamente preparado. Para inducir la formación de la fase cristalina, la muestra se sometió a un proceso de

calcinación en un horno de altas temperaturas a 1000°C durante 3 h. Tras el transcurso de las 3 horas, la muestra se retiró del horno. Este proceso de tratamiento térmico se repitió varias veces hasta que se calcinó por completo el polvo obtenido tras la síntesis.

2.8 Caracterización de las nanopartículas

2.8.1 Caracterización de partículas tipo virus a partir del virus del mosaico del bromo

Tras el aislamiento de los viriones del virus del mosaico del bromo, así como de las partículas tipo virus, se procedió a realizar su caracterización mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS. Mediante esta técnica se evaluó el radio hidrodinámico. Para ello se depositaron 70 μL de muestra en 1 mL de medio de solución amortiguadora de autoensamblaje. Esta suspensión de partículas fue depositada en cubetas Malvern Panalytical-Disposable Solvent Resistant Micro Cuvette.

2.8.2 Caracterización de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio

Se realizó la caracterización por microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las nanopartículas metálicas de óxido de gadolinio con y sin sonicar. Se preparó un stock de nanopartículas dispersas en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL. De este volumen se tomaron 10 μL de la muestra y éstos se depositaron en una rejilla para TEM. Después de 10 minutos con un papel absorbente se removió el exceso de volumen y la rejilla se dejó secar por aproximadamente media hora. De manera simultánea se sonicó la muestra de nanopartículas durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se realizó el mismo procedimiento de depósito de las nanopartículas en las rejillas de cobre para TEM.

Ambas muestras fueron visualizadas bajo el microscopio electrónico de transmisión (TEM). A partir de las micrografías obtenidas se pudo conocer la morfología y el tamaño de los nanomateriales. Adicionalmente, se realizó un histograma de frecuencias para determinar el rango de tamaños.

2.9 Evaluación del efecto toxicológico de las nanopartículas en estadio embrionario y larval de *Danio rerio*

Debido a la cantidad requerida para los experimentos tanto del modelo de nanotoxicidad como del modelo de regeneración de la aleta caudal, se optó por descartar la evaluación de las VLPs obtenidas a partir de BMV. Por lo tanto, los resultados presentados corresponden únicamente a la evaluación biológica de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europeo.

Para el modelo de nanotoxicidad, fue indispensable establecer un modelo en embriones y larvas de pez cebra con el fin de evaluar los efectos toxicológicos, teratogénicos y en la cardiotoxicidad tras la exposición con nanopartículas. Se evaluaron las siguientes concentraciones de las nanopartículas metálicas: 0, 12,5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para ello se configuró una pecera de reproducción de 1.5 L, siguiendo los pasos previamente descritos. Una vez que los desechos fueron removidos de los embriones, éstos se distribuyeron en capas de 6 pozos, colocando 40 embriones por pozo cada uno conteniendo 4 mL de la solución de trabajo.

En cuanto a los tratamientos, se preparó una solución madre de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ a una concentración de 1 mg/mL en medio E3, la cual fue sometida a 30 minutos de sonicación. Luego, se prepararon las soluciones de trabajo, las cuales también se sometieron a 30 minutos de sonicación. La exposición de los embriones se realizó durante el periodo de blástula, el cual abarca desde las 0 a 5.25 hpf. Con el fin de evitar la acumulación de las nanopartículas en el fondo del pozo, cada 24 h, es decir a las 24, 48, 72 hpf, los embriones fueron transferidos a nuevas cajas de 6 pozos con soluciones de trabajo recién preparadas cada 24 h. La evaluación toxicológica concluyó a las 96 hpf. Cabe resaltar que durante la experimentación, los animales se mantuvieron en una incubadora previamente programada para tener un fotoperíodo de 14 h luz y 10 h de oscuridad y una temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Durante este periodo de tiempo los alevines no fueron alimentados.

Con respecto a los parámetros de toxicidad evaluados se monitoreó la mortalidad, eclosión, ritmo cardíaco y malformaciones. Los tiempos de medición para dichos parámetros se describen en la **Figura 14**. La mortalidad de los alevines se midió a las 24, 48, 72 y 96 hpf; la eclosión y el ritmo cardíaco a las 48, 72 y 96 hpf y las malformaciones a las 96 hpf.

Para el seguimiento de la mortalidad y la eclosión, se visualizaron los pozos que contenían a los embriones y larvas tratados con un estereomicroscopio ST57-6C-W. La mortalidad fue monitoreada a los tiempos 24,

48, 72 y 96 hpf. En el caso de la mortalidad, se anotó el número de alevines muertos y vivos en cada intervalo de tiempo. En cuanto a la eclosión, se monitoreó el número de embriones y larvas que habían eclosionado a las 48, 72 y 96 hpf.

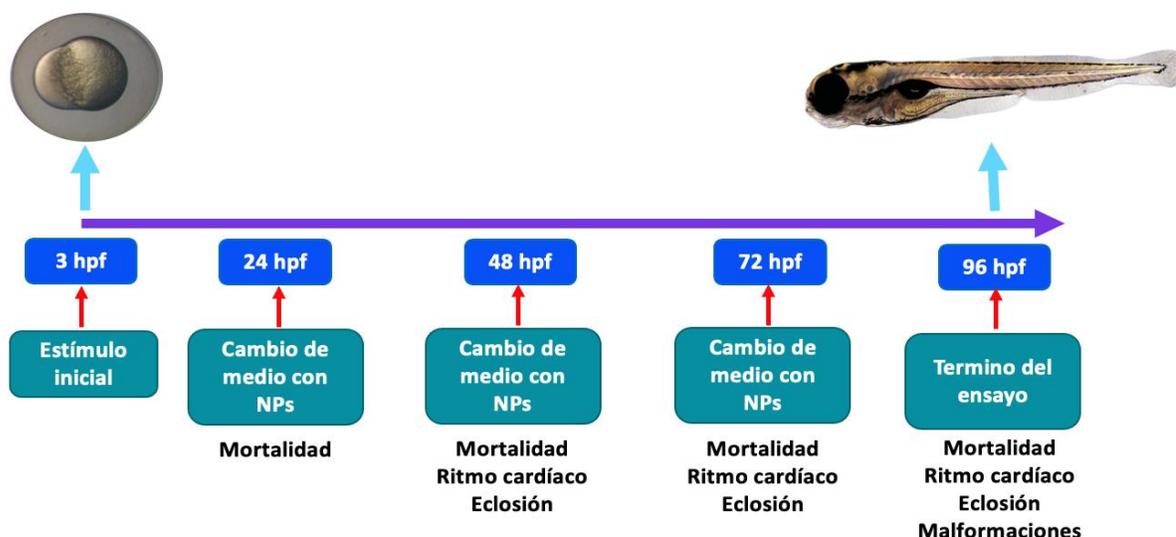


Figura 14. Representación visual del diseño experimental de la evaluación toxicológica de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en fases tempranas del desarrollo del pez cebra. Se destacan los tiempos de evaluación de los parámetros toxicológicos registrados (Ansharani *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2009; Bar-Ilan *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2008).

En cuanto al ritmo cardíaco, los pozos que contenían los embriones y larvas tratadas con los diferentes grupos fueron visualizados con un microscopio invertido Olympus IX71/Modulación Hoffman. Para dicha medición, se consideraron 20 embriones por grupo experimental. Cada alevín fue observado durante 15 segundos bajo el microscopio invertido y se registraron sus pulsaciones cardíacas en dicho intervalo. Posteriormente, estos valores se extrapolaron para con ello obtener la frecuencia cardíaca por minuto (Duan *et al.*, 2013).

La evaluación de la teratogénesis se llevó a cabo al finalizar el experimento. A las 96 hpf, se tomaron fotografías de todos los alevines vivos utilizando la cámara del microscopio invertido Olympus IX71/Modulación Hoffman. Siguiendo el mismo protocolo que en los demás experimentos, inicialmente se incluyeron 40 embriones por grupo. Sin embargo, para la captura de las fotografías, se consideraron aquellos alevines que aún presentaban pulsaciones cardíacas en este momento. En caso de que algunos embriones no hubieran eclosionado para este momento, se procedió a romper manualmente su corion utilizando una punta de pipeta de 200 μL . Antes de realizar la captura de las imágenes, las larvas fueron anestesiadas con triclaína al 0.02% diluida en medio E3 (Gu *et al.*, 2020). Una vez anestesiadas, se colocaron

en un portaobjetos y se observaron bajo el microscopio invertido. Se tomó una fotografía de cada embrión en posición horizontal para visualizar claramente la morfología de su cuerpo. Además, se capturó una segunda fotografía con la larva recostada en uno de sus costados, enfocando específicamente uno de los ojos para distinguir sus detalles y márgenes con claridad.

Las malformaciones consideradas en esta investigación fueron la presencia y severidad de: (1) yema opaca, (2) yema no agotada, (3) malformación de la cabeza, (4) malformaciones de la mandíbula y boca, (5) crecimiento reducido, (6) malformaciones circulatorias (hemorragias y coágulos de sangre), (7) malformaciones de la cola, (8) degradación del cuerpo (formaciones similares a burbujas en el saco vitelino), (9) tejido de la cola en descomposición), (10) edema pericárdico, (10) columna vertebral doblada, (11) tejido opaco de la cabeza, (12) edema del saco vitelino y (13) ausencia de inflación de la vejiga natatoria.

Se emplearon las fotografías de las malformaciones para cuantificar las longitudes de las larvas. Para este análisis, se utilizó el software Image J, el cual permitió obtener las longitudes a partir de una distancia conocida. Además, este mismo programa se empleó para determinar si la exposición con las nanopartículas metálicas de los embriones y larvas en desarrollo generaba un impacto en la organogénesis de los ojos de los alevines a través de la medición de sus áreas. Utilizando la herramienta de selección poligonal (**Figura 15**), se procedió a obtener las áreas de los ojos, las cuales fueron posteriormente graficadas.

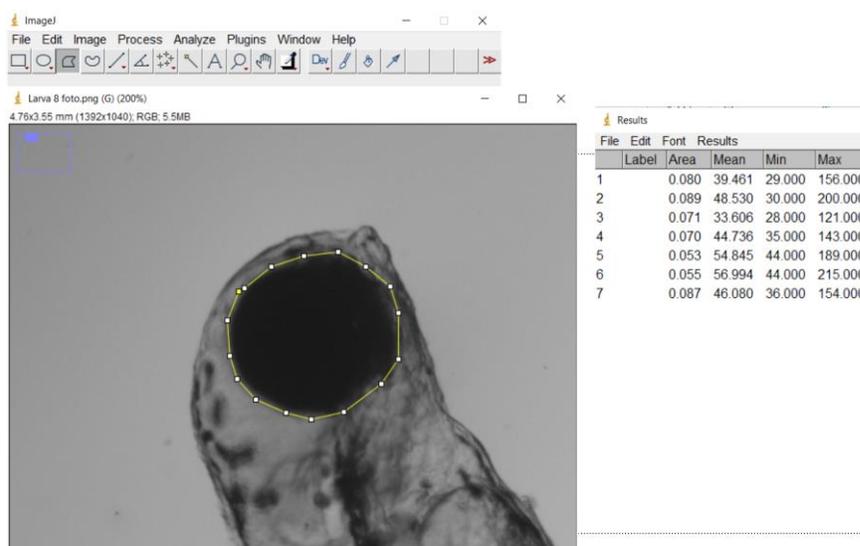


Figura 15. Descripción del procedimiento en Image J mediante el cual se determinó la afectación que las NPs metálicas ejercieron en el desarrollo del ojos de las larvas de 96 hpf de *Danio rerio*. Para llevar a cabo la cuantificación de las áreas de los ojos de las larvas tratadas con los nanomateriales, se requirió emplear la herramienta de selección poligonal.

Además de describir detalladamente las malformaciones observadas, se cuantificaron las anomalías en el desarrollo de las larvas del pez cebra mediante el uso de dos sistemas de puntuación. Para ambas cuantificaciones se consideró una N inicial de 40 embriones, no obstante, a las 96 hpf se consideró como vivos a las larvas que para dicho tiempo aún presentaban pulsaciones cardíacas.

En primer lugar, se empleó el sistema de puntuación propuesto por Bar-Ilan *et al.*, 2009, el cual asigna un puntaje de 0 a 4 según la gravedad de las malformaciones observadas. Esta escala proporciona información importante sobre la severidad de las malformaciones. Las puntuaciones (**Figura 16**) variaron de 0 a 4, donde 0 indicaba la presencia de cero efectos nocivos visibles y 4 la muerte. El valor de 1 se le otorgaba a aquellas larvas que presentaban uno a dos efectos toxicológicos menores, el valor de 2 a aquellos con un efecto toxicológico moderado o de 3 a 4 efectos toxicológicos menores y el valor de 3 a aquellos que mostraban uno o más efectos toxicológicos severos o más de 4 afectaciones menores.

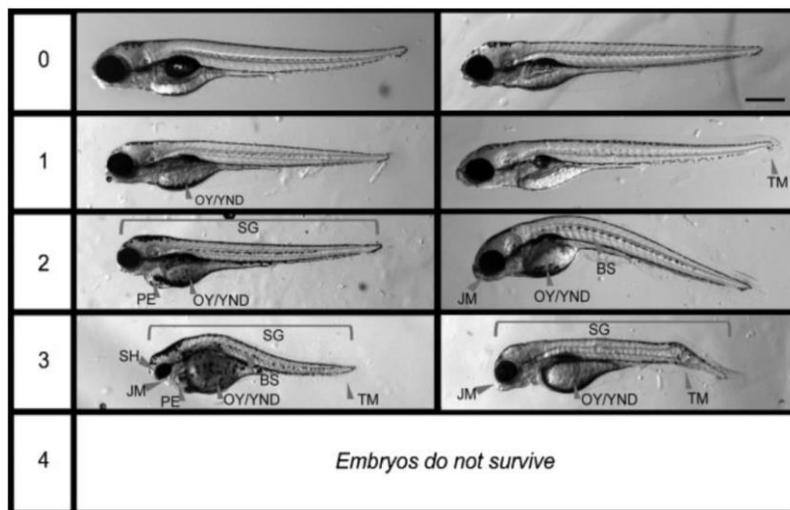


Figura 16. Escala de malformaciones de larvas tratadas con agentes toxicológicos propuesta por Ba-Ilan *et al.*, 2009. La escala abarcaba un puntaje que abarcaba desde el 0 correspondiendo a ningún efecto toxicológico observado hasta el 4, el cual representaba la muerte del animal. YND: yema opaca y no agotada, SH: cabeza pequeña, SG: retraso en el crecimiento, CM: malformaciones circulatorias, TM: malformaciones de la cola, BD: degradación del cuerpo, PE: edema pericárdico, BS: columna doblada, OH: tejido opaco de la cabeza, YSE: edema del saco vitelino, OY: yema opaca, OH: tejido opaco de la cabeza y YSE: edema del saco vitelino. Modificado de Ba-Ilan *et al.*, 2009.

Por otro lado, se propuso una nueva métrica que registra únicamente la presencia o ausencia de ciertos tipos de malformaciones, proporcionando información complementaria a la escala propuesta por Bar-Ilan *et al.*, 2009. Para ello, se revisaron nuevamente las fotografías de las malformaciones obtenidas y se identificaron los diversos tipos de irregularidades en el desarrollo presentes. Se registró el número promedio de malformaciones por larva en los distintos grupos tratados (Asharani *et al.*, 2008; Asharani, *et*

al., 2011; Bai *et al.*, 2009; Bai & Tang, 2020; Bar-Ilan *et al.*, 2009; Chakraborty *et al.*, 2016; Dumistrescu *et al.*, 2019; Massarsky *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2008).

2.10 Evaluación del efecto de nanopartículas en la regeneración de la aleta caudal en adultos de *Danio rerio*

Adicionalmente a la evaluación toxicológica de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio, se evaluó su efecto toxicológico en la regeneración de la aleta caudal en peces cebra adultos con el objetivo de determinar su potencial como andamio de terapias basadas en nanomedicina para la estimulación de la regeneración ósea. Para llevar a cabo esto, se tuvo que realizar el establecimiento del modelo de regeneración de la aleta caudal en pez cebrá.

Se seleccionaron 25 peces cebrá de aproximadamente 8 meses de edad, los cuales tuvieran tamaño y pesos cercanos a los 0.25 gr y a los 30 mm de longitud. Una vez seleccionados los animales, éstos fueron divididos en cinco grupos experimentales: el control, tracolimus 0.1 µg/mL y tres grupos con distintas concentraciones de NPs 0.1, 4 y 40 µg/mL. El fármaco tracolimus se añadió como un grupo de control positivo, puesto que Kujawski, *et al.*, 2014 probaron que la exposición con el mismo promovía la regeneración de la aleta caudal en peces cebras amputados.

En cuanto al protocolo de exposición, una vez que se amputó el 50% de las aletas caudales de los peces cebrá, se procedió a exponer a los animales a los tratamientos mencionados durante 5 minutos en los siguientes momentos: 0 (inmediatamente después de la amputación), 2, 4, 6, 8 y 10 días después de la amputación (dpa). Además, se registró el peso y la longitud de los peces cebrá antes y después de la amputación (0 dpa), así como en los días 3, 5, 7, 9 y 11 dpa. Durante estos tiempos, se procedió a la toma de fotografías de igual forma. El ensayo concluyó en el día 11 dpa, momento en el cual los animales fueron sacrificados.

Previo a la amputación de las aletas caudales se anestesiaron a los organismos con una solución de triclaína al 0.16 mg/mL (agua de acuario como diluyente) por 5 minutos (Pang, *et al.*, 2020). Posterior a esto, los organismos fueron pesados en una balanza análítica. De acuerdo a los grupos experimentales, cada pez fue tomado de su tanque de crianza respectivo con una red y su peso fue registrado. Posteriormente, el pez fue medido con un vernier digital desde el inicio de su mandíbula hasta el extremo distal de su aleta caudal.

Una vez pesado y medido, el pez fue visualizado en un estereomicroscopio con cámara y se procedió a la toma de la fotografía del estado pre amputatorio.

Para la amputación de la aleta caudal, el pez se mantuvo sumergido en la solución de tricaína 0.16 mg/mL. Se tomó su aleta caudal con unas pinzas quirúrgicas y se realizó el corte al 50% utilizando unas tijeras quirúrgicas. Luego de la amputación, el pez fue fotografiado como indicado anteriormente. Asimismo, el pez fue pesado y medido desde el inicio de su mandíbula hasta el extremo distal de su aleta caudal amputada. Una vez tomado los datos, el animal fue transferido a su tanque de mantenimiento con ayuda del par de espátulas.

Posteriormente a la amputación de las aletas caudales se llevó a cabo la primera exposición al estímulo. Para esto, se tomó un recipiente rectangular con capacidad de 250 mL. Se preparó un volumen de 130 mL de las distintas soluciones de trabajo. Con respecto a la preparación de la solución de tracolimus 0.1 µg/ml, primeramente se preparó una solución madre de 1 mg/mL, utilizando como diluyente al DMSO. A partir de ésta se obtuvo la concentración de trabajo de 0.1 µg/mL, la dilución se hizo utilizando agua del acuario. De igual forma, para las $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ se preparó una solución madre con concentración de 1 mg/mL utilizando como diluyente medio E3 sin azul de metileno el cual fue sonicado por 30 min. A partir de esta solución se obtuvieron las concentraciones de las soluciones de trabajo de 0.1, 4, 40 µg/mL de nanopartículas. Previo a la exposición de los animales amputados, estas soluciones fueron sometidas a un periodo de 30 min de sonicación adicionales. La temperatura de todas las soluciones de trabajo fue de $28^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$.

Una vez preparadas las soluciones de trabajo, los animales fueron expuestos a los diferentes tratamientos durante 5 min. Terminado este tiempo, el pez fue llevado al tanque de mantenimiento evitando que cayeran gotas de la solución de trabajo al tanque de mantenimiento. Los tanques de mantenimiento fueron insertos de policarbonato de $\frac{1}{3}$ de altura de 20", éstos fueron colocados en la zona de cuarentena del acuario de pez cebra. Las peceras fueron llenadas con 4 litros de agua proveniente del acuario y se colocó un calefactor con termostato, el cual se ajustó a una temperatura de $28^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$. Los animales fueron alimentados dos veces al día con alimento comercial de hojuelas y nauplios de Artemia.

El monitoreo de la regeneración de la aleta se realizó los días 3, 5, 7, 9 y 11 dpa. Los 5 animales incluidos por cada grupo experimental fueron tomados de su respectivo tanque de mantenimiento utilizando una red. Estos animales fueron manipulados de acuerdo a lo establecido previamente, tomándose en cada uno

de estos tiempos el peso, longitud y fotografías con el estereomicroscopio que permitieran monitorear la regeneración de la aleta caudal.

Con respecto a las re-exposiciones con los tratamientos, las cuales se realizaron en los días post amputación 2, 4, 6, 8 y 10, se prepararon las soluciones de trabajo siguiendo los mismos pasos previamente llevados a cabo para la preparación de los estímulos iniciales a las 0 dpa. Una vez preparadas estas soluciones, se transfirieron los peces de la zona de cuarentena a la zona de trabajo. Por cada grupo experimental, se tomaron los cinco peces con una red y se transfirieron al recipiente que contenía los 130 ml de estímulo. Los animales fueron expuestos durante 5 minutos. Después de este tiempo, se volvieron a tomar los animales con una red y se depositaron en su tanque de mantenimiento.

La **Figura 17** presenta una representación visual de todos los parámetros considerados, así como las horas de exposición y toma de fotografías de dichos parámetros.

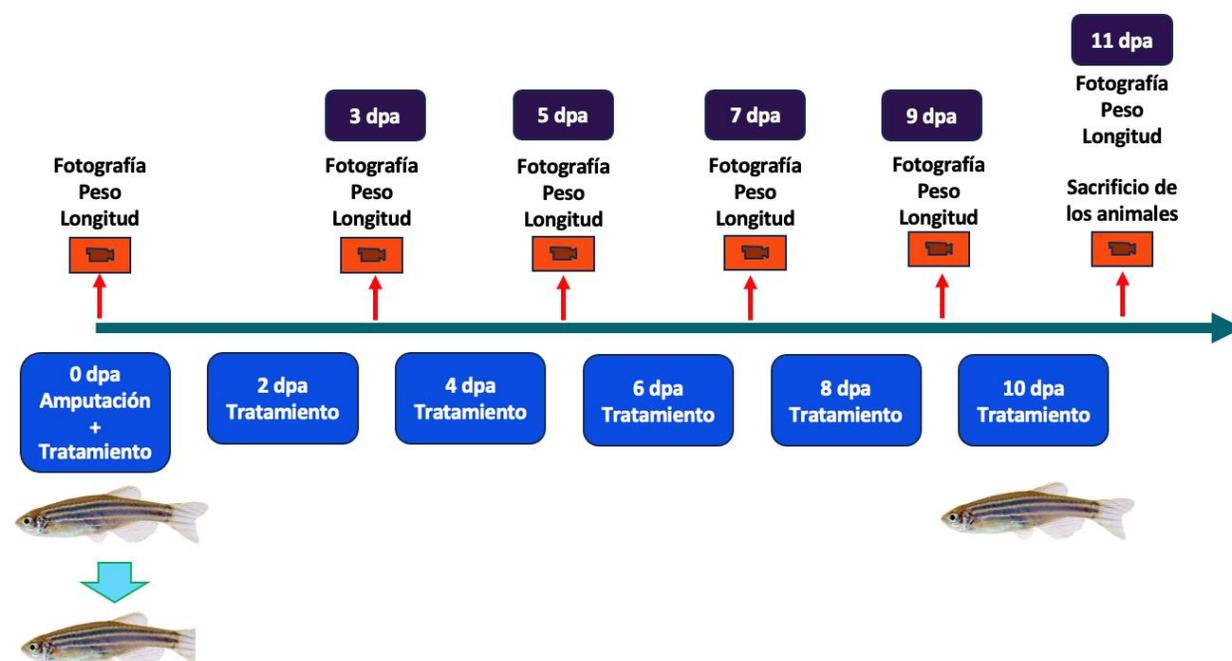


Figura 17. Descripción gráfica del diseño experimental de la evaluación del efecto de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en la regeneración de la aleta caudal en adultos de pez cebra. Se destacan los parámetros monitoreados, así como los tiempos de amputación, exposición y registro de parámetros.

Para evaluar la regeneración de la aleta caudal en los diferentes grupos, se comparó la longitud de los peces antes y después de la amputación y con los días 3, 5, 7, 9 y 11 dpa. Además, se calcularon las áreas de las aletas caudales a partir de las imágenes obtenidas durante todo el período de monitoreo utilizando

el software Image J y su herramienta de selección poligonal. En la **Figura 18** se muestra un ejemplo de cómo utilizar esta herramienta para obtener el área.

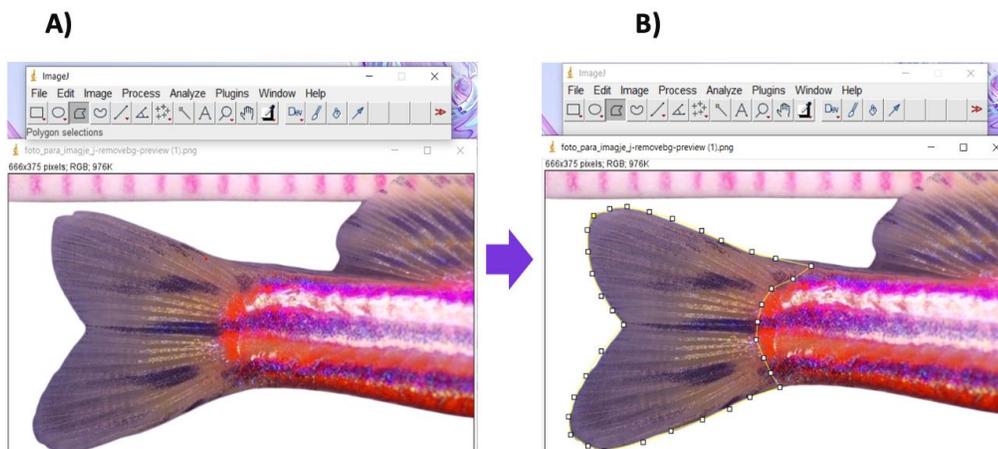


Figura 18. Herramienta de selección poligonal en Image J para el cálculo del área de las aletas caudales regeneradas. A) Imagen en Image J antes de seleccionar la herramienta de selección poligonal. B) Área de la aleta caudal tomada en cuenta por dicha herramienta de análisis digital.

Durante los 11 días que duró el experimento, a cada una de las peceras de los distintos grupos experimentales se les realizó un recambio de agua dos veces al día (mañana y tarde). Aunado a esto, los parámetros de la calidad de agua de las peceras de la zona de cuarentena referentes a concentración de NAT, nitritos y nitratos fueron monitoreados dos veces al día siguiendo las instrucciones del fabricante. En caso de que las concentraciones fueran superiores a 0.25 ppm para NAT, 0 ppm para nitritos y 10 ppm para nitratos era necesario un recambio de agua. Este análisis se realizó tomando muestras de agua previo el recambio de agua.

Con respecto a la alimentación, los animales fueron alimentados con hojuelas comerciales y nauplios de *Artemia salina* dos veces al día (mañana y tarde) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizó un sifoneo para la remoción de cualquier desecho (Azevedo *et al.*, 2011; Henriquez-Martínez *et al.*, 2022; Kujawski *et al.*, 2014; Lebedeva *et al.*, 2020; Örling *et al.*, 2023; Pang *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2013; Sehring & Weidinger, 2019; Uemoto *et al.*, 2020).

2.11 Presentación de resultados y análisis estadístico

Se reportaron los resultados de monitoreo de calidad semanal por 12 semanas utilizando Microsoft Excel incluida en el paquete de Microsoft 365.

Se reportó el triplicado experimental con su desviación estándar de los experimentos concernientes a la optimización del protocolo de reproducción. Se realizaron pruebas t de Student con un valor de significancia del $\alpha=0.05$ (5%). Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico de GraphPad Prism 10.

Se reportaron triplicados todos los experimentos referentes a las pruebas toxicológicas del modelo de nanotoxicidad. Se reportó el promedio de cada grupo experimental, así como su desviación estándar. Para determinar la presencia de diferencias significativas en los diferentes grupos experimentales se realizaron pruebas t de Student. El valor de significancia fue $\alpha=0.05$ (5%). De igual forma, estos análisis se realizaron por medio GraphPad Prism 10.

Con respecto a los resultados del modelo de regeneración de la aleta caudal, se reportaron los resultados de la experimentación con cinco peces adultos. Se reportó el promedio y la desviación estándar. Para la presentación de resultados se procedió a utilizar el software de GraphPad Prism 10.

Es importante mencionar que en todas las gráficas presentadas en este trabajo se incluyó el valor de p directamente en la figura. Además, cabe destacar que el grupo experimental que no tiene un valor de p asociado es el grupo de referencia contra el cual se realizaron las comparaciones con los otros grupos experimentales. Si se realizaron otras comparaciones para obtener el valor de p, estas fueron claramente indicadas en la gráfica.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Optimización de la calidad de agua del acuario de pez cebra

Una vez integrado el biofiltro al sistema, se realizó un monitoreo semanalmente de los parámetros previamente mencionados durante un periodo de 12 semanas. En la **Figura 19** se muestran los resultados de los parámetros monitoreados, los cuales incluyeron al pH (**Figura 19a**), temperatura (**Figura 19b**), dureza carbonatada (KH) (**Figura 19c**), dureza general (GH) (**Figura 19d**), nitrógeno amoniacal total (**Figura 19e**), nitritos y nitratos (**Figura 19f**). Para fines comparativos, se realizaron mediciones tanto del agua del acuario como del agua tomada directamente del suministro municipal, con el objetivo de evaluar la calidad del agua que abastecía al acuario de pez cebra. Cabe resaltar que las mediciones de la calidad de agua fueron realizadas un día previo al retrolavado del sistema, el cual de igual forma se realizó semanalmente.

El pH (**Figura 19a**) del agua del acuario y del suministro municipal mostró diferencias a lo largo de las 12 semanas. El agua del suministro municipal mostró un pH cercano a 8.0, mientras que el agua del acuario alcanzó un pH de aproximadamente 8.4. Este aumento del pH en el acuario se atribuyó al incremento de sales y minerales en el agua debido a la pérdida de agua por evaporación y aeración.

Con respecto a la temperatura (**Figura 19b**), se comprobó que este parámetro se mantenía constante en un intervalo de $28\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ para el agua de acuario. No se observaron fluctuaciones considerables en el comportamiento de este parámetro.

Por otra parte, para el análisis de la dureza del agua tanto carbonatada (KH) (**Figura 19c**) como general (GH) (**Figura 19d**), se observó que el agua presentaba niveles altos de dureza, tanto dureza carbonatada como dureza general debido a la alta concentración de minerales disueltos en ella.

Durante el proceso de desnitrificación, el monitoreo de tres especies nitrogenadas, las cuales fueron el NAT (**Figura 19e**), nitritos y nitratos (**Figura 19f**), resultó crucial. Esto con el objetivo de comprobar la colonización del medio por parte de las bacterias Nitrobacter y Nitrosomas. Con respecto al NAT, se observó un aumento de éste para el caso del agua de acuario. No obstante, a partir de la semana 4 se mantuvo en una concentración constante de 0.25 mg/L. En el caso de los nitritos, todas las mediciones tanto del agua municipal como del agua del acuario mostraron que la concentración de esta especie

nitrogenada era indetectable. Esto se registró como 0 mg/L, ya que los resultados provenían de un análisis colorimétrico. Dados estos valores nulos, no se reportó una gráfica.

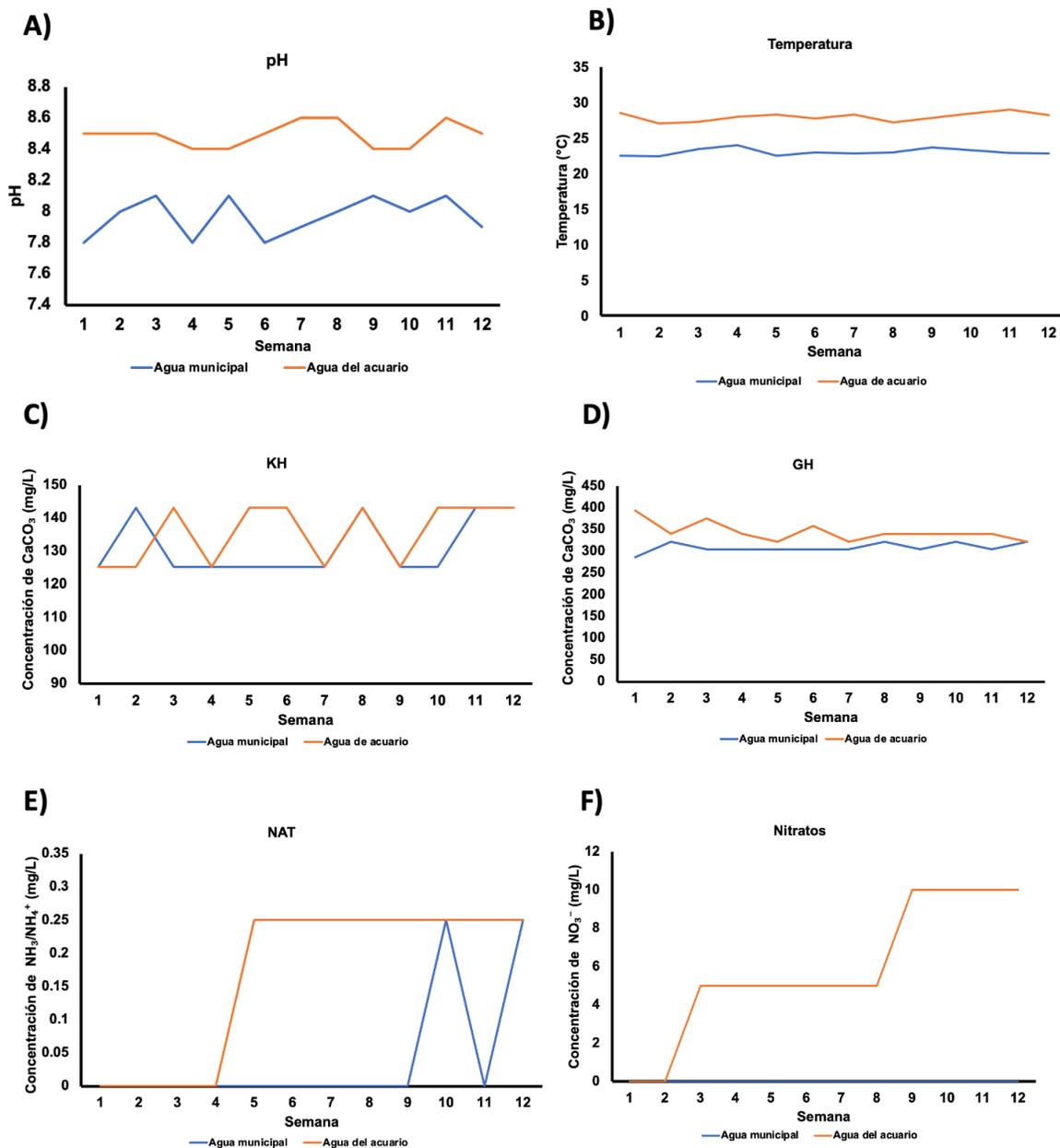


Figura 19. Monitoreo de la calidad de agua tras la integración de un biofiltro. La medición de los parámetros se realizó por 12 semanas.

La maduración del biofiltro se confirmó mediante el monitoreo del aumento de la concentración de nitratos en el agua del acuario (**Figura 19f**). Como se observa, la concentración de nitratos en el agua del acuario aumentó después de dos semanas desde la integración del biofiltro. De acuerdo a lo observado, la maduración del biofiltro tomó aproximadamente tres semanas.

3.2 Estado de salud de los peces adultos

Dado que se desconocía el estado de salud de los peces cebra del acuario de investigación, se llevó a cabo un análisis histopatológico con tinción de hematoxilina y eosina de tres peces que permitió determinar la presencia de distintos organismos patógenos, como se describe en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Histopatología de peces cebra adultos escogidos aleatoriamente. Se mencionan los tipos de patógenos encontrados en distintos órganos y tejidos de tres peces cebra adultos a los cuales se les realizó histopatología con tinción de hematoxilina y eosina.

Ejemplar	Sexo	Nematodos presumiblemente <i>Pseudocapillaria tomentosa</i>	Trematodos	Microsporidios presumiblemente <i>Pseudoloma neurophilla</i>
1	Masculino	Epitelio columnar de intestino	Quistes y larvas en lumen de estómago e intestino	
2	Femenino			Cordón espinal y cerebro
3	Femenino		Metacercarias en epitelio columnar de intestino y en el lumen del tracto digestivo	Cordón espinal

A pesar de la apariencia saludable de los peces cebra seleccionados, los resultados revelaron la presencia de diversos organismos multicelulares patógenos, incluyendo trematodos, microsporidios y nematodos. Se observó que la presencia de estos organismos no estaba vinculada a un sexo específico. En cuanto a su localización, éstos se encontraron en el epitelio columnar de los intestinos, estómago, cordón espinal, tracto digestivo y cerebro.

En la **Figura 20** se observa un corte histopatológico que muestra el lumen del estómago, en él se puede distinguir la presencia de trematodos en diferentes etapas de desarrollo (**Figura 20a**, **Figura 20b** y **Figura 20c**), incluyendo quistes y metacercarias, estas últimas siendo una forma larval característica de estos parásitos. En la **Figura 20d** se observa la obstrucción intestinal por presencia de quistes de trematodos. No pudo ser posible la distinción de una especie de trematodos en específico.

Adicionalmente, otro parásito observado en el análisis histológico fueron los microsporidios los cuales también fueron encontrados en dos especímenes analizados (**Figura 21**). Dada que los parásitos

observados se encontraron en el sistema nervioso de los peces, más específicamente en el cordón espinal, se propuso que la especie era *Pseudoloma neurophilla*.

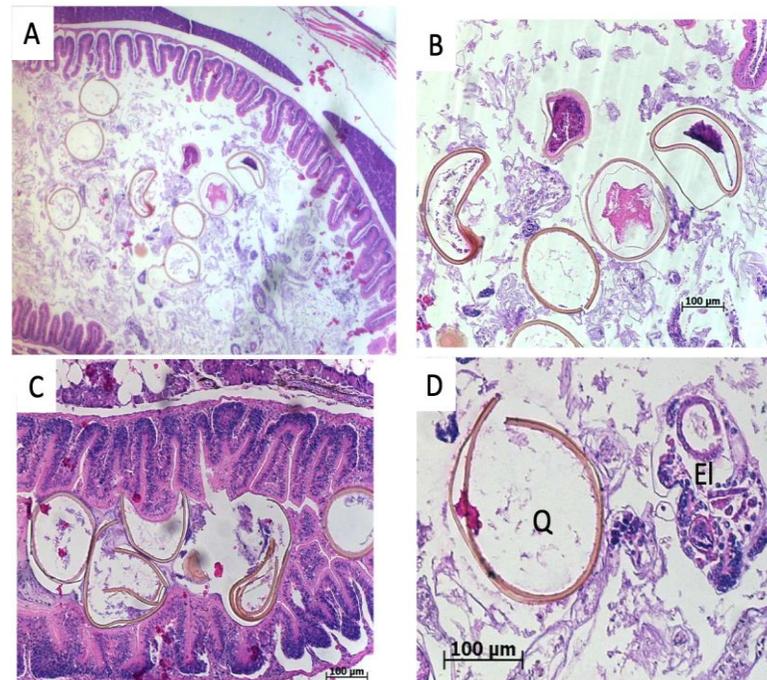


Figura 20. Trematodos en el lumen del estómago. A) Agrupación de quistes y estadios larvales de un trematodo en el lumen del estómago. B) Acercamiento de quistes. C) Obstrucción intestinal ocasionada por los quistes. D) Quiste vacío (Q) y un estadio larval (El) de un trematodo.

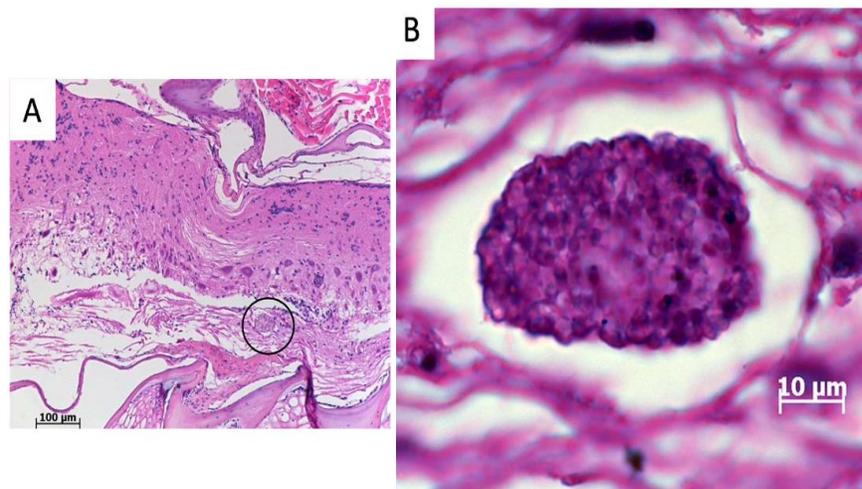


Figura 21. Microsporidiosis de la especie *Pseudoloma neurophilla* en el cordón espinal de un individuo de pez cebrá. A) Agrupación de microsporidiosis y B) Acercamiento de la agrupación de parásitos dentro de un axoma.

Otro tipo de patógeno encontrado, fueron los nematodos. Dada la ubicación y la morfología de los nematodos en los peces, la especie se teorizó que podría ser *Pseudocapillaria tormentosa*. En la **Figura 22** se observa la presencia de esta especie en el epitelio intestinal de los peces cebrá adultos.

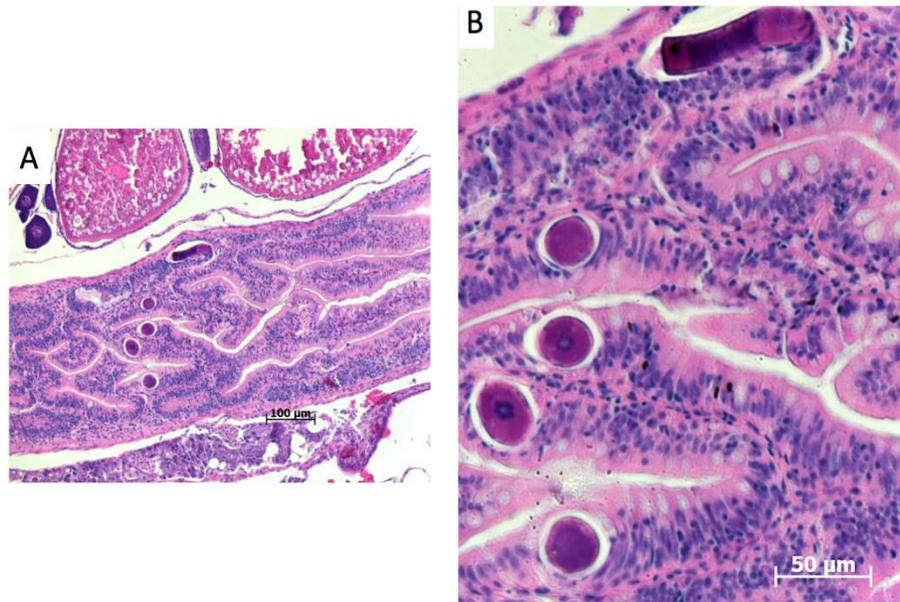


Figura 22. Nematodos en el epitelio intestinal de un individuo adulto de pez cebra, presuntamente de la especie *Pseudocapillaria tomentosa*. Distintos aumentos (A y B).

Aunado a esto, durante la crianza de los peces cebra desde el estadio larval hasta la adultez, se observaron distintas malformaciones en la columna vertebral de algunos ejemplares. Algunas de las malformaciones observadas incluyeron una curvatura anormal y acortamiento por vértebras comprimidas (plastipondilia). La curvatura podría ocurrir en direcciones ventrales (lordosis), dorsal (cifosis) y lateral (escoliosis).

3.3 Cultivo de *Artemia salina* y mantenimiento

El cultivo de *Artemia* fue esencial para enriquecer la dieta de los peces cebra en todas las etapas de su crecimiento. Además de realizar una eclosión y filtración efectivas de la *Artemia* con filtros especializados que separan los quistes y las cáscaras de los nauplios, se necesitaba desarrollar un protocolo de cría de *Artemia* que permitiera su cultivo en un entorno salino. El objetivo principal de este experimento consistió en identificar la dieta óptima que permitiera el desarrollo completo de los crustáceos, desde la eclosión hasta la adultez con el fin de mejorar la nutrición de los peces cebra adultos.

Se recolectaron muestras de agua de manera aleatoria de los diferentes grupos alimentados con los siguientes alimentos: 1) Easy Reef EasyBooster 25 (**Figura 23a**), un alimento líquido a base de fitoplancton compuesto por *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* y *Phaeodactylum*; 2) Market DHA Gold (**Figura 23b**), un enriquecedor para nauplios que contiene ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso esencial

de la serie omega-3, obtenido del alga *Cryptocodinium*; y 3) Lomas Spirulina Boost (**Figura 23c**), un suplemento basado en la alga *Arthrospira platensis*. Luego, se analizó el estado de madurez de las Artemias presentes en las muestras para determinar qué alimento promovía un crecimiento óptimo hasta la etapa adulta.

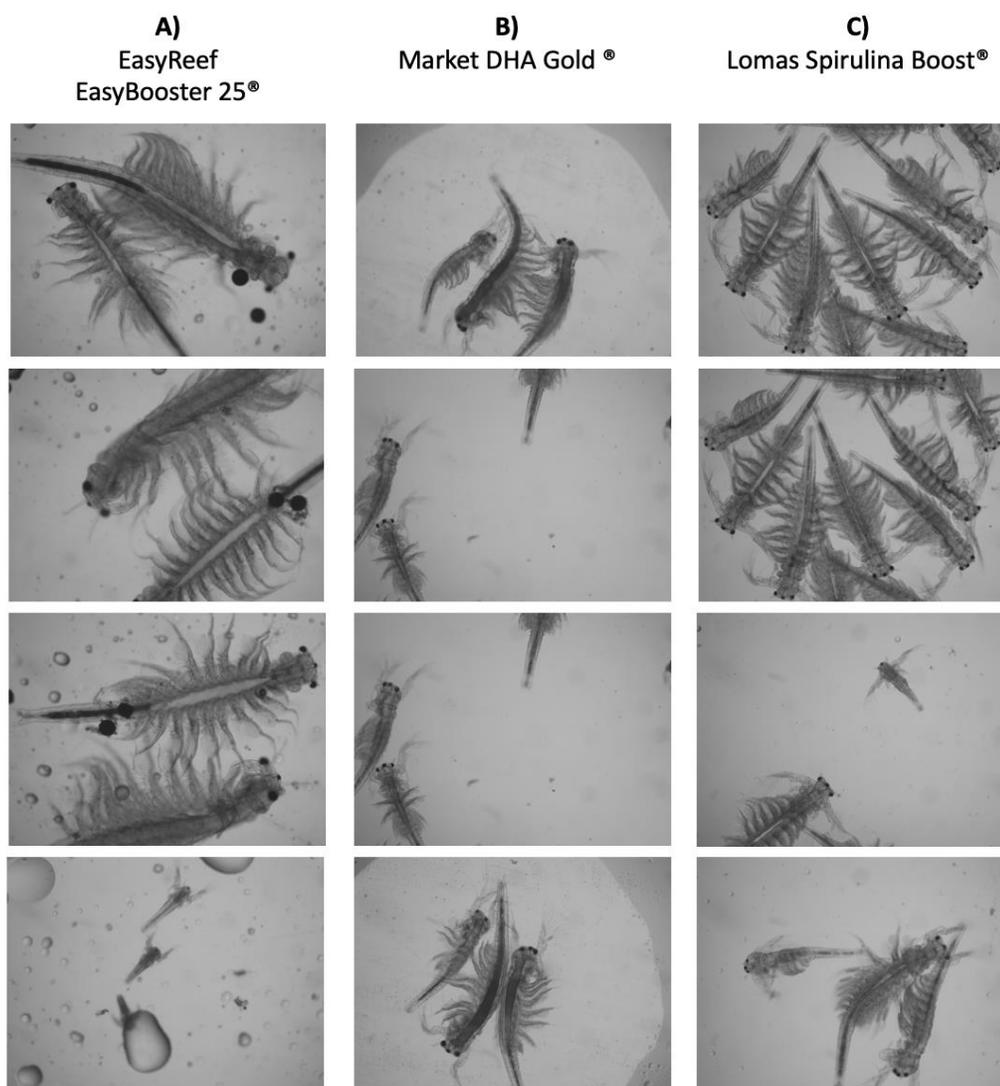


Figura 23. Resultados de Artemia alimentada por 25 días post eclosión con diferentes dietas. A) Easy Reef EasyBooster 25, Market DHA Gold , Lomas Spirulina Boost. Aumento con 4X.

La **Figura 23** presenta imágenes representativas de los resultados obtenidos de los distintos grupos, no obstante, se destaca que los tres tipos de alimento contribuyeron al desarrollo de las Artemias hasta el estadio adulto. Sin embargo, por medio de un análisis cualitativo, se observó un mayor crecimiento de los adultos en el grupo alimentado con Easy Reef EasyBooster 25 en comparación con los otros grupos. En este mismo grupo, aunque en menor medida, se detectaron crustáceos en el estadio de metanauplios.

Por otro lado, en el grupo alimentado con Spirulina Boost se evidenció la presencia de Artemias adultas de menor tamaño y de crustáceos en estadio de metanauplios. A pesar de ello, este grupo exhibió una mayor densidad de Artemias. En contraste, el grupo alimentado con Market DHA Gold mostró Artemias en los estadios mencionados previamente. Sin embargo, se observó una menor densidad de crustáceos en este grupo.

Estos resultados sugieren que las Artemias pueden ser criadas alimentándose con Easy Reef EasyBooster 25 o Spirulina Boost, pero la alimentación exclusiva con Market DHA Gold mostró una deficiencia en promover el estadio adulto de los animales.

3.4 Reproducción de peces cebra

El protocolo de reproducción de peces comerciales *Danio rerio* se optimizó con el propósito de mejorar los tiempos de recuperación de embriones fecundados y aumentar el rendimiento de las reproducciones y oviposiciones. Dichas modificaciones fueron necesarias para permitir la exposición de los embriones durante la etapa de blastulación, crucial para realizar experimentos de toxicidad de nanopartículas, ya que esta fase ocurre entre las 3 y 4 horas después de la fertilización (hpf). Por ende, la optimización del tiempo era un factor primordial.

En consecuencia, se desarrolló una rejilla plástica diseñada para separar a los peces adultos de los huevos, con el fin de disminuir tanto el tiempo de recuperación como la manipulación inherente al proceso. La ventaja principal de esta plataforma plástica fue su capacidad para prevenir la depredación de los adultos sobre los óvulos, lo que a su vez resultó en un aumento del rendimiento de las oviposiciones. Aunado a esto, un factor que a su vez afectaba el tiempo de la recuperación de los huevos fue el volumen de la pecera. Por lo tanto, se llevaron a cabo distintas reproducciones con diferentes volúmenes de peceras de reproducción de entre 1.5 a 10 L.

Para ninguna de las peceras de reproducción se observó una disminución en el rendimiento, el cual era de aproximadamente 300 embriones considerando una hembra y dos machos (**Figura 24**). Basándose en los resultados observados, se decidió utilizar peceras de 1.5 litros de capacidad para las reproducciones posteriores, es decir, aquellas destinadas a obtener embriones fertilizados para los experimentos de toxicidad de nanopartículas. La optimización del protocolo de reproducción y la limpieza posterior de los

embriones fecundados permitieron que los huevos estuvieran listos para su uso posterior en tan solo 35 minutos después de finalizado el período de reproducción.

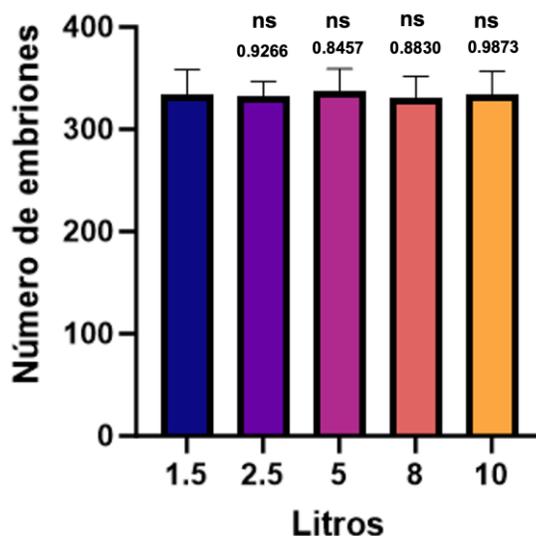


Figura 24. Rendimiento de las reproducciones de peces cebra adultos al ser puestos a reproducción en peceras con diferentes volúmenes de agua. Los resultados correspondieron a un triplicado experimental y se reporta la media junto con la desviación estándar. Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t de Student.

3.5 Crianza de peces cebra desde el estadio embrionario hasta la adultez

Durante las etapas larvales y juveniles del desarrollo, la alimentación desempeña un papel crucial en el crecimiento de peces cebra. En este sentido, la incorporación de nutrientes provenientes de Artemia recién eclosionada tuvo un efecto positivo en la supervivencia de los peces.

El protocolo de crianza diseñado, junto con mejoras en los parámetros relacionados con la calidad del agua, permitió obtener ocho reproducciones con una tasa de supervivencia del $10\% \pm 3\%$ al día 30 después de la fertilización. Cabe mencionar que dicho protocolo de crianza fue de suma importancia para la obtención de los peces adultos que fueron utilizados como reproductores y como sujetos de prueba para la evaluación toxicológica del efecto de las nanopartículas metálicas en la regeneración de la aleta caudal.

Además, este protocolo se aplicó tanto en la cría de peces silvestres (WT) y de peces mutantes fli-1 proporcionados por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, cortesía del Dr. Fernando Casillas. En este caso, los embriones de 1 día post-fertilización (dpf) fueron transportados y aclimatados directamente a las condiciones del acuario de pez cebra. Después de 30 dpf,

se obtuvieron 22 y 32 peces *fli-1* y WT, respectivamente. Actualmente, la edad de estos peces ronda los 8 meses post fertilización.

3.6 Caracterización de las nanopartículas

3.6.1 Caracterización de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio

Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio ($Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs) por el método sol gel, así como el aislamiento de partículas tipo virus provenientes del virus del mosaico del bromo (BMV VLPs). Una vez realizada la síntesis o el aislamiento de las nanopartículas, se realizaron distintos tipos de caracterizaciones fisicoquímicas dependiendo de la naturaleza de las mismas.

El tamaño y morfología de las $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs fue analizada por medio de micrografías obtenidas a partir de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados indicaron que las NPs presentaban morfología *quasi* esférica. Tras 20 min de sonicación se observó una dispersión moderada de los nanomateriales(Figura 25).

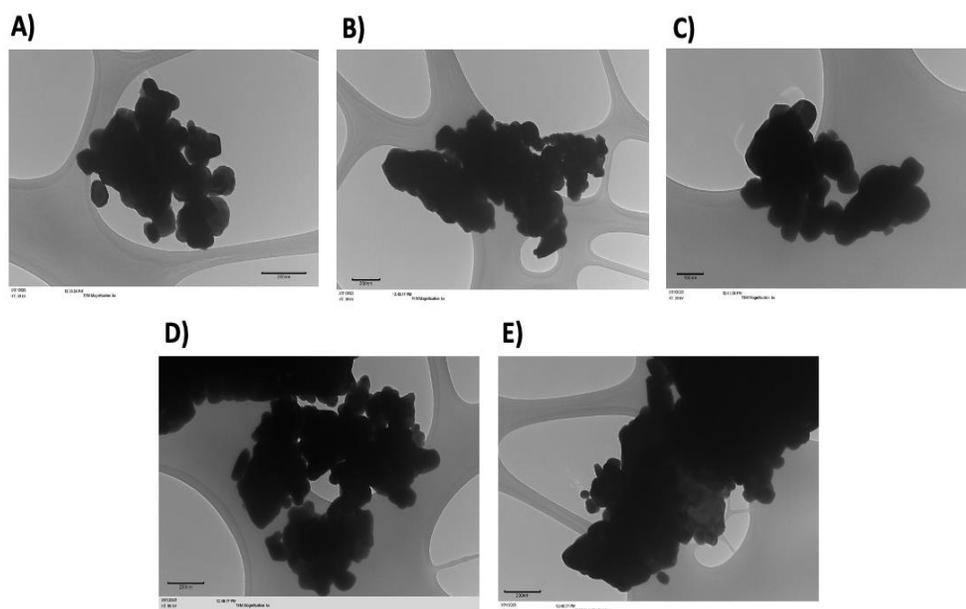


Figura 25. Micrografías de TEM de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio sin sonicación. Escala: 200 nm.

Basado en esta dispersión moderada a pesar de los 20 min sonicación, para los protocolos referentes a la evaluación toxicológica de los nanomateriales se estableció una hora de sonicación, previo a la exposición de los organismos.

A partir de las imágenes obtenidas de las NPs metálicas tras 20 minutos de sonicación, se determinó el rango de los diámetros de las mismas. De acuerdo a un histograma de frecuencias, el diámetro de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio se encontró en su mayor parte entre los 50 y 95 nm, con un pico destacado en los 66 nm (**Figura 26**).

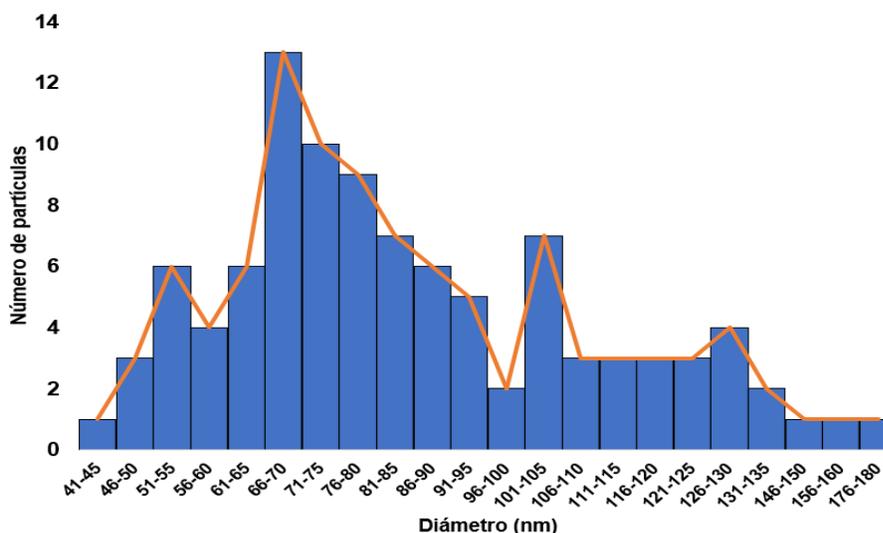


Figura 26. Histograma de frecuencias con los tamaños de las NPs metálicas. Rango de diámetros de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio.

3.6.2 Caracterización de partículas tipo virus

Por otro lado, en relación con el otro tipo de nanopartículas, las cuales corresponden a partículas tipo virus (VLPs), se emplearon 100 gramos de plantas de *Hordeum vulgare* infectadas con el virus del mosaico del bromo (BMV). Después del proceso de aislamiento, se logró obtener 77 mg de viriones de BMV.

A los viriones de BMV aislados se les sometió a un procedimiento adicional para eliminar el material genético del virus y así obtener las VLPs. En la **Figura 27** se presentan las caracterizaciones mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) de los viriones (**Figura 27a**) y de las VLPs obtenidas (**Figura 27b**). Estos resultados confirmaron que, a pesar del procedimiento de extracción y desmontaje y posterior montaje, las VLPs mantuvieron un tamaño de 28 nm, que es el tamaño característico de los viriones del virus del mosaico de bromo. Esto confirma un exitoso aislamiento de las VLPs.

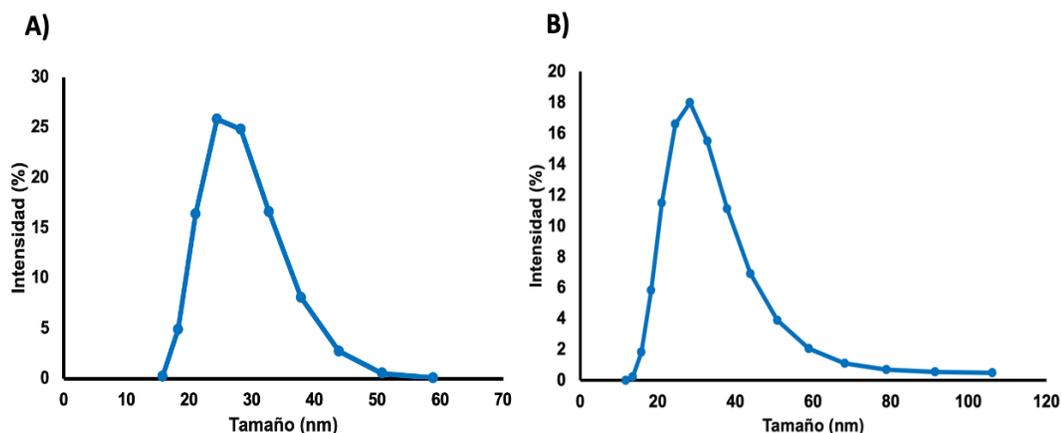


Figura 27. Dispersión dinámica de la luz de viriones y partículas tipos virus. Este análisis permite determinar el radio hidrodinámico de los viriones (A) y partículas tipo virus (B) aisladas del virus del mosaico del bromo.

Es importante destacar que para futuros experimentos, específicamente aquellos relacionados con el modelo de nanotoxicidad y el modelo de regeneración de la aleta caudal, se optó por no emplear estas VLPs. Esto se debe a que el establecimiento de ambos modelos requería una cantidad considerable de dicho tipo de nanopartículas.

3.7 Efecto toxicológico de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en etapas tempranas del desarrollo en *Danio rerio*

Se llevó a cabo la evaluación del efecto toxicológico de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en embriones y larvas de pez cebra. El experimento se extendió por un período de 96 horas post-fertilización (hpf). Se evaluaron varios parámetros, incluyendo la mortalidad, la eclosión, el ritmo cardíaco y las malformaciones. La mortalidad se registró cada 24 hpf, mientras que la eclosión y el ritmo cardíaco se monitorearon diariamente a partir de las 48 hpf. Las malformaciones se evaluaron específicamente al final del período, a las 96 hpf. Las concentraciones evaluadas de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs fueron de 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu g/mL$. Se añadió un grupo control, el cual no fue tratado con los nanomateriales.

Durante toda la duración del experimento, se realizaron un total de cuatro exposiciones con nanopartículas recién preparadas al final de las 96 hpf, específicamente a las 4 hpf (en el blástula), 24, 48 y 72 hpf. Este esquema de exposición es concordante con lo propuesto en la literatura para evaluaciones toxicológicas de nanopartículas en este tipo de modelos animales.

3.7.1 Exposición acumulativa de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs

Es importante resaltar que en ninguno de los artículos donde se evaluó el efecto toxicológico de las nanopartículas se mencionaba la necesidad de transferir los embriones y larvas a cajas con un nuevo medio con nanopartículas cada 24 horas post-fertilización (hpf). Esto era crucial debido a que incluso a bajas concentraciones, las nanopartículas $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs se precipitaban en el fondo de los pozos de la caja de 6 pozos. Por ende, después de transcurridas las 24 hpf, la mayoría de las nanopartículas se encontraban en el fondo del pozo, lo que implicaba que la remoción del medio para agregar nuevo medio con la concentración adecuada de nanopartículas fuera ineficiente. Esto dio lugar a un tipo de exposición acumulativa con los nanomateriales. A continuación se describen algunos de los resultados obtenidos tras haber expuesto a embriones y larvas a este tipo de exposición acumulativa.

3.7.1.1 Mortalidad

En la **Figura 28** se presentan los resultados de la supervivencia a las 96 hpf de embriones y larvas tratadas de manera acumulativa con las $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs. Aunque se observa un decremento en todos los grupos en comparación con el grupo control, no se aprecia un efecto relacionado con la concentración de NPs, lo cual contrasta con lo que se esperarí según otros reportes similares.

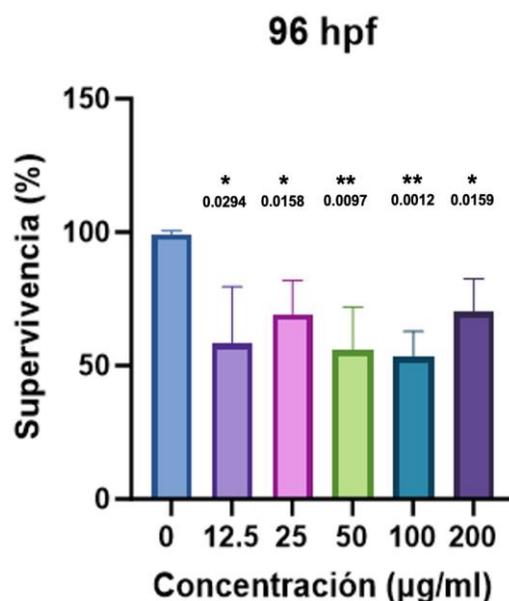


Figura 28. Exposición acumulativa: mortalidad de larvas tratadas con distintas concentraciones de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs a las 96 hpf. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40.

3.7.1.2 Eclosión

Por otro lado, en relación con la eclosión (**Figura 29**), se observó un decremento proporcional a la concentración de las nanopartículas. Sin embargo, el porcentaje de eclosión fue bajo incluso a las 96 hpf y a la concentración más baja de nanomateriales, que era de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este bajo resultado de eclosión, incluso a bajas concentraciones, sugirió la necesidad de llevar a cabo una remoción más efectiva de nanopartículas para evitar que el corión quedara obstruido, permitiendo así la entrada continua de los nanomateriales en el embrión a través de los poros coriónicos.

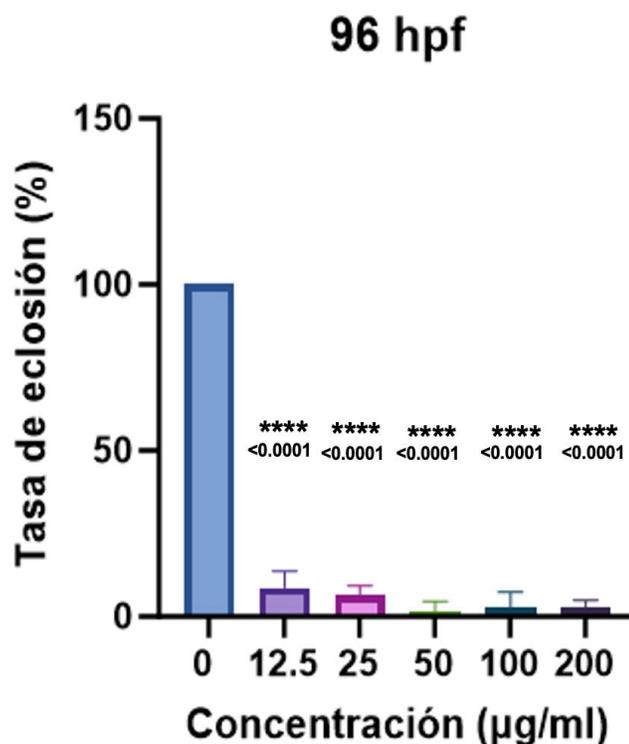


Figura 29. Exposición acumulativa: eclosión de larvas tratadas con distintas concentraciones de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs a las 96 hpf. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40.

3.7.1.3 Ritmo cardíaco

Con respecto a los resultados obtenidos de ritmo cardíaco, a las 72 (**Figura 30a**) y 96 (**Figura 30b**) hpf se obtuvo un aumento proporcional en las pulsaciones/min en todos los grupos tratados con los nanomateriales en comparación con el grupo control, el cual presentaba un promedio de 170 pulsaciones/min. El valor máximo fue el correspondiente al grupo de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual exhibió un promedio de 210 pulsaciones/min.

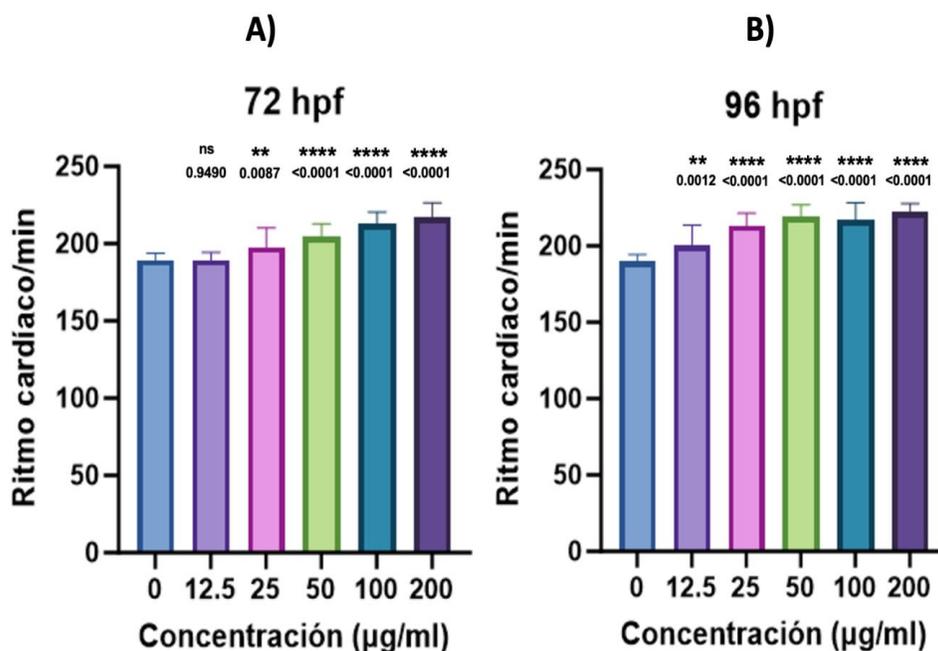


Figura 30. Exposición acumulativa: ritmo cardíaco a distintas horas de larvas tratadas con Gd₂O₃:Eu³⁺ NPs. A) 72 y B) 96 hpf. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40.

3.7.2 Exposición no acumulativa de Gd₂O₃:Eu³⁺ NPs

Dado que los resultados de la exposición acumulativa de las nanopartículas no arrojaron datos concluyentes, se procedió a ajustar el protocolo de evaluación del efecto toxicológico de las Gd₂O₃:Eu³⁺ NPs en etapas tempranas del desarrollo de *Danio rerio*. Esto se tuvo en cuenta debido a que las nanopartículas se precipitaban, lo que requería que los embriones y larvas tratadas fueran transferidos a nuevos pozos con medio E3 y nanopartículas para evitar una exposición acumulativa. Esta modificación aseguró que los animales estuvieran expuestos a una concentración específica y constante de nanomateriales.

3.7.2.1 Mortalidad

Con respecto a la mortalidad de los grupos tratados con los nanomateriales se observó un decremento gradual conforme aumentaba la concentración y el tiempo de exposición (**Figura 31**). No obstante, a las 96 hpf se registró el mayor decremento en la viabilidad de los alevines tratados, alcanzando un mínimo del 28% en el grupo expuesto a 200 µg/mL. Cabe resaltar que el grupo tratado con 12.5 µg/mL mantuvo una supervivencia del 80% también a este tiempo.

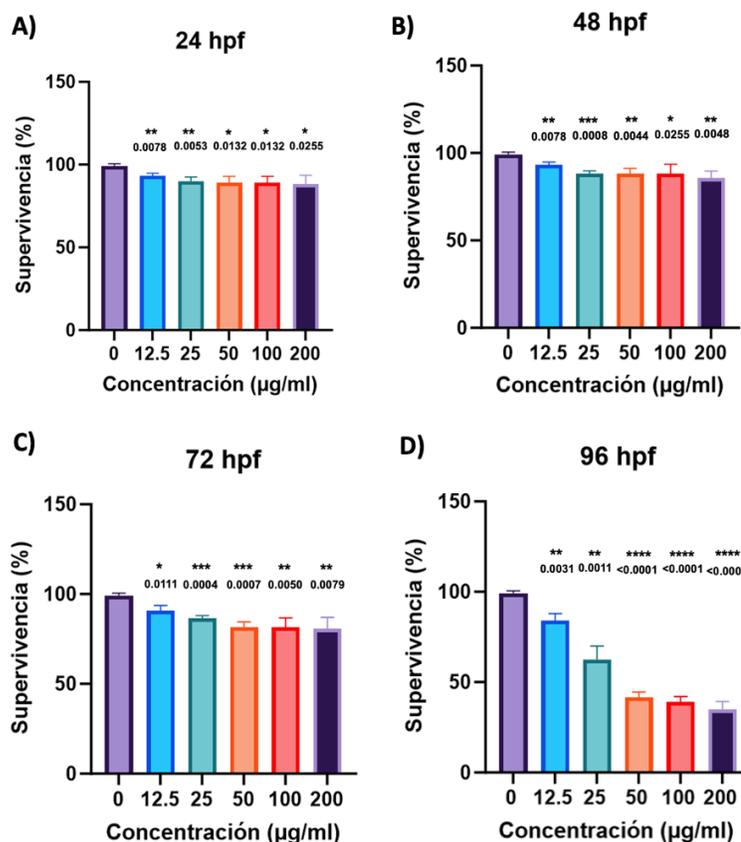


Figura 31. Supervivencia de larvas tratadas con distintas concentraciones de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ nanopartículas a diferentes tiempos. A las 24 (A), 48 (B), 72 (C), y 96 (D) hpf. La exposición se considera no acumulativa. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40.

En la **Figura 32** se comparan las diversas tendencias en cuanto a la supervivencia de los embriones y larvas tratados con diferentes concentraciones de las nanopartículas a los tiempos de 24, 48, 72 y 96 hpf. En dicha gráfica se observa que el decremento de supervivencia era superior al 80% a las 24 y 48 horas, mientras que el mayor decremento en la viabilidad se registró a las 72 y 96 hpf.

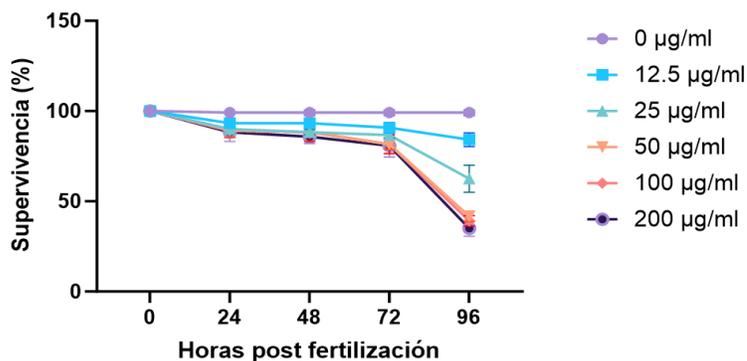


Figura 32. Comparación de supervivencia de embriones y larvas de *Danio rerio* tratados con nanopartículas de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ a diferentes tiempos. Se muestran las tendencias de todos los grupos y todos los tiempos considerados.

3.7.2.2 Eclosión

Por otro lado, el proceso de eclosión fue monitoreado a partir de las 48 hpf; sin embargo, no se observó eclosión prematura en ninguno de los grupos tratados, incluyendo el grupo control. Por lo tanto, la eclosión se registró a las 72 y 96 hpf (**Figura 33**). Es importante destacar que en este último tiempo se observó un aumento en comparación con lo obtenido a las 72 hpf. Específicamente para el tiempo de 96 hpf, es posible distinguir una clara tendencia de disminución de la eclosión conforme aumentaba la concentración de los nanomateriales. Por ejemplo, para el grupo de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la eclosión a las 96 hpf fue de 5%. Estos resultados suponen la posibilidad de que si la exposición con los nanomateriales hubiera continuado por más tiempo, estos alevines eventualmente hubieran muerto por inanición dado que el proceso de eclosión se viera inhibido.

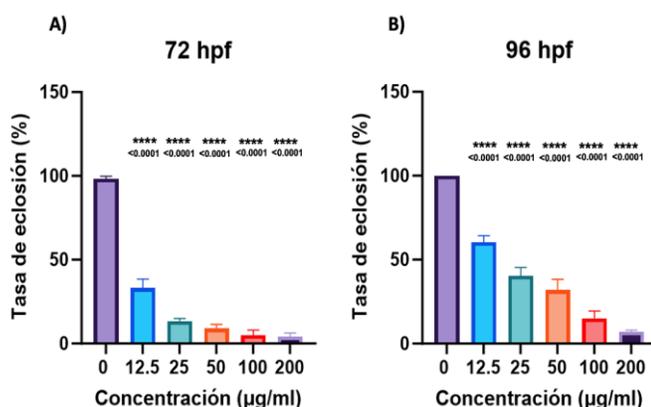


Figura 33. Tasa de eclosión reportada a las 72 y 96 hpf de los grupos tratados con $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ nanopartícula. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=40.

En la **Figura 34** se distingue claramente las tendencias demostradas en cuanto a eclosión del grupo control y los grupos tratados con distintas concentraciones de las nanopartículas.

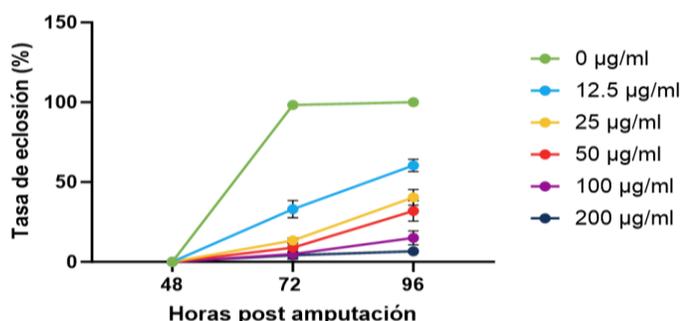


Figura 34. Tasa de eclosión a distintos tiempos de larvas expuestas a distintas concentraciones de nanopartículas metálicas. Se reporta la tasa de eclosión de larvas a distintos tiempos.

3.7.2.3 Cardiotoxicidad

Con el objetivo de determinar si la exposición a las $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs causaba cardiotoxicidad, se evaluó el ritmo cardíaco de los diferentes grupos tratados a las 48, 72 y 96 hpf. Según se observa en la **Figura 35**, se evidencia una clara tendencia de aumento en el ritmo cardíaco en los distintos tiempos posteriores a la fertilización, a medida que se incrementó la concentración de los nanomateriales y el tiempo de exposición. Este aumento es especialmente notable a las 96 hpf, donde el grupo control presentaba un valor aproximado de 170 pulsaciones/minuto, mientras que los grupos tratados con concentraciones más altas (100 y 200 $\mu g/mL$) mostraron valores superiores a 200 pulsaciones/minuto. Estos resultados confirman la presencia de cardiotoxicidad inducida por las nanopartículas. Se observan diferencias significativas de todos los grupos con respecto a los grupos controles.

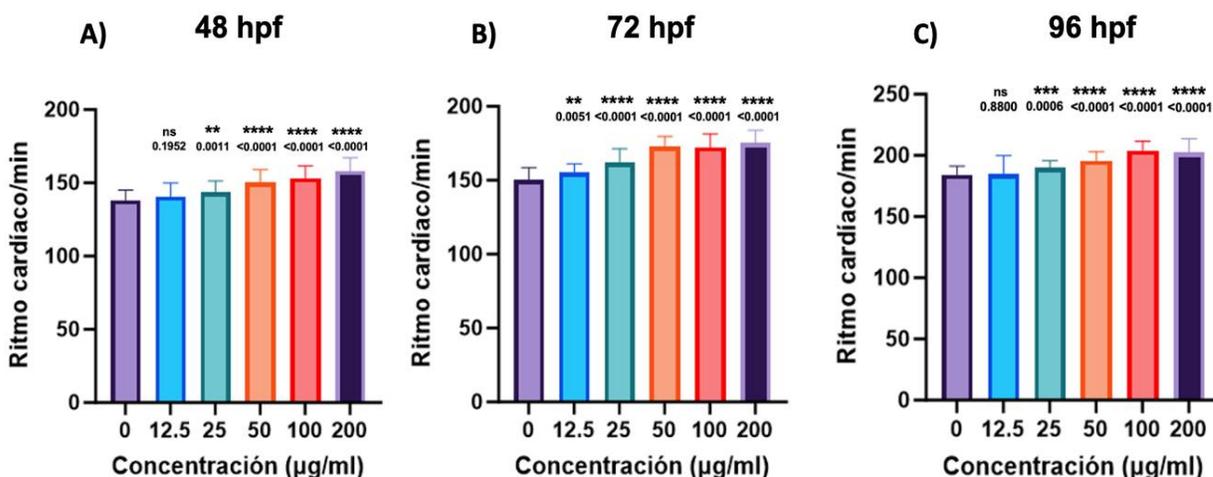


Figura 35. Cardiotoxicidad de las nanopartículas metálicas ($Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs) en embriones y larvas a diferentes tiempos. Se reporta la frecuencia cardíaca por minuto de alevines tratados con diferentes concentraciones de nanopartículas metálicas. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar de tres réplicas experimentales. N=20.

3.7.2.4 Análisis de malformaciones

A las 96 horas post-fertilización (hpf) se llevó a cabo un análisis de las malformaciones (**Figura 36**) presentes en las larvas tratadas, tanto aquellas expuestas a concentraciones altas como bajas de los nanomateriales. Es importante destacar que, para evaluar las malformaciones, se consideraron todas los embriones y larvas vivas hasta ese momento. Para el caso de aquellos embriones que no habían eclosionado, se realizó una ruptura manual de los coriones.

Las malformaciones fueron observadas en todos los grupos tratados con nanopartículas, incluso a bajas concentraciones. Se encontraron una diversidad de malformaciones, en la mayoría de los casos, se presentaron los siguientes tipos de anomalías en el desarrollo, incluyendo: malformaciones en la cabeza, en la mandíbula, tejido de la cola en descomposición, edema pericardial, columna doblada y ausencia de la inflación de la vejiga natatoria.

Con respecto a la columna, se observó una curvatura considerable para todos los grupos tratados. De igual forma, la ausencia de una vejiga natatoria en todos los grupos sugiere un acceso limitado al aire de la superficie durante el periodo de inflación inicial. Cabe resaltar que otros tipos de malformaciones comunes en larvas, tales como daños al sistema circulatorio como hemorragias, tejido de la cabeza opaco, edema en la yema o malformaciones en el notocordio, no fueron observados. En las larvas tratadas se observó la presencia de yemas opacas. Estas observaciones, junto con los resultados previos referentes a la afectación en el ritmo cardíaco, demuestran la cardiotoxicidad de los nanomateriales en los alevines.

En cuanto al crecimiento reducido, que es otra forma de malformación comúnmente observada en larvas expuestas a nanomateriales, se llevó a cabo un análisis para investigar el tamaño de las larvas a las 96 hpf, utilizando las imágenes obtenidas de las malformaciones. Se midió el tamaño de las larvas desde el inicio de la mandíbula hasta el extremo distal de la cola. Según el análisis estadístico de la prueba t de Student, se observó un decremento en el tamaño de las larvas en todos los grupos tratados (**Figura 37**). Sin embargo, no se encontró una correlación clara con el incremento de la concentración de los nanomateriales. Además, la comparación estadística entre el grupo de menor concentración y el de mayor concentración no reveló una diferencia significativa.

Asimismo, se llevó a cabo una evaluación del área de los ojos (**Figura 38**) de las larvas tratadas con las nanopartículas a las 96 horas post-fertilización (hpf), con el fin de determinar si la exposición a los nanomateriales afectaba el desarrollo ocular. Se observó un decremento en el tamaño de los ojos en comparación con el grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los grupos expuestos a concentraciones de 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos resultados confirman la afectación del proceso de desarrollo ocular debido a la exposición a las nanopartículas. Una vez identificados los diferentes tipos de malformaciones en las larvas, se procedió a generar una escala basada en la escala reportada por Barllan *et al.*, 2009 (**Figura 16**). La importancia del uso de esta escala es que ésta permite evidenciar la gravedad de los defectos morfológicos, la supervivencia y los efectos adversos de larvas de pez cebra expuestas con nanopartículas. Las puntuaciones variaron de 0 a 4, donde 0 indicaba la presencia de cero efectos nocivos visibles y 4 la muerte.

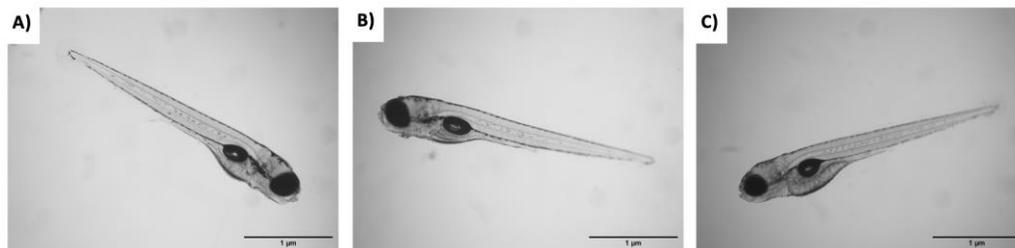
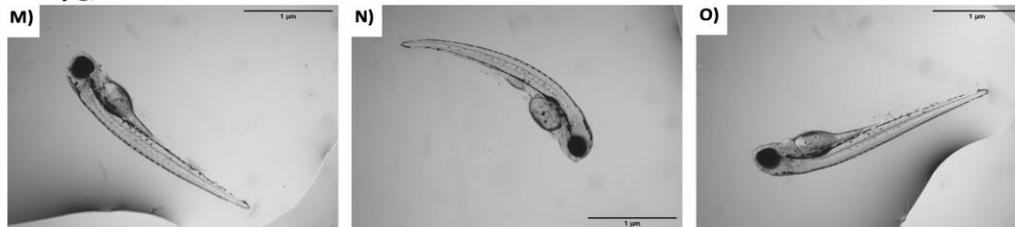
Control**12.5 µg/ml NPs****25 µg/ml NPs****50 µg/ml NPs****100 µg/ml NPs****200 µg/ml NPs**

Figura 36. Malformaciones de larvas de pez cebra tratadas con distintas concentraciones de nanopartículas de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$. Se agregan imágenes representativas de larvas de 96 hpf de los distintos grupos de tratamiento. Escala: 1 µm.

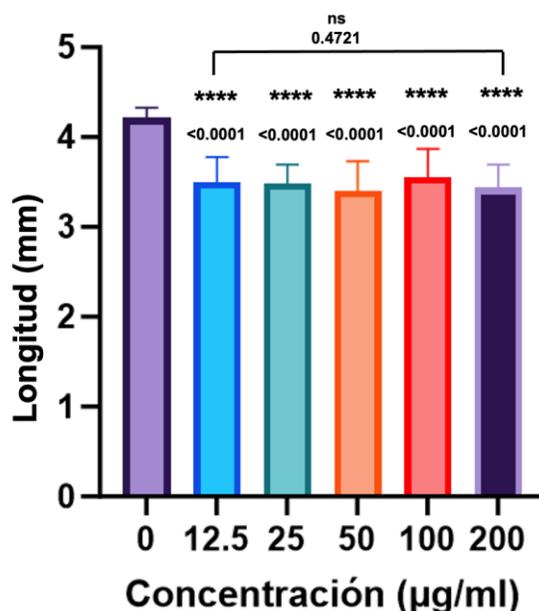


Figura 37. Longitud de larvas de 96 hpf tratados con diferentes concentraciones de nanopartículas metálicas. Se reporta la longitud de larvas desde el inicio de la mandíbula hasta el extremo distal de su aleta caudal. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar. Para dicha medición se consideraron 12-15 sujetos experimentales por grupo.

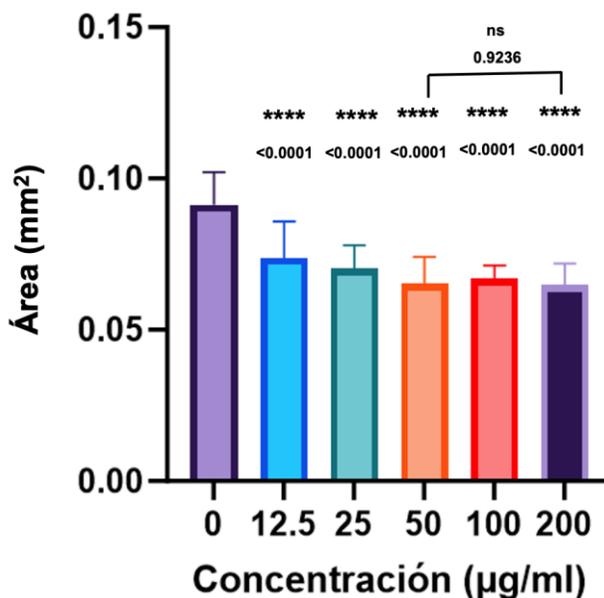


Figura 38. Evaluación del impacto de la exposición con nanopartículas de óxido de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ en el desarrollo ocular de larvas de pez cebra de 96 hpf. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar. Para dicha medición se consideraron 12-15 sujetos experimentales por grupo.

El uso de esta escala permitió determinar las concentraciones de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio que generaban mayores defectos en el desarrollo después de una

exposición que abarcaba las 96 horas post fertilización (hpf). De acuerdo a los resultados de dicha escala (**Figura 39**), se observa que los valores promedio de las escalas para todos los grupos son aproximados a 3. De igual manera, es notable un incremento en la escala de las malformaciones a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

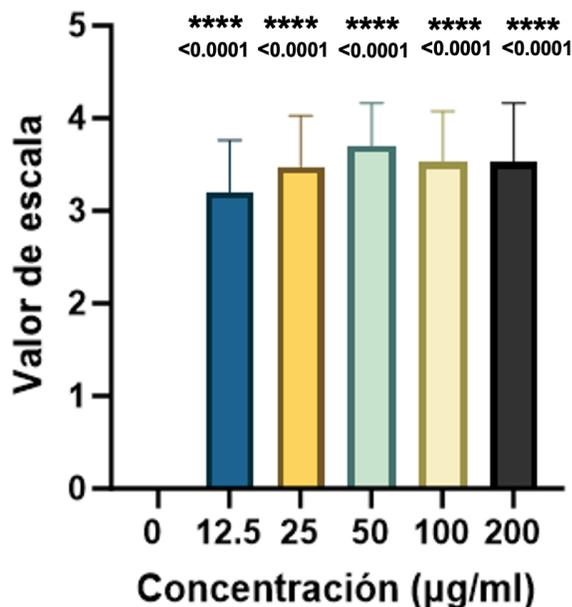


Figura 39. Escala de malformaciones a las 96 hpf de larvas tratadas con distintas concentraciones de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs basada en la escala propuesta por Bar-Ilan *et al.*, 2009. Las larvas de 96 hpf se les otorgó un puntaje dependiendo de la severidad de sus malformaciones. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar. Para dicha medición se consideraron 12-15 sujetos experimentales por grupo.

Dado que la escala de Bar-Ilan *et al.*, 2009, basada en la categorización de los efectos toxicológicos como leves, moderados y severos, conlleva un grado de subjetividad, se propuso una nueva escala que simplemente reportara la presencia o ausencia de malformaciones en las larvas. Esta escala (**Figura 40**) consideró los tipos de malformaciones más comunes: yema opaca, yema no agotada, cabeza pequeña, malformación en la cabeza, malformación en la mandíbula, crecimiento reducido, malformaciones en el sistema circulatorio tales como hemorragias y coágulos sanguíneos, malformación en la cola, degradación corporal, tejido de la cola en descomposición, edema pericardial, columna doblada, tejido de la cabeza opaca, edema del saco vitelino y yema opaca. Los valores obtenidos con esta nueva escala propuesta permitieron identificar al grupo de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como el grupo con mayor número de malformaciones obtenidas, no obstante, el resto de los grupos tratados mostraron un aproximado de 7 malformaciones por larva. Se observaron diferencias significativas entre el grupo de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación con el resto. No obstante, al comparar los grupos de 12.5 , 25, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, éstas no fueron encontradas.

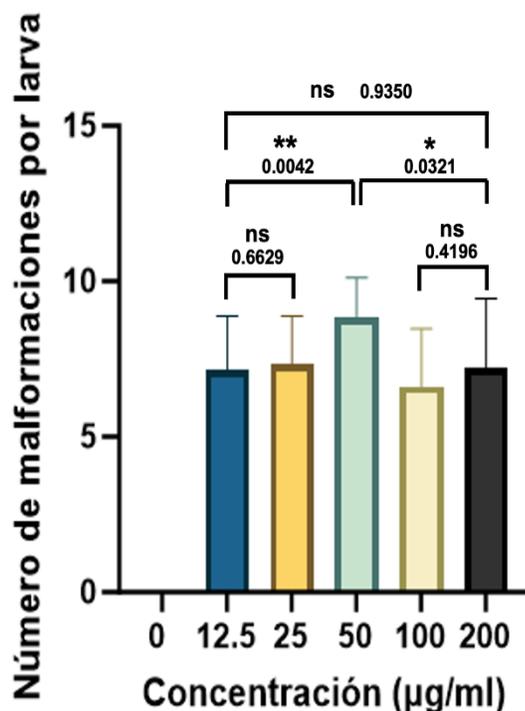


Figura 40. Número de malformaciones por larvas tras una exposición con nanopartículas metálicas desde el estadio de blástula hasta las 96 hpf. Se realizó una prueba estadística t de Student y se muestran los valores de p para cada grupo experimental en comparación con el grupo control. Se incluyen las desviaciones estándar. Para dicha medición se consideraron 12-15 sujetos experimentales por grupo.

3.8 Evaluación del efecto toxicológico de nanopartículas metálicas en la regeneración de la aleta caudal en peces cebra adultos

El protocolo usado en esta investigación fue diseñado teniendo como base el protocolo de Pang *et al.* (2020) (Figura 9). En este protocolo, los animales fueron anestesiados con tricaina y amputados y posteriormente fueron expuestos una sola vez a distintas concentraciones de AgNPs durante 5 a 10 minutos. La toma de medidas y fotografías fue realizada cada 24 h hasta completar 8 días.

El efecto toxicológico de las $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs en la regeneración de la aleta caudal de *Danio rerio* fue evaluado en peces adultos de entre 6 y 8 meses de edad. Los individuos seleccionados para el experimento de regeneración de la aleta caudal tenían un tamaño aproximado de 30 mm. La exposición con los nanomateriales se realizó durante 5 minutos en los días post-amputación (dpa) 0, 2, 4, 6, 8 y 10. De manera complementaria a esto y con el objetivo de monitorear la regeneración de las aletas caudales, se tomaron fotografías de dichos apéndices y se tomaron mediciones de longitud y peso tanto antes como después de la amputación (0 dpa), y a los 3, 5, 7, 9 y 11 dpa.

En la **Figura 41** se observa el proceso de regeneración de los diferentes grupos tratados. Cabe resaltar que en todos los grupos amputados, fue posible distinguir el plano de amputación debido a una despigmentación del regenerado de la aleta en la parte distal de la misma. El proceso de regeneración para el caso del grupo control tomó 11 dpa en alcanzar un estadio avanzado. Cabe resaltar que la formación del estadio de blastema pudo ser distinguible desde el 3 dpa para todos los grupos incluidos en el experimento.

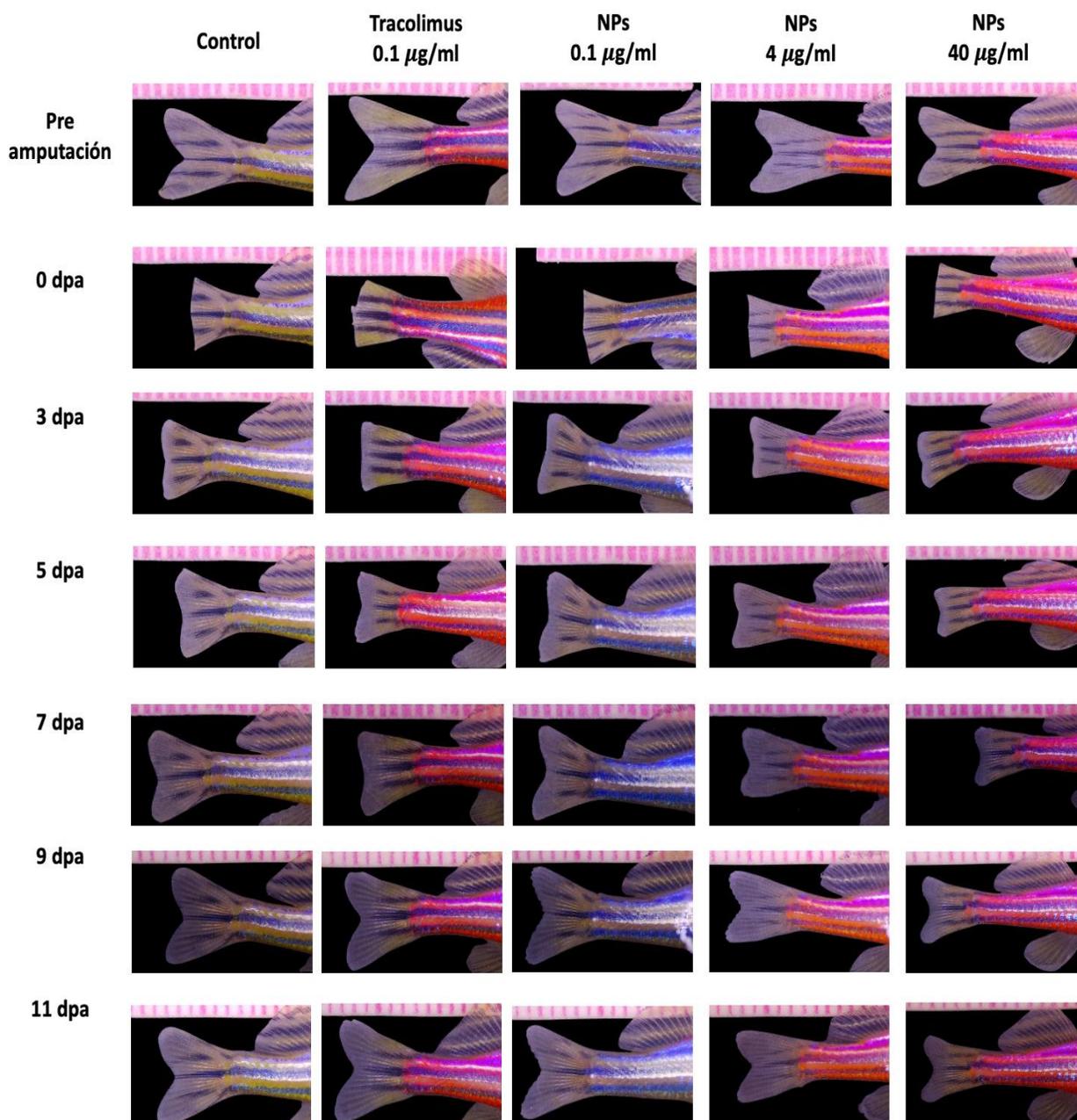


Figura 41. Fotografías del proceso de regeneración de la aleta caudal de peces cebrá adultos tratados con diferentes estímulos durante un lapso de 11 días post amputación (dpa). Se incluyen las imágenes representativas de los grupos control, tracolimus 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y los grupos referentes a la exposición con $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs a diferentes concentraciones (0.1, 4 y 40 $\mu\text{g/ml}$).

Para el control positivo, se incluyó un grupo tratado con tacrolimus a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cabe resaltar que no se observaron deformaciones ni asimetría en la estructura de la aleta regenerada tras el tratamiento con dicho fármaco. De igual forma, a simple vista, no es posible distinguir un crecimiento exacerbado de la aleta caudal amputada tras los 11 días de monitoreo.

En relación con los grupos tratados con $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs, se utilizaron tres concentraciones distintas: 0.1, 4 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En lo que respecta a los defectos visibles en la aleta regenerada, las aletas amputadas tratadas con 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no mostraron ningún signo de afectación. Esto se evidenció en el patrón de regeneración al día 11 post-amputación (dpa), el cual fue similar al patrón observado antes de la amputación. Por otra parte, el grupo expuesto a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs exhibió una reducción en el tamaño de la aleta caudal regenerada, no obstante, no se observó afectación en la forma ni estructura de ésta, ya que ésta fue similar al estadio previo de la amputación. Finalmente, para el grupo tratado con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs, se observaron los efectos más severos en la regeneración de la aleta caudal. La aleta caudal al día 11 dpa mostró un patrón similar al previo a la amputación; sin embargo, se evidenció una reducción en el tamaño de la aleta en comparación a los controles, lo cual se observó en el ancho del apéndice. En comparación con el grupo control, esta afectación comenzó a ser más visible a partir del día 5 dpa. Esta reducción en la regeneración de la aleta implicó un menor número de segmentos presentes en las lepidotricias, así como del tejido interrayas.

3.8.1 Longitud de los peces

Con el propósito de cuantificar la regeneración de la aleta caudal, se monitorearon los parámetros de longitud (**Figura 42**) y área (**Figura 43**) de las aletas regeneradas. En la **Figura 42**, se presenta la comparación de las longitudes de las aletas caudales regeneradas en los diferentes grupos, incluyendo la longitud de los peces antes de la amputación. Estos resultados evidencian el proceso de regeneración de la aleta caudal en términos del aumento en la longitud del pez. Respecto al grupo tratado con tacrolimus, se observó una ligera tendencia en incremento en el tamaño de los peces en comparación con el grupo control. Es importante destacar que, aunque no se siguió el mismo protocolo que el estudio de Kujawski *et al.* (2014) y la exposición fue de menor duración, se observó un incremento en el tamaño de la aleta caudal regenerada en comparación con el grupo control. Sin embargo, este aumento no fue lo suficientemente exacerbado como para causar asimetría en la aleta regenerada. Por otro lado, los grupos tratados con nanopartículas metálicas mostraron un decremento en la longitud del animal dependiendo del aumento en la concentración de los nanomateriales.

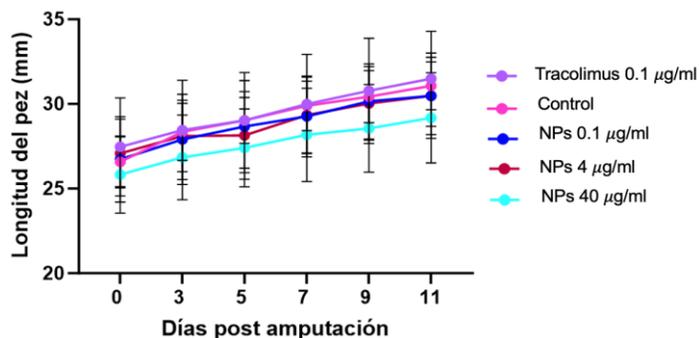


Figura 42. Longitud de los peces amputados de su aleta caudal y tratados con diferentes estímulos durante un periodo de 11 días post amputación. Se compara la longitud de los peces considerando los diferentes estadios de la regeneración. Los animales se midieron desde el inicio de su mandíbula hasta uno de los extremos distales de la aleta caudal en proceso de regeneración. Se muestra la desviación estándar. N=5.

Si bien el monitoreo de la longitud de las aletas caudales regeneradas arroja información valiosa, este parámetro no considera afectaciones en la distancia vertical entre la parte superior y la parte inferior de la aleta caudal durante el proceso de regeneración de la aleta caudal.

3.8.2 Área de las aletas caudales regeneradas

En la **Figura 43** se presenta una comparativa del área de las aletas caudales durante los 11 días que abarcó el experimento. Similar a los resultados de la longitud de los peces en proceso de regeneración, el área de las aletas regeneradas exhibieron una ligera tendencia en aumento por parte del grupo tratado con tracolimus en comparación con el grupo control, especialmente durante el período de 3 al 9 dpa. Sin embargo, para el 11 dpa, el grupo tratado con tracolimus alcanzó valores similares al grupo control. Por otra parte, la exposición de las aletas caudales a las nanopartículas metálicas mostró un efecto toxicológico que aumentó conforme se incrementó la concentración de los nanomateriales.

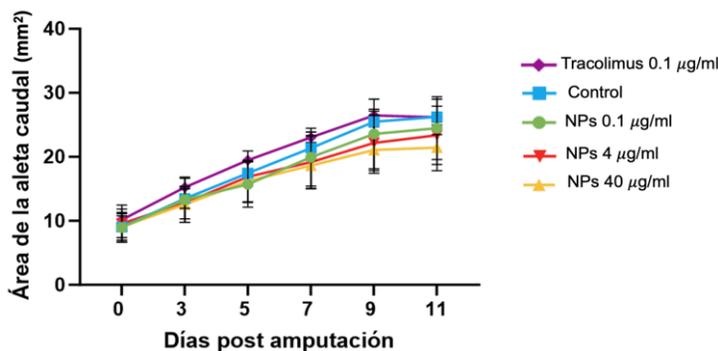


Figura 43 Áreas de las aletas caudales regeneradas tras la exposición con diferentes tratamientos. Se midió el área de las aletas regeneradas en un periodo de 11 días post amputación. Se muestra la desviación estándar. N=5.

3.8.3 Peso de los peces cebra

Finalmente, considerando que el objetivo de este proyecto de investigación era también establecer un protocolo que permitiera evaluar el impacto de las nanopartículas en la regeneración de la aleta caudal en el pez cebra adulto, era crucial comprobar si la manipulación de los animales resultante de la exposición a nanomateriales, junto con el proceso de toma de fotografías y mediciones, inducía estrés severo en los animales. Dicho estrés podría conducir potencialmente a la pérdida de peso de los animales, afectando posteriormente la regeneración de la aleta caudal y potencialmente interfiriendo con los resultados obtenidos.

Basado en esto, se procedió a monitorear el peso de los animales (**Figura 44**). No se observaron diferencias en ninguno de los grupos de tratamiento. Estos resultados sugieren que el estrés causado por el protocolo no generó un estrés severo en el animal, lo cual indica que el protocolo de exposición diseñado es adecuado para los experimentos en donde la cantidad de muestra es limitada, como en el caso de la experimentación con nanopartículas.

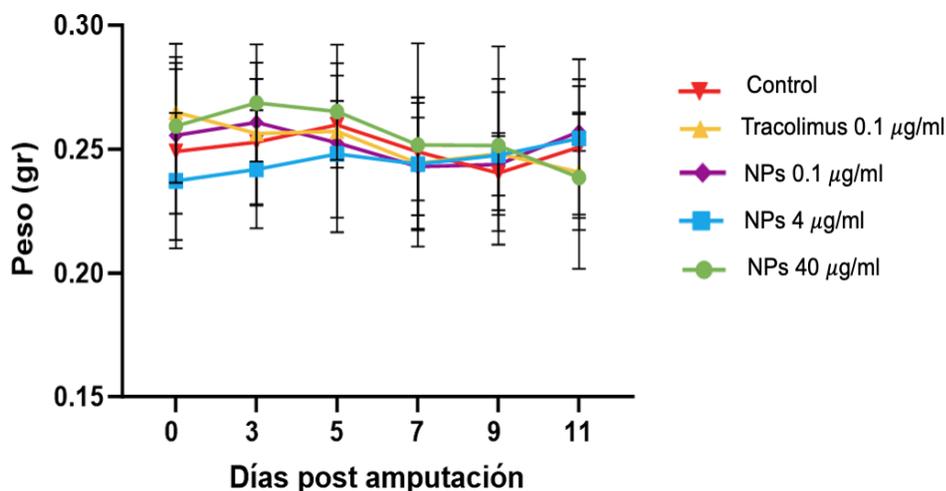


Figura 44. Peso de peces cebra amputados de su aleta caudal y tratados durante un periodo de 11 dpa con diferentes tratamientos. Se muestra la desviación estándar. N=5.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Optimización de la calidad de agua del acuario de pez cebra

El pez cebra es una especie de pez tropical o subtropical el cual se ha adaptado a una variedad de diferentes hábitats. En los últimos años, este organismo modelo ha sido ampliamente usado en la investigación biomédica. El cuidado en las condiciones de la calidad del agua en la que se encuentran los peces es un elemento clave para asegurar la propagación y mantenimiento de diversas colonias genéticamente diversas y sanas (Nasiadka y Clark, 2012).

La optimización de las condiciones de crianza del *Danio rerio* se realizó considerando las condiciones óptimas de calidad de agua reportadas por el Centro Internacional de Recursos de Pez Cebra o también conocido como ZIRC por sus siglas en inglés. En la **Tabla 2** se muestra el rango de condiciones recomendadas para la crianza de este organismo. De acuerdo al ZIRC, existe un rango de condiciones tales como: temperatura, concentración de solutos totales disueltos en el agua, concentraciones de NAT, nitritos y nitratos y pH, en las cuales el pez cebra puede ser criado. De manera complementaria a esto, el ZIRC reporta las condiciones en las que ellos mantienen a sus animales, las cuales corresponden a las condiciones óptimas de crianza. Es posible notar que los parámetros de calidad de agua, tales como el pH, la temperatura, la dureza general (GH) y dureza carbonatada (KH) del agua, así como los niveles de nitritos, nitratos y amoníaco, desempeña un papel fundamental y crucial en el establecimiento de un acuario de investigación para este organismo (Varga, 2011).

Tabla 2. Condiciones óptimas de calidad de agua para la crianza de *Danio rerio* en el ZIRC. Modificado de Varga, 2011.

Parámetros de agua	ZIRC	Rango tolerado
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	500	Hasta 2000
Dureza general en dH ($\text{mg}/\text{L CaCO}_3$)	6-7 (120-130)	1-19 (25-340)
pH	7.2-7.6	6.0-8.0
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	28.5	16-32
Nitrógeno amoniacal total ($\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$) mg/L	0	Hasta 0.05
Nitrito (NO_2^-) mg/L	0	Hasta 0.05
Nitrato (NO_3^-) mg/L	0-5	200

Con base a esto, en el acuario de la Dra. Patricia Juárez Camacho se realizaron modificaciones en el diseño del acuario y con respecto al monitoreo de condiciones para con ello poder cumplir con dichos parámetros. El objetivo de realizar dichas modificaciones sería el de mantener las concentraciones de NAT, nitritos y nitratos lo más cercanas posible a los valores considerados óptimos por el Centro de Recursos Internacional de Pez Cebra (ZIRC). Por lo tanto, fue necesario el diseñar un acuario que permitiera la integración de un biofiltro de perlas de burbuja de AST. Dicho biofiltro permitió disminuir la concentración de amoníaco y del ion amonio, aunado a ofrecer un mantenimiento sencillo y una filtración eficaz. Este tipo de filtro de perlas proporciona una filtración biológica, descomponiendo los desechos nitrogenados en sustancias no tóxicas.

Las perlas del biofiltro permitieron la colonización de ciertas bacterias importantes para el cumplimiento del ciclo del nitrógeno (**Figura 45**), tales como las bacterias nitrificantes del género nitrosomas y nitrobacter. Las bacterias del género nitrosomas son las encargadas de convertir el amoníaco en nitrito, lo que es posteriormente convertido en nitrato por acción de las bacterias nitrobacter. Durante ambas conversiones químicas realizadas por las bacterias se liberan H^+ , lo cual promueve una disminución del pH (Limbo, 2009).

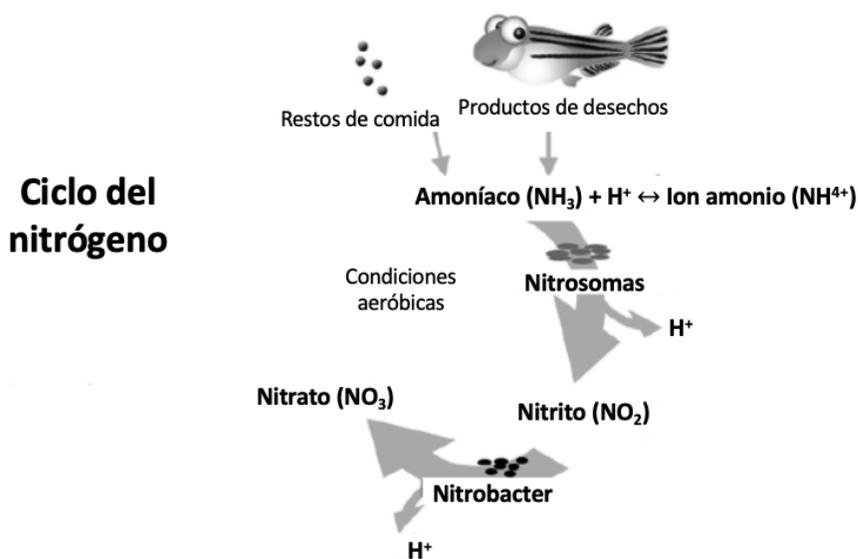


Figura 45. Ciclo del nitrógeno. Modificado de Limbo, 2009.

Mediante el monitoreo por 12 semanas de la calidad de agua (**Figura 19**) fue posible comprobar que el ciclo de nitrógeno se estaba llevando a cabo en el acuario tras la integración del biofiltro puesto que la concentración de NAT se mantuvo constante (alcanzando máximos de 0.25 ppm) y la concentración de nitratos aumentó. Los picos inesperados observados en el aumento del NAT (**Figura 19e**) en el agua de

suministro municipal se atribuyeron a la variabilidad intrínseca en la calidad del agua proporcionada por el proveedor municipal. Así mismo, una vez maduro el biofiltro la concentración de nitratos (**Figura 19f**) se mantuvo constante entre los 5-10 ppm. Estos resultados comprobaron la correcta integración del biofiltro en el sistema, así como de su correcto funcionamiento en el proceso de desnitrificación. Aunado a esto, las concentraciones obtenidas de NAT, nitritos y nitratos obtenidas en el acuario de pez cebra se encuentran en el rango tolerado reportado por el ZIRC (**Tabla 2**).

Basado en los resultados vistos en la **Figura 19**, se observó que la maduración del biofiltro tomó un aproximado de 3 semanas. La rápida colonización de las bacterias *Nitrobacter* y *Nitrosomas* se atribuyó a la concentración de nitrógeno amoniacal total presente en el acuario, debido a los productos de desecho de los peces y los restos de alimento en proceso de descomposición, así como a la temperatura de 28°C la cual propició la rápida proliferación de los microorganismos.

Aunado a su participación en el ciclo del nitrógeno, el filtro integrado al acuario, contaba con la capacidad de capturar el 100% de las partículas de más de 50 μm y el 48% de las partículas en el rango de 5 a 10 μm . Cabe mencionar que los retrolavados del biofiltro se recomiendan periódicamente para eliminar los desechos sólidos acumulados. No obstante, dichos retrolavados no perjudicaron la biopelícula (Limbo 2009; Murray *et al.*, 2020).

Por otra parte, los valores obtenidos de pH (**Figura 19a**) del acuario sobrepasaron el valor máximo del rango tolerado en la crianza del pez cebra, el cual es de 8, de acuerdo a lo reportado por Varga, 2011. Si bien esto se puede considerar una potencial fuente de estrés para los animales, en ciertos hábitats naturales de este animal se han reportado valores cercanos a pH 9. Esto de acuerdo a lo reportado por Alestrom *et al.* (2020), el cual registró los valores de pH para 35 hábitats naturales de este animal ubicados en altitudes de entre los 14 a los 1576 m sobre el nivel del mar.

Por otra parte y con relación a la dureza del agua del acuario. La dureza general o GH se refiere a la concentración de sales minerales disueltas en el agua, principalmente calcio y magnesio, por otra parte, la dureza carbonatada se refiere a la concentración de bicarbonatos (HCO_3^-) y carbonatos (CO_3^{2-}) disueltos en el agua. Estos iones son los principales responsables de proporcionar la capacidad de amortiguación del agua, ayudando a mantener el pH estable. Por lo tanto, el hecho de que no se observara un decremento en el pH debido al proceso de nitrificación se le atribuyó a la alta dureza del agua, así como a la alta concentración de bicarbonatos y carbonatos, los cuales actúan como amortiguadores de pH (Wurst, 2002). En la literatura se recomiendan niveles estables de dureza general entre 75 a 200 ppm, lo que representa

un rango similar al rango que se presenta en los ambientes naturales en donde habitan los peces cebra. Dicho valor de dureza corresponde a un valor “agua de dureza moderada”. En contraste a esto, el valor de dureza del agua del acuario de la Dra. Patricia Juárez Camacho se encuentra en el rango de 292.4-412.8 ppm, lo cual corresponde a “agua muy dura” (Hammer, 2020; Lawrence & Mason, 2012). Este factor podría suponer una posible fuente de estrés considerable para los animales. No obstante, existen pocos estudios que investiguen los efectos de diferentes niveles de dureza en el desarrollo y éxito reproductivo del pez cebrá.

Para remover la alta dureza del agua, así como cualquier otro contaminante, Hammer *et al.*, 2020 recomienda utilizar un proceso de filtración de cuatro pasos para mantener en valores adecuados de dureza en los distintos acuarios de pez cebrá, independientemente de la dureza de su agua municipal. Este sistema de filtración recomendado consiste en: 1) un pre filtro de cartucho mecánico, seguido de 2) un pre filtro de carbón activado granular, seguido de 3) un filtro de ósmosis inversa y finalmente un filtro de desionización (**Figura 46**). En este sistema, el agua municipal pasa a un prefiltro mecánico, posteriormente a dos filtros de carbón activado granular y posteriormente entra a un filtro de ósmosis inversa, el cual se encarga de remover sales y minerales del agua. Posteriormente, el agua continúa su proceso de filtración al pasar por el filtro de ionización. Después de esto, esta agua entra a un proceso de desinfección UV, el cual inactiva microorganismos potencialmente patógenos para los peces. Finalmente, al agua se le agrega la concentración adecuada de sales.

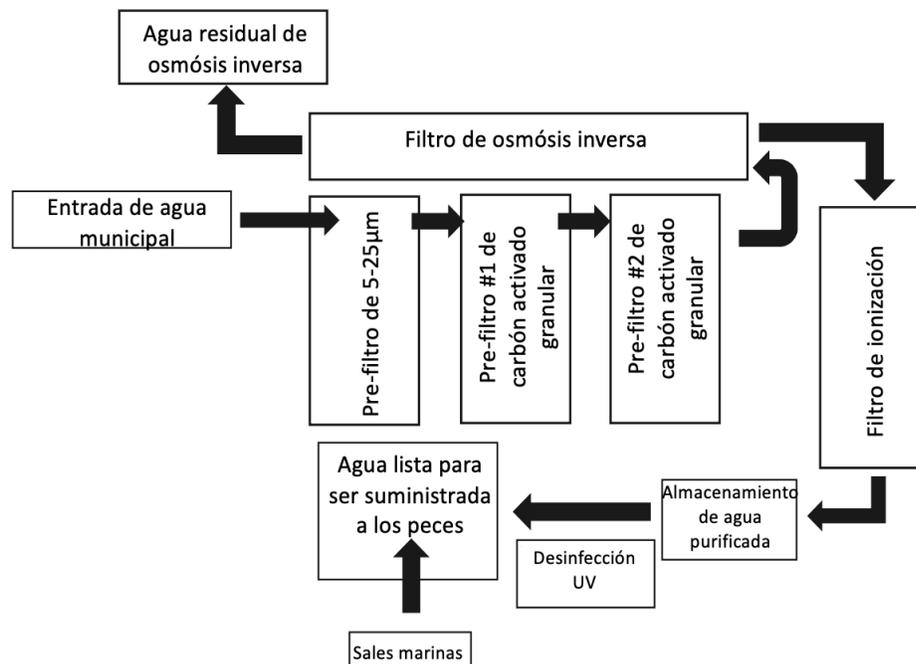


Figura 46. Proceso de filtración de agua municipal utilizado en una acuario de investigación de pez cebrá. Modificado de Lawrence, 2007.

4.2 Estado de salud de peces adultos

Puesto que los peces cebras con los que se contaba en el acuario de investigación no provenían de proveedores especializados o de centros de investigación, se desconocía el estado de salud de los mismos. Por consiguiente resultó relevante realizar estudios de histopatología de los organismos con el fin de determinar la presencia de parásitos u otros microorganismos patógenos que pudieran afectar la mortalidad o el éxito reproductivo de los animales. Los resultados de histopatología revelaron la presencia de trematodos, nematodos y microsporidios. Aunado a esto, el conocimiento del estado de salud de los peces que posteriormente serían utilizados como peces reproductores era de suma importancia, puesto que esto influiría en la calidad y viabilidad de los embriones obtenidos, dado que los peces enfermos pueden experimentar problemas en sus sistemas reproductivos, lo que puede resultar en la producción de huevos de menor calidad o en una disminución en la fertilidad.

Como se pudo apreciar en las figuras que muestran las histologías de los peces, se identificó la presencia de microsporidios (**Figura 21**). Estos son un grupo de parásitos intracelulares que pertenecen al filo Microsporidia. Los parásitos microsporidios se encuentran entre los patógenos más comunes de los peces, con más de 120 especies y alrededor de 15 géneros descritos en numerosas especies de peces. Particularmente, dos especies se han reconocido como causantes de importantes enfermedades en el pez cebra criado en laboratorio: *Pseudoloma neurophilia* y *Pleistophora hyphessobryconis* (Kent, *et al.*, 2020). Se teorizó que la especie de parásitos observadas las muestras analizadas era *Pseudoloma neurophilia* dado que el sitio principal de infección de esta especie suele ser el tejido neural de los peces adultos, generalmente centrado alrededor de la médula espinal y el rombencéfalo, y a menudo se puede observar que el parásito recorre las fibras nerviosas mielinizadas. En el caso de los tejidos de los animales analizados, esta especie se encontró en el cordón espinal y en el cerebro (Kent *et al.*, 2020; Spagnoli *et al.*, 2015).

La **Figura 47** presenta una imagen representativa de un pez cebra afectado por una infección severa causada por *Pseudoloma neurophilia*. Tras la infección, los peces enfermos muestran signos de debilitamiento y, en algunos casos, pueden presentar deformidades en la columna vertebral, tales como lordosis, cifosis y escoliosis (Sanders, *et al.* 2014). Cabe resaltar que estos signos de infección fueron observados en algunos ejemplares adultos de peces cebra del laboratorio de investigación de pez cebra de CICESE, lo cual es congruente con la hipótesis de que los animales estaban infectados con este parásito.

Por otra parte, los nematodos son gusanos cilíndricos y no segmentados que pertenecen al filo Nematoda. Dada la localización de los organismos vistos en las laminillas (**Figura 22**), los cuales se encontraron en el

epitelio columnar del intestino, la especie de nematodo propuesta fue *Pseudocapillaria tomentosa*. Aunado a esto, Gaulke *et al.* (2019), demostraron que la infección con este organismo altera la composición del microbioma intestinal del pez cebra.



Figura 47. Imagen representativa de un pez cebra enfermo con una infección severa de *Pseudoloma neurophilia*, un tipo de microsporidio. Modificado de Kent *et al.* 2020.

Otro de los parásitos encontrados en los animales tomados para el estudio histopatológico, fueron los trematodos (**Figura 20**), los cuales son gusanos parásitos pertenecientes al filo Platyhelminthes. Los trematodos son un tipo de gusanos planos parasitario pertenecientes al filo Phatyhelminthes. Estos gusanos son generalmente planos y poseen ventosas que les permiten adherirse a sus huéspedes (Hotez *et al.*, 2008). Cabe mencionar que ambos grupos, los trematodos y los nematodos, incluyen especies que pueden ser patógenas y causar problemas de salud en los organismos hospederos (Hotez *et al.*, 2008). En el caso particular de este trabajo de investigación, no fue posible distinguir una especie en particular de tremátodos.

Con respecto al nematodo *Pseudocapillaria tomentosa* y el microsporidio *Pseudoloma neurophilla* son especies, son comunes en el pez cebra, pudiendo llegar a causar alteraciones importantes, incluso pudiendo provocar altas mortalidades. Por otra parte, los trematodos son parásitos comunes en peces ornamentales de acuario en general. No obstante, la infección con estos últimos organismos puede provocar diversas alteraciones como obstrucción intestinal y en casos severos, la muerte.

La determinación del tipo de parásitos presentes en los animales del acuario de pez cebra de la Dra. Patricia Juárez resultó fundamental para con ello determinar el impacto que tendría el uso de estos animales en las reproducciones que se utilizarían para la evaluación toxicológica de las nanopartículas metálicas en estadios tempranos del desarrollo de este organismo modelo. Esto basado en lo reportado por Ramsay *et al.* (2009), quienes evaluaron los efectos del estrés causado por infección de *Pseudoloma neurophilia* en la supervivencia, crecimiento y reproducción de peces cebra. Sus resultados mostraron que la infección con este parásito puede reducir el peso y la fecundidad de los peces, y que el estrés adicional puede agravar la infección, llegando a causar la muerte. En el caso de los peces cebra de este estudio, aunque se confirmó la presencia de estos parásitos, se lograron reproducciones exitosas cuyos controles arrojaron datos significativos en la evaluación toxicológica del nanomaterial de interés.

Es importante destacar que, a pesar de la presencia de parásitos endógenos, los animales reproductores lograron reproducirse con éxito, lo que permitió obtener crías que luego se utilizaron en la evaluación toxicológica de los nanomateriales. Además, una ventaja significativa del uso de estos animales en experimentos biomédicos es que proporcionan una aproximación más fiel al efecto que los nanomateriales podrían tener en un entorno biológico real (Kent *et al.*, 2020).

4.3 Reproducciones de peces adultos

Al igual que la crianza, el entendimiento de cómo se originan las reproducciones en el ambiente natural del pez resulta beneficioso para poder simular dichas condiciones en el laboratorio y, por ende, obtener oviposiciones exitosas. En la naturaleza, los peces cebra salvajes prefieren cuerpos de agua estancados, tales como arrozales, estanques, arroyos y ríos, los cuales tienen como factor común la presencia de un flujo lento. Asimismo, el desove ocurre en aguas poco profundas, en donde los huevos caen al fondo del sustrato. Esto se atribuye a factores tales como calidad de agua, el tipo y disponibilidad de alimento y los antecedentes genéticos (Castranova, 2020; Kolb *et al.*, 2018; Stevens *et al.*, 2021).

De acuerdo con Kolb *et al.* (2018), existe una serie de factores tanto abióticos y bióticos que propician una reproducción exitosa en ejemplares de pez cebra (**Tabla 3**). Por consiguiente, en el laboratorio el objetivo fue imperante en simular de manera óptima dichas condiciones para con ello asegurar reproducciones viables que sean útiles para realizar diversos tipos de experimentos (Kolb *et al.*, 2018; Parichy & Postlethwait, 2020).

Con el fin de estimular la reproducción, los animales fueron colocados en tanques de reproducción con agua estática junto con plantas de plástico que proporcionaran un enriquecimiento natural. Aunado a esto, el tanque tenía un inserto removible con orificios que permitía que los huevos cayeran al fondo del tanque. Sin dicha separación, los embriones sufren de depredación por parte de los individuos progenitores con el fin de cumplir con el reciclaje de proteína (Kolb *et al.*, 2018). Los factores tanto abióticos como bióticos descritos previamente (**Tabla 3**) lograron ser simulados exitosamente mediante las peceras de reproducción utilizadas para el presente trabajo, lo cual incentivó la reproducción de los organismos.

Las peceras de reproducción de igual forma influyen en propiciar una reproducción exitosa. Existen diferentes tamaños de tanques dependiendo del proveedor. No obstante, es importante utilizar tanques que tengan dimensiones adecuadas, puesto que utilizando tanques de reproducción con volúmenes de

agua menores a 200 mL de agua se obtiene un decremento en el rendimiento reproductivo (Castranova & Wang, 2020). En este sentido, Goolish *et al.*, 1997 probaron distintos volúmenes de peceras de reproducción, sus observaciones indicaron que no había diferencia significativa para aquellas peceras de reproducción que superaban los 300 mL. Estos resultados fueron congruentes con lo visto en la **Figura 24**, en donde no se observó afectación en el rendimiento de las reproducciones a pesar de utilizar distintos volúmenes.

Tabla 3. Factores abióticos y bióticos que impactan el rendimiento y éxito reproductivo del pez cebra. Modificado de Kolb *et al.*, 2018.

		Alto éxito reproductivo
Factores abióticos	Ciclos de luz	El desove es iniciado cuando las luces alcanzan su máxima intensidad (simulando el amanecer).
	Tiempo	El desove se inicia al comienzo del día.
	Almacenamiento de los animales vs solos	Los peces criados en grupos presentan menores niveles de estrés.
	Profundidad del agua	Las inclinaciones en los tanques de reproducción son preferidas pues imitan la inclinación del sustrato de las orillas de los ríos en donde naturalmente suceden los desoves.
	Enriquecimiento	El incluir plantas en la pecera ayuda a disminuir el nivel de estrés de los animales pues éstas funcionan como escondites.
	Calidad de agua	Temperatura: 28.5°C; pH= 7-8; nitritos= 0 ppm; nitratos= 0 a 5 ppm; nitrógeno amoniacal total= 0 A 10 ppm.
	Competencia entre los animales	Los machos compiten por las hembras con vientres más hinchados (signo de mayor cantidad de huevos).
	Frecuencia de reproducción	Se recomienda reproducir a los animales una vez a la semana para aumentar la tasa de éxito de la supervivencia de los desoves.
Factores bióticos	Relación de machos a hembras	Una hembra y dos machos por pecera de reproducción.
	Nutrición	Dietas con alto contenido de proteínas, alto contenido de grasas/lípidos y alta digestibilidad.
	Frecuencia de alimentación	Hasta saciedad o 5% del peso corporal, hasta tres veces al día.

4.4 Crianza de alevines de pez cebra

La crianza de peces cebra tiene como uno de los mayores retos el de proporcionar alimentos con alto valor nutricional a partir de los 5 dpf. Aunado a esto, fue imprescindible desarrollar una metodología efectiva para la cría de alevines, ya que la evaluación del impacto de las nanopartículas en la regeneración de la aleta caudal requería el uso de peces adultos con al menos tres meses de edad, momento en el cual estos organismos alcanzan la madurez (Pang *et al.*, 2020). Con respecto a la frecuencia de alimentación, ésta se ajustó basado en la frecuencia que Lawrence *et al.* (2012) recomienda como óptima para los estadios larvarios y juveniles (**Figura 48**). Para las larvas, que abarcan desde los 5 hasta los 12 dpf, se sugiere una

alimentación continua. En el caso de los peces juveniles de hasta 60 dpf, se recomienda alimentarlos de 3 a 5 veces al día, mientras que para aquellos que superan esta edad, la literatura aconseja una frecuencia de alimentación de 1 a 3 veces al día.

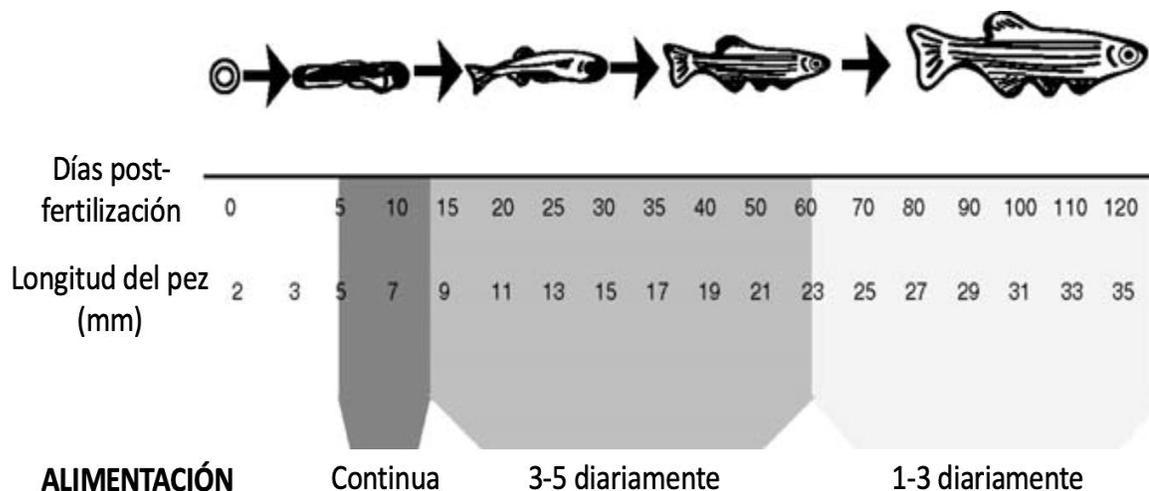


Figura 48. La frecuencia de alimentación recomendada para los peces *Danio rerio* a través de los distintos estadios del desarrollo. Modificado de Lawrence, 2011.

Uno de los aspectos técnicos más críticos del cultivo de distintas colonias de *Danio rerio* es la crianza exitosa de embriones hasta la adultez del animal. Esto debido en mayor medida a la alimentación de las larvas, puesto que lo que se desea es poder alimentar a las larvas con alimentos con alto valor nutricional, sin que esto comprometa la calidad del agua. Durante el estadio larvario temprano, el pez cebrá necesita alimentarse constantemente para satisfacer las demandas energéticas requeridas para el crecimiento somático (Lawrence *et al.*, 2011). Posteriormente, una vez que el pez alcance estadios más avanzados de crecimiento, las alimentaciones pueden ser más espaciadas entre sí.

En el caso particular de los animales del acuario de la Dra. Camacho, después de 30 días post fertilización, se obtuvo aproximadamente el $10\% \pm 3\%$ de supervivencia en peces juveniles criados directamente en el acuario y alimentados con una mezcla de *Artemia salina* y alimento liofilizado comercial. A pesar de que este porcentaje permite, la obtención de un número adecuado de individuos, el protocolo de crianza de alevines puede seguir siendo optimizado. Como alternativa a esto y con el fin de incrementar la supervivencia de alevines, Lawrence *et al.*, 2016, propuso el método de policultivo de rotíferos. Mediante este método, se cultivaron las larvas de pez cebrá de cinco días post fertilización junto con rotíferos vivos de agua salada a una salinidad de 5 g/L y a una densidad aproximada de 932 rotíferos/mL (*Brachionus plicatilis*) en el mismo tanque, lo cual tuvo como propósito el proporcionar a las larvas una fuente continua de alimento.

4.5 Evaluación de la nanotoxicidad de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en estadios embrionario y larval de *Danio rerio*

Por lo general, los estudios toxicológicos se evalúan en dos niveles: *in vitro* e *in vivo*. En el caso de investigación *in vivo*, esta suele realizarse en ratones y ratas. No obstante, es complicado evaluar el potencial efecto de los nanomateriales en etapas de desarrollo embrionario usando los organismos modelo tradicionales. Tomando en cuenta estas consideraciones, el modelo de nanotoxicidad en embriones y larvas de pez cebra resulta un modelo conveniente para realizar muestreos amplios de nanomateriales de interés y con ello poder estimar la toxicidad durante esta fase de crecimiento tan crucial (Hacke & Ward, 2018).

El pez cebra es un organismo modelo ideal para evaluaciones rápidas de numerosos materiales debido a su alta fecundidad, corto período de embriogénesis y fácil manipulación. Además, comparte un alto grado de homología con otros vertebrados y estructuras conservadas, permitiendo extrapolar datos de toxicidad a organismos superiores, incluidos los humanos. Los embriones de pez cebra, fertilizados externamente y rodeados por un corión, son ideales para la investigación biomédica y la evaluación de agentes tóxicos, como las nanopartículas (Castranova, *et al.* 2020; Dumitrescu, *et al.* 2019).

No se ha identificado hasta la fecha ningún artículo que evalúe el efecto toxicológico de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en estadios tempranos del desarrollo en el pez cebra. Por ende, el presente trabajo se posiciona como la primera contribución que aborda esta temática, proporcionando un análisis pionero en la literatura científica respecto a dicha evaluación toxicológica.

Cabe mencionar que los protocolos reportados para evaluar el efecto de nanopartículas metálicas en el estadio embrionario y larval de pez cebra presentan diferencias que abarcan desde el rango de concentración hasta el tiempo de exposición a los mismos. En el caso particular de este proyecto de investigación, el protocolo seguido con el fin de evaluar la toxicidad de las nanopartículas de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ fue una adaptación de lo reportado por Asharani *et al.*, 2010 y Bai *et al.*, 2009. En cuanto a parámetros de toxicidad evaluados para embriones y larvas tratadas con nanopartículas, se ha sugerido el monitoreo de los siguientes parámetros: mortalidad, eclosión, ritmo cardíaco, malformaciones, internalización de los nanomateriales, estudio de los efectos en el desarrollo de órganos usando un análisis histológico, efectos a nivel celular utilizando imágenes de apoptosis, evaluación del estrés oxidativo y el desequilibrio redox

en órganos individuales mediante el control de especies reactivas de oxígeno (Bai *et al.*, 2015; Dumitrescu *et al.*, 2019).

La elección del medio de disolución de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio, es decir, el medio E3, se realizó considerando las prácticas previamente reportadas en la literatura científica, donde se han evaluado la toxicidad de nanopartículas metálicas. Esto a su vez aseguró coherencia y comparabilidad con la investigación toxicológica existente en la evaluación de nanomateriales (Bai *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2020; Paatero *et al.*, 2017;).

El mecanismo propuesto por el cual las nanopartículas logran causar efectos morfológicos en el embrión de pez cebra desde las primeras horas post fertilización se atribuye, en parte, a la entrada de estos nanomateriales al espacio perivitelino a través de los poros coriónicos (Hamm *et al.*, 2019). Aunado a lo anterior, la determinación de si la sonicación influiría en la dispersión de las nanopartículas era fundamental para el modelo de nanotoxicidad en embriones y larvas de *Danio rerio*, dado que antes de la eclosión, la entrada de las nanopartículas está limitada por los canales coriónicos del corión. En el presente trabajo, los resultados de caracterización por TEM (**Figura 25**) mostraron un bajo grado de dispersión de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio, lo que influyó en su rápida precipitación. Por lo tanto, con el objetivo de asegurar que los nanomateriales se internalizaran en el embrión antes de la eclosión a las 72 hpf, se incrementó el tiempo de sonicación a 1 hora.

El corión es una estructura encargada de brindar protección al embrión de influencias externas hasta la eclosión, pero que al mismo tiempo es lo suficientemente permeable para permitir un suministro suficiente de gas y un transporte de nutrientes. La carga superficial negativa del corión atrae cationes. Esta estructura está atravesada por poros llamados poros coriónicos, cuyo diámetro ronda los 500 nm. (**Figura 49**) (Auffan *et al.*, 2014; Böhme *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020).

El hecho de que las nanopartículas hayan precipitado en la superficie del corión a su vez explica las causas por las cuales los animales tratados con las distintas concentraciones de los nanomateriales presentaron una ausencia de una vejiga natatoria prominente (**Figura 36**), como en el caso del grupo control. La literatura ha sugerido que dicha ausencia a su vez está relacionada a un limitado intercambio de gases con la superficie durante el periodo de inflación inicial, lo cual típicamente sucede entre las 24 y 72 hpf (Venuto *et al.*, 2023). Tras la exposición con nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio se observó un efecto dependiente de la concentración para el caso de la mortalidad (**Figura 31**) y eclosión (**Figura 34**). Estos resultados son congruentes con lo previamente reportado en la literatura. Tal es el caso

de Asharani *et al.* (2010), quienes evaluaron la toxicidad de embriones y larvas de pez cebra tras una exposición por 72 hpf con tres tipos de nanopartículas metálicas: de plata, oro y platino respectivamente. Sus resultados mostraron que la misma tendencia tanto de mortalidad como de eclosión para el caso de alevines tratados con los nanomateriales. De igual forma, la exposición con nanopartículas de oro y de platino se asoció con un retraso en la eclosión para los grupos de mayor concentración. Aunado a esto, en su análisis de malformaciones se determinó que la exposición con estas nanopartículas metálicas indujo anomalías en el desarrollo tales como: derrame pericárdico, morfología cardíaca anormal, defectos circulatorios y ausencia o malformaciones de los ojos a las 72 hpf. La perturbación en el desarrollo del ojo (**Figura 38**) resulta congruente con lo visto en el presente trabajo, en donde de igual forma se observó un decremento en el tamaño del ojo dependiente de la concentración.

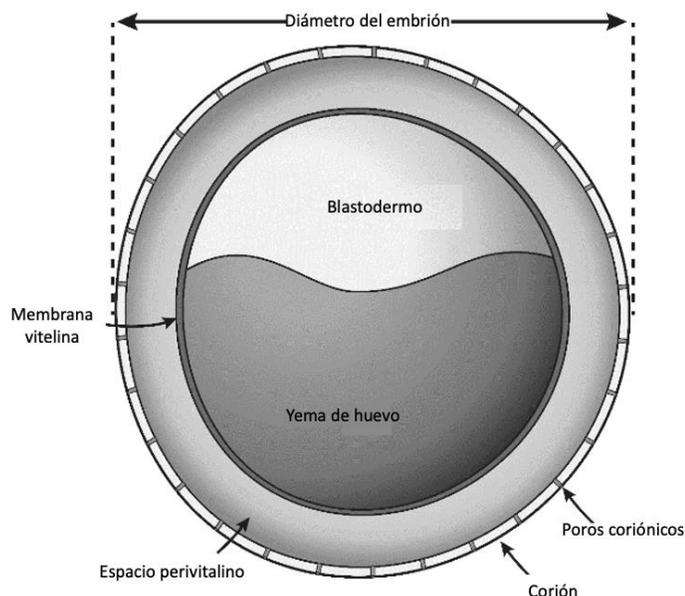


Figura 49. Estructuras diferenciadas de un embrión de pez cebra. Se observa la presencia de corión y de los poros coriónicos. Modificado de Hamm *et al.*, 2019.

Los resultados de malformaciones observados en este estudio fueron evidentes desde la concentración más baja de nanopartículas, es decir, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Setyawati *et al.* (2013), los cuales evaluaron la citotoxicidad de nanopartículas de tres tipos de nanopartículas, incluyendo las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con terbio en estadios embrionarios y larvales de pez cebra. Sus resultados indicaron que estas nanopartículas generaron un efecto citotóxico y teratogénico más severo a comparación de sus contrapartes, las cuales fueron nanopartículas de dióxido de titanio y de poli(ácido láctico-co-glicólico). Estas observaciones respaldan la limitada biocompatibilidad de las nanopartículas derivadas de tierras metálicas.

Con respecto a la teratogenotoxicidad de los nanomateriales (**Figura 36**), las alteraciones del desarrollo observadas en este artículo no presentan la misma severidad que las malformaciones observadas por otros artículos científicos en donde se han evaluado la toxicidad de nanopartículas metálicas, incluyendo aquellas derivadas de tierras raras. Ejemplo de ello fue lo obtenido por Duan *et al.*, 2013. En este trabajo, se evaluó la toxicidad de embriones y larvas de pez cebra tratadas con nanopartículas de titanio por 96 hpf. En la **Figura 50**, se muestra una imagen ilustrativa de las malformaciones obtenidas por su grupo tratado a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se observa la presencia de malformaciones craneal, edema pericárdico, cola doblada y edema del saco vitelino.

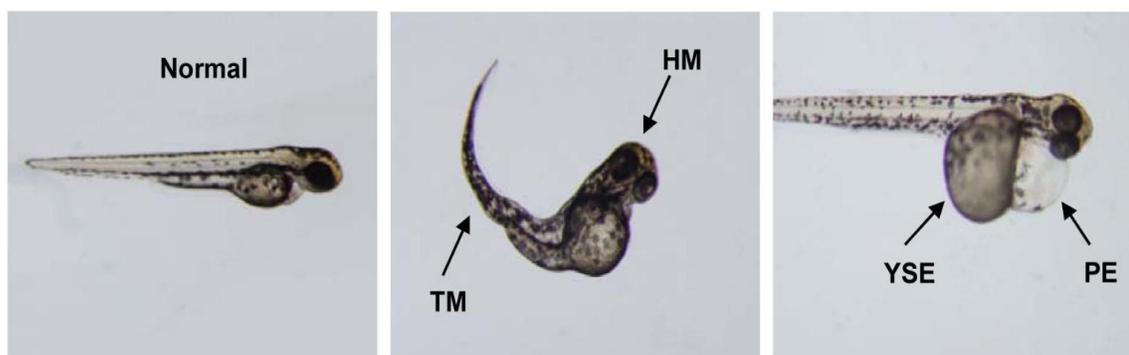


Figura 50. Imágenes representativas de larvas de pez cebra tratadas con nanopartículas de titanio desde el estadio de blástula hasta las 96 hpf. Grupos A) no tratadas, B) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y C) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. HD: malformación craneal, TM: malformación en la cola, YSE: edema del saco vitelino, PE: edema pericárdico. Modificado de Duan *et al.*, 2013.

Con respecto a la afectación observada en todos los grupos experimentales tratados con los nanomateriales, en cuanto a la inflación de la vejiga natatoria de las larvas tratadas con los nanomateriales (**Figura 36**), distintos reportados han demostrado que este fenómeno está relacionado con un acceso restringido al acceso del aire superficial, durante el periodo inicial del inflado de la vejiga natatoria, lo cual sucede entre las 24 y 72 hpf (Venuto *et al.*, 2023).

Los estudios relacionados con la evaluación toxicológica de nanopartículas en larvas de pez cebra han reportado tanto la ausencia de la vejiga natatoria como un decremento en la inflación de este órgano. En el caso específico de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio, al precipitarse incluso a concentraciones bajas, estas quedaban adsorbidas en la superficie del corión, lo que limitaba el intercambio adecuado de gases con el medio (Balasubramanian, *et al.*, 2023).

Otro tipo de malformación observado en las larvas tratadas con las $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ NPs (**Figura 36**) fue la presencia de tejidos opacos. En los embriones de pez cebra, la opacidad es indicativa de tejido necrótico

o apoptótico, mientras que una yema opaca puede ser representativa de un efecto adverso tóxico subyacente, incluyendo hepatotoxicidad o cardiotoxicidad (Bar-Ilan *et al.*, 2009). El efecto cardiotoxico de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio fue posteriormente corroborado con la evaluación del ritmo cardíaco (**Figura 35**), en donde se observó la presencia de arritmia en los distintos grupos tratados.

Junto con la documentación visual a través de fotografías, que ilustraron la magnitud de las malformaciones provocadas en las larvas de pez cebra de 96 hpf tras la exposición a NPs de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$, se informó sobre la gravedad de estas malformaciones utilizando la escala establecida por Bar-Ilan, *et al.* en 2009 (**Figura 39**), la cual se basa en los parámetros previamente establecidos por Heiden, *et al.* en 2007. En resumen, al concluir el experimento, se analizó minuciosamente la morfología de los animales, asignándoles un valor en la escala según la gravedad de las malformaciones observadas. Estos valores oscilaron entre 0 y 4, donde 0 indicó la ausencia de efectos nocivos visibles y 4 representó la muerte, mientras que los números intermedios reflejaron diversos grados y cantidades de anomalías morfológicas.

En su investigación, Bar-Ilan *et al.* (2009) utilizaron esta escala para evaluar el efecto teratogénico en larvas de pez cebra, tratadas desde el estadio de blástula hasta las 120 hpf, con nanopartículas de oro y plata. Este grupo de investigación observó un aumento en la puntuación de la escala en función de la concentración de los nanomateriales. En el presente trabajo, incluso el grupo tratado con una baja concentración (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio registró un valor de 3 en la escala (**Figura 39**), lo que evidencia la teratogenotoxicidad de estas nanopartículas.

En adición a la escala mencionada anteriormente, este proyecto de investigación propuso la implementación de una nueva escala de valores diseñada para analizar la presencia o ausencia de los diferentes efectos morfológicos previamente descritos. Esta escala, a diferencia de la anterior, excluía el factor de gravedad o severidad de las malformaciones. Es importante destacar que, a pesar de tener parámetros distintos, ambos enfoques produjeron resultados que indicaron la misma tendencia; específicamente, el grupo de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ demostró ser el que causaba los efectos morfológicos más severos, lo cual puede atribuirse parcialmente al grado de dispersión de los nanomateriales.

El mecanismo por el cual las nanopartículas metálicas ejerce toxicidad en embriones y larvas de pez cebra aún no está claro. En este sentido, Aerle *et al.* (2013), realizaron un análisis transcriptómico de embriones y larvas tratados con nanopartículas de plata previamente sonicadas durante 1 hora. El tratamiento comenzó durante la fase embrionaria de desarrollo, es decir, desde la blastulación y terminó a las 48 hpf.

Ellos encontraron alteraciones significativas en la expresión génica, en especial aquellas que estaban relacionadas con la fosforilación oxidativa y la síntesis de proteínas. No obstante, otros estudios han sugerido que el mecanismo de toxicidad de nanopartículas metálicas está causado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bai *et al.*, 2009; Franklin *et al.*, 2007).

Por otra parte, en un estudio más completo, Hou *et al.*, (2019) analizaron los efectos toxicológicos a través de microarreglos de cDNA de peces cebra adultos expuestos a nanopartículas de óxido de zinc por 96 hfp. Los resultados indicaron que estos nanomateriales afectaron negativamente el crecimiento y el desarrollo normal del pez cebrá. Esto debido a la inhibición de las ciclinas (Cycs), las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y el mantenimiento de minicromosomas (MCM), perjudicando la activación y actividad de complejos fundamentales tales como CycD/CDK4, CycD/CDK6, CycE/CDK2, CycA/CDK2 y MCM en diferentes fases del ciclo celular (G1, M y G2). Todo esto indicó que la exposición con estas nanopartículas afectó a la división, la diferenciación y la proliferación celular.

Asimismo, Lee, *et al.*, 2022, investigaron el mecanismo de toxicidad de NPs de plata y de óxido de zinc en embriones y larvas de *Danio rerio*. Las nanopartículas de óxido de zinc retrasaron la eclosión de las larvas, a comparación de las nanopartículas de plata, las cuales no mostraron un efecto en este fenómeno. Sin embargo, la exposición con ambos tipos de nanopartículas provocaron una activación de la autofagia, lo cual se evidenció con un aumento en los niveles de ROS, de la apoptosis y de la actividad lisosomal. Cabe resaltar que la autofagia se considera como un indicador temprano de las interacciones causadas por nanopartículas diseñadas, de las cuales las nanopartículas de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ forman parte, por lo cual se podría hipotetizar que el mecanismo de toxicidad ejercido por estas nanopartículas es similar al de otras ENPs.

Aunado a las ventajas inherentes del uso del modelo de toxicidad de nanopartículas en estadios tempranos del desarrollo, los embriones de pez cebrá son particularmente adecuados para la evaluación toxicológica del desarrollo cardíaco de las NPs. El corazón de un pez cebrá se parece al corazón embrionario humano y tiene una aurícula y un ventrículo con válvulas entre los compartimentos auriculoventriculares. Los latidos cardíacos regulares comienzan a partir de las 36 hpf y el microscopio se puede utilizar directamente para observar la forma y el ritmo del corazón, como los latidos del corazón, la morfología de los vasos sanguíneos y la actividad celular en los vasos sanguíneos, lo que ha facilitado enormemente la evaluación de la toxicidad y la investigación toxicológica. El corazón de un pez cebrá presenta similitudes estructurales con el de un embrión humano, puesto que tiene una aurícula y un ventrículo con válvulas entre los compartimientos auriculoventriculares (Duan *et al.*, 2013).

En este sentido, Cheng *et al.* (2020) investigaron el mecanismo de cardiotoxicidad y de toxicidad cerebrovascular de nanopartículas de Nd_2O_3 , es decir, otro tipo de nanopartículas de óxidos de tierras raras en embriones y larvas de pez cebra. Estas nanopartículas generaron un aumento en las tasas de mortalidad y de malformaciones, mostrando una correlación directa con la concentración aplicada. Aunado a esto, los embriones tratados mostraron arritmia severa y una reducción en el ritmo cardíaco, lo cual se le atribuyó a una activación de la vía de señalización apoptótica.

Aunque en este trabajo de investigación no se determinó el mecanismo de toxicidad de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones de europio en estadios tempranos del desarrollo de *Danio rerio*, los informes realizados por otros grupos de investigación, donde se evaluó el efecto toxicológico de nanopartículas metálicas en embriones y larvas de pez cebra, proporcionan indicios invaluable del mecanismo por el cual las nanopartículas de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ejercen su acción, esto debido a las propiedades químicas de los metales.

4.6 Efecto toxicológico de las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio en la regeneración de la aleta caudal de *Danio rerio*

En los últimos años, el pez cebra se ha convertido en un organismo modelo importante para la investigación referente a enfermedades óseas. Hasta la fecha se tiene el conocimiento de que el 82% de los genes relacionados con enfermedades tienen genes ortólogos con el pez cebra, lo cual hace factible que estos organismos se usen para el modelado de diversos padecimientos de este tipo. En este sentido, el pez cebra con su modelo de regeneración de la aleta caudal ofrece un modelo ideal para la evaluación *in vivo* de sustancias que promuevan el remodelado óseo, un proceso que se encuentra presente durante la curación de defectos óseos y fracturas.

Cabe mencionar que a pesar de que las aletas ventrales, dorsales y anales también se regeneran después de sufrir una amputación, la aleta caudal, al ser el apéndice más grande, presentar una estructura alargada y bifurcada (Dietrich *et al.*, 2021; Howe *et al.*, 2013).

La aplicación del modelo de regeneración de la aleta caudal del pez cebra para la investigación del efecto de nanopartículas en el remodelado óseo es un área de investigación poco explorada. Además, los protocolos de exposición a los fármacos de interés son variados debido a las necesidades específicas de

cada estudio. Por lo tanto, fue necesario diseñar un protocolo de exposición que, aunque se basara en la literatura existente, también permitiera minimizar el uso de muestra en una exposición constante.

En resumen, los peces amputados se mantuvieron en una zona de cuarentena separada del resto del sistema, sin flujo constante de agua ni biofiltro para la desnitrificación y el mantenimiento de la calidad del agua. Basado en esto, el monitoreo de la calidad del agua fue esencial para asegurar que el diseño de la zona de cuarentena fuera adecuado. Por lo tanto, los grupos tratados se mantuvieron en peceras separadas con cambios de agua dos veces al día, y se monitorearon las concentraciones de NAT, nitritos y nitratos para mantenerlas lo más bajas posible y reducir el estrés en los animales, lo que a su vez podría afectar su capacidad de regeneración de la aleta caudal. Además de esto, se registró el peso de los animales para detectar posibles efectos de estrés derivados del experimento, pero no se observó una pérdida de peso drástica en los grupos de control, lo que descarta la posibilidad de que el protocolo experimental diseñado para el presente trabajo haya sido una fuente considerable de estrés para los animales (Hammer, 2020).

Los resultados de la exposición de aletas amputadas de peces de ocho meses de edad a diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de gadolinio revelaron un impacto negativo en la remodelación de la aleta caudal. Se observó una disminución en la regeneración de la aleta caudal, la cual fue dependiente de la concentración de nanopartículas. Estos resultados son consistentes con lo previamente publicado en la literatura, en donde el tratamiento de aletas amputadas con nanopartículas metálicas generaba una disminución en la tasa de regeneración. En este contexto, Park & Yeo (2013) llevaron a cabo un estudio en el que expusieron peces cebra de 7-8 meses de edad a una concentración constante de nanopartículas y nanotubos de óxido de titanio (1 µg/mL) durante un período de 10 días. El objetivo era determinar el impacto de la forma de los nanomateriales en el proceso de remodelado óseo. Después de los 10 días de tratamiento, no se registró mortalidad relacionada con la exposición a los nanomateriales en ningún grupo tratado. Al comparar las longitudes de las aletas después de este período, se observó una reducción del 31.4% en el grupo tratado con nanotubos y del 31.7% en el grupo tratado con nanopartículas, en comparación con el grupo no tratado.

Los efectos negativos en la regeneración de la aleta caudal causada por la exposición a nanopartículas diseñadas de tipo metálicas ha sido de igual forma respaldada por otros reportes. Tal es el caso de Pang, *et al.*, 2020, quienes expusieron peces cebra de 3 meses de edad a nanopartículas de plata esféricas con diámetro de 15 nm. El objetivo de la investigación era explorar el impacto que tiene la exposición de estos nanomateriales en la cicatrización de heridas teniendo distintos tiempos de exposición post amputación.

Los resultados indicaron que, en efecto, las nanopartículas de plata afectaban la regeneración de aletas de manera dependiente de la etapa de exposición. Por lo tanto, se observó un decremento en la regeneración cuando la exposición era realizada durante la epitelización y la etapa inicial en la formación del blastema. En el caso de la exposición de aletas amputadas con $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs de igual forma se observó un decremento en el área y longitud de las aletas regeneradas, no obstante, no es posible atribuir este efecto a la exposición en alguna etapa de la regeneración en específico, puesto que en el caso del presente trabajo de investigación la exposición se realizó en diferentes estadios del proceso de regeneración incluyendo al estadio de blastema.

Por otra parte, en el presente trabajo de investigación, la regeneración de la aleta caudal fue monitoreada midiendo la longitud y el área de la aleta regenerada. En comparación con la literatura, esto se suele monitorear con la tasa de la regeneración. Basado en el trabajo de Park, *et al.*, 2013, los cuales amputaron el 50% de la aleta caudal, la tasa de regeneración a los distintos tiempos fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$Tasa\ de\ regeneración\ (\%) = [\Sigma(i - ii)/i] \times 100 / n \quad (1)$$

donde n es el número de peces por grupo, i representa la longitud de la aleta amputada, ii representa la longitud de la aleta que ha sido lesionada en días posteriores a la amputación. Para calcular ii , se toma la longitud de la aleta en proceso de regeneración (a un tiempo en específico) y se resta de la longitud de la aleta que no ha sido lesionada. Este valor indica cuánto ha crecido la aleta después de la amputación en comparación con la aleta no lesionada. No obstante, otros artículos científicos, tal es el caso de Hayati, *et al.*, 2022, monitorean la regeneración de la aleta caudal a través del área regenerada. En el caso del presente trabajo, la regeneración de la aleta caudal fue monitoreada a través del monitoreo de la longitud del pez y área de las aletas caudales en proceso de regeneración.

Por otra parte, la adición del grupo de 0.1 $\mu g/mL$ tracolimus (FK506) al diseño experimental se realizó con el fin de agregar un control positivo que pudiera demostrar que bajo las mismas condiciones a las cuales los demás grupos estaban sometidos era posible la estimulación de la regeneración de la aleta caudal. Esta decisión se realizó teniendo como fundamento al reporte hecho por Kujawski, *et al.* (2014), quienes expusieron a peces cebra amputados de las aletas caudales con el fármaco tracolimus (FK506), un inmunosupresor e inhibidor de la calcineurina. Esto con el objetivo de determinar el rol que tiene la respuesta inmune desencadenada después de la amputación en el proceso de la regeneración de la aleta caudal. En su diseño experimental, peces cebra adultos fueron expuestos durante 29 dpa, de manera

continua, a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tracolimus. Los resultados indicaron que el tratamiento con este fármaco promovió un crecimiento excesivo de las aletas (**Figura 51**).

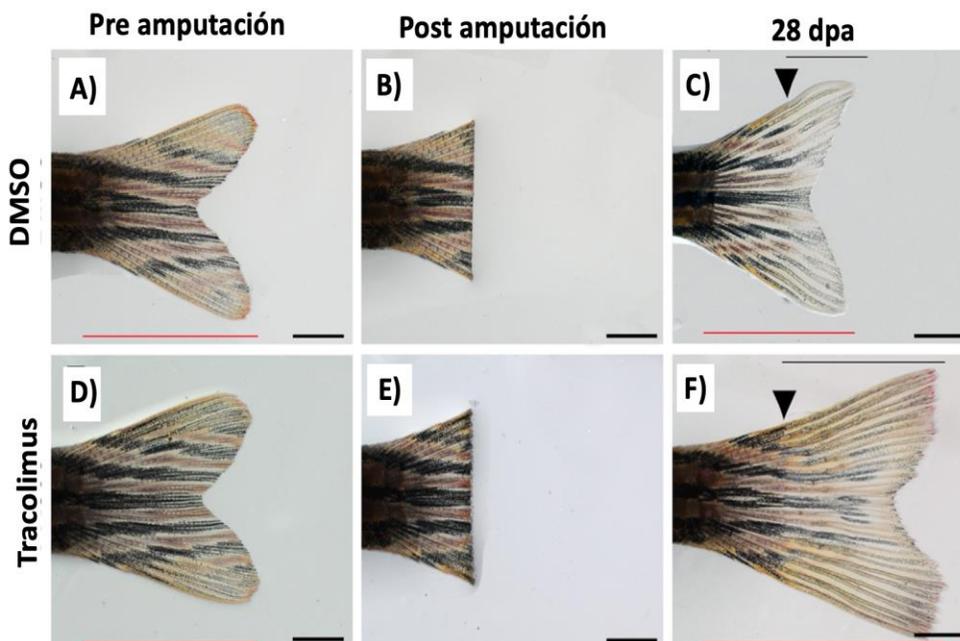


Figura 51. Imágenes representativas del proceso de regeneración de aletas caudales de peces cebra tratadas de manera continua durante 28 dpa con DMSO y tracolimus. Modificado de Kujawski *et al.* (2014).

En el caso del diseño experimental que se propuso para este trabajo de investigación, la exposición con tracolimus no se realizó de manera continua, sino que los animales fueron expuestos por 5 minutos durante los días 0,2,4,6,8, y 10 dpa. Los resultados del grupo tratado por tracolimus mostraron un ligero incremento en la regeneración caudal, sin embargo, ésta no fue exacerbada como en el caso de lo visto por Kujawski *et al.* (2014), lo cual se le puede atribuir a las diferencias en el protocolo de exposición.

Con respecto a la distancia ideal para realizar el corte de amputación de las aletas, la literatura sugiere que se ampute aproximadamente el 50% de las aletas adultas. Esta amputación proximo-distal se considera óptima ya que permite un período de aproximadamente 12 días para que la aleta regenerada alcance un estadio avanzado en el remodelado óseo, logrando un tamaño similar al de un estadio pre-amputación. Uemoto *et al.* (2020) llevaron a cabo investigaciones sobre el periodo y la tasa de crecimiento de aletas amputadas a diferentes distancias proximo-distales. Descubrieron que una amputación más proximal requiere un período más prolongado para reconstruir la morfología y el tamaño original en comparación con una amputación más distal. Por lo tanto, para este trabajo de investigación, resultó de suma importancia que los cortes de amputación se realizaran de manera consistente a una distancia del 50% en relación con la longitud total de las aletas de los animales.

Es importante destacar la existencia de un modelo adicional basado en el proceso de regeneración de la aleta caudal en adultos, el cual puede adaptarse al estadio larval. La principal ventaja de estos experimentos radica en la reducción del tiempo requerido, ya que los animales utilizados para estas evaluaciones tienen aproximadamente 72 dpf, lo cual representa una considerable disminución en comparación con el modelo de regeneración de la aleta caudal en adultos, que requiere animales de al menos tres meses de edad, momento en el cual *Danio rerio* alcanza la madurez. Basado en lo anterior, Gu, *et al.* (2020) investigaron el efecto de la exposición de nanoplásticos con diámetros de 50 nm en larvas de 72 hpf. La exposición con estos materiales generó una inhibición en la regeneración de la aleta. De igual manera, se realizó un análisis transcriptómico de las aletas regeneradas. En específico, se ha reportado que una variedad de vías de señalización, incluyendo Wnt/ β -catenina, FGF, BMP, Hh, RA, IGF, Notch, etc., son requeridas para una adecuada remodelación ósea. Los estudios transcriptómicos demostraron una perturbación de la mayoría de los genes relacionados con la regeneración de la aleta caudal debido a la exposición a los nanoplásticos.

Capítulo 5. Conclusiones

Actualmente, las fracturas más severas son tratadas mediante procedimientos quirúrgicos, los cuales dejan secuelas severas en el hueso incluso después de haber sanado. Por lo tanto, surge la necesidad de desarrollar nuevas terapias que promuevan la regeneración ósea. Una de las áreas de investigación emergentes son las terapias basadas en nanopartículas. Las nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio ($Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs) surgen como un potencial esqueleto para sistemas basados en nanopartículas que estimulen el proceso de regeneración de la aleta caudal. En este trabajo, se evaluó el efecto toxicológico y el efecto en la regeneración de la aleta caudal en *Danio rerio* tras la exposición con nanopartículas de óxido de gadolinio dopadas con iones europio sintetizadas mediante el método sol-gel. Cabe resaltar que no existe un estudio previo en la literatura en donde la biocompatibilidad de este tipo de nanomateriales haya sido evaluado en un modelo de pez cebra.

La evaluación toxicológica durante las 96 hpf en embriones y larvas de pez cebra demostró la toxicidad de estos nanomateriales. La exposición con los nanomateriales generó un decremento de la viabilidad de los alevines y en la eclosión dependiente de la concentración a las 96 hpf. Dichos resultados fueron congruentes con lo previamente reportado en la literatura referente a la evaluación toxicológica de nanopartículas metálicas en embriones y larvas de *Danio rerio*. Con respecto al ritmo cardíaco se observó la presencia de arritmia en las larvas tratadas con las nanopartículas, igualmente dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Por otra parte, las malformaciones fueron observadas desde el grupo tratado con la menor concentración, es decir, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las malformaciones fueron cuantificadas, utilizando dos escalas. La primera de ellas basaba en la severidad de las anomalías, permitía valores de 0 a 4, donde 0 era el valor otorgado a un organismo sin aparentes malformaciones y 4 era el valor otorgado a los alevines muertos. Esta escala arrojó valores superiores de 3 en los diferentes grupos tratados. Con respecto a la segunda escala utilizada, la cual cuantificaba exclusivamente los tipos de malformaciones sin considerar su severidad, se observó que el grupo de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó un promedio de 8 malformaciones distintas por larva tratadas.

Además de la evaluación toxicológica, se llevó a cabo un estudio sobre el impacto de las $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs en la regeneración de la aleta caudal en peces adultos. Basado en esto, se estableció un protocolo específico para determinar cómo estos nanomateriales afectan este proceso, garantizando una exposición constante y monitoreando el tamaño y peso de los animales de manera precisa. La exploración del peso

de los animales permitió determinar que el protocolo no generó estrés que causara pérdida significativa de peso durante el transcurso de los 11 dpa.

En cuanto a la exploración del efecto del área de la aleta regenerada, el seguimiento de las áreas de los apéndices amputados durante el proceso de regeneración confirmó el impacto negativo de los nanomateriales. En los grupos tratados con $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ NPs, se observó un efecto dependiente de la concentración tanto en la longitud del pez como en el área de la aleta regenerada. Concretamente, el grupo tratado con la concentración más alta, que fue de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, exhibió una regeneración disminuida en comparación con el grupo control. Además, al examinar las fluctuaciones de peso de los animales, se demostró que ni el régimen de tratamiento ni el procedimiento de manipulación para la toma de medidas para el monitoreo de la regeneración de la aleta caudal generaban un estrés severo en los animales, lo cual se reflejó en la ausencia de una pérdida considerable de peso durante los 11 días que duró el experimento.

Los resultados del estudio confirmaron la toxicidad y la capacidad teratogénica de los nanomateriales durante las etapas tempranas del desarrollo de *Danio rerio*. En cuanto a la regeneración de la aleta caudal, se observó que la exposición a altas concentraciones de los nanomateriales redujo significativamente el proceso de remodelación de este apéndice. Estos hallazgos indican la necesidad de llevar a cabo procesos adicionales de funcionalización que mejoren la biocompatibilidad, solubilidad y actividad en el remodelado óseo de estos materiales. Esto permitiría que los nanomateriales sean utilizados en sistemas basados en nanopartículas para actuar como agentes teranósticos en el tratamiento de afecciones óseas.

Literatura citada

- Aerle, R., Lange, A., Moorhouse, A., Paszkiewicz, K., Ball, K., Johnston, B., Bastos, E., Booth, T., Tyler, C. y Santos, E. (2013). Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environmental Science & Technology*, 47(14), 8005-8014. <https://doi.org/10.1021/es401758d>
- Akhtar, M., Ahamed, M. y Alhadlaq, H. (2020). Gadolinium oxide nanoparticles induce toxicity in human endothelial HUVECs via lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and autophagy modulation. *Nanomaterials*, 10(9), 1675-1584. <https://doi.org/10.3390/nano10091675>
- Aleström, P., D' Angelo, L., Mdtlyng, P., Schorderet, D., Schulte-Merker, S., Sohm, F. y Warner, S. (2020). Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *LabAnimal*, 54(3), 213-224. Doi: <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>
- Anderson, D. (1967). Larval development and segment formation in the branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* (L.) (Anostraca). *Australian Journal of Zoology*, 15(1), 47-91. <https://doi.org/10.1071/ZO9670047>
- Ankeny, R. y Leonelli, S. (2011). What's so special about model organisms? *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, 42(2), 313-323. doi: <https://doi.org/10.1016/j.shpsa.2010.11.039>
- Ansari, M. (2019). Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in Biomaterials*, 8(4), 223-237. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>
- Asharani, P., Lianwu, Y., Gong, Z. y Valiyaveettil, S. (2010). Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, 5(1), 43-54. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.489207>
- Asharani, P., Lian, Y., Gong, Z. y Valiyaveettil., S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19(25), 223-237. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/25/255102>
- Auffan, M., Matson, C., Rose, J., Arnold, M., Proux, O., Fayard, B., Liu, W., Chaurand, P., Wiesner, M., Bottero, J. y Giulio, R. (2013). Salinity-dependent silver nanoparticle uptake and transformation by Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos. *Nanotoxicology*, 8(1), 167-176. doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.869627>
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D., Verdile, G. y Marting, R. (2012). Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *Journal of Visualized Experiments*, 69, 4196. doi: <https://doi.org/10.3791/4196>
- Azevedo, A., Grotek, B., Jacinto, A., Weidinger, G. y Saúde, L. (2011). The regenerative capacity of the zebrafish caudal fin is not affected by repeated amputations. *PLoS One*, 6(7), e22820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022820>
- Babuska, V., Babu, P., Chocholata, P., Wiesnerova, L., Dvorakova, J., Vrzakova, R., Neklionova, A., Landsmann, L. y Kuida, V. (2022). Nanomaterials in bone regeneration. *Applied Sciences*, 12(13), 6793-6803. <https://doi.org/10.3390/app12136793>

- Bai, C. y Tang, M. (2020). Toxicological study of metal and metal oxide nanoparticles in zebrafish. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 37-63. <https://doi.org/10.1002/jat.3910>
- Bai, W., Zhang, Z., Tian, W., He, X., Ma, Y., Zhao, Y. y Chai, Z. (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1645-1654. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9740-9>
- Balasubramanian, S., Rangasamy, S., Vivekanandam, R. y Perumal, E. (2023). Acute exposure to tenorite nanoparticles induces phenotypic and behavior alterations in zebrafish larvae. *Chemosphere*. 339, 139681. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139681>
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R., Fako, V. y Furgeson, D. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*, 5(16), 1897-1910. <https://doi.org/10.1002/smll.200801716>
- Böhme, S., Baccaro, M., Schmidt, M., Potthoff, A., Stärk, H., Reemtsma, T. y Kühnel, D. (2017). Metal uptake and distribution in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo: differences between nanoparticles and metal ions. *Environmental Science: Nano*, 4, 1005-1015. <https://doi.org/10.1039/C6EN00440G>
- Busse, B., Galloway, J., Gray, R., Harris, M. y Kwon, R. (2020). Zebrafish: An emerging model for orthopedic research. *Journal of Orthopedic Research*, 38(5), 925-936. <https://doi.org/10.1002/jor.24539>
- Cahu, C., Infante, J. y Takeuchi, T. (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227(1), 245-258. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00507-6)
- Sanders, G. (2020). Zebrafish in biomedical research: Head and body: Anatomy. En S. C. Cartner, J. S. Eisen, & G. E. Sanders (Eds.), *The zebrafish in biomedical research: Biology, husbandry, diseases, and research applications* (pp. 77-79). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00006-3>
- Castranova, D., & Wang, C. (2020). Zebrafish breeding and colony management. En S. C. Cartner, J. S. Eisen, & G. E. Sanders (Eds.), *The zebrafish in biomedical research: Biology, husbandry, diseases, and research applications* (pp. 357-364). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00031-2>
- Chakraborty, C., Ranjan, A., Sharma, G. y Lee, S. (2016). Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(65), 645-668. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0217-6>
- Chaudhary, S., Kumar, S., Umar, A., Singh, J., Rawat, M. y Mehta, S. (2017). Europium-doped gadolinium oxide nanoparticles: A potential photoluminescent probe for highly selective and sensitive detection of Fe³⁺ and Cr³⁺ ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 579-588. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.002>
- Chen, Y., Zhu, W., Shu, F., Fan, Y., Yang, N., Wu, T., Ji, Le., Xie, W., Bade, R., Jiang, S., Liu, X., Shao, G., Wu, G., Jia, X. (2020). Nd₂O₃ nanoparticles induce toxicity and cardiac/cerebrovascular abnormality in zebrafish embryos via the apoptosis pathway. *International Journal of nanomedicine*, 22(15), 387-400. <https://doi.org/10.2147/IJN.S220785>
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3, 131-139. <http://doi.org/10.2215/CJN.04151206>

- Collymore, C., Crim, M. y Lieggi, C. (2016). Recommendations for health monitoring and reporting for zebrafish research facilities. *Zebrafish*, 13, 138-148. <http://doi.org/10.1089/zeb.2015.1210>
- De Magalhaes, J. (2015). The big, the bad and the ugly. Extreme animals as inspiration for biomedical research. *Science & Society*, 16, 771-776. <https://doi.org/10.15252/embr.201540606>
- Dietrich, K., Fiedler, I., Kurzyukova, A., López-Delgado, A., McGowan, L., Geurtzen, K., Hammond, C., Busse, B. y Knopf, F. (2021). Skeletal biology and disease modeling in zebrafish. *Journal of Bone and Mineral Research*, 36(3), 436-458. <http://doi.org/10.1002/jbmr.4256>
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D. y Giannoudis, P. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicines*, 9(66), 546-553. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>
- Duan, J., Yu, Y., Shi, H., Tian, L., Guo, C., Huang, P., Zhou, X., Peng, S. y Sun, Z. (2013). Toxic effects of silica nanoparticles on zebrafish embryos and larvae. *PLoS One*, 8(9), e74606. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074606>
- Dumitrescu, E., Wallace, K., y Andreescu, S. (2019). Nanotoxicity assessment using embryonic zebrafish. En J. L. (Editor), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1894, pp. 331-343). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4_20
- Florencio-Silva, R., Rodrigues da Silva Sasso, G., Sasso-Cerri, E., Simoes, M. y Cerri, P. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, e421746. <http://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Franklin, N., Rogers, N., Apte, S., Batley, G., Gadd, G. y Casey, P. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41(24), 8484-8490. <http://doi.org/10.1021/es071445r>
- Gama, P., Cadena-Nava, R., Juárez-Moreno, K., Pérez-Robles, J. y Vazquez-Duhalt, R. (2021). Virus-based nanoreactors with GALT activity for classic galactosemia therapy. *ChemMedChem*, 16(9), 1438-1445. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000999>
- Gaulke, C., Martins, M., Watral, V., Humphreys, I., Spagnoli, S., Kent, M. y Sharpton, T. (2019). A longitudinal assessment of host-microbe-parasite interactions resolves the zebrafish gut microbiome's link to *Pseudocapillaria tomentosa* infection and pathology. *Microbiome*, 7(1), 783-796. <http://doi.org/10.1186/s40168-019-0622-9>
- Gemberling, M., Bailey, T., Hyde, D. y Poss, K. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics*, 29 (11), 611-620. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>
- Giannoudis, P. y Einhorn, T. (2009). Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury*, 40(3), 903-914. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(09\)00642-](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(09)00642-)
- Goldys, E., Drozdowics-Tomsia, K., Jinjun, S., Dosev, D., Kennedy, I., Yatsunencko, S. y Godlewski, M. (2006). Optical characterization of Eu-Doped and undoped Gd₂O₃ nanoparticles synthesized by the hydrogen flame pyrolysis method. *Journal of the American Chemical Society*, 128(45), 14498-14505. <http://doi.org/10.1021/ja0621602>

- Goolish, E., Evans, R., Okutake, K. y Max, R. (1998). Chamber volume requirements for reproduction of the zebrafish *Danio rerio*. *The progressive Fish-Culturist*, 60(2), 127-132. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1998\)060<0127:CVRFRO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1998)060<0127:CVRFRO>2.0.CO;2)
- Gu, L., Tian, L., Gao, G., Peng, S., Zhang, J., Wu, D., Huang, J., Hua, Q., Lu, T., Zhong, L., Fu, Z., Pan, X., Qian, H. y Sun, L. (2020). Inhibitory effects of polystyrene microplastics on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. *Environmental Pollution*, 266(3), 114664. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114664>
- Hacke, E. y Ward, A. (2018). Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*, 8(7), 561-572. <http://doi.org/10.3390/nano8070561>
- Hajiali, H., Ouyang, L., Llopis-Hernandez, V., Dobre, O. y Rose, F. (2021). Review of emerging nanotechnology in bone regeneration: progress, challenges and perspectives. *Nanoscale*, 13(23), 10266-10280. <http://doi.org/10.1039/d1nr01371h>
- Hamm, J., Ceger, P., Allen, D., Stout, M., Maull, E., Baker, G., Zmarowski, A., Padilla, S., Perkins, E., Planchart, A., Stedman, D., Tal, T., Tanguay, R., Volz, D., Wilbanks, M. y Walker, N. (2019). Characterizing sources of variability in zebrafish embryo screening protocols. *Altex*, 36(1), 103-120. <http://doi.org/10.14573/altex.1804162>
- Hammer, H. S. (2020). Water quality for zebrafish culture. En S. C. Cartner, J. S. Eisen, & G. E. Sanders (Eds.), *The zebrafish in biomedical research: Biology, husbandry, diseases, and research applications* (pp. 321-335). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00029-4>
- Hawkyard, M., Sæle, Ø., Nordgreen, A., Langdon, C. y Hamre, K. (2011). Effect of iodine enrichment of *Artemia* sp. on their nutritional value for larval zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*, 316(4), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.013>
- Heiden, T., Dengler, E., Kao, W., Heideman, W. y Peterson, R. (2007). Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(1), 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.07.009>
- Henriquez-Martínez, A., Ávila, L., Pulido, M., Ardila, Y., Akle, V. y Bloch, N. (2022). Age-Dependent effects of chronic stress on zebrafish behavior and regeneration. *Frontiers in Physiology*, 13, e856778. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.856778>
- Hotez, P., Brindley, P., Bethony, J., King, C., Pearce, E. y Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1311-1321. <https://doi.org/10.1172/JCI34261>
- Hou, J., Liu, H., Zhang, S., Liu, X., Havat, X., Hayat, T., Alsaedi, A. y Wang, X. (2019). Mechanism of toxic effects of Nano-ZnO on cell cycle of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 229(1), 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.217>
- Howe, K., Clark, M., Torroja, C., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J., Koch, R., Rauch, G., White, S., ... Stemple, D. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

- Jain, A., Koyani, R., Muñoz, C., Sengar, P., Contreras, O., Juárez, P. y Hirata, G. (2018). Magnetic-luminescent cerium-doped gadolinium aluminum garnet nanoparticles for simultaneous imaging and photodynamic therapy of cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 526(1), 220-229. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.100>
- Kent, M., Sanders, J., Spagnoli, S., Al-Samarrie, C. y Murray, K. (2021). Review of diseases and health management in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822) in research facilities. *The Journal of Fish Disease*, 43(6), 637-650. <https://doi.org/10.1111/jfd.13165>
- Kolb, A., Hildebrandt, F. y Lawrence, C. (2018). Effects of diet and social housing on reproductive success in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish*, 15(5), 445-453. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1599>
- Kujawski, S., Lin, W., Kitte, F., Börmel, M., Fuchs, S., Arulmozhivarman, G., Vogt, S., Theil, D., Zhang, Y., y Antos, C. (2014). Calcineurin regulates coordinated outgrowth of zebrafish regenerating fins. *Developmental Cell*, 28(5), 573-587. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.019>
- Lawrence, C., Adatto, I., Best, J., James, A. y Maloney, A. (2012). Generation time of zebrafish (*Danio rerio*) and medakas (*Oryzias latipes*) housed in the same aquaculture facility. *LabAnimal*, 41(6), 158-165. <https://doi.org/10.1038/labon0612-158>
- Lawrence, C., Best, J., Cockington, J., Henry, E., Hurley, S., James, A., Lapointe, C., Maloney, K. y Sanders, E. (2016). The complete and updated “Rotifers polyculture method” for rearing first feeding zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, 107, e53629. <https://doi.org/10.3791/53629>
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Lawrence, C. (2011). Advances in zebrafish husbandry and management. En H. W. Detrich III, L. I. Zon, & M. Westerfield (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 104, pp. 429-451). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374814-0.00023-9>
- Lawrence, C., y Mason, T. (2012). Zebrafish housing systems: A review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR Journal*, 53(2), 179-191. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.179>
- Lebedeva, L., Zhumabayeva, B., Gebauer, T., Kisselev, I. y Aitasheva, Z. (2020). Zebrafish *Danio rerio* as a model for understanding the process of caudal fin regeneration. *Zebrafish*, 17(6), 359-372. <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1926>
- Linbo, T. (2009). *Zebrafish (Danio rerio): Husbandry and colony maintenance at the Northwest Fisheries Science Center* (NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-100). U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service.
- Liu, C., Hou, Y., y Gao, M. (2014). Are rare-earth nanoparticles suitable for in vivo applications? *Advanced Materials*, 26(40), 6922-6932. <https://doi.org/10.1002/adma.201305535>
- Liu, Y., Zhu, Z., Pei, X., Zhang, X., Cheng, X., Hu, S., Gao, X., Wang, J., Chen, J., y Wan, Q. (2020). ZIF-8-modified multifunctional bone-adhesive hydrogels promoting angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(33), 36978-36995. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c12090>

- Li, X., Song, L., Hu, X., Liu, C., Shi, J., Wang, H., Zhan, L., y Song, H. (2018). Inhibition of epithelial-mesenchymal transition and tissue regeneration by waterborne titanium dioxide nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(4), 3449-3458. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b18986>
- Lucas, R. W., Larson, S. B., y McPherson, A. (2002). The crystallographic structure of brome mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 95-108. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5389>
- Markovich, M. L., Rizzuto, N. V., y Brown, P. B. (2007). Diet affects spawning in zebrafish. *Zebrafish*, 4(1), 69-74. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9993>
- Massarsky, A., Dupuis, L., Taylor, J., Eisa-Beygi, S., Strek, L., Trudeau, V. L., y Moon, T. W. (2013). Assessment of nanosilver toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Chemosphere*, 92(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.060>
- Matthews, M., Trevarrow, B., y Matthews, J. (2002). A virtual tour of the Guide for zebrafish users. *Lab Animal*, 31(3), 34-40. <https://doi.org/10.1038/5000140>
- McMenamin, S. K., Chandless, M. N., y Parichy, D. M. (2016). Working with zebrafish at postembryonic stages. *Methods in Cell Biology*, 134, 587-607. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.12.001>
- McNeale, D., Dashti, N., Cheah, L. C., y Sainsbury, F. (2022). Protein cargo encapsulation by virus-like particles: Strategies and applications. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 15(3), e1869. <https://doi.org/10.1002/wnan.1869>
- Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19. <https://doi.org/10.1002/cpet.19>
- Murray, K. N., Lains, D., y Spagnoli, S. T. (2020). Water Quality and Idiopathic Diseases of Laboratory Zebrafish. En *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications* (pp. 463-477). American College of Laboratory Animal Medicine. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00039-7>
- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., y Cummings, B. S. (2020). Safe nanoparticles: Are we there yet? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 385-398. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>
- Nasiadka, A., y Clark, M. D. (2012). Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR Journal*, 53(2), 161-168. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.161>
- Nuñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodriguez-Hernandez, A. G., Vazquez-Duhalt, R., y Cadena-Nava, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11(1), 372-382. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>
- Osborne, N., Paull, G., Grierson, A., Dunford, K., Busch-Nentwich, E. M., Sneddon, L. U., Wren, N., Higgins, J., y Hawkins, P. (2016). Report of a meeting on contemporary topics in zebrafish husbandry and care. *Zebrafish*, 13(6), 584-589. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1324>
- Örling, J., Kosonen, K., Villman, J., Reichard, M., y Paatero, I. (2023). Impaired fin regeneration and angiogenesis in aged zebrafish and turquoise killifish. *Biology Open*, 12(4), bio059622. <https://doi.org/10.1242/bio.059622>

- Paatero, I., Casals, E., Niemi, R., Özliseli, E., Rosenholm, J. M., y Sahlgren, C. (2017). Analyses in zebrafish embryos reveal that nanotoxicity profiles are dependent on surface-functionalization controlled penetrance of biological membranes. *Scientific Reports*, 7(1), 8423-8437. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09312-z>
- Paige, C., Hill, B., Canterbury, J., Sweitzer, S., y Romero-Sandoval, E. A. (2014). Construction of an affordable and easy-to-build zebrafish facility. *Journal of Visualized Experiments*, 93, e51989. <https://doi.org/10.3791/51989>
- Pang, S., Gao, Y., Wang, F., Wang, Y., Cao, M., Zhang, W., Liang, Y., Song, M., y Jiang, G. (2020). Toxicity of silver nanoparticles on wound healing: A case study of zebrafish fin regeneration model. *Science of The Total Environment*, 717, 137178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137178>
- Parichy, D. M., y Postlethwait, J. H. (2020). The biotic and abiotic environment of zebrafish. En *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish* (pp. 3-16). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817528-6.00001-2>
- Park, H. G., y Yeo, M. K. (2013). Effects of TiO₂ nanoparticles and nanotubes on zebrafish caudal fin regeneration. *Molecular & Cellular Toxicology*, 9, 375–383. <https://doi.org/10.1007/s13273-013-0046-8>
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., y Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339(16), 2693-2700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.09.007>
- Rombolá, E. (2017). Evaluación radiológica de los elementos de osteosíntesis en el miembro superior [Radiological evaluation of bone synthesis in the upper limb]. *Revista Argentina de Radiología*, 81(4), 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.rard.2016.11.007>
- Rujitanapanich, S., Kumpapan, P., y Wanjanoi, P. (2014). Synthesis of Hydroxyapatite from Oyster Shell via Precipitation. *Energy Procedia*, 56, 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.138>
- Sanders, J. L., Watral, V., Stidworthy, M. F., y Kent, M. L. (2016). Expansion of the known host range of the microsporidium, *Pseudoloma neurophilia*. *Zebrafish*, 13(Suppl 1), S102-S106. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1214>
- Savage, D. T., Hilt, J. Z., y Dziubla, T. D. (2019). In vitro methods for assessing nanoparticle toxicity. En *Methods in Molecular Biology*, 1894, 1-29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4_1
- Sehring, I. M., y Weidinger, G. (2020). Recent advancements in understanding fin regeneration in zebrafish. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 9(1), e367. <https://doi.org/10.1002/wdev.367>
- Setyawati, M. I., Khoo, P. K. S., Eng, B. H., Xiong, S., Zhao, X., Das, G. K., Tan, T. T.-Y., Loo, J. S. C., Leong, D. T., y Ng, K. W. (2013). Cytotoxic and genotoxic characterization of titanium dioxide, gadolinium oxide, and poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in human fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(3), 633-640. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34363>
- Sheng, L., Wang, L., Su, M., Zhao, X., Hu, R., Yu, X., Hong, J., Liu, D., Xu, B., Zhu, Y., Wang, H., y Hong, F. (2016). Mechanism of TiO₂ nanoparticle-induced neurotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 31(2), 163-175. <https://doi.org/10.1002/tox.22031>

- Sommer, N. G., Hahn, D., Okutan, B., Marek, R., y Weinberg, A.-M. (2019). Animal Models in Orthopedic Research: The Proper Animal Model to Answer Fundamental Questions on Bone Healing Depending on Pathology and Implant Material. En E. Tvrdá & S. C. Yenisseti (Eds.), *Animal Models in Medicine and Biology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89137>
- Spagnoli, S., Xue, L., y Kent, M. L. (2015). The common neural parasite *Pseudoloma neurophilia* is associated with altered startle response habituation in adult zebrafish (*Danio rerio*): Implications for the zebrafish as a model organism. *Behavioural Brain Research*, 291, 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.046>
- Stevens, C. H., Reed, B. T., y Hawkins, P. (2021). Enrichment for laboratory zebrafish - A review of the evidence and the challenges. *Animals (Basel)*, 11(3), 698-709. <https://doi.org/10.3390/ani11030698>
- Tal, T. L., Franzosa, J. A., y Tanguay, R. L. (2010). Molecular signaling networks that choreograph epimorphic fin regeneration in zebrafish - A mini-review. *Gerontology*, 56(2), 231-240. <https://doi.org/10.1159/000259327>
- Tautzenberger, A., Kovtun, A., & Ignatius, A. (2012). Nanoparticles and their potential for application in bone. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4545-4557. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34127>
- Tonelli, F., Bek, J. W., Besio, R., De Clercq, A., Leoni, L., Salmon, P., Coucke, P. J., Willaert, A., & Forlino, A. (2020). Zebrafish: A resourceful vertebrate model to investigate skeletal disorders. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 11, 489. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00489>
- Uemoto, T., Abe, G., & Tamura, K. (2020). Regrowth of zebrafish caudal fin regeneration is determined by the amputated length. *Scientific Reports*, 10(1), 649. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57533-6>
- Varga, Z. M. (2016). Aquaculture, husbandry, and shipping at the Zebrafish International Resource Center. *Methods in Cell Biology*, 135, 509-534. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.01.007>
- Varga, Z. M. (2011). Aquaculture and husbandry at the zebrafish international resource center. *Methods in Cell Biology*, 104, 453-478. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374814-0.00024-0>
- Venuto, A., Thibodeau-Beganny, S., Trapani, J. G., y Erickson, T. (2023). A sensation for inflation: initial swim bladder inflation in larval zebrafish is mediated by the mechanosensory lateral line. *bioRxiv*, 2023.01.12.523756. <https://doi.org/10.1101/2023.01.12.523756>
- Villamizar, N., Vera, L. M., Foulkes, N. S., y Sánchez-Vázquez, F. J. (2014). Effect of lighting conditions on zebrafish growth and development. *Zebrafish*, 11(2), 173-181. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0926>
- Williams, S. Y., y Renquist, B. J. (2016). High throughput *Danio rerio* energy expenditure assay. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 107, e53297. <https://doi.org/10.3791/53297>
- Yao, S., Xu, Y., Zhou, Y., Shao, C., Liu, Z., Jin, B., ... Tang, R. (2019). Calcium phosphate nanocluster-loaded injectable hydrogel for bone regeneration. *ACS Applied Bio Materials*, 2(10), 4408-4417. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00270>
- Zhu, X., Tian, S., y Cai, Z. (2012). Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS ONE*, 7(9), e46286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046286>

Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., & Lang, Y. (2008). Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43(3), 278-284. <https://doi.org/10.1080/10934520701792779>