



## Un pez en el viñedo

*Uso del modelo animal pez cebrá para  
evaluar las diferencias entre diferentes  
tratamientos fitosanitarios*

**Sandra Rainieri, Alejandro Barranco**

[srainieri@azti.es](mailto:srainieri@azti.es)  
[abarranco@azti.es](mailto:abarranco@azti.es)

Barcelona, 5 Abril 2017



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea



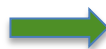
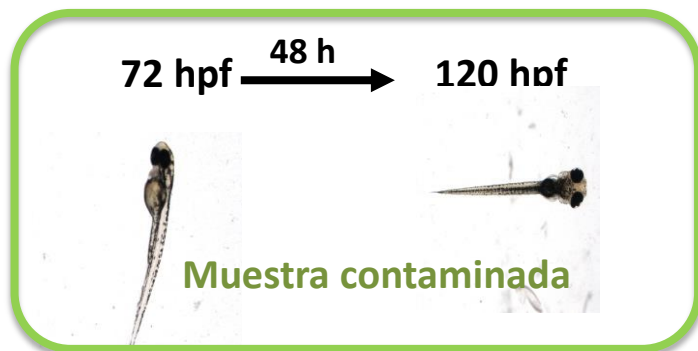
Evaluación del impacto de los nuevos tratamientos sobre:

- Salud de los consumidores
- Medioambiente

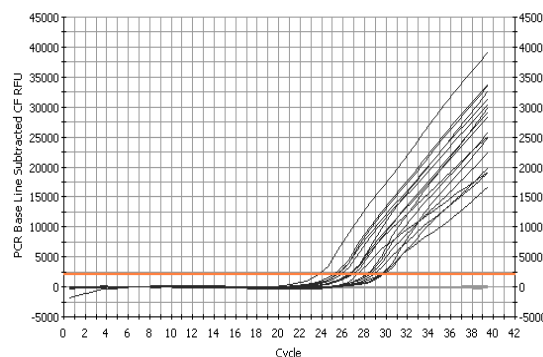


¿Cómo?

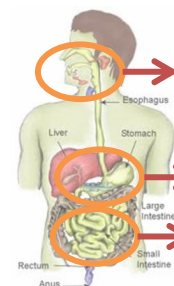
## 1. Exposición a embriones de pez cebra



## 2. Expresión génica



## 3. Ensayos de bio-accesibilidad *in vitro*



Boca

Digestión gástrica

Intestino



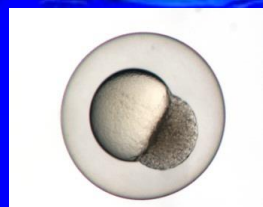
# ZEBRAFISH (*Danio rerio*)



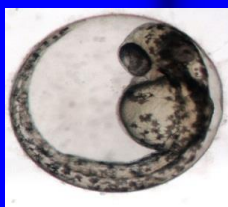
- Fácil y económico de mantener
- Reproducción externa (100 huevos/hembra/día)
- Embriones y larvas transparentes
- Genoma secuenciado
- Éticamente buen sistema – test alternativo

## MODELO CONOCIDO

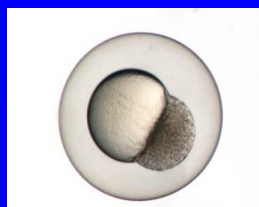
- Biología del desarrollo
- Enfermedades humanas
- Desarrollo de fármacos
- Eco-toxicología
- Alimentación
- .....



5 hpf



2 dpf



5 hpf



5 dpf

→ Alimentación espontanea (animal de laboratorio)



## TEST DE TOXICIDAD

### Contaminantes alimentarios

- Pesticidas
- Metales pesados (MeHg, Cd, As)
- Compuestos perfluorados (PFOA, PFOS, PFNA)
- HAPs y metabolitos
- Microplásticos
- Estudio de mezclas
- Toxinas marinas

### Nuevos ingredientes alimentarios

- Nanopartículas (AgNPs, TiO<sub>2</sub>NPs)
- Ingredientes funcionales

INVESTIGACIÓN ALIMENTARIA

ALIMENTACIÓN ANIMAL



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea





## TEST DE EFECTIVIDAD

**Ingredientes funcionales, extractos naturales, residuos de procesos industriales...**

- Inmunoestimulantes
- Anti-inflamatorios
- Probióticos (*Lactobacillus* ssp. Etc.)
- Prebióticos
- Antioxidantes
- Moléculas reguladoras del metabolismo lipídico

## Microbiota

- Modelo de infección e interacción con patógenos
- Interacción microbiota-huesped



**INVESTIGACIÓN ALIMENTARIA**

**ALIMENTACIÓN ANIMAL**



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea





- **Estudio con muestras reales (vino, mosto y uva).**
  - Optimización del tratamiento de la muestra. Dilución, pre-concentración, fraccionamiento...
- **Selección de genes biomarcadores.**



Mecanismo de acción de los fitosanitarios puede relacionarse con:

- 1) Producción estrés oxidativo
- 2) Inhibición del desarrollo
- 3) Ambos



***Cyp1a1***: involucrado en sistemas de detoxificación y en la síntesis de esteroides

***Il1b***: relacionado con la respuesta del sistema inmune.

***Gstp1***: se sobre-expresa en presencia de estrés oxidativo



## Muestras reales.

### Mosto y vino

- Ajuste a pH 7 con NaOH
- Filtrado por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$
- Extracción líquido-líquido con acetona. Se forman dos fracciones



#### Fracción 1

- <1% del volumen total
- Muy coloreado

Evaporación acetona

Dilución en embryowater

Dilución final 1:50

#### Fracción 2

- >99% del volumen total
- Incoloro

Evaporación acetona

Dilución en embryowater

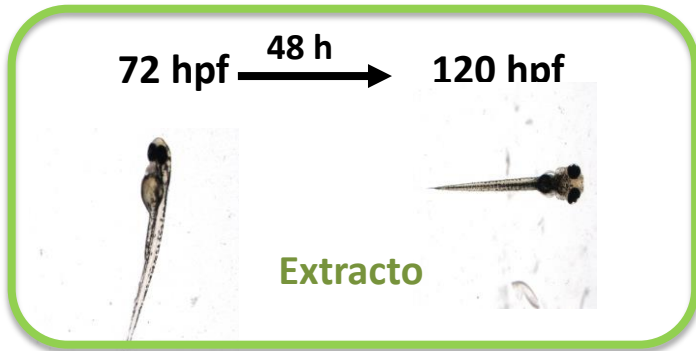
Dilución final 1:50



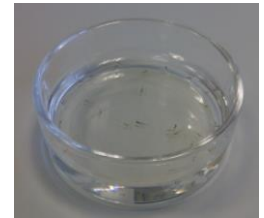
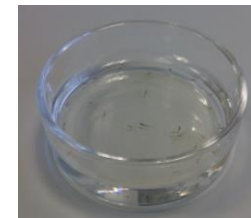
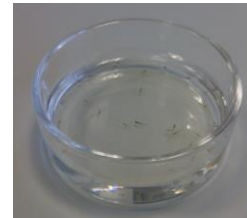


# PREPARACIÓN MUESTRAS





Exposición a extracto muestra contaminada



- Extracción RNA
- Evaluación expresión génica diferencial: ***cyp1a1***  
***il1 $\beta$***   
***gstp1***



## Muestras Laguardia

	No tratado									Residuo cero									Fitosanitario tradicionales									Acumulación est. fenológico									Estación meteorológica								
Muestra	1A			7A			11A			2B			6B			13B			4D			8D			15D			5E			10E			14E			3C			9C			12C		
Genes	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g
Uva																																													
Mosto																																													
Vino																																													

## Muestras Aia

	No tratado									Residuo cero									Fitosanitario tradicionales									Estación meteorológica								
Muestra	1A			7A			12A			3B			5B			9B			2D			6D			10D			4E			8E			11E		
Genes	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g	c	i	g			
Uva	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
Mosto	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
Vino	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		

- Gen inducido
- Gen reprimido
- Gen no afectado
- No determinado

### Genes testados

c = *cyp1a1*  
i = *il1β*  
g = *gstp1*



## Objetivo 1

- Relacionar los efectos observados con los tratamientos

## Tratamientos

- En total se han llevado 5 tipos de tratamientos diferentes.
- Uno de ellos, según el parámetro sumatorio de grados-día, sólo se ha llevado a cabo en Laguardia.

## Resultados

- Tomando todos los datos en su conjunto se observa una gran dispersión en los resultados que impide asociar los efectos observados con los tratamientos aplicados. Por lo tanto no se puede establecer una correcta clasificación (<50%).
- Separando la información por lugar, tampoco se puede establecer una correcta clasificación (<50%).



Hacen falta más muestras: Campaña 2016



## Objetivo 2

- Relacionar los efectos observados con el lugar de la parcela

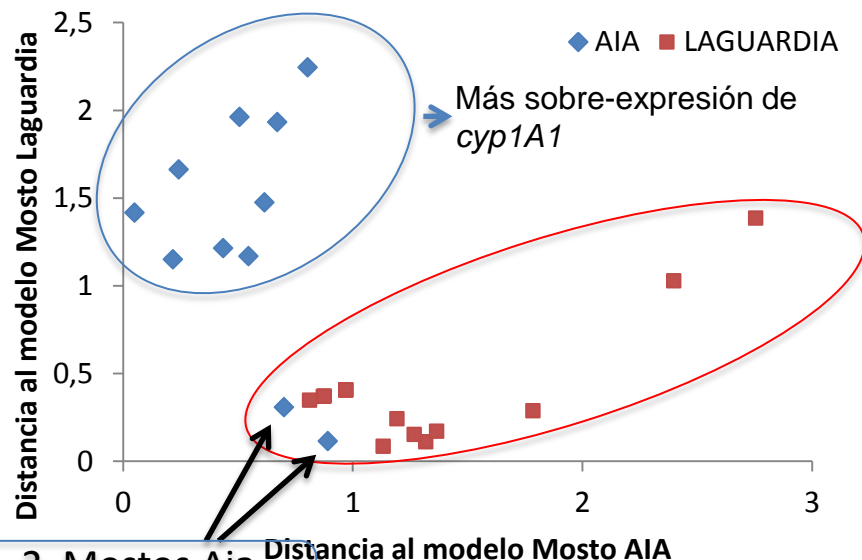
## Parcelas

- Dos parcelas: AIA (Txakoli) y LAGUARDIA (Vino tinto)

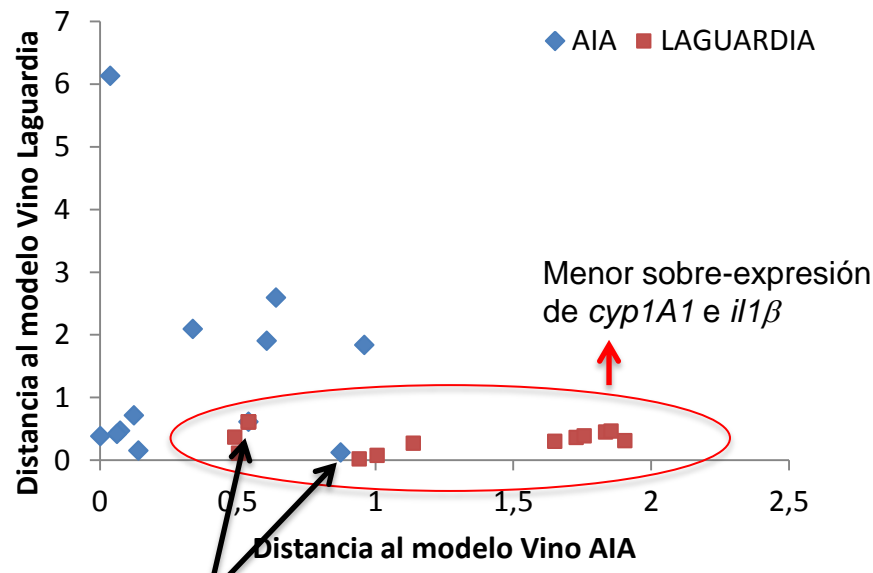
## Resultados

- Las muestras de uva no se pueden distinguir

### MOSTO

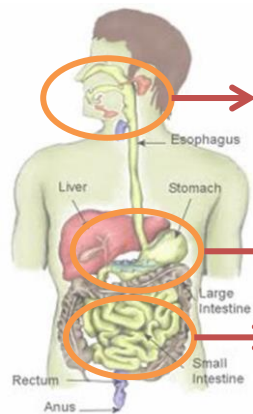


### VINO





Fracción soluble después de la digestión de los alimentos que puede ser absorbida en el intestino

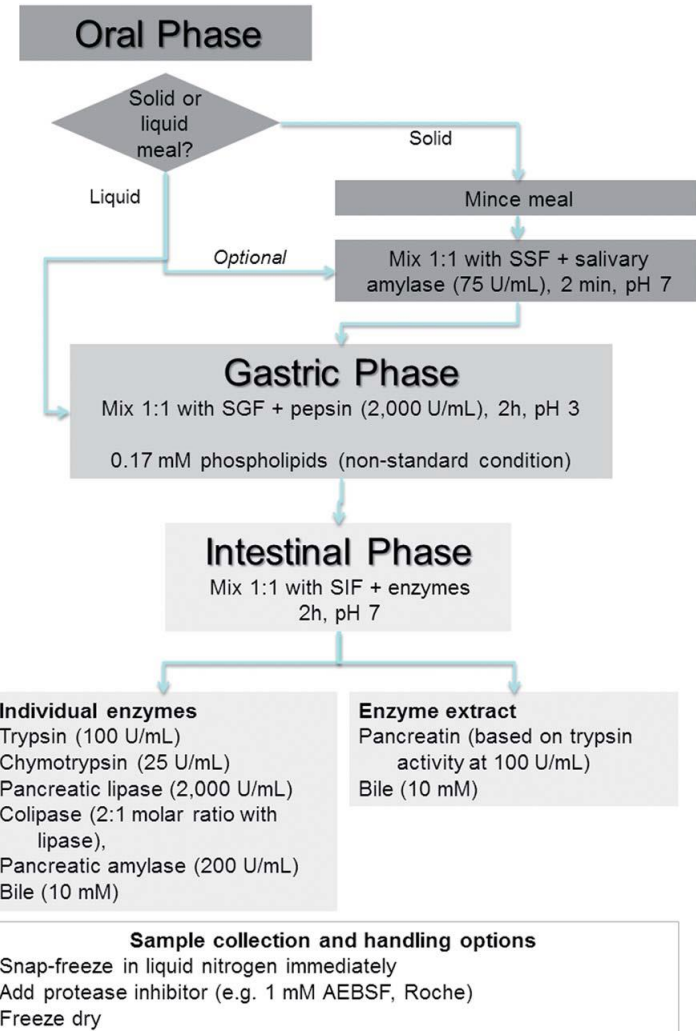
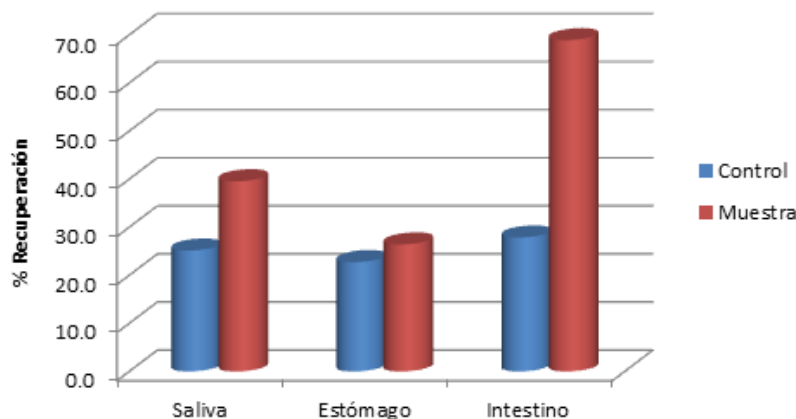


Boca

Digestión gástrica

Intestino

Producto fitosanitario





- ✓ Se han adaptado las **condiciones experimentales** del ensayo con pez cebra a las características de las sustancias activas bajo estudio.
- ✓ Se ha optimizado un **protocolo de tratamiento de la muestras** reales compatible con el ensayo de pez cebra.
- ✓ **No se ha encontrado relación** entre tratamiento y efecto en pez cebra (vendimia 2015).
- ✓ Las muestras de procedentes de Aia y Laguardia han mostrado efectos en pez cebra significativamente diferentes (mosto y vino).
- ✓ **Permite distinguir las muestras por su procedencia (vino y mosto).**



## Financiación



## Equipo de trabajo



Alejandro Barranco



Sandra Rainieri



Nadia Conlledo



Xabi Izquierdo



Nagore Egurrola