El CNSA conCIENCIA

El CNSA apuesta por el uso de métodos alternativos en toxicología: el embrión de pez cebra como modelo

Dra. Mónica Torres Ruíz.
Área de Toxicología Ambiental. CNSA.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la toxicología demanda modelos que permitan evaluar eficazmente los efectos de las sustancias contaminantes tanto para la salud de los organismos como de los ecosistemas. En este sentido, el embrión de pez cebra (*Danio rerio*) ofrece una alternativa muy sensible y de alto rendimiento que permite evaluar efectos en el desarrollo y fenotípicos así como integrar el estudio de los mecanismos de acción a nivel celular y molecular. En el ámbito regulatorio, el ensayo FET[1] (*fish embryo toxicity test*, OECD TG 236) se viene utilizando desde el año 2013 para determinar la toxicidad aguda en estados embrionarios aportando datos sobre la evaluación de peligros para organismos acuáticos. Por otro lado, en toxicología humana, este modelo está siendo utilizado cada vez más debido a su alta homología genética y la facilidad de disponer de líneas transgénicas[2,3].

BREVE HISTORIA DEL USO DEL PEZ CEBRA EN TOXICOLOGÍA

El pez cebra (*Danio rerio*) es un animal oriundo de aguas dulces del sur de Asia (India, Pakistan y alrededores). Fue descrito por primera vez por el médico escocés Francis Hamilton, quien lo bautizó como el pez cebra por las rayas que presenta a lo largo del cuerpo[4]. A partir de los años 80, el pez cebra pasó de ser un pez ornamental a un modelo de laboratorio gracias al trabajo pionero de George Streisinger (Universidad de Oregon)[5]. Más adelante, en 1995 Kimmel y colaboradores[6] publicaron la embriogénesis del pez cebra, esencial para su uso en toxicología del desarrollo. La transparencia del corion y el embrión, su rápido desarrollo y su alta fecundidad elevada aceleraron su adopción por la ecotoxicología desde finales de los 90 e inicios de los 2000, con propuestas de usar embriones como alternativa refinada a ensayos con peces juveniles o adultos[7]. Finalmente, en 2013 se publicó y adoptó la OECD TG 236 (OECD, 2013) y esto constituyó un hito regulatorio que consolidó al embrión como alternativa de ensayo de toxicidad aguda[8]. Más recientemente, estudios de metaanálisis y ejercicios interlaboratorio han reforzado la transferibilidad y discutido ámbitos de aplicabilidad y sensibilidad relativa frente a ensayos tradicionales[9].

DESCRIPCIÓN DEL MODELO: EL EMBRIÓN DE DANIO RERIO

El desarrollo embrionario del pez cebra es muy rápido y en 24 horas progresa desde mórula hasta una larva primordial que puede incluso mover la cola. A los tres días, tras su eclosión, tiene su organogénesis prácticamente completa y es una larva de nado libre. La disponibilidad del atlas de su desarrollo y de herramientas genéticas específicas han facilitado la identificación de mecanismos de acción de diversos tóxicos y la construcción de rutas de resultados adversos (AOPs). Desde el punto de vista ético y legal europeo y español, los estadios embrionarios previos a la alimentación independiente (≈120 hpf) no están protegidos por la Directiva 2010/63/UE de protección de animales de experimentación. Esta distinción ha favorecido el uso del embrión como método alternativo compatible con los principios de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento).

VENTAJAS DEL MODELO EN TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

El embrión de pez cebra es un modelo sensible, reproducible y que es apto para pruebas estandarizadas. Por ejemplo, el FET define criterios claros de letalidad y condiciones experimentales comparables entre laboratorios. Eso se traduce en que el protocolo se haya transferido y que existan datos de muchas sustancias con diversos modos de acción[10]. Por otro lado, es un modelo que admite ensayos de alto rendimiento debido a su pequeño tamaño, que permite formatos de 96 o hasta 384 pocillos para imagen y cuantificación automatizada[11]. Esto hace posible la lectura rápida de fenotipos relacionados con el desarrollo (edemas, escoliosis, etc.) así como la evaluación del comportamiento. En este sentido, la larva de 120 hpf se utiliza cada vez más para evaluar puntos finales complejos como son la reacción ante estímulos sensoriales, la aversión, la ansiedad, el aprendizaje temprano y la memoria entre otros[12]. Asimismo, el embrión de pez cebra tiene una relevancia especial en el estudio de los efectos de contaminantes emergentes. Se ha utilizado así en el estudio de las consecuencias de la exposición a PFAS, bisfenoles, biocidas y nanomateriales proporcionando evidencia sobre sus modos de acción y

efectos en el desarrollo[13-15]. En el ámbito de la protección animal, este modelo contribuye al principio de las 3Rs ya que, al usar estadios no protegidos, el embrión contribuye a sustituir o reducir ensayos con peces adultos u otros modelos vertebrados más complejos.

NUEVAS APLICACIONES EN TOXICOLOGÍA HUMANA

El valor del embrión de pez cebra como modelo de toxicología humana se apoya en la conservación de rutas genéticas y fisiológicas, avalada por la secuenciación del genoma y el mapeo de ortólogos humanos[16]. Esto ha permitido el uso de este modelo para evaluar mecanismos de toxicidad claves para el ser humano como son la cardiotoxicidad, la neurotoxicidad o la disrupción endocrina, entre otros. En los embriones a partir de las 24 hpf y en larvas es fácil monitorizar el ritmo cardiaco, la contractilidad y el electrocardiograma así como los mecanismos de acción comparables a los efectos observados en humanos[17,18]. Por otro lado, la organización del sistema nervioso y los neurotransmisores está ampliamente conservada en el pez cebra permitiendo estudios sobre el cruce de la barrera hematoencefálica y efectos evaluados a través de cambios morfológicos en el sistema nervioso, del comportamiento o efectos en la expresión de genes, proteínas o metabolitos relacionados con el neurodesarrollo. Esto permite la evaluación de los efectos de sustancias neuroactivas con medidas cuantitativas de función neural[19,20].

Este modelo también es muy útil para investigar efectos de disrupción endocrina ya que presenta ejes hormonales conservados. Por ejemplo, a los 3 días de vida el embrión ya es capaz de sintetizar por sí mismo hormonas tiroideas por lo que se puede evaluar fácilmente los tóxicos que afectan a este eje, tan importante para el neurodesarrollo[21,15]. Asimismo, el uso de las técnicas ómicas está facilitando la evaluación de los mecanismos de acción y el estudio de la toxicología de sistemas enlazando cambios moleculares tempranos con resultados adversos en órganos diana[22, 3].

El embrión de pez cebra es, por tanto, un modelo ideal para evaluar la toxicidad de las sustancias, tanto para la toxicología humana como la ambiental, siendo el puente perfecto dentro de un enfoque *One Health* y respetando el principio de las 3Rs en la investigación. En el Centro Nacional de Sanidad Ambiental, el laboratorio de Embrión de Pez Cebra se centra en la evaluación de los efectos de sustancias como el mercurio, los nanoplásticos y otros contaminantes orgánicos emergentes con resultados sumamente interesantes y relevantes para la salud humana y ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

1. OECD. Fish embryo acute toxicity test (236). OECD guidelines for the testing of chemicals, section; 2:1-22. 2013.
2. Cassar S. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. Chem. Res. Toxicol. 2019; 32:1860-74.
3. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery. 2015; 14:721-31.
4. Hamilton F. An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Vol 1: Archibald Constable. 1822.
5. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio). Nature. 1981; 291:3.
6. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics. 1995; 203:253-310.
7. Scholz S, Fischer S, Gundel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. Environmental Science and Pollution Research. 2008; 15:394-404.
8. Sobańska M. Applicability of the fish embryo acute toxicity test (FET) in chemical hazard assessment. Environmental Science and Pollution Research. 2018; 25:16228-40.
9. Birke A. Zebrafish embryo and acute fish toxicity test show similar sensitivity for baseline toxicants. Chemosphere. 2019; 221:548-56.
10. ECHA. ECHA (European Chemicals Agency) dossiers using FET/zFET.2025.
11. Horzmann KA, Freeman JL. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. Toxicol. Sci.2018; 163:5-12.
12. Tombari RJ, Mundy PC, Morales KM, Dunlap LE, Olson DE, Lein PJ. Developmental Neurotoxicity Screen of Psychedelics and Other Drugs of Abuse in Larval Zebrafish (Danio rerio). ACS Chem. Neurosci.2023; 14:875-84.
13. Peskova N. Bisphenols: Endocrine Disruptors and Their Impact on Fish. Fishes. 2025; 10:365.
14. Rericha Y. Review of the zebrafish as a model to investigate PFAS toxicity. Toxics. 2023; 11:548.
15. Torres-Ruiz M, de Alba González M, Morales M, Martin-Folgar R, González MC, Cañas-Portilla AI et al. Neurotoxicity and endocrine disruption caused by polystyrene nanoparticles in zebrafish embryo. Science of The Total Environment. 2023; 874:162406.
16. Howe K.The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 2013; 496:498-503.
17. Coppola A. Zebrafish as a Model of Cardiac Pathology and Toxicity. Int. J. Mol. Sci. 2023; 24:5656.
18. Echeazarra L. Adult and Developing Zebrafish as Suitable Models for Cardiac Electrophysiology and Cardiotoxicity. Front. Physiol.2021; 11:607860.
19. Adedara IA, Akingbade GT, Farombi EO, Ebenyi LN. Utility of zebrafish-based models in understanding mechanisms of neurotoxicity of environmental pollutants. Front. Physiol. 2024; 15:1369421.

20. Fitzgerald JA. Approaches to Test the Neurotoxicity of Environmental Chemicals Using Zebrafish. Environmental Toxicology and Chemistry. 2021; 40:989-1007.

21. Fraser TWK, Khezri A, Lewandowska-Sabat AM, Henry T, Ropstad E. Endocrine disruptors affect larval zebrafish behavior: Testing potential mechanisms and comparisons of behavioral sensitivity to alternative biomarkers. Aquat. Toxicol. 2017; 193:128-35.

22. Li RA. Systems Toxicology Approach for Assessing Developmental Neurotoxicity Using Zebrafish. Frontiers in Genetics. 2021; 12:652632.

El CNSA conCIENCIA

Nuestra orina habla: descubriendo los plaguicidas que nos rodean

Dra. Sandra Fernández Fernández.
Área de Toxicología Ambiental. CNSA.

Cada día estamos en contacto -aunque sea de manera imperceptible- con pequeñas dosis de plaguicidas a través del aire, los alimentos o el agua. En el Área de Toxicología Ambiental, del Centro Nacional de Sanidad Ambiental (CNSA), del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), llevamos tiempo preguntándonos qué cantidad de esos plaguicidas llega realmente a nuestro organismo y cuáles son las principales fuentes de exposición en la población española. Aunque los alimentos y el agua están sujetos a controles que garantizan el cumplimiento de los límites legales que pueden estar presentes en ellos, todavía sabemos poco sobre los posibles efectos que puede tener la exposición combinada a múltiples plaguicidas a dosis bajas.

Para conocer mejor esta exposición, nos centramos en algo tan cotidiano como revelador: la orina. Los plaguicidas más utilizados actualmente son no persistentes, es decir, se metabolizan y excretan rápidamente (en menos de 72 horas) tras la exposición, por lo que su presencia en orina refleja exposiciones recientes. En ella podemos detectar los propios plaguicidas y sus metabolitos —los productos en los que se transforman los plaguicidas una vez que el cuerpo los metaboliza— y así obtener una imagen precisa de esa exposición.

En el Laboratorio de Cromatografía, del Área de Toxicología Ambiental, hemos desarrollado métodos avanzados para analizar un total de 30 metabolitos en orina de distintas familias de plaguicidas, entre ellos organofosforados, piretroides, neonicotinoides y herbicidas, como el glifosato, todos de uso muy extendido tanto en el ámbito agrícola como doméstico y considerados de interés por las autoridades nacionales y europeas. Para ello, utilizamos el robot autopipeteador, que nos ayuda a preparar las muestras de orina mediante extracción en fase sólida (SPE) antes de analizarlas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), una técnica muy sensible capaz de detectar y cuantificar estas sustancias a niveles del orden de partes por trillón.

Estos métodos analíticos desarrollados, se están aplicando en BIOEXPLA-ES, un proyecto de biomonitorización humana diseñado para evaluar la exposición a plaguicidas no persistentes en distintos grupos de población del territorio español. Para ello, trabajamos con muestras de orina recogidas en estudios previos, como BIOAMBIENT.ES (población adulta), DEMOCOPHES (parejas madre-hijo/a) y BEA (adolescentes). Además, estamos recogiendo nuevas muestras de población infantil a través del proyecto ESQUIPI, uno de los grupos más sensibles y prioritarios desde el punto de vista de la salud pública. Actualmente, estamos en fase de análisis de las muestras y, una vez obtenidos todos los resultados, nuestro objetivo es establecer valores de referencia nacionales, conocer los niveles de exposición de la población española y detectar posibles diferencias entre grupos de edad, sexo, periodos de muestreo o zonas geográficas. Estos datos son fundamentales para la evaluación del riesgo y servirán de base para diseñar estrategias más eficaces de prevención y control, así como futuros estudios de biomonitorización humana. En definitiva, lo que buscamos es que los resultados de nuestras investigaciones se traduzcan en políticas públicas mejor informadas que protejan la salud de toda la población, especialmente la de los más pequeños, y nos permitan entender mejor cómo, cuándo y en qué medida la población española está expuesta a los plaguicidas.

Este trabajo está alineado con los objetivos de la Comisión Interministerial de Biomonitorización Humana (PCM/1049/2022), el impulso nacional para generar una

Figura 1. Robot autopipeteador empleado en el Área de Toxicología Ambiental del CNSA-ISCIII para la preparación automatizada de muestras de orina para el análisis de plaguicidas

base científica sólida sobre la exposición de la población a sustancias químicas y establecer un programa nacional de biomonitorización humana. Además, BIOEXPLA-ES se integra en iniciativas europeas como el Partenariado para la Evaluación de Riesgos de Sustancias Químicas (PARC), compartiendo metodologías, criterios de calidad y resultados con otros laboratorios, lo que permite obtener resultados fiables, situar la exposición de la población española en un contexto internacional y así avanzar hacia los objetivos del Plan Europeo de Acción "*Hacia una contaminación cero*".

Aunque aún queda camino por recorrer, nuestro grupo de investigación está convencido de que la biomonitorización humana es una herramienta esencial para entender la relación entre el medio ambiente y la salud. Nuestro compromiso es seguir ampliando el conocimiento sobre los plaguicidas que nos rodean y su impacto real. Escuchar lo que nuestro cuerpo nos dice no solo nos ayuda a entender mejor nuestro entorno, sino también a cuidar el mundo que compartimos.

Los micro y nanoplásticos (MNPs) constituyen un grupo muy heterogéneo de contaminantes ambientales, que tienen en común estar compuestos por materiales plásticos y presentar tamaños menores de 5 mm y 1 µm respectivamente[1]. A diferencia de otros contaminantes ambientales, los MNPs no presentan una composición química definida, lo que les otorga unas propiedades fisicoquímicas muy variables, complicando así su monitoreo y tratamiento.

El CNSA conCIENCIA

Hacia una metodología robusta para el estudio de micro y nano plásticos atmosféricos: el proyecto AeroPlasINT

Dr. Francisco Sánchez Soberón.
Área de Contaminación Atmosférica. CNSA.

Debido a su tamaño reducido y a presentar estructuras químicas estables, los MNPs se dispersan fácilmente en el medio natural, siendo su presencia ubicua en diferentes matrices ambientales. Una vez dispersos en el medio, los MNPs son causa de diferentes efectos adversos, tanto a nivel de salud ecosistémica, como a nivel de salud humana[2,3]. Por estos motivos, no es de extrañar que exista un creciente interés por parte de la comunidad científica por el estudio de la presencia y niveles de estos contaminantes en distintas matrices ambientales y biológicas.

Uno de los medios que juegan un papel fundamental en las dinámicas de los MPNs en el ambiente es la atmósfera. Por un lado, la atmósfera actúa como dispersor global de MNPs, especialmente de aquellos que presentan una densidad menor, permitiéndoles llegar a lugares tan remotos como los polos o las cimas de las montañas[4]. Además, una vez suspendidos en el aire, pueden afectar a las dinámicas atmosféricas, actuando como núcleos de condensación de partículas en suspensión y afectando a la formación de nubes en capas altas de la atmósfera[5]. Por otro lado, el aire es un vector de exposición a MNPs vía respiración. Así, aquellos MPs con tamaños menores de 10 µm son susceptibles de ser inhalados, pudiendo llegar a pasar al torrente sanguíneo los de menor tamaño[6] (Kopatz et al., 2023).

Pese a la importancia que la atmósfera tiene en la dispersión de MNPs y su posterior exposición inhalatoria, su estudio en este medio no ha recibido la misma atención que en otras matrices. Esta limitación se debe en parte a que no existe hoy en día una metodología normalizada para el muestreo y análisis de MNPs en aire[7]. Su menor tamaño, densidad y concentración hace que la detención de MNPs sea más compleja en aire que en otras matrices (como agua o alimentos). Como consecuencia de esto, existe una falta de conocimiento en cuanto a la ocurrencia y niveles de MNPs aéreos, lo cual tiene una relevancia especial en ambientes interiores, donde pasamos cerca el 90 % de nuestro tiempo y la concentración de estos contaminantes suele ser superior al exterior[8].

Para dar solución a esta limitación, se presenta el proyecto AeroPlastINT (Caracterización de Aerosoles en Espacios Interiores con Alta Presencia de Microplásticos). Este proyecto, en el que participan investigadores del Área de Contaminación Atmosférica, del Centro Nacional de Sanidad Ambiental (CNSA), y el Departamento de Ciencias Analíticas, de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), financiado por el Instituto Mixto de Investigación ISCIII-UNED, busca desarrollar metodologías que permitan el monitoreo de MNPs atmosféricos de una manera robusta y reproducible. Para ello, se explorará el uso de captadores activos de bajo volumen en el desarrollo de estrategias de muestreo de MNPs aéreos. Este tipo de captadores logran captar un volumen de aire suficiente (unos 55 m^3/día) para poder asegurar unos niveles de MNPs detectables, pero sin presentar los inconvenientes (voluminosidad, ruido) asociados a captadores de mayor volumen. Estos rasgos los hacen adecuados para el muestreo en ambientes interiores. Por otro lado, se estudiará el desempeño en cuanto a recuperación, repetibilidad y reproducibilidad que diferentes tipos de materiales (como fibra de vidrio, fibra de cuarzo, PTFE o acetato de celulosa) presentan como soporte de muestreo de MNPs atmosféricos.

Una vez desarrollada una metodología de muestreo robusta, se seleccionarán locales interiores que potencialmente puedan presentar una carga elevada de MNPs, como talleres de reparación de calzado y neumáticos, campos de césped artificial, gimnasios,

tiendas de arreglos de ropa y plantas de tratamiento de residuos. Para evaluar el efecto que factores ambientales y ocupacionales puedan tener sobre los niveles de estos contaminantes, se prevén dos campañas de muestreo: una en invierno y otra en verano. Posteriormente, las muestras de MNPs adquiridas serán sometidas a diferentes tipos de ensayos (SEM-EDX, micro-FTIR-ATR, Raman, GC-QTOF) para determinar su composición fisicoquímica. Una vez conocida esta, se procederá al estudio de posibles correlaciones entre los diferentes parámetros fisicoquímicos de los MNPs para estimar la contribución que diferentes actividades doméstico-laborales tienen en el total de MNPs aéreos. Finalmente, por medio de un modelo matemático de deposición en el tracto respiratorio, se conocerá la dosis de MNPs que queda retenida en cada parte de este, evaluándose los riesgos inhalatorios para cada ambiente estudiado.

Los resultados de este proyecto permitirán identificar el impacto que diversas fuentes y factores ocupacionales tienen sobre los riesgos potenciales que puede presentar la inhalación de MNPs por parte de trabajadores y usuarios de los diferentes espacios estudiados. En consecuencia, serán de gran utilidad para la implementación de estrategias de mitigación de estos riesgos en los ámbitos industrial, regulatorio y doméstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yang Z, DeLoid GM, Zarbl H, Baw J, Demokritou P. Micro- and nanoplastics (MNPs) and their potential toxicological outcomes: State of science, knowledge gaps and research needs. NanoImpact. 2023; 32:100481.

2. Roy P, Mohanty AK, Misra M. Microplastics in ecosystems: their implications and mitigation pathways. Environmental Science Advances. 2022; 1(1):9–29.

3. Winiarska E, Jutel M, Zemelka-Wiacek M. The potential impact of nano- and microplastics on human health: Understanding human health risks. Environmental Research. 2024; 251:118535.

4. Materić D, Kjær HA, Vallelonga P, Tison JL, Röckmann T, Holzinger R. Nanoplastics measurements in Northern and Southern polar ice. Environmental Research. 2022; 208:112741.

5. Aeschlimann M, Li G, Kanji ZA, Mitrano DM (2022). Potential impacts of atmospheric microplastics and nanoplastics on cloud formation processes. Nature Geoscience. 2022; 15 (12):967–75.

6. Kopatz V, Wen K, Kovács T, Keimowitz AS, Pichler V, Widder J, Vethaak AD, Hollóczki, O, Kenner L. Micro- and Nanoplastics Breach the Blood–Brain Barrier (BBB): Biomolecular Corona's Role Revealed. Nanomaterials. 2023; 13(8):1404.

7. Seo JH, Shin Y, Song I gyu, Lim J, Ok YS, Weon S. Atmospheric microplastics: Challenges in site- and target-specific measurements. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2024; 178:117859.

8. Eberhard T, Casillas G, Zarus GM, Barr DB Systematic review of microplastics and nanoplastics in indoor and outdoor air: identifying a framework and data needs for quantifying human inhalation exposures. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2024; *34*(2): 185–96.