

BIOENSAYO DE EXPOSICIÓN A FLORACIÓN PRODUCTORA DE MICROCISTINAS: BIOACUMULACIÓN EN *ASTRALOHEROS FACETUS*

Natalia Badagian¹, Maite Letamendia², Macarena Pirez³, Daniel Carnevia², Beatriz Brena¹

1 Área Bioquímica, Facultad de Química, UdelaR. 2 Área Acuicultura y Patología de Organismos Acuáticos, Facultad de Veterinaria, UdelaR. 3 Área Inmunología Facultad de Química, UdelaR.



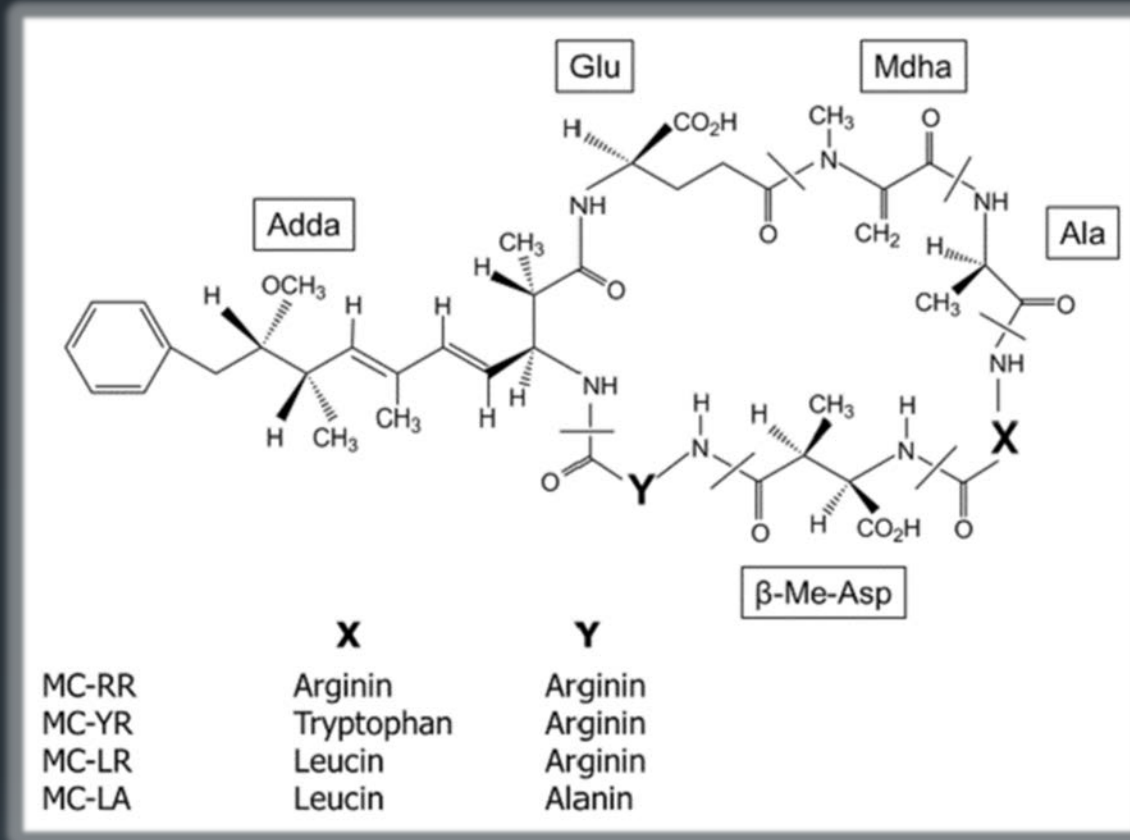
Foto: Leonardo Mainé



Foto: Marcelo Bonjour



MICROCISTINAS



Son una familia de más de **240 variantes químicas**, que surgen de modificaciones y sustituciones de los aminoácidos del heptapéptido (Spooft&Catherine, 2017)

Las microcistinas son las cianotoxinas que ocasionan el tipo más común de **intoxicación** por su **alta frecuencia** y **distribución en el mundo**

(Chorus & Bartram, 1999, Van Apeldoorn, M.E., et al. 2007)

Objetivo: Demostrar la **validez** de herramientas sencillas como los **inmunoensayos**, para determinar **MCs en tejido de pescados** de consumo humano

Caracterización floración

- Clorofila $48 \pm 7,8$ mg/L.
- MCs totales $66,8 \pm 15,5$ mg/L.
- Variantes mayoritarias MC-LR, -RR,



Bioensayo

- 15 juveniles por pecera
- Dos concentraciones por duplicado: 60 (C1), 600 (C2) $\mu\text{g/L}$ + controles
- 18 días consecutivos.



Muestreo

- Muestras de Agua: Días 1, 7, 10, 15 y 18
- Peces para extracción: Día 18
- Peces cortes histológicos: Días 10 y 18



Extracción

- Acetonitrilo:H₂O (75:25) 1% ácido fórmico
- Desgrasado con hexano
- Evaporación y neutralización con TRIS base.



Análisis de Microcistinas.

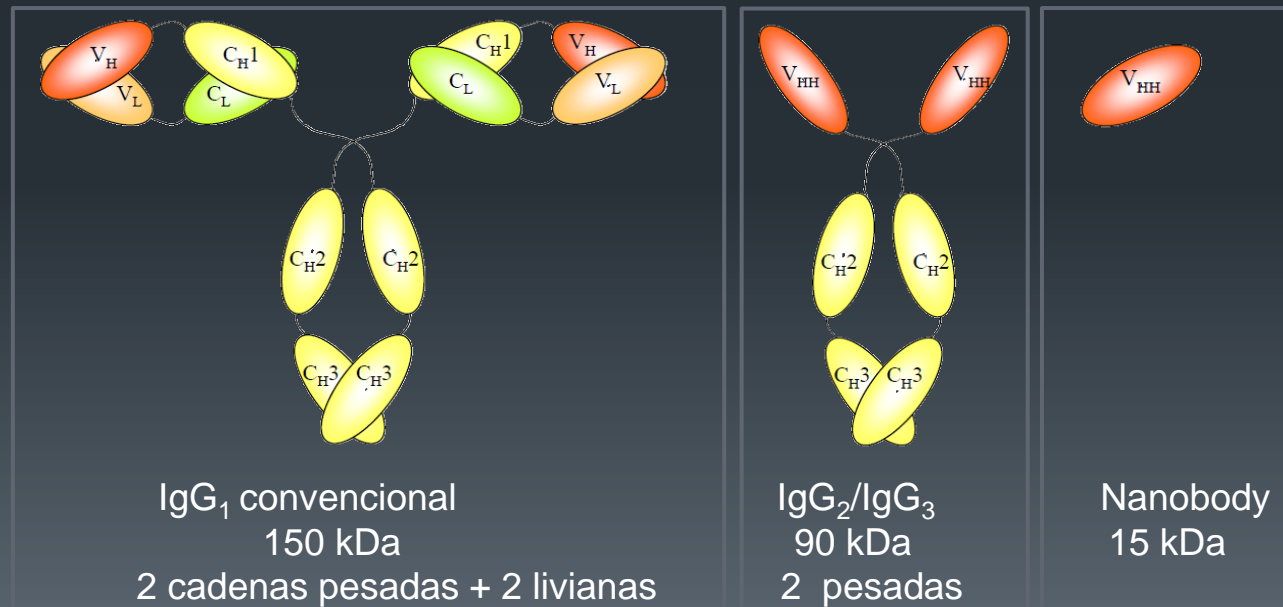
NANOBODIES: anticuerpos sin cadenas livianas



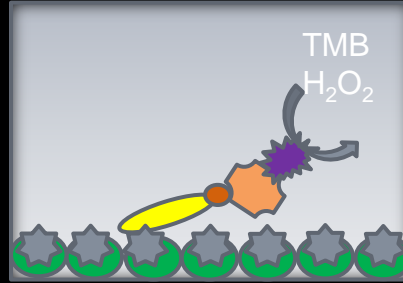
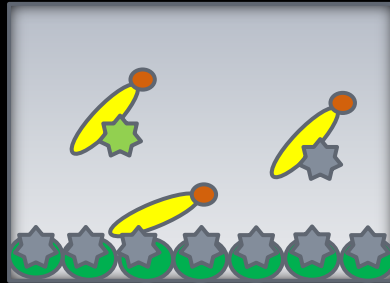
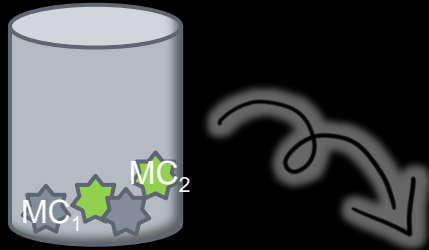
Ventajas:

- Mayor solubilidad y estabilidad que los anticuerpos convencionales
- Elevada estabilidad térmica y frente a solventes
- Altos niveles de expresión en E. coli
- Secuencia sintetizada por cualquier proveedor en forma sencilla
- Posible generar conjugados recombinantes bi-funcionales

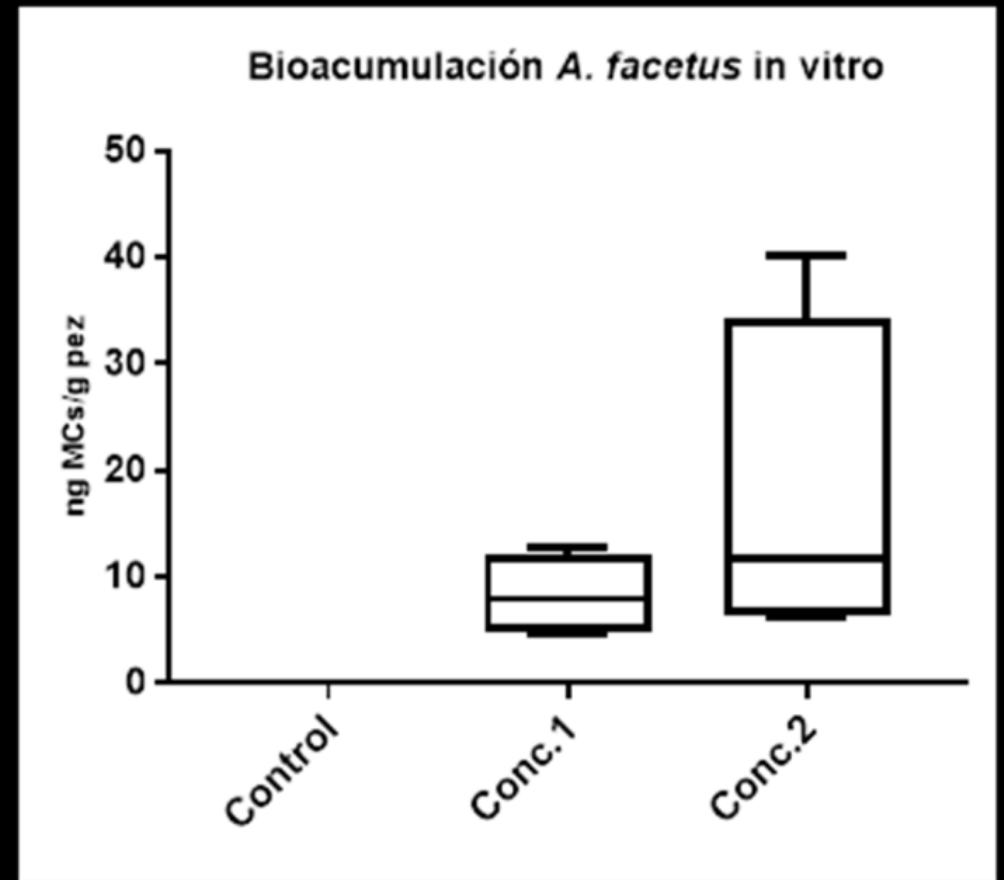
MAYOR CAPACIDAD DE ESTANDARIZAR Y ADAPTAR A DISTINTOS FORMATOS DE INMUNOENSAYOS



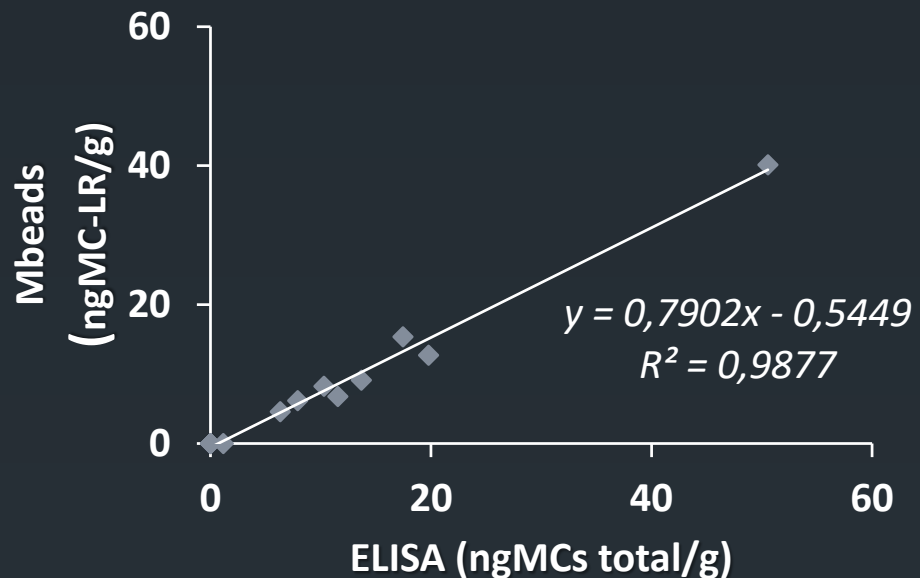
Análisis de Microcistinas ELISA MONOCLONAL



-  Nanobody
-  Estreptavidina-peroxidasa
-  Bead Magnética
-  Microcistina 1
-  Microcistina 2
-  Estándar interno



Comparación ELISA: MBEADS_MALDI TOF



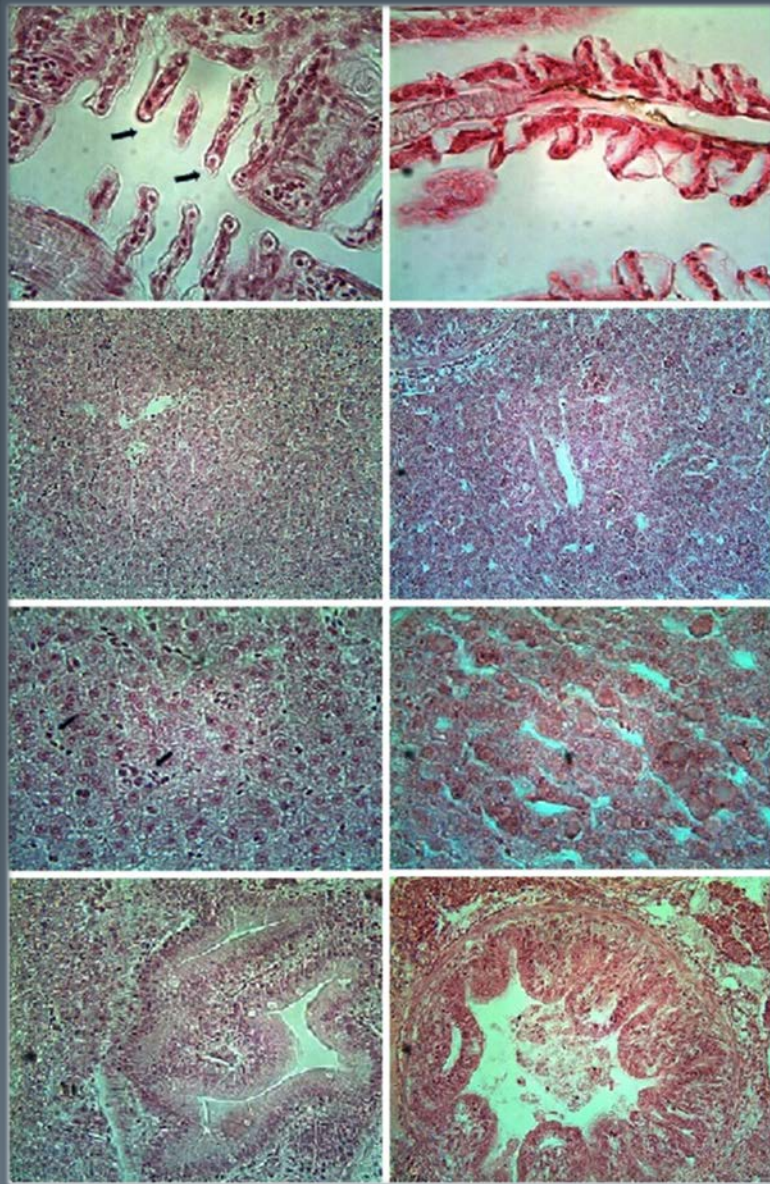
Compound	Method	Matrix	EPA DL (ng/g)	MRL (ng/g)	Upper PIR	Lower PIR	QCS (%Rec)	%RSD (EC50)	%Rec (EC50)
MC-LR	Mbeads_MALDI-TOF	A.facetus	0,11	0,29	150	72	75	7,5	101
MC-LR	nanobody ELISA	A.facetus	0,59	1,76	144	58	70-120	12,2	99

HISTOPATOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA



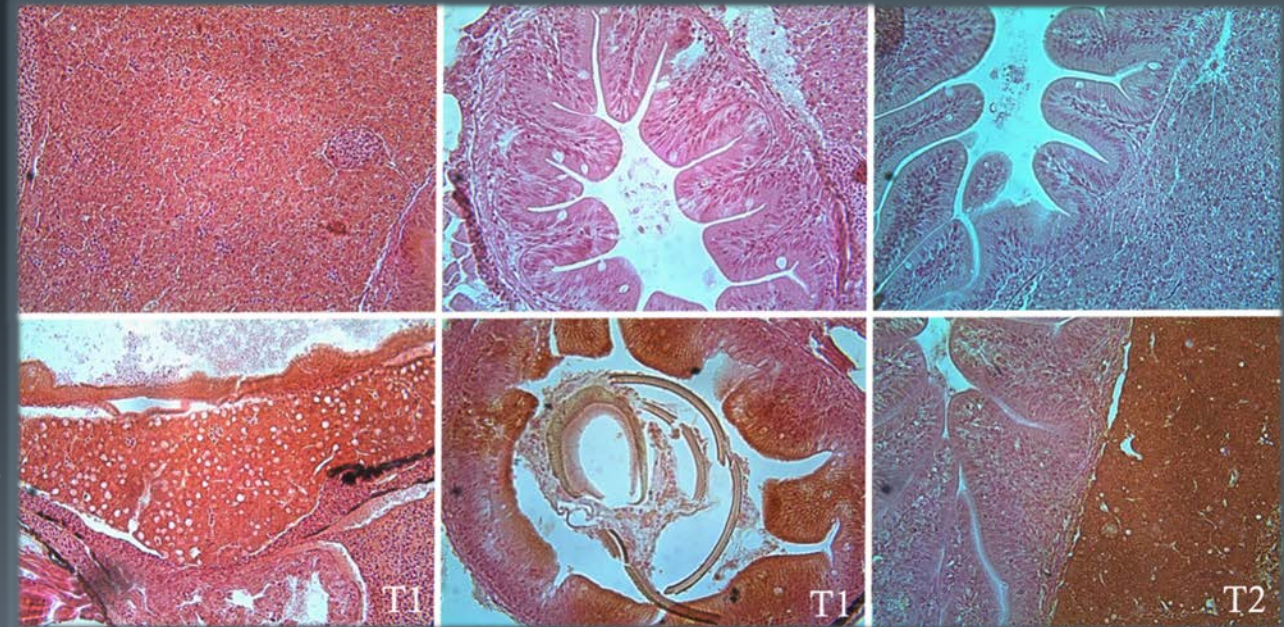
Control

Expuesto C2



Control

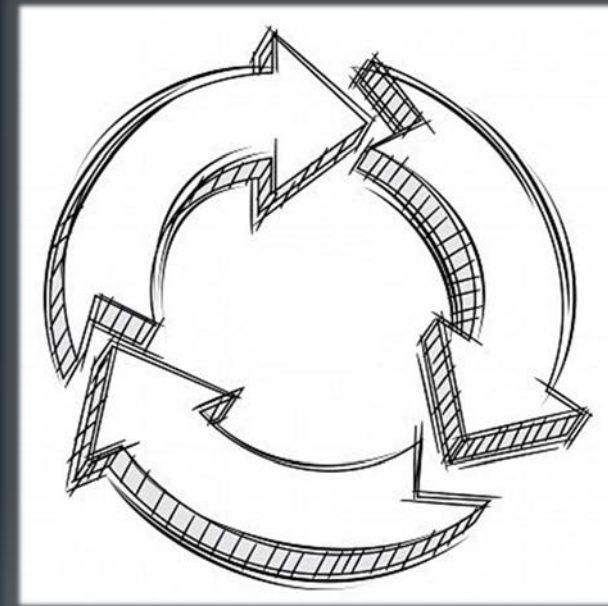
Expuesto



PERSPECTIVAS



- Análisis de alto número de peces expuestos en la naturaleza por ambos métodos.
- Optimización de parámetros de LC-MS/MS: método de referencia y correlación de resultados.
- Comparación de resultados de concentración en tejidos con cortes histológicos: daños y localización.



MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN

