

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

Natalia Badagian<sup>1</sup>, Maite Letamendia<sup>2</sup>, Macarena Pirez<sup>3</sup>, Daniel Carnevia<sup>2</sup>, Beatriz Brena<sup>1</sup>

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.



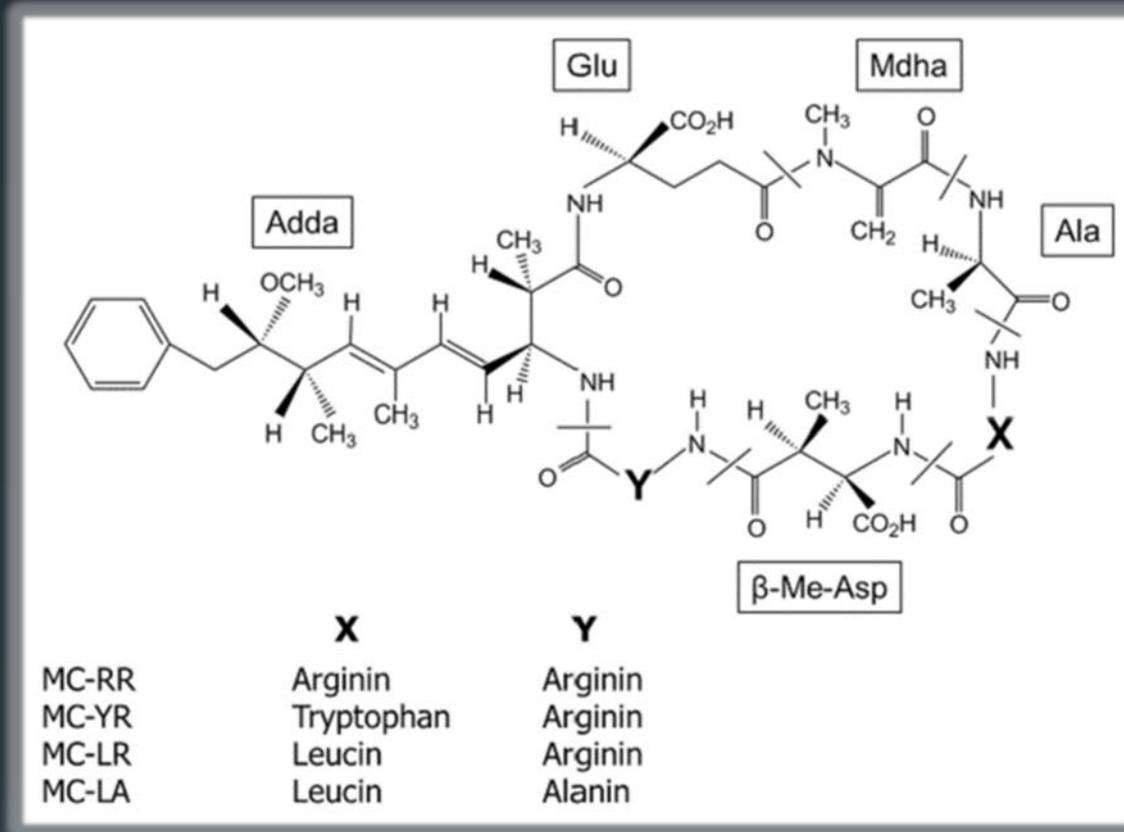
Foto: Leonardo Mainé



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:H<sub>2</sub>O (75:25) 1% ácido fórmico
- Desgrasado con hexano
- Evaporación y neutralización con TRIS base.



# Análisis de Microcistinas.

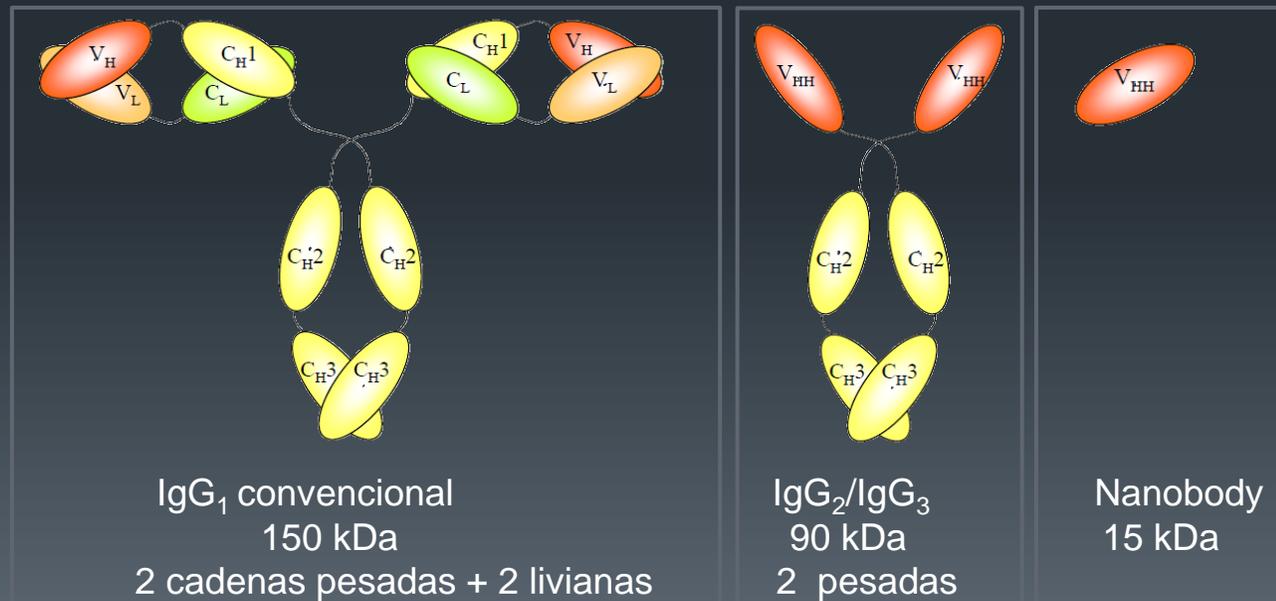
## NANOBODIES: anticuerpos sin cadenas livianas



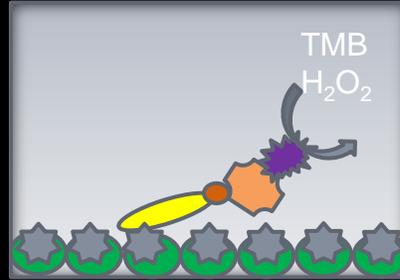
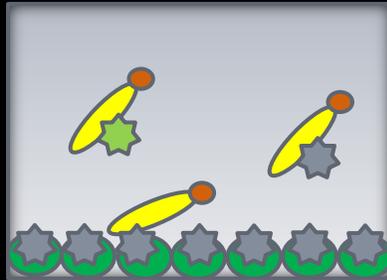
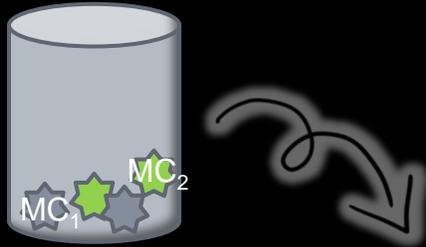
### Ventajas:

- 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

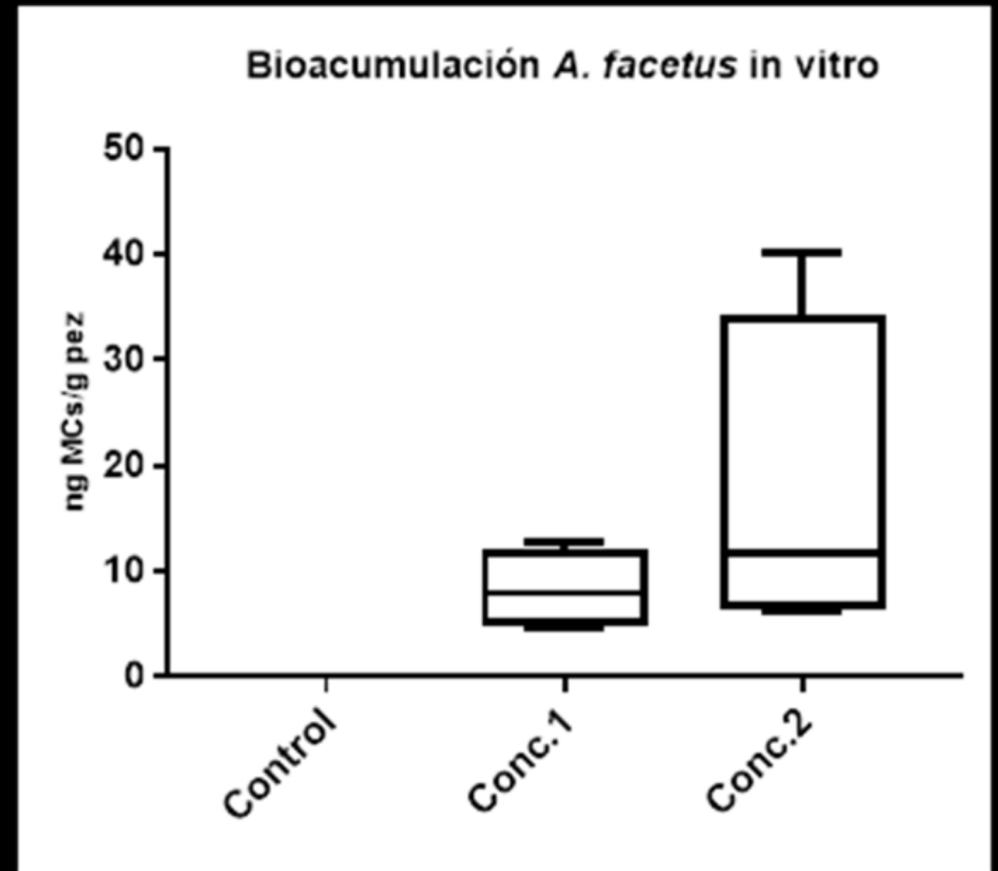
**MAYOR CAPACIDAD DE ESTANDARIZAR Y ADAPTAR A DISTINTOS FORMATOS DE INMUNOENSAYOS**



# Análisis de Microcistinas ELISA MONOCLONAL

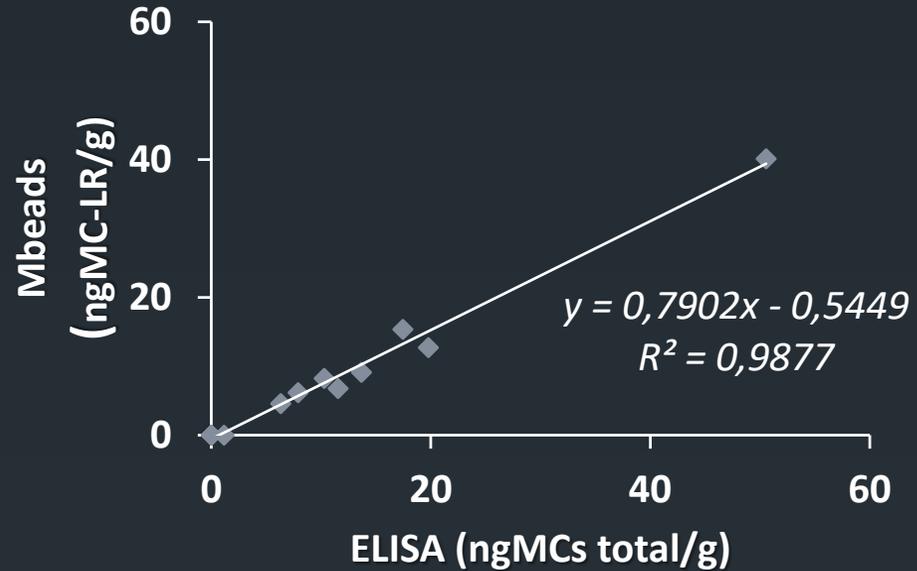


-  Nanobody
-  Estreptavidina-peroxidasa
-  Bead Magnética
-  Microcistina 1
-  Microcistina 2
-  Estándar interno





# Comparación ELISA: MBEADS\_MALDI TOF



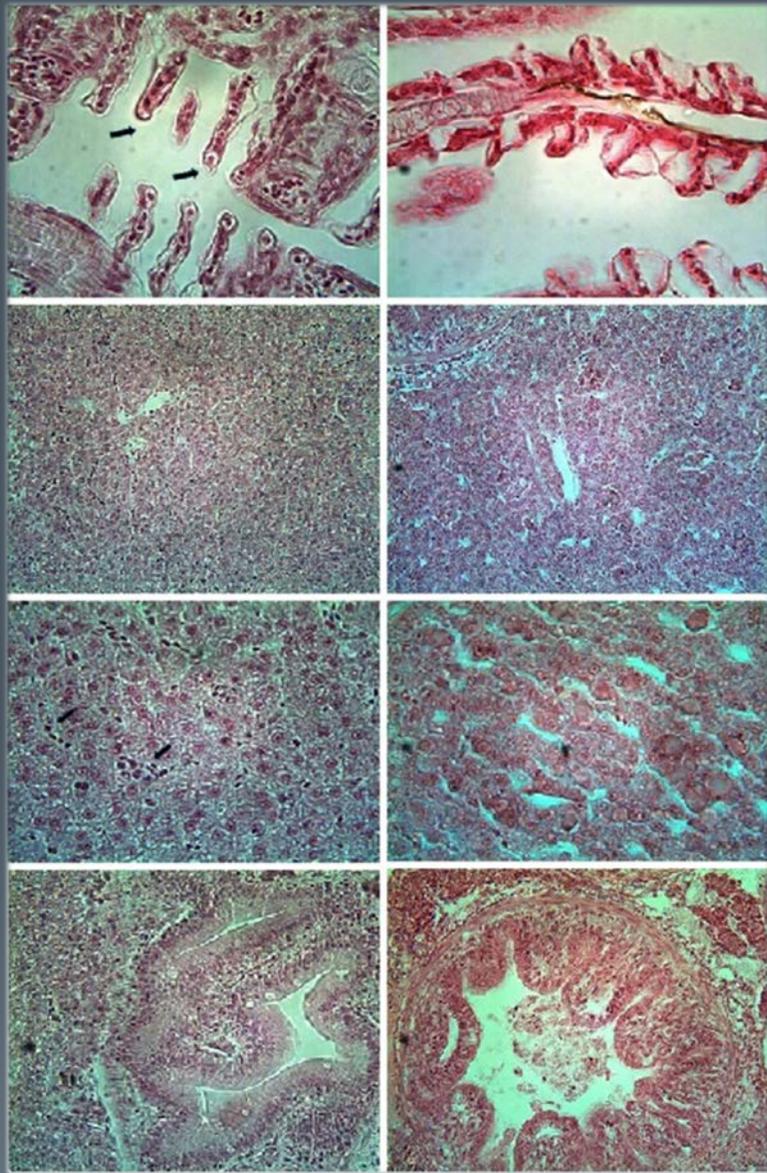
Compound	Method	Matrix	EPA DL (ng/g)	MRL (ng/g)	Upper PIR	Lower PIR	QCS (%Rec)	%RSD (EC50)	%Rec (EC50)
MC-LR	Mbeads_MALDI-TOF	A.facetus	0,11	0,29	150	72	75	7,5	101
MC-LR	nanobody ELISA	A.facetus	0,59	1,76	144	58	70-120	12,2	99

# HISTOPATOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA



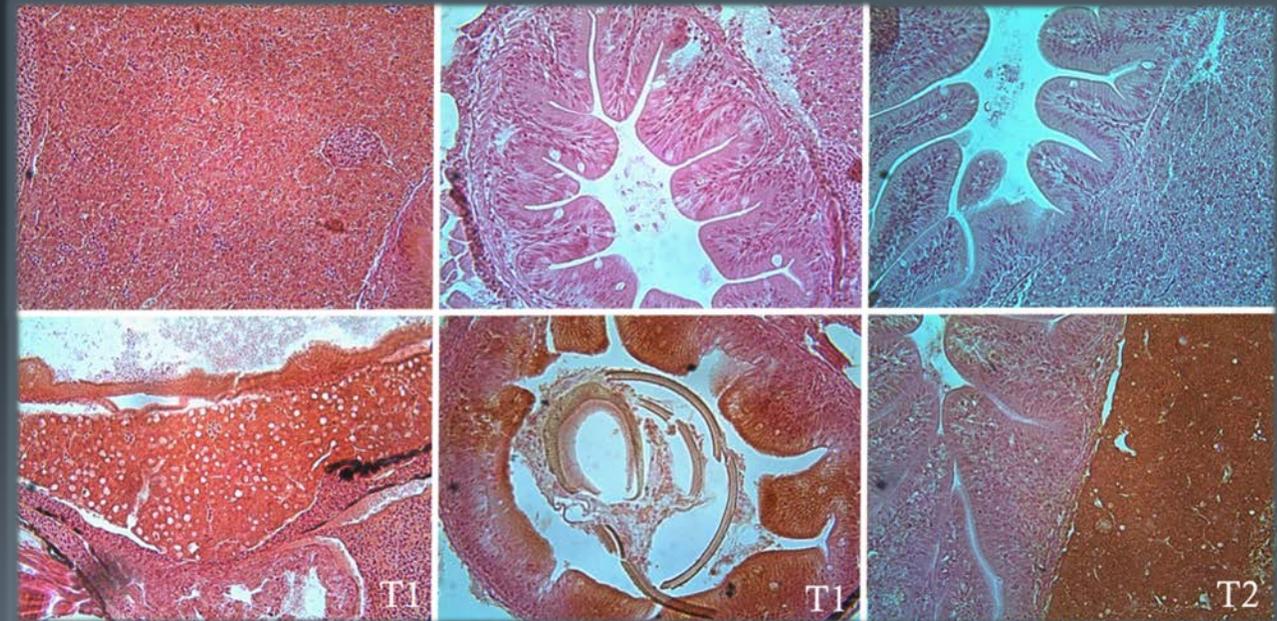
Control

Expuesto C2



Control

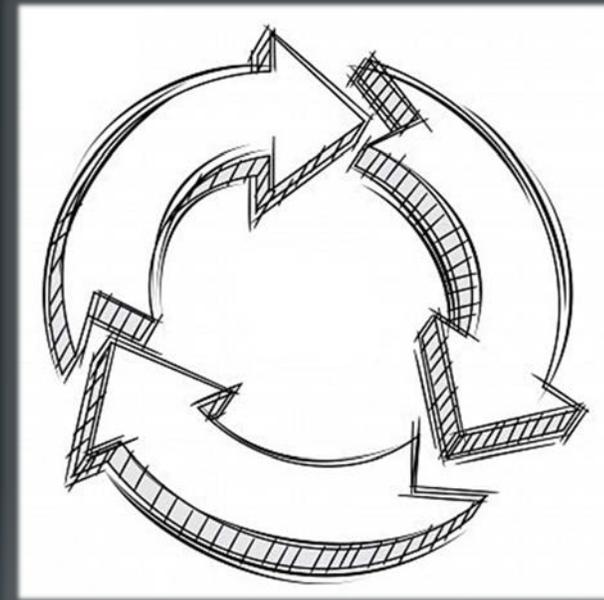
Expuesto



# 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

