

## EL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*) COMO UN SISTEMA MODELO PARA LA VALORACIÓN BIOLÓGICA DE LAS TOXINAS PRODUCIDAS POR LA MAREA ROJA

### THE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) AS A MODEL SYSTEM FOR BIOLOGICAL EVALUATION OF THE TOXINS PRODUCED BY THE RED TIDE

**Daniel Barrio** (Departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería. Sede Atlántica de la Universidad Nacional de Río Negro), **Agustín Avila** (Laboratorio de Salud Ambiental de Viedma. Centro de Biología y Toxicología Aplicada de Viedma, Río Negro), **Patricio Solimano** (Departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería. Sede Atlántica de la Universidad Nacional de Río Negro), **Lucrecia Piñuel** (Departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería. Sede Atlántica de la Universidad Nacional de Río Negro), **Patricia Boeri** (Departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería. Sede Atlántica de la Universidad Nacional de Río Negro), **Fany Zubillaga** (Departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería. Sede Atlántica de la Universidad Nacional de Río Negro) y **Gustavo E. Cantoni** (Laboratorio de Salud Ambiental de Viedma. Centro de Biología y Toxicología Aplicada de Viedma, Río Negro) - Argentina

#### Resumen

La extracción, producción y procesamiento de moluscos bivalvos presenta un inconveniente para la calidad e inocuidad agroalimentaria, dado que pueden estar contaminados con toxinas marinas. El consumo de mariscos infectados causa intoxicaciones graves, lo que constituye un problema para la salud de la población. Es necesario entonces contar con un método rápido, sensible y específico para determinar su presencia. El bioensayo en ratón es el procedimiento oficial utilizado (AOAC 2012), sin embargo la polémica en torno al uso de mamíferos en ensayos, sumada a los problemas y limitaciones inherentes a su realización, han impulsado el desarrollo de otros métodos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad de biotoxinas marinas para desarrollar un bioensayo de detección y cuantificación en moluscos bivalvos utilizando el modelo del pez cebra. Las tres toxinas (STX, AO y AD) causaron la inhibición del desarrollo de embriones del pez cebra entre las 2 y 48 horas posfertilización. Los efectos tóxicos dependieron de la dosis, y STX fue la más potente (DL50: 0,5 µg de STX / ml; 3,3 µg de AO / ml y 12 µg de AD / ml). El ensayo con peces adultos inyectados intraperitonealmente con las tres toxinas mostró resultados satisfactorios para generar un bioensayo de valoración de STX, AO, AD y sus correspondientes congéneres. La dosis letal cincuenta para las tres toxinas fue: 5,6 ng de STX/g de pez, 500 ng de AO/g de pez y 2700 ng de AD/g de pez, respectivamente, mientras que el límite de cuantificación fue de 10 ng de STX/g de pez, 1000 ng de AO/g de pez y 4000 ng de AD/g de pez, respectivamente. En conclusión, el modelo del pez cebra adulto podría ser utilizado para la valoración biológica de toxinas marinas (STX, AO y AD).

**Palabras clave:** Marea roja, pez cebra, bioensayo de toxinas

#### Abstract

The extraction, production and shellfish processing presents an inconvenience for the quality and food safety because it may be contaminated with marine toxins. The consumption of shellfish contaminated with toxins produce severe poisoning, being a problem for the human health, so it is necessary to have a rapid, sensitive and specific method to determine its presence. The mouse bioassay is the standard method (AOAC 2012), but the controversy surrounding the use of mammals in testing, associated with the problems and limitations inherent in its implementation, promotes the development of new methods. The aim of this project is to develop a bioassay for detecting marine toxins in shellfish using the zebrafish model. The three toxins (STX, AO and AD) caused the inhibition of the zebrafish embryos development between 2 and 48 hpf. Toxic effects were dose dependent and the most potent was STX (LD50: 0,5 µg STX/ml; 3,3 µg AO/ml and 12 µg AD/mL). Adult zebrafish injected i.p. with the three toxins showed satisfactory results to develop a bioassay for evaluating STX, AO, AD and their related molecules. The lethal dose 50 to three toxins was 5,6 ng STX/g of fish, 500 ng AO/g of fish and 2700 ng AD/g of fish, respectively. The limit of quantification was 10 ng STX/g of fish, 1000 ng AO/g of fish and 4000 ng AD/g of fish, respectively. In conclusion, the adult zebrafish model could be used for biological evaluation of marine toxins (STX, AO and AD).

**Keywords:** Red Tide, zebrafish, bioassay toxins

## INTRODUCCIÓN

La extracción, producción y procesamiento de moluscos bivalvos presenta un inconveniente para la calidad e inocuidad agroalimentaria, dado que pueden estar contaminados con toxinas marinas. La explotación agroalimentaria de la Costa Atlántica argentina requiere de una vigilancia exhaustiva, porque representa una potencial amenaza para la salud humana. En particular, todos los lotes de moluscos bivalvos deben ser controlados para garantizar su calidad e inocuidad, ya que pueden estar contaminados con toxinas marinas. El origen de estas toxinas son las floraciones algales nocivas, conocidas como marea roja, que desarrollan proliferaciones de microorganismos planctónicos pigmentados entre los que se encuentran microalgas, ciliados y bacterias. Los síndromes tóxicos más conocidos causados por microalgas son la intoxicación paralizante por marisco (causado por Saxitoxina [STX] y sus congéneres), la intoxicación diarreica por marisco (causado por ácido Okadaico [AO] y análogos) y la intoxicación amnésica por marisco (causado por el ácido Domoico [AD] como principal componente) (Sar *et al.*, 2002).

Los episodios tóxicos asociados al consumo de mariscos constituyen un problema para la seguridad alimentaria, puesto que en la mayoría de los casos causan la muerte, por ello es necesario contar con un método rápido, sensible y específico para determinar el contenido y la presencia de toxinas. El bioensayo en ratón es el método oficial utilizado (AOAC 2012); sin embargo, la polémica en torno al uso de mamíferos en ensayos, los costos y las limitaciones inherentes a su realización impulsan el desarrollo de nuevos métodos. Actualmente, se está trabajando en diferentes estrategias y modelos entre los que se incluyen ensayos farmacológicos, inmunoensayos, ensayos químicos o de separación y bioensayos alternativos para mejorar la confiabilidad, precisión y especificidad, y disminuir los costos (Etheridge, 2010; Berry *et al.*, 2007; Mons *et al.*, 1998). Los métodos químicos (HPLC) tienen la capacidad de discriminar gran parte de las toxinas, aunque no es posible identificarlas a todas. Además, es una metodología que requiere de equipamiento complejo y costoso, y de personal calificado, lo que limita su adopción por la mayoría de los laboratorios. Los métodos inmunológicos (ELISA, RIA, EIA) son

precisos y específicos, pero tienen un alto costo y baja efectividad (Ben-Gigirey y Villar-Gonzalez, 2008).

El embrión del pez cebra (*Danio rerio*) es ampliamente utilizado como modelo vertebrado de estudio en diferentes áreas del conocimiento, el *screening*, la búsqueda de nuevas drogas y la toxicología (Nagel, 2002; Spitsbergen y Kent 2003; Hill *et al.*, 2005). Las ventajas del modelo son la simplicidad, la economía de mantenimiento y la reproducción (se puede contar con 200 embriones semanales por hembra); los ensayos pueden realizarse en platos de 96 pocillos que requieren poca cantidad de toxina para el estudio. Además, es posible llevar a cabo ensayos rápidos en adultos utilizando diferentes vías de administración: oral, inyección intramuscular e intraperitoneal. Este sistema se aplica cada vez más para el estudio de toxinas microbianas y más específicamente para investigar toxinas marinas (Tiedeken, 2005; Wang *et al.*, 2005; Lefebvre *et al.*, 2004 y 2009; Purdie, 2009).

El grupo de investigación del doctor John P. Berry (2007) de la Universidad de Miami desarrolló un método para la detección y caracterización de toxinas provenientes de algas marinas y de agua dulce. En particular, trabajaron con toxinas lipofílicas que afectaron el desarrollo de embriones del pez cebra. Este método es sensible y contribuye al entendimiento de los mecanismos de acción de estas toxinas, sin embargo no resulta rápido ni eficaz como bioensayo de control para los lotes de bivalvos a fin de ser liberados al mercado. Por otro lado, Lefebvre y col. (2009) utilizaron peces cebra adultos en ensayos con ácido Domoico y toxina amnésica mediante administración intraperitoneal. Estos estudios se llevaron a cabo con el fin de analizar dosis subletales y evaluar los mecanismos de acción del ácido Domoico. Aunque no se realizó con el fin de desarrollar un método para la determinación de toxinas marinas, la vía de administración de este ensayo resulta de gran interés, dado que puede ser utilizada para la optimización de un bioensayo de cuantificación de toxinas marinas.

Estas características convierten al pez cebra en un modelo vertebrado muy versátil y apto para estudios *in vivo* de toxicidad, cuya instalación en los laboratorios de toxicología permitiría, adicionalmente, la adopción de nuevas técnicas para la realización de ensayos en alimentos, aguas residuales y otras matrices (Scholz *et al.*, 2008).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

El ácido Okadaico y el ácido Domoico fueron comprados en Sigma (Sigma-Aldrich, USA) y producidos en Canadá, país desde donde fue importada la Saxitoxina. La línea de pez cebra wt AB fue donada por la Dra. Kathleen Withlock del Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, Chile. Se utilizó el alimento para peces de la marca TetraMin pro (Tetra Holding US Inc., Alemania).

### Preparación de extractos

Los extractos de moluscos bivalvos utilizados fueron obtenidos por el Laboratorio de Salud Ambiental de Viedma (Centro de Biología y Toxicología Aplicada de Viedma, Río Negro) mediante la metodología oficial (AOAC) y evaluados por el método del ratón. Las toxinas se extrajeron de los tejidos blandos de los bivalvos, previa homogeneización en HCl. Para obtener la toxina paralizante, Saxitoxina y sus congéneres, se realiza una extracción acuosa ácida, y para la toxina diarreica, ácido Okadaico y sus análogos, se recurre a una extracción con solventes orgánicos.

### Mantenimiento de peces cebra y producción de huevos fertilizados

Los peces cebra de la cepa wt AB de 4 a 12 meses de edad fueron mantenidos en peceras con agua pura libre de cloro a una temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  con sistema de burbujeo de aire para mantener la saturación de oxígeno. Los reproductores fueron criados en una relación de una hembra cada dos machos en peceras con un pez por litro de agua con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Los peces fueron alimentados una vez al día con artemias (*Artemia persimilis*) obtenidas en el laboratorio a partir de huevos comerciales (VitaFish, Argentina) y tres veces por día con alimento comercial para peces tropicales.

### Ensayo de toxicidad con huevos

Huevos fertilizados del pez cebra (embriones) fueron incubados en platos de 24, 48 o 96 pocillos en un rango definido de cinco concentraciones de extracto o toxina pura. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en las guías de la OECD (Guideline for the testing of chemicals 2006, OECD). En un plato multipocillo, se agregaron las diferentes diluciones de los extractos o toxinas para ensayar. Se reservaron pocillos para los controles sin el agregado de toxina, en los casos en los que se utilizó DMSO se incluyó en los controles. Los huevos fertilizados fueron colocados en los pocillos del plato con la asistencia de una pipeta Pasteur. Luego, a las 24 y 48 horas de exposición, fueron evaluadas las siguientes características (*apical endpoints*): número de huevos coagulados, irregularidades en la formación de somites, no despegado de la cola, ausencia del latido cardíaco, edemas y malformaciones en general. Los embriones fueron considerados muertos cuando una de las características descriptas fue observada.

### Ensayo de toxicidad con peces cebra adultos

Los peces adultos de 0,4 a 0,6 g fueron inoculados con diferentes concentraciones de toxina para hallar la dosis y el tiempo que produce ataxia, convulsiones, nado deficiente o la muerte. Las toxinas puras o los extractos se administraron por vía intraperitoneal (Figura 1). Se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de toxina o extracto en solución fisiológica y luego los peces fueron inyectados intraperitonealmente con dosis crecientes de toxina. Posteriormente, se evaluó el comportamiento de los peces, y se registraron los tiempos y dosis mínimas necesarias para causar la muerte o un efecto tóxico detectable como se especificó previamente.

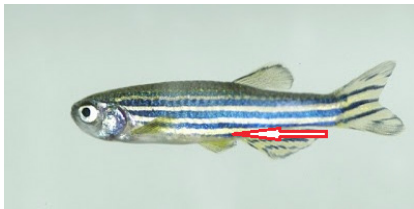
### Ensayo de recuperación de STX

La Saxitoxina se incorporó en dos niveles (4 y 20  $\mu\text{g/g}$  de molusco) en muestras de bivalvos libres de toxina y se homogeneizó en ultraturrax por 5 minutos a 10.000 rpm, luego se realizó la extracción ácida en caliente con HCl 0,1 N de acuerdo a protocolo estándar. El extracto centrifugado a 10.000 xg 10 minutos se inyectó en peces adultos según lo descrito previamente.

## Tratamiento de los resultados

Los resultados fueron evaluados mediante un análisis de ANOVA, test-t de student y el método de Probit.

Figura 1. Inyección intraperitoneal en pez cebra



Peces cebra adultos fueron inoculados con 30  $\mu$ l de extracto o solución de toxina pura intraperitonealmente utilizando jeringas de 300  $\mu$ l y agujas de 32 G.

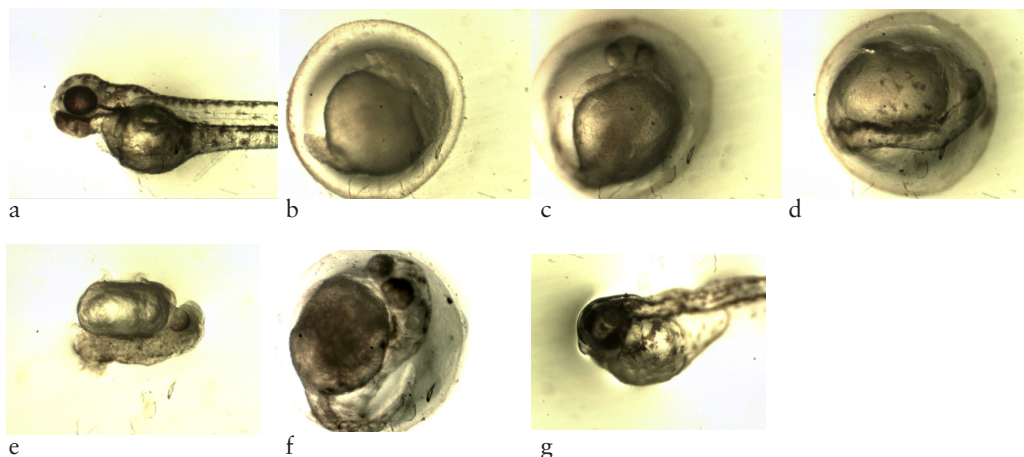
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inhibición del desarrollo de embriones del pez cebra

Mediante el modelo de huevos fertilizados (embriones) del pez cebra, se estudió la toxicidad de STX, AO y AD. Las tres toxinas causaron la inhibición del desarrollo de embriones de pez cebra entre las 2 y las 48 horas posfertilización (Figura 2). Los efectos tóxicos fueron dependientes de la dosis, STX fue la más potente (DL50: 0,5  $\mu$ g/ml). La Gráfico 1 muestra una

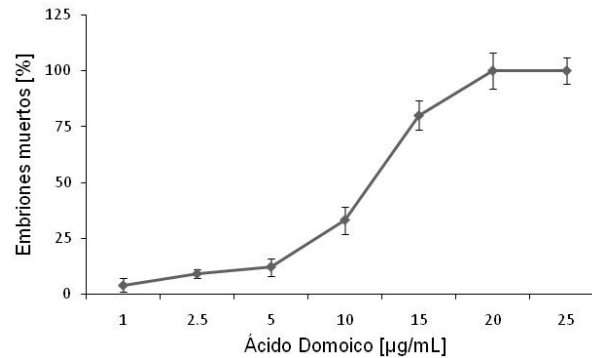
curva dosis-respuesta para el ácido Domoico. A partir de estas gráficas y utilizando el método de Probit, se calcula la dosis letal cincuenta (DL50). En la Tabla 1 se muestran los resultados para la DL50 de cada una de las toxinas estudiadas, los límites de detección del método del ratón y los valores de aceptación para consumo humano en equivalentes de STX, AO y AD [ $\mu$ g/ml]. El modelo de embriones de pez cebra puede ser utilizado para la valoración biológica de las tres toxinas. El ácido Domoico es el que mayor seguridad presentaría, dado que los límites de aceptación y de detección en ratones es diez y veinte veces superior a la DL50, respectivamente. Para el ácido Okadaico, el valor de DL50 y los límites antes mencionados son similares. Por su parte, la Saxitoxina muestra valores similares entre DL50 y los límites de aceptación y detección; sin embargo, el extracto de Saxitoxina se obtiene con HCl 0,1 N, y el medio ácido afecta la viabilidad de los huevos. La neutralización del extracto podría modificar la toxicidad de Saxitoxina y sus análogos (Nagashima *et al.*, 1991; Alfonso *et al.*, 1994), razón por la cual el método de embriones del pez cebra no sería apropiado para la valoración biológica de esta toxina y sus análogos. Finalmente, el objetivo de este trabajo fue buscar un método simple, económico y rápido para reemplazar el método del ratón; y aunque el método de embriones del pez cebra reúne las dos primeras características, podría demandar hasta 48 horas para obtener el resultado.

Figura 2. Embriones de pez cebra en diferentes estados de desarrollo en presencia de 12  $\mu$ g/ml de ácido Domoico



Los huevos fertilizados del pez cebra fueron incubados 1 hpf con 12 µg/ml de ácido Domoico y se registraron imágenes representativas de las malformaciones y defectos que causa la toxina. a) control, b - g) embriones con defectos de desarrollo embrionario.

Gráfico 1. Curva dosis respuesta de ácido domoico en embriones del pez cebra



Los huevos fertilizados del pez cebra se incubaron en presencia de diferentes dosis de ácido domoico y se determinó el número de embriones muertos en un período de 48 h. La gráfica representa los porcentajes de acumulación de embriones muertos en función de la concentración.

Tabla 1. Dosis letal cincuenta y límites de detección y aceptación para el modelo de embriones del pez cebra

Toxina	DL50	Límite de detección. Modelo del ratón	Límite de aceptación para consumo humano
Saxitoxina [µg/ml]	0,5 ± 0,1	0,3	0,4
Ácido Okadaico [µg/ml]	3,3 ± 0,1	4,0	0,8
Ácido Domoico [µg/ml]	12,0 ± 0,1	200	100

Los embriones del pez cebra fueron incubados en presencia de diferentes concentraciones de STX, AO, AD. La dosis letal cincuenta (DL50) fue calculada a partir de curvas dosis respuesta. El límite de detección para cada toxina fue determinado con el modelo del ratón y el límite de aceptación es el establecido para consumo humano (Sar *et al.*, 2002).

#### Toxicidad de STX, AO y AD administrados intraperitonealmente en peces cebra adultos

A través del modelo del pez cebra adulto, se estudió la toxicidad de STX, AO y AD administrada intraperitonealmente. Las tres toxinas causaron efectos tóxicos y letales según la dosis y el tiempo.

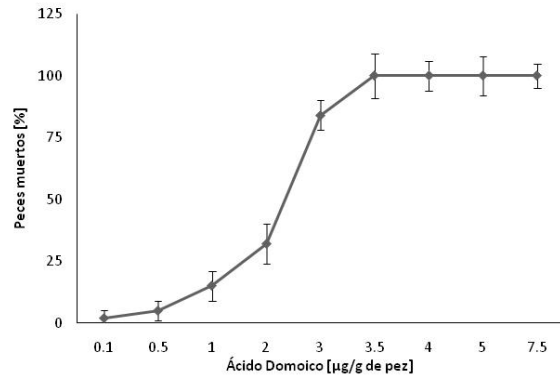
A partir de curvas dosis-respuesta se determinó el rango de trabajo, la dosis tóxica y letal cincuenta (DT50 y DL50). Además, se estimaron los límites de cuantificación y detección para las tres toxinas sobre la base del total de los individuos que manifestaron efectos tóxicos o letales.

### Ácido Domoico

En la Gráfico 2, se muestran los resultados de la curva dosis-respuesta para el ácido Domoico. Los peces se consideraron muertos cuando no movían sus opérculos y no respondían a estímulos físicos (estímulo lateral con varilla de vidrio) en un tiempo menor o igual a veinte minutos. Por su parte, la Gráfico 3 muestra la curva dosis-respuesta para los efectos tóxicos no letales (nado deficiente y característico en círculos, cabezazos, ataxia y nado con el vientre hacia arriba), que se observaron a partir de los dos minutos durante las primeras tres horas y fueron reversibles. Según la dosis, los efectos tóxicos desaparecieron entre las 4 y 12 horas posteriores a la inyección. A partir de estas curvas, se determinó la dosis a la cual no se observaron efectos tóxicos (NOAEL: 0,01 ng AD/g de pez) y la mínima dosis a la que se observaron efectos tóxicos en al menos algún individuo (LOAEL: 0,05 ng AD/g de pez). El tiempo de muerte y los efectos tóxicos o letales se observaron a partir del minuto de realizada la inyección intraperitoneal.

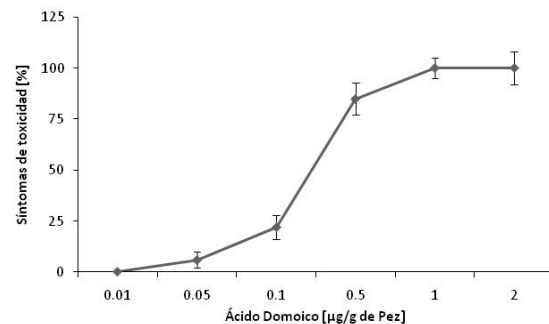
El límite de cuantificación estimado para el AD fue de 4 µg/g de pez. Los peces utilizados para el ensayo son de 0,4 a 0,6 g a los cuales se les administró una dosis de 30 µl de extracto. Es posible detectar entre 2,1 y 3,2 µg de AD/g de molusco realizando la extracción en condiciones estándar para el ensayo de AD. Estos valores son inferiores a los reportados utilizando el modelo del ratón, cuyo límite de detección es 40 µg de AD/g de molusco. Por otro lado, el límite aceptado de ácido Domoico es de 20 µg de AD/g de molusco. Estos resultados y los límites aceptados de AD en moluscos sugieren que el método del pez cebra es apropiado para la detección y cuantificación de ácido Domoico en moluscos bivalvos.

Gráfico 2. Curva dosis respuesta (muerte) de ácido domoico en peces adultos inyectados intraperitonealmente



Los peces fueron inmovilizados parcialmente con frío (agua de baño 8 °C), inyectados intraperitonealmente con diferentes dosis de ácido domoico y liberados en agua a 28 °C. Se registró el comportamiento, tiempo y porcentaje de muerte de los peces.

Gráfico 3. Curva dosis respuesta (comportamiento) de ácido domoico en peces adultos inyectados intraperitonealmente



Los peces fueron inmovilizados parcialmente con frío (agua de baño 8 °C), inyectados intraperitonealmente con diferentes dosis de ácido domoico y liberados en agua a 28 °C. Se registró el comportamiento de los peces.

### Ácido Okadaico

Las curvas dosis-respuesta para el AO se realizaron considerando que los peces estaban muertos cuando no movían sus opérculos y no respondían a estímulos físicos (estímulo lateral con varilla de vidrio) en un tiempo menor o igual a 24 horas. Por otro lado, se realizó la curva dosis-respuesta para efectos tóxicos no letales (nado deficiente, falta de flotabilidad y ataxia). Los síntomas reversibles se detectaron a partir de los cinco minutos de practicada la inyección intraperitoneal y durante las primeras doce horas. De acuerdo a la dosis, los efectos tóxicos desaparecieron entre las 12 y 24 horas posteriores a la inyección. A partir de estas curvas, se determinó la dosis a la cual no se observaron efectos tóxicos (NOAEL: 10 ng AO/g de pez) y la mínima dosis a la que se observaron efectos tóxicos en al menos algún individuo (LOAEL: 100 ng AO/g de pez).

La dosis letal cincuenta para el AO fue de 500 ng de AO/g de pez, mientras que para el ratón es de 200 ng de AO/g de ratón. Por lo tanto, para lograr una cuantificación similar a la del modelo del ratón, será necesario modificar la cantidad de muestra utilizada para la extracción de la toxina o resuspender el extracto en un menor volumen, para luego realizar la validación correspondiente.

### Saxitoxina

La curva dosis-respuesta para Saxitoxina se realizó considerando que los peces estaban muertos cuando

no movían sus opérculos y no respondían a estímulos físicos (estímulo lateral con varilla de vidrio) en un tiempo menor o igual a 30 minutos. Los efectos tóxicos no letales (nado deficiente, convulsiones, ataxia y nado con el vientre hacia arriba) se evaluaron para las dosis subletales y se observaron a partir de los dos minutos durante las primeras cinco horas y fueron reversibles. Dependiendo de la dosis, los efectos tóxicos desaparecieron entre las cinco y doce horas posteriores a la inyección. A partir de estas curvas, se determinó la dosis a la cual no se observaron efectos tóxicos (NOAEL: 0,1 ng/g) y la mínima dosis a la que se observaron efectos tóxicos en al menos algún individuo (LOAEL: 0,5 ng/g). Por otro lado, se realizaron curvas de tiempo de muerte para dosis letales. Se observó una relación lineal entre la dosis y el tiempo de muerte ( $p < 0,01$ ). El rango de linealidad fue 10 a 30 ng de STX/g de pez. Dosis superiores no se diferenciaron en el tiempo de muerte.

El límite de cuantificación estimado para la STX fue de 10 ng/g de pez. Los peces utilizados para el ensayo son de 0,4 a 0,6 g a los cuales se le administró una dosis de 30 µl de extracto. Es posible detectar entre 26 y 40 µg de STX/100 g de carne de molusco realizando la extracción en condiciones estándar para el ensayo de STX. Estos valores son similares a los reportados con el modelo del ratón, cuyo límite de detección está entre 32 y 58 µg de STX/100 g de carne de molusco. Los resultados sugieren que el método del pez cebra es apropiado para la detección y cuantificación de toxina paralizante. El máximo nivel aceptado para el consumo humano es de 80 µg equivalentes de STX por 100 g de carne de molusco (Sar *et al.*, 2002).

Tabla 2. Dosis intraperitoneales letales y tóxicas para el modelo del pez cebra adulto

Parámetro [ng/g de pez]	Saxitoxina	A. Okadaico	A. Domoico
DL50	5,6 ± 1,5	500 ± 125	2700 ± 700
Límite de cuantificación	10	1000	4000
Dosis tóxica cincuenta	1,7 ± 0,5	150 ± 50	280 ± 90
Límite de detección	5	250	1000

A partir de curvas dosis respuesta (muerte) se determinó la dosis letal cincuenta como la dosis que mató el 50 % de los peces y el límite de cuantificación como la concentración que produjo la muerte del total de los individuos. Las curvas dosis respuesta (comportamiento anómalo de los peces) permitieron calcular la dosis tóxica cincuenta

y el límite de detección, el cual se calculó como la dosis que afectó el comportamiento de todos los peces sin causar la muerte.

### Ensayo de recuperación de STX

Se realizaron ensayos de recuperación de Saxitoxina a partir de homogenatos de bivalvos libres de toxina a los cuales se les incorporó la toxina en dos niveles (4 y 20 µg de STX/g de molusco). Los valores de recuperación para tres repeticiones fueron: para el nivel bajo, de  $90 \pm 17 \%$ , y para el nivel alto, de  $87 \pm 15 \%$ , no mostrando diferencias significativas. Los valores de recuperación fueron aceptables de acuerdo a los límites de detección y cuantificación del modelo del pez cebra.

### Toxicidad de extractos ácidos de bivalvos administrados intraperitonealmente en peces cebra adultos

Por último, se llevaron a cabo ensayos en el pez cebra con extractos de moluscos para valorar toxina paralizante y se compararon con los realizados en ratones. Se utilizó un extracto negativo y otro con un título de 500 UR. El resultado expresado en UR para el ensayo con peces fue  $624 \pm 140$  UR, correspondientes a 123 µg equivalentes de STX/100 g de molusco. No se encontraron diferencias significativas para ambos métodos. Estos resultados muestran que es posible utilizar el modelo del pez cebra para valorar biológicamente Saxitoxina en extractos de moluscos bivalvos.

### CONCLUSIÓN

El modelo del pez cebra adulto podría ser utilizado para la valoración biológica de toxinas marinas (STX, AO y AD) a partir de extractos ácidos o lipofílicos de acuerdo a la toxina investigada.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Río Negro, al Servicio Nacional de Sanidad y

Calidad Agroalimentaria (Senasa) y al Laboratorio de Salud Ambiental de Viedma (Centro de Biología y Toxicología Aplicada de Viedma, Río Negro).

Daniel A Barrio es miembro de la carrera del investigador de CONICET.

El trabajo fue financiado con el primer premio al proyecto de investigación, transferencia y comunicación en sanidad, calidad e inocuidad agroalimentaria otorgado por el Senasa en diciembre de 2013.

### BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, A.; Louzao, M. C.; Vieytes, M. R. y L. M. Botana (1994), "Comparative study of the stability of saxitoxin and neosaxitoxin in acidic solutions and lyophilized samples", *Toxicon* 32, pp. 1593-1598.
- Ben-Gigirey, B. y A. Villar-Gonzalez (2008), "Chemistry, metabolism and chemical analysis", en Botana, L. M. (ed.), *Seafood and Fresh water Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 177-196.
- Berry, J. P.; Patrick, M. G.; Gibbs, D. L. y M. C. Schmale (2007), "The zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae", *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145 (1), pp. 61-72.
- Etheridge, S. M. (2010), "Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives", *Toxicon* 56, pp. 108-122.
- Guideline for the testing of chemicals (2006), OECD. Fish embryo toxicity (FET) test. Draft OECD guideline for the testing of chemicals [en línea]. Disponible en: <<http://oecd.org/dataoecd/39/59/36817070.pdf>>.
- Hill, A. J.; Teraoka, H.; Heideman, W. y R. E. Peterson (2005), "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity", *Toxicological Sciences* 86, pp. 6-19.



- Horwits W. y G. W. Latimer (eds.) (2005), *Official Methods of Analysis of AOAC*, Washington DC, Association of Official Analytical Chemists.
- Lefebvre, K. A.; Trainer, V. L. y N. L. Scholz (2004), "Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin", *Aquatic Toxicology* 66, pp.159-170.
- Lefebvre, K. A.; Tilton, S. C.; Bammler, T. K.; Beyer, R. P.; Srinouanprachan, S.; Stapleton, P. L.; Farin, F. M. y E.P. Gallagher (2009), "Gene Expression Profiles in Zebrafish Brain after Acute Exposure to Domoic Acid at Symptomatic and Asymptomatic Doses", *Toxicological Sciences* 107 (1), pp. 65-77.
- Mons, M. N.; Van Egmond, H. P. y G. J. A. Speijers (1998), "Paralytic shellfish poisoning: A review" [en línea]. Disponible en: <<http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/10000/1/388802005.pdf>> (RIVM Report 388802 005).
- Nagashima, Y.; Noguchi, T.; Tanaka, M. y K. Hashimoto (1991), "Thermal degradation of paralytic shellfish poison", *J. Food Sci.* 56, pp. 1572-1575.
- Nagel, R. (2002), "DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* a general model in ecotoxicology and toxicology", *Altex* 19, pp. 38-28
- Purdie, E. L.; Samsudin, S.; Eddy, F. B. y G. A. Codd (2009), "Effects of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*)", *Aquatic Toxicology* 95, pp. 279-284.
- Sar, A. A.; Ferrario, M. E. y B. Reguera (eds.) (2002), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*, Instituto Español de Oceanografía [en línea]. Disponible en: <naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>.
- Scholz, S.; Fischer, S.; Gündel, U.; Küster, E; Luckenbach, T y D. Voelker (2008), "The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing", *Environ Sci. Pollut Res.* 15, pp. 394-404.
- Spitsbergen, J. M. y M. L. Kent (2003), "The state of the art of the Zebrafish model for toxicity and toxicologic pathology research advantages and current limitations", *Toxicol Pathol* 31, pp. 63-87.
- Tiedeken, J. A.; Ramsdell, J. S. y A. F. Ramsdell (2005), "Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*)", *Neurotoxicol. Teratol* 27, pp. 711-717.
- Wang, P. J.; Chien, M. S.; Wu, F. J.; Chou, H. N. y S. J. Lee (2005), "Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, *Danio rerio*", *Toxicol* 1, 45 (3), pp. 303-308.