UCC UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA JESUITAS | Sistema de Bibliotecas

PRODUCCIÓN ACADÉMICA

Ciaffoni, Diana Valentina

Paredes, Andrés

Caracterización de la exposición humana a microcistina-LR: revisión de métodos de detección y optimización del ensayo ELISA

Tesis para la obtención del título de grado de Bioquímico/a

Directora: Ruiz, Marcia A.

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias de la Salud

Caracterización de la exposición humana a microcistina-LR: revisión de métodos de detección y optimización del ensayo ELISA

Trabajo Final de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica de Córdoba conforme a los requisitos para obtener el título de Bioquímica.

Por

Diana Valentina Ciaffoni

Andrés Paredes

Córdoba, Argentina

2025

Director de Trabajo Final

Mag. Bioq Farm. Marcia A. Ruiz.

Co-director

Dra. Bioq. Ana Laura Ruibal Conti

Co-director

Dr. Bioq. Alejandro Ferrari

Comisión Evaluadora:

Dr. Bioq. Nicolás Juan Carlos

AGRADECIMIENTOS

En este capítulo de nuestras vidas, queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a todas las personas que formaron parte de este proceso. Cada encuentro a lo largo de nuestro recorrido académico y personal ha dejado una huella significativa en nosotros. Somos el resultado de cada enseñanza, de cada gesto compartido y de cada experiencia vivida. Lo que somos hoy es la síntesis de todas esas presencias que, de una u otra manera, contribuyeron a nuestra formación y nos acompañaron hasta este momento.

Agradecemos especialmente a nuestras familias, por brindarnos la posibilidad de estudiar y por su apoyo incondicional, su confianza y su acompañamiento constante a lo largo de toda nuestra formación académica.

A nuestros amigos, y en particular a aquellos que conocimos durante este trayecto universitario, les agradecemos las charlas compartidas, los días de estudio en la biblioteca, los momentos previos a cada examen final y cada experiencia vivida. Cada uno de esos momentos quedará siempre inmortalizado en nuestro recuerdo.

Expresamos también nuestro sincero agradecimiento a nuestros directores y codirectores de tesis, Ana Laura, Marcia Ruiz y Alejandro Ferrari, por su tiempo, paciencia y dedicación, así como por brindarnos el espacio y la guía necesarios para llevar adelante y concretar este trabajo final.

Con cariño,

Valentina y Andrés

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS VI
ÍNDICE DE FIGURAS IX
ÍNDICE DE TABLAS X
RESUMEN XI
SUMMARY XI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 12
CAPITULO II. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS 13
2.1 Objetivos generales 13
2.2 Objetivos específicos 13
2.3 Hipótesis de la investigación 13
CAPÍTULO III. MARCO TEÓRICO 14
3.1 Microcistinas: estructura química 15
3.2 Toxicocinética de la Microcistina-Leucina-Arginina 17
3.3 Fisiopatología de la Microcistina-Leucina-Arginina 22
3.4 Diagnóstico de la Intoxicación por Microcistinas 24
3.4.1 Síntomas Clínicos e Historia de Exposición 24
3.4.2 Detección de Anticuerpos en el Diagnóstico de Exposición. 28
3.5 Determinación de Microcistina-Leucina-Arginina en Fluidos Humanos 29
3.5.1 Métodos analíticos empleados en la determinación Microcistina-Leucina-Arginina en Fluidos Humanos 29
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS 37
4.1 Población de voluntarios y procesamiento de muestras 37
4.2. Producción de MC-LR conjugada a Albúmina de Suero Bovino 37
4.3 ELISA indirecto para la detección de isotipos de inmunoglobulinas 38
4.4 Diseño de la placa 39
4.5 Revelado de la reacción: desarrollo de color y lectura de resultados 41
CAPÍTULO V. RESULTADOS 42
5.1 Procesamiento de los datos 42
5.2 Presentación de los resultados de cada Inmunoglobulina 42
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN 45
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES 47
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS 49
ANEXO I: DENSIDADES ÓPTICAS Y TRATAMIENTO DE DATOS DEL ENSAYO ELISA 56
ANEXO II: NOTA DE ACEPTACIÓN DEL DIRECTOR Y CODIRECTORES 60

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	
ADDA	(2S,3S,4E,6E,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ALT	Alanina Aminotransferasa.
AST	Aspartato Aminotransferasa.
B	
BC	Buffer coating
BD	Buffer de dilución
BSA	Albúmina de Suero Bovino
C	
Ca^{2+}	Calcio
CAMKII	Proteína Quinasa Dependiente de Calcio/Calmodulina
E	
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
G	
GE	Grupo Expuesto
GEN	Grupo No Expuesto
H	
HPLC	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento.

HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Espectrometría de Masas
I	
IC-LS-MS	Inmunocaptura Cromatografía Líquida de Espectrometría de Masas
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
L	
LC-MS	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem
LOD	Limite de detección
LPS	Lipopolisacáridos
M	
MAPKs	Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos
MCs	Microcistinas
MC-LR	Microcistina-Leucina-Arginina
MC-LR-GSH	Microcistina-Leucina-Arginina conjugada con glutatión reducido
MC-RR	Microcistina-Arginina-Arginina
MC-LR-Cys	Microcistina-Cisteína
MC-YR	Microcistina-Tirosina-Arginina
MDR-2	Proteína 2 de resistencia a múltiples fármacos
MPT	Transición de permeabilidad mitocondrial
N	
NHS	N-hidroxisuccinimida
P	
PBS	Buffer salino fosfato

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PP1	Fosfatasa Proteica 1
PPA2	Fosfatasa Proteica A2
P53	Proteína Supresora de Tumores
R	
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
S	
scF	Fragmento Variable de Cadena Única
SL	Solución de Lavado.
SOD	Superóxido Dismutasa
Q	
q-PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real
V	
VPP	Valor Predictivo Positivo
Y	
γ-GT	γ-glutamil transferasa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura cíclica general de la Microcistina-Leucina-Arginina 16

Figura 2 Biotransformación de MC-LR a través de la vía del glutatión 18

Figura 3 Mecanismos moleculares de toxicidad de MCs. 20

Figura 4 Mecanismos de toxicidad hepática por exposición a MC 22

Figura 5 Principales mecanismos de acción involucrados en la respuesta dual frente a altas y bajas concentraciones de MC-LR. 23

Figura 6 Fisiopatología de la MC en hígado, riñón, intestino, cerebro, pulmón, corazón y sistema reproductivo. 25

Figura 7 Esquema de siembra de muestras y blancos 39

Figura 8 Esquema de reacción de ensayo de dos capas, para la detección de inmunoglobulinas IgG e IgM (Elaboración propia). 40

Figura 9 Esquema de reacción de ensayo de tres capas, para la detección de inmunoglobulinas IgE e IgA. 41

Figura 10 IgG anti-MC-LR en GE y GNE. 43

Figura 11 IgM anti-MC-LR en GE y GNE. 43

Figura 12 IgE anti-MC-LR en GE y GNE 44

Figura 13 IgA anti-MC-LR en GE y GNE 44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Revisión de Métodos Analíticos para Detectar MC-LR en Fluidos Humanos..... 30

Tabla II. Datos crudos obtenidos de IgG 56

Tabla III. Datos crudos obtenidos de IgE..... 56

Tabla IV. Datos crudos obtenidos de IgA 57

Tabla V. Datos crudos obtenidos de IgM..... 57

Tabla VI. Datos obtenidos duplicados promediados (blancos restados): IgG 58

Tabla VII. Datos obtenidos duplicados promediados (blancos restados): IgE 58

Tabla VIII. Datos obtenidos duplicados promediados (blancos restados): IgA 59

Tabla IX. Datos obtenidos duplicados promediados (blancos restados): IgM..... 59

RESUMEN

La Microcistina-Leucina-Arginina (MC-LR) es una de las hepatotoxinas más tóxicas producidas por la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* y representa un riesgo considerable para la salud humana cuando se encuentra en concentraciones elevadas en ambientes acuáticos eutrofizados. La exposición a MC-LR, ya sea por contacto dérmico, inhalación o ingestión de agua contaminada, se ha asociado con efectos agudos y crónicos, como daño hepático, renal y un posible riesgo de cáncer.

La detección de la intoxicación por MC-LR es compleja debido a la inespecificidad de los síntomas clínicos y las limitaciones de los métodos directos de cuantificación en fluidos biológicos humanos. Este estudio plantea la necesidad de métodos alternativos de monitoreo y sugiere el uso de ensayos ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra MC-LR en suero humano como una herramienta indirecta pero efectiva para la detección a la exposición a MC-LR. Para ello, se evaluaron diferentes isotipos de anticuerpos (IgM, IgE, IgA, IgG) con el fin de ofrecer información útil para futuras aplicaciones en estudios médicos y epidemiológicos.

SUMMARY

Microcystin-Leucine-Arginine (MC-LR) is one of the most toxic hepatotoxins produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and poses a significant risk to human health when present at high concentrations in eutrophic aquatic environments. Exposure to MC-LR, whether through dermal contact, inhalation, or ingestion of contaminated water, has been associated with both acute and chronic effects, such as hepatic and renal damage, as well as a potential cancer risk.

Detecting intoxication to MC-LR is challenging due to the nonspecific nature of clinical symptoms and the limitations of direct quantification methods in human biological fluids. This study highlights the need for alternative monitoring methods and suggests the use of ELISA assays to detect specific antibodies against MC-LR in human serum as an indirect but effective tool. To this end, different antibody isotypes (IgM, IgE, IgA, IgG) were evaluated to provide useful information for future applications in medical and epidemiological studies.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, también conocidas como algas verdeazuladas, son microorganismos procariotas ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos (Lee et al., 2021). Estos organismos pueden producir toxinas, denominadas cianotoxinas, que representan un riesgo considerable para la salud humana y animal, particularmente en cuerpos de agua destinados a recreación o consumo humano (Le Moa et al., 2019). La proliferación masiva de cianobacterias, fenómeno conocido como floración algal, constituye una problemática de impacto global en términos ambientales y de salud pública, con repercusiones importantes en países como Argentina, donde diversas provincias ya experimentan sus efectos adversos (Aguilera et al., 2018).

Entre las cianotoxinas, las microcistinas (MCs) se destacan por su toxicidad. Estas moléculas, estructuralmente definida como heptapéptidos cíclicos, comprenden más de 246 variantes, siendo las más comunes la microcistina-leucina-arginina (MC-LR), la microcistina-arginina-arginina (MC-RR) y la microcistina-tirosina-arginina (MC-YR). De estas, la MC-LR es la variante mejor caracterizada y se reconoce por su potente efecto hepatotóxico, con capacidad para afectar además otros órganos, como el sistema pulmonar, renal y reproductor (Arman et al., 2021). La exposición humana a MC-LR puede ocurrir de forma aguda o crónica, mediante la inhalación de aerosoles, el contacto dérmico o la ingestión de agua contaminada (Ruiz et al., 2010). Sin embargo, el diagnóstico de intoxicación es complejo, ya que los síntomas son inespecíficos y se dificulta la correlación directa entre exposición y daño fisiológico.

Dada la necesidad de evaluar la exposición a MC-LR y sus riesgos asociados, resulta necesario desarrollar métodos de detección y cuantificación en matrices biológicas humanas. Los métodos actuales enfrentan limitaciones en sensibilidad y especificidad debido a las bajas concentraciones de toxina en fluidos biológicos, su biotransformación en el organismo y la presencia de interferentes en las muestras. En este contexto, la detección de anticuerpos específicos contra MC-LR en suero mediante ensayos ELISA se presenta como una alternativa con potencial para superar las limitaciones de la detección directa de la toxina. Este enfoque podría aportar una herramienta más precisa para evaluar la exposición humana, con implicancias relevantes en estudios de vigilancia y epidemiología ambiental.

CAPITULO II. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

2.1 Objetivos generales

1. Revisar las características químicas y toxicológicas de la microcistina-leucina-arginina (MC-LR).
2. Analizar y comparar los métodos analíticos actualmente disponibles para la detección de la toxina MC-LR en fluidos humanos, con el fin de evaluar su eficacia y sensibilidad.
3. Optimizar el método ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la toxina MC-LR, mediante la evaluación de distintas estrategias orientadas a mejorar la precisión y confiabilidad del ensayo.

2.2 Objetivos específicos

En el contexto de los objetivos generales mencionados, se definen los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar las rutas de exposición humana a las microcistinas.
2. Investigar sobre las vías absorción, distribución, metabolismo y excreción.
3. Analizar y comparar los métodos actualmente disponibles para la detección de MC-LR en fluidos biológicos humanos.
4. Adquirir destreza en el trabajo de laboratorio vinculado a la puesta a punto de un enzimoinmunoensayo y el cálculo de las diluciones óptimas para la detección de los anticuerpos en suero humano.
5. Detectar los distintos isotipos de anticuerpos anti MC-LR inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina G (IgG), para así aportar información relevante desde el punto de vista médico y/o epidemiológico.

2.3 Hipótesis de la investigación

Dada la complejidad técnica y económica que implica la detección directa de la toxina microcistina-leucina-arginina (MC-LR) en muestras biológicas, asociada a su baja concentración, su metabolización y su susceptibilidad a interferencias, se plantea la siguiente hipótesis:

La detección de anticuerpos específicos contra MC-LR en suero humano mediante ensayo ELISA proporciona una medida indirecta, sensible y confiable para evaluar la exposición humana a esta toxina.

CAPÍTULO III. MARCO TEÓRICO

La eutrofización es una de las principales causas de contaminación de lagos, embalses, y estuarios en la actualidad (Wilkinson & Johnson, 2024). Se produce cuando una masa de agua recibe un aporte muy elevado de nutrientes, principalmente de nitrógeno y fósforo. Así un cuerpo de agua eutrofizado se caracteriza por un exceso de nutrientes, lo que puede desencadenar efectos adversos, como la proliferación descontrolada de organismos fitoplanctónicos —un fenómeno conocido como floraciones algales nocivas (FANs)— alterando el equilibrio ambiental.

Estas floraciones, pueden generar gran cantidad de biomasa que, al degradarse, agotan el oxígeno en el agua y pueden producir emisiones de gases no deseados o tóxicos cómo CO_2, H_2S y CH_4. Los impactos más notables incluyen pérdida de biodiversidad y anoxia, que puede causar la muerte masiva de organismos acuáticos (Le Moal et al., 2019).

Dentro de las FANs, las proliferaciones de cianobacterias (algas verde-azuladas) son conocidas por generar una amplia variedad de metabolitos secundarios bioactivos, algunos de los cuales son tóxicos. Estas toxinas, denominadas cianotoxinas, presentan una gran diversidad química y se pueden clasificar en función de su modo de acción en hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas, o según su estructura química: en péptidos cíclicos, alcaloides cíclicos y lipopolisacáridos (LPS). Entre las cianotoxinas más destacadas se encuentran las microcistinas (MCs), cilindrospermopsinas, saxitoxinas, nodularinas, anatoxina-a y anatoxina-a(S) (Andrinolo, 2017).

Las cianotoxinas son motivo de gran preocupación debido a sus efectos nocivos en la salud humana y el medio ambiente, además de que estructuralmente son estables, lo que les permite persistir en el ambiente acuático durante períodos prolongados, incrementando el riesgo de exposición (Bonilla, 2009). Cada tipo de cianotoxina tiene un mecanismo de toxicidad particular, las microcistinas y nodularinas, ambos péptidos cíclicos, son conocidas por su hepatotoxicidad, causando daño severo al hígado y, en algunos casos, promoviendo el desarrollo de tumores a largo plazo.

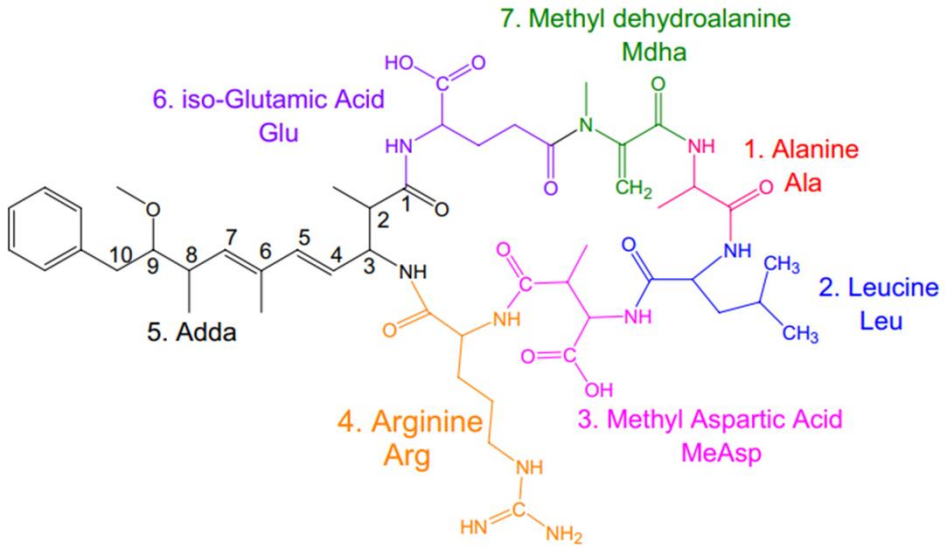
Además de las MCs, las cianobacterias tienen otras toxinas como los LPS que son componentes de la membrana celular con propiedades antigénicas. Los LPS son conocidos por causar irritaciones en la piel, trastornos gastrointestinales y reacciones alérgicas, aunque su toxicidad aún requiere más investigación. Dentro de las cianotoxinas, las MCs son las más prevalentes y peligrosas, especialmente la microcistina que contiene leucina y arginina (MC-LR), que ha sido identificada como altamente tóxica (Yi, 2019).

3.1 Microcistinas: estructura química

Las MCs producidas principalmente por cianobacterias del género *Microcystis aeruginosa* (Giannuzzi et al., 2009) son de naturaleza peptídica e hidrosoluble. Estructuralmente esta toxina es un heptapéptido cíclico formado por siete aminoácidos. La estructura química de las microcistinas (MCs) puede describirse mediante la fórmula general ciclo (D-Ala–L-X–D-eritro-β-metilAsp–L-ADDA–D-Glu–N-metildehidro-Ala), donde ADDA hace referencia al residuo (2S,3S,4E,6E,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico, un compuesto específico de las cianobacterias (Campos & Vasconcelos, 2010). Como se observa en la Figura 1, la variabilidad de las MCs radica principalmente en los aminoácidos en las posiciones 2 (X) y 4 (Z) de la estructura heptapeptídica, así como en la metilación del ácido D-metilaspártico (D-MeAsp) y N-metildehidroalanina (Mdha). Como resultado de su conformación estructural muestra una notable estabilidad química, pueden mantenerse activas incluso después de horas de ebullición o años almacenadas en condiciones secas a temperatura ambiente. Son resistentes a la hidrólisis química o la oxidación a pH neutro, y solo se degradan lentamente a temperaturas elevadas y en condiciones extremas de pH (1 o 9). Esto les permite persistir en los cuerpos de agua durante largos períodos, lo que incrementa su potencial de causar daños a largo plazo (Chorus & Welker, 2021).

Los residuos en las posiciones 2 y 4 de la molécula corresponden a leucina y arginina, lo que caracteriza estructuralmente a la MC-LR. Estas posiciones son las más variables dentro de la estructura, lo que permite la existencia de numerosos congéneres que se diferencian por cambios en los aminoácidos situados en esas regiones específicas, mientras que otras partes de la molécula permanecen constantes (Andrinolo, 2017).

Hasta la fecha, se han identificado al menos 246 variantes estructurales de MCs, que se diferencian por alteraciones en sus residuos (Bouaïcha et al., 2019). Esta diversidad contribuye a las diferencias en sus efectos biológicos, ya que algunos congéneres presentan una mayor toxicidad que otros (Díez-Quijada et al., 2019). Entre todas estas variantes, la MC-LR se destaca como la más estudiada debido a su potente hepatotoxicidad, siendo clasificada como carcinógeno del grupo 2B por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2010).



Variant	X	Y
MC-LR	Leucine	Argenine
MC-RR	Argenine	Argenine
MC-YR	Tyrosine	Argenine
MC-LW	Leucine	Tryptophan
MC-LA	Leucine	Alanine
MC-LF	Leucine	Phenylalanine

Figura 1 Estructura cíclica general de la Microcistina-Leucina-Arginina La estructura cíclica general de las MCs. El heptapéptido contiene los siguientes aminoácidos: [1] D-Alanina (D- Ala); [2] Variable L-aminoácido (X); [3] D- Ácido metil aspártico (D-MeAsp); [4] Variable L-aminoácido (Z); [5] ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico (ADDA); [6] D-Ácido glutámico (D- Glu); [7] N-metildehidroalanina (Mdha) (Tomado de Antoniou et al., 2008.)

El grupo ADDA es una estructura única, compleja y que tiene un papel fundamental en la actividad biológica de las MCs. Esta estructura consiste en una cadena lateral larga y ramificada con varias modificaciones específicas: tiene grupos metilo, un grupo amino y un grupo metoxi, además de enlaces dobles conjugados que contribuyen a su rigidez y especificidad estructural. Este grupo es una estructura conservada en las microcistinas y es reconocida por los anticuerpos específicos dando su carácter inmunogénico a la toxina (Liu et al., 2021).

3.2 Toxicocinética de la Microcistina-Leucina-Arginina

El estudio de la toxicocinética de la MC-LR es fundamental para entender su comportamiento en el organismo y sus implicaciones tóxicas. Este apartado aborda cómo la toxina es procesada por el organismo a través de los cuatro mecanismos fundamentales de la farmacocinética: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME), basado en evidencias que provienen de experimentos realizados in *vitro* e *in vivo*.

La MC-LR ingresa al organismo principalmente por dos rutas de exposición, a través de la ingestión de agua (Carmichael & Boyer, 2016) o de alimentos contaminados con cianobacterias (Roy-Lachapelle et al., 2017). Sin embargo, también puede ingresar al cuerpo por vías alternativas, como a través de la piel en contacto directo con agua contaminada o por inhalación de aerosoles (Breidenbach et al., 2022). Estudios toxicológicos en ratones han indicado que, una vez que la toxina llega al sistema digestivo, es absorbida predominantemente en la mucosa del intestino delgado (Song et al., 2024). Una vez en el torrente sanguíneo, la MC se distribuye rápidamente, afectando varios órganos, aunque se concentra principalmente en el hígado debido a su captación mediada por transportadores específicos (Li et al., 2023).

Las MC-LR, debido a su carácter polar e hidrofílico, no pueden atravesar libremente las membranas celulares y requieren transportadores específicos, como el polipéptido transportador de aniones orgánicos 1B (OATP), expresado en la membrana sinusoidal de los hepatocitos (Li et al., 2023). Una vez dentro de las células, su eliminación está mediada por la proteína 2 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MDR-2), que es responsable de su flujo desde las células hepáticas (Taranay, A., & Clarke, J. D. 2021).

En cuanto al metabolismo hepático, (Figura 2), este proceso comienza con la conjugación de la MC-LR con glutatión, en una reacción catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa, formando el conjugado MC-LR-GSH, esta modificación aumenta la solubilidad de la MC, facilitando su excreción (Gehringer et al., 2004). Durante la biotransformación, el MC-LR-GSH es degradado por la γ-glutamil transferasa, generando MC-γ-glutamilcisteína, que posteriormente se convierte en microcistina-cisteína (MC-LR-Cys), tras la eliminación del grupo glutamato mediante peptidasas. Investigaciones han evidenciado que los conjugados MC-LR-GSH y MC-LR-Cys, son menos tóxicos que la toxina no conjugada, pero siguen siendo biológicamente activos, pudiendo inhibir la actividad de las fosfatasas proteicas e interferir con funciones celulares (Schmidt, Wilhelm, & Boyer, 2014).

Finalmente, el complejo MC-LR-Cys, se oxida por la acción de una acetiltransferasa, formando el derivado final conocido como MC-LR-ácido mercaptúrico.

Además de los conjugados con glutatión y cisteína, se han identificado otras variantes estructurales, como la MC-desmetil-LR. Estas variantes se forman mediante la eliminación de grupos metilo en los aminoácidos D-3-metilaspártico (d-MeAsp) y N-metildehidroalanina (Mdha) de la estructura de MC-LR, dando lugar a [3Asp]MC-LR y [7Dha]MC-LR, respectivamente. Se ha descubierto que estos congéneres desmetilados son tan tóxicos o incluso más que la MC-LR completamente metilada, tanto en hepatocitos primarios humanos como de rata (Ufelmann et al., 2012).

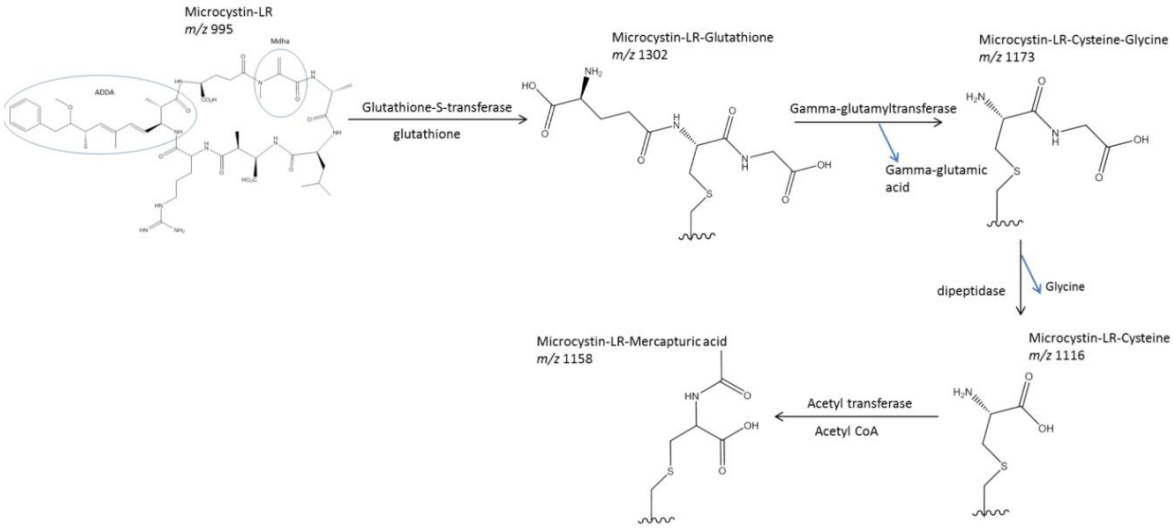


Figura 2 Biotransformación de MC-LR a través de la vía del glutatión. La MC-LR se metaboliza en el doble enlace de la Mdha. El glutatión se une a la Mdha mediante glutatión-S-transferasa, formando MC-LR-glutatión. Luego, la gamma-glutamiltransferasa elimina el grupo gamma-glutámico, generando MC-LR-cisteína-glicina. Finalmente, la dipeptidasa elimina la glicina, resultando en MC-LR-cisteína, que se oxida a MC-LR-ácido mercaptúrico. (Tomado de Schmidt et al., 2014).

A pesar de su biotransformación, estudios sugieren que la toxina tiende a acumularse en el hígado y no se elimina fácilmente del organismo (Guo et al., 2015; Moreno, Repetto, & Cameán, 2002). En estudios que utilizaron toxinas radiomarcadas para evaluar la distribución en tejidos, se demostró que el hígado es el principal sitio de acumulación de MC-LR, concentrando el 83% de la dosis total administrada (Robinson et al., 1991).

En cuanto a la excreción, la mayor parte de las MCs eliminadas en la orina corresponde a la molécula original, junto con una fracción menor en forma de conjugados, principalmente durante las primeras 6 horas tras la exposición. Se estima que el conjugado MC- LR-Cys es más abundante en la orina que el MC-LR-GSH (Arman

et al., 2021). El estudio de Robinson et al. (1991) investigó la excreción de la MC-LR. Los resultados indicaron que el 24% de la toxina radiomarcada fue eliminado del organismo, distribuyéndose principalmente entre la orina (aproximadamente un 9%) y las heces (alrededor de un 15%). La mayor parte de la excreción urinaria, equivalente al 74% del total eliminado por esta vía, se produjo en las primeras 12 horas, con un 63% de la toxina en su forma original y el 30% restante en forma de metabolitos. En cuanto a la excreción fecal, se observó una tasa de eliminación del 0,9% y 0,5% por hora en los puntos de tiempo de 6 y 12 horas, respectivamente, reduciéndose posteriormente a un 1% diario durante un período de seis días. En otro estudio, donde hígados aislados de ratas fueron perfundidos durante 60 minutos con MC-LR radiomarcada ([3H]MC-LR) se informó que solo un pequeño porcentaje de la toxina administrada se excretó, específicamente, el 1,7% de la toxina radiomarcada fue excretada en la bilis, mientras que el 79% permaneció en el perfusato (el líquido de circulación) y el 16% se retuvo en el hígado. La mayoría de la toxina presente en el hígado se encontraba en una forma más polar que la toxina original, lo que sugiere que, aunque se excreta del cuerpo, una gran parte de ella se acumula en el hígado, dificultando su eliminación completa (Pace et al. 1991).

Mecanismos de toxicidad

Se han llevado a cabo numerosos estudios, tanto in vitro como in vivo, para investigar el mecanismo de acción de las MCs y su relación con los daños observados en los eventos de intoxicación reportados a nivel global. Sin embargo, los mecanismos y procesos subyacentes que se desencadenan tras la exposición aún no están completamente aclarados.

Estas toxinas tienen la capacidad de inhibir enzimas conocidas como serina/treonina fosfatasas (Figura 3), las cuales son necesarias para regular procesos celulares vitales como la proliferación y muerte celular, la movilidad celular, la dinámica del citoesqueleto y el control del ciclo celular. Específicamente inhiben las fosfatasas proteicas 1 (PP1) y 2A (PP2A) (Zhou et al., 2015). Estas enzimas funcionan eliminando grupos fosfatos de proteínas fosforiladas, lo que regula su actividad. PP1 está involucrada en la regulación del metabolismo del glucógeno, el ciclo celular y el mantenimiento del citoesqueleto, mientras que PP2A controla la proliferación celular, actúa como supresor tumoral y regula la apoptosis.

La inhibición PP1 y PP2A por parte de las MCs ocurre de manera covalente y se realiza en dos etapas, en primer lugar, el residuo ADDA de la MC interactúa con la

subunidad catalítica de la enzima fosfatasa de proteína formando un enlace de hidrógeno reversible. En segundo lugar, el residuo Mdha forma un enlace covalente irreversible con un sitio nucleofílico de la enzima, bloqueando completamente su función (Taranay et al., 2021).

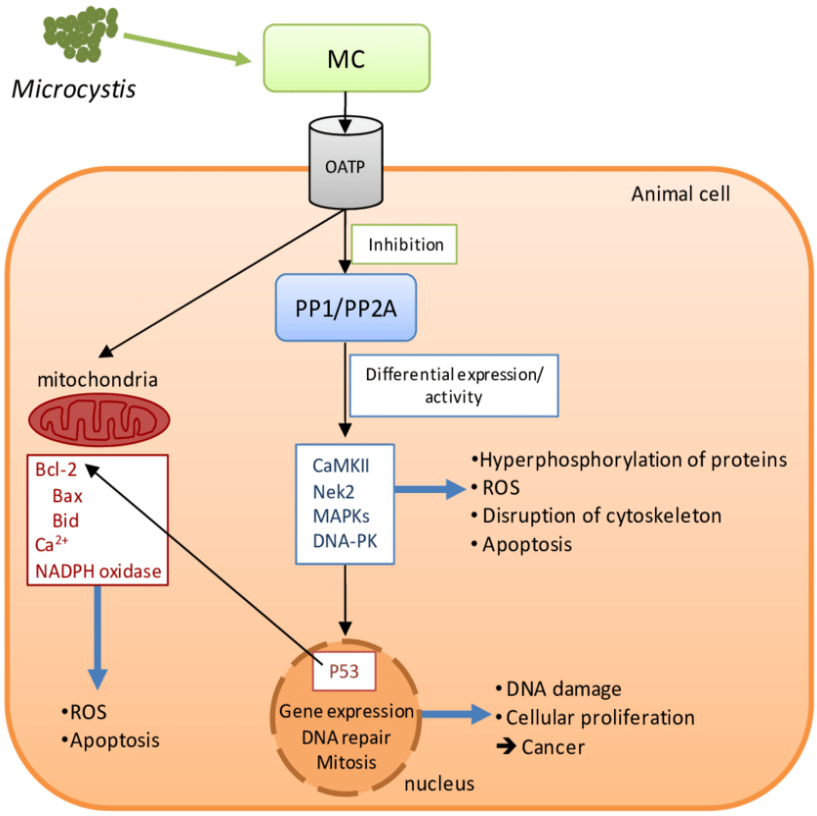


Figura 3 Mecanismos moleculares de toxicidad de MCs: revisión (tomado de Valerio, Chaves y Tenreiro, 2010).

Fosfatasas proteicas

La inhibición PP1 y PP2A, desencadena una cascada de eventos moleculares que desregulan vías de identificación esenciales (Figura 3) tales como la actividad de quinasas como CAMKII (proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina), NEK2 (quinasa reguladora del ciclo celular), MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos), ADN-PK (quinasa dependiente de ácido desoxirribonucleico (ADN)) y P53 (proteína supresora de tumores) entre otras (Valerio et al., 2010). Como resultado de la alteración de este equilibrio fosforilación/desfosforilación se encontrarán alteraciones a varios niveles como es el caso del citoesqueleto en el cual se encuentran alteradas sus tres estructuras (microtúbulos, filamentos intermedios, microfilamentos), o del ciclo celular donde se producen desajustes que pueden derivar en apoptosis o en la proliferación celular descontrolada dependiendo del caso (Arman et al., 2021).

Estrés oxidativo

Adicionalmente, la exposición a MCs provoca un aumento significativo en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que altera el estado redox celular, especialmente en órganos como el hígado y el pulmón (Muniz de Mesquita et al., 2022). La acumulación de ROS tiene un impacto profundo en los componentes esenciales de la célula debido a su alta reactividad, ya que reaccionan rápidamente con lípidos, proteínas y ADN, ocasionando daños funcionales. Esto se evidenció en el incremento de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OhdG), un biomarcador específico de daño oxidativo en el ADN, detectado en el ADN genómico de las células hepáticas de ratones expuestos a MC-LR. Los resultados de los experimentos de cuantificación mostraron que a concentraciones de 10 µg/L, los niveles de 8-OHdG fueron significativamente mayores en comparación con los grupos control ($p = 0,037$). Este hallazgo sugiere que incluso exposiciones a concentraciones relativamente bajas de MC-LR inducen daño oxidativo (Li et al., 2015).

Daño mitocondrial

A nivel mitocondrial, la exposición a MCs provoca la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), lo que altera la integridad de la membrana mitocondrial interna (Li et al., 2015). Esta condición facilita la liberación de calcio (Ca^{2+}) y citocromo c al citoplasma. La liberación de Ca^{2+} actúa como un segundo mensajero, activando enzimas como calpaínas, CaMKII y fosfolipasa A2, lo que afecta procesos celulares fundamentales. Además, el citocromo c liberado activa cascadas apoptóticas, promoviendo la muerte celular programada (Valerio et al., 2010).

Apoptosis

Desde el punto de vista de la muerte celular, la exposición a MC-LR puede desencadenar tanto apoptosis como necrosis en los hepatocitos. Al inhibir de manera significativa la actividad de PP1 y PP2A, resulta en la hiperfosforilación del citoesqueleto, activando así vías apoptóticas. A concentraciones de 15 µg/kg, se activan las vías per-Bax-cyt, c-caspasa, caspasa-9, caspasa-3, aumentando la tasa de apoptosis. Además, la producción excesiva de ROS, inducida por exposiciones a MCs, contribuye a la activación de genes apoptóticos, promoviendo un incremento en la apoptosis hepatocitaria. Este fenómeno se ve acompañado de un aumento en los niveles de enzimas hepáticas dañinas, indicando un daño significativo en la función hepática (Li et al, 2023).

3.3 Fisiopatología de la Microcistina-Leucina-Arginina

La MC-LR ha sido implicada en el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática y carcinoma hepatocelular (Figura 4) (Li et al., 2023). En modelos animales, la exposición crónica a esta toxina ha demostrado aumentar el contenido de grasa en el hígado y alterar de manera significativa la actividad de las enzimas antioxidantes. Un estudio realizado por Arman et al. (2021) observaron que la exposición prolongada a concentraciones de MC-LR (a partir de 1 µg/L) elevaba los niveles de triglicéridos y colesterol total en el suero y el hígado, promoviendo así la esteatosis hepática y la infiltración de células inflamatorias en el tejido. La activación de las células estrelladas hepáticas y la transición epitelial-mesenquimal de los hepatocitos generan un ambiente inflamatorio que promueve la remodelación de la matriz extracelular, favoreciendo así el desarrollo de fibrosis hepática (Shen et al., 2020). Esta cicatrización progresiva del tejido representa un paso clave que puede facilitar la evolución hacia el carcinoma hepatocelular (Li et al., 2023).

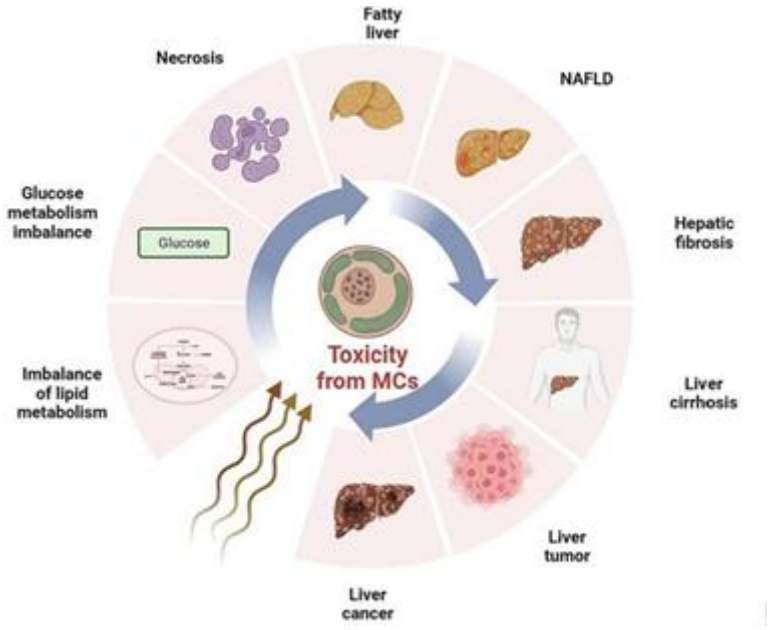


Figura 4 Mecanismos de toxicidad hepática por exposición a MC. La entrada de MC en las células primero causa trastornos metabólicos en el hígado, luego cambia la morfología celular e induce apoptosis. Con una gran cantidad de MC que ingresan a las células, se observa un hígado graso, que gradualmente evoluciona hacia fibrosis hepática y finalmente induce tumores, lo que conduce al cáncer de hígado (Tomado de Li et al., 2023).

Estudios demuestran que la exposición crónica a la MC-LR induce el carcinoma hepatocelular al alterar varios mecanismos moleculares en los hepatocitos (Shengu, Jiang y Zhang., 2022). En particular, se ha observado que la MC-LR afecta la expresión de ácido ribonucleico (ARN) no codificante, incluidos los microARN, ARN circulares y ARN largos no codificantes (Xu et al., 2018) que desempeñan roles cruciales en la regulación de genes asociados con el cáncer. Además, la MC-LR promueve la

metilación del ADN, lo que puede llevar al silenciamiento de genes supresores de tumores (Chen et al., 2018). Estos cambios epigenéticos, combinados con las alteraciones en los ARN no codificantes, activan vías de señalización clave, como las vías MAPK y PI3K-Akt, favoreciendo así la progresión del carcinoma hepatocelular.

Para concluir, dependiendo de los niveles de toxina a los que esté expuesto el organismo, se pueden generar dos tipos de daño distintos lo que ha llevado a la propuesta de un patrón de efecto dual (Figura 5). En modelos in vivo, se administraron dosis orales de MC-LR a ratones, y se evidenció que a dosis altas (≥ 32 $\mu g.kg^{-1}$), esta toxina induce apoptosis celular especialmente en el hígado, mientras que a dosis bajas (≤ 20 $\mu g.kg^{-1}$) las MCs pueden promover la división celular, incrementando el riesgo de crecimiento de lesiones precancerosas en tejidos como el hígado y el colon (Gheringer et al., 2004).

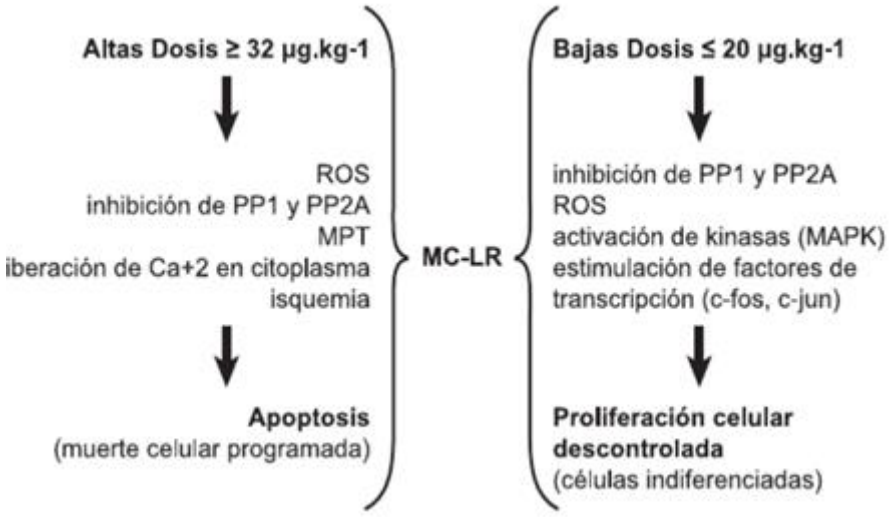


Figura 5 Principales mecanismos de acción involucrados en la respuesta dual frente a altas y bajas concentraciones de MC-LR (Tomado de Andrinolo, 2017).

Los estudios revisados destacan que la toxicidad de la MC-LR no se limita al hígado, sino que abarca otros sistemas esenciales del cuerpo, lo que subraya su impacto multisistémico y relevancia clínica. A nivel hematológico, la exposición crónica provoca alteraciones en el metabolismo del hierro, lo que genera anemia microcítica caracterizada por niveles reducidos de hemoglobina y eritrocitos (Pan et al., 2021). En el sistema renal, la exposición aguda a MC-LR incrementa la tasa de filtración glomerular y altera la homeostasis del sodio mediante la inhibición de bombas de Na^+ en las células renales (Lowe et al., 2012). Además, se ha demostrado que la MC-LR puede acceder a las células β pancreáticas a través del transportador OATP1b2, afectando la secreción de insulina y promoviendo la apoptosis por daño mitocondrial. Este proceso vincula la

exposición prolongada a MC-LR con el deterioro de la función pancreática y el desarrollo de trastornos metabólicos como la diabetes (Chen et al., 2020).

Estas alteraciones explican el impacto clínico observado en eventos como el brote de Caruaru, Brasil, en 1996, donde la exposición directa a MC-LR a través de agua contaminada en centros de diálisis desencadenó daño hepático agudo, síndrome hepático-renal e insuficiencia multiorgánica. De los 130 pacientes afectados, 116 presentaron síntomas graves y 60 fallecieron por fallo hepático agudo (Jochimsen et al., 1998; Pouria et al., 1998). Este caso evidencia la gravedad de las complicaciones derivadas de la exposición sistémica a la MC-LR y remarca la importancia de limitar sus niveles en agua potable, como lo indican las recomendaciones de la OMS (<1 µg/L) (Organización Mundial de la Salud, 1998). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2015) respalda este umbral, añadiendo una distinción específica que establece un límite más estricto de <0,3 µg/L para niños pequeños, lo que pone de manifiesto la vulnerabilidad de este grupo etario.

3.4 Diagnóstico de la Intoxicación por Microcistinas

El diagnóstico de intoxicación por MCs es un reto clínico debido a la variedad de síntomas inespecíficos que frecuentemente se confunden con otras enfermedades. Actualmente, este diagnóstico se basa en una combinación de síntomas clínicos, historia de exposición y pruebas de laboratorio que permiten identificar posibles intoxicaciones.

3.4.1 Síntomas Clínicos e Historia de Exposición

La recopilación detallada de la historia clínica del paciente, especialmente en relación con la exposición a agua contaminada o floraciones, es necesaria para el diagnóstico. Se indaga sobre actividades recreativas o el consumo de agua no tratada en áreas afectadas, además de explorar los síntomas presentados, como dolor abdominal, náuseas, vómitos, piel irritada, erupciones.

El 7 de enero de 2007 se reportó uno de los primeros casos de intoxicación aguda con cianobacterias y cianotoxinas en aguas recreativas de la represa de Salto Grande, Argentina (Giannuzzi et al., 2011). Un joven de diecinueve años practicaba deporte acuático con su moto acuática en la represa. Accidentalmente terminó en una bahía donde había una gran mancha de “pintura verde”, como la describió más tarde. Estuvo sumergido en esa agua durante dos horas, en transcurso del día el joven comenzó a experimentar malestar gastrointestinal, náuseas, vómitos y debilidad muscular, la condición del paciente empeoró después de cuatro días, requiriendo hospitalización y cuidados médicos intensivos. Los síntomas evolucionaron en tres

fases: primero, náuseas, vómitos y fiebre; luego, complicaciones respiratorias con neumonía, baja oxigenación y dificultad respiratoria; y finalmente, al tercer día, daño hepático severo, reflejado en un aumento significativo de enzimas hepáticas como la alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y γ-glutamil transferasa (γGT), lo que indicaba hepatotoxicosis grave. La exposición ocurrió por contacto directo, inhalación e ingestión accidental durante una floración de *Microcystis spp.*, con una concentración de MC-LR de 48 µg/L en el agua. Tras recibir tratamiento intensivo, el paciente mostró una recuperación progresiva de la función hepática y respiratoria.

También existen numerosos reportes de intoxicaciones crónicas por MCs. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Schaefer et al. (2020) en Stuart, Florida, donde se evaluaron los síntomas de 125 personas que estuvieron expuestas de manera crónica a floraciones de algas verdeazuladas en 2018. Este estudio reveló que los participantes experimentaron una media de 4,94 síntomas auto informados, siendo los respiratorios los más frecuentes, presentes en el 74,4% de los casos, con manifestaciones como tos seca y disnea. Además, un 49,6% reportó afecciones oculares, incluyendo irritación y picazón, mientras que el 44% presentó síntomas gastrointestinales, tales como náuseas y dolor abdominal (Figura 6).

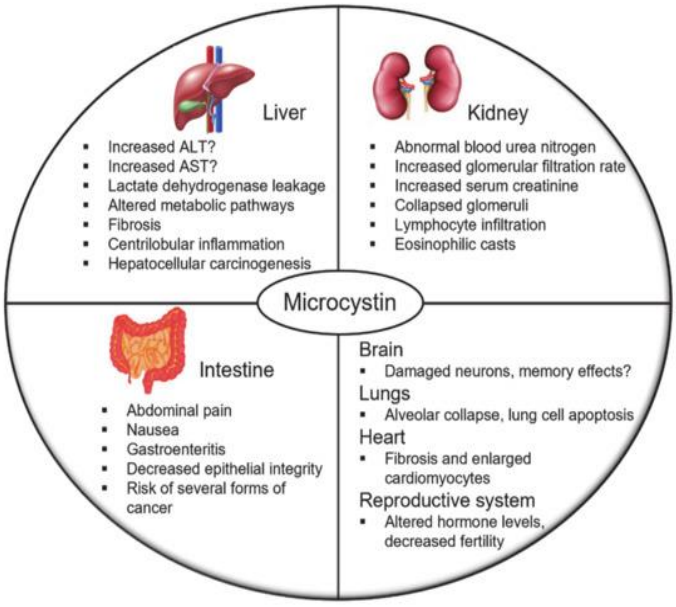


Figura 6 Fisiopatología de la MC en hígado, riñón, intestino, cerebro, pulmón, corazón y sistema reproductivo. Abreviaturas: ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa. Los signos de interrogación representan mecanismos que requieren una mayor investigación (Tomado de: Arman et al., 2021)

3.4.2 Respuesta Inmune frente a la Microcistina-Leucina-Arginina

Pese a la extensa evidencia sobre los efectos nocivos de la exposición a MCs, la investigación sobre la respuesta inmune frente a estas toxinas sigue siendo limitada. Hasta el momento, no se ha investigado de manera exhaustiva la presencia de anticuerpos específicos contra MCs en individuos expuestos de forma crónica a aguas contaminadas. La escasez de datos en este ámbito es significativa, y aún se desconoce si la MC en el torrente sanguíneo podría comportarse como hapteno o si necesitan asociarse a proteínas transportadoras para generar una respuesta inmunológica (Ferrari et al., 2022).

Por lo tanto, en este apartado, se desarrollará una breve revisión de los avances recientes en el estudio de la respuesta inmune a las MCs.

Generalidades sobre Anticuerpos

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Igs), son proteínas producidas por el sistema inmunológico para desempeñar un papel esencial en la defensa contra patógenos. Estas moléculas son generadas en respuesta a antígenos, estructuras que pueden incluir proteínas, polisacáridos u otros compuestos que el sistema inmune reconoce como extraños. En el caso de toxinas como las MCs, la identificación de epítopos específicos resulta necesaria para comprender cómo el sistema inmune las reconoce y combate. Las Igs, producidas por los linfocitos B activados, están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos pesadas (H) y dos ligeras (L), que juntas conforman dos sitios de unión al antígeno, conocidos como paratopos. Cada linfocito B activado produce Igs con una especificidad única, y aunque el isotipo puede cambiar mediante un proceso irreversible denominado cambio de isotipo, la especificidad del anticuerpo se mantiene. La detección de anticuerpos específicos en fluidos biológicos permite evaluar si un organismo ha estado en contacto previo con un antígeno, actuando como un marcador de respuesta inmune.

Anticuerpos contra Microcistina-Leucina-Arginina

La investigación ha evidenciado que las microcistinas pueden inducir la formación de anticuerpos, aunque este campo de estudio sigue siendo poco explorado. En particular, se ha observado que estas toxinas desencadenan respuestas inmunitarias, resultando en la producción de anticuerpos específicos. Un componente fundamental en estas respuestas es el epítopo ADDA, identificado como el principal sitio de reconocimiento tanto por células presentadoras de antígenos como por anticuerpos.

En un estudio realizado por Li et al. (2021) se analizaron específicamente los epítopos involucrados en la interacción de la MC-LR con anticuerpos. Los investigadores

clonaron los genes variables de una línea celular de hibridoma de ratón generada contra la MC-LR, formando un fragmento variable de cadena única (scFv). Utilizando técnicas de ELISA, determinaron que el scFv tenía una reactividad cruzada significativa no solo con la MC-LR, sino también con otras MCs, lo que indica que el sistema inmune podría reconocer varias variantes de MCs.

A través de métodos de acoplamiento molecular, se identificaron los residuos ADDA5 y Arg4 de la MC-LR como claves para la interacción con el scFv, respaldando la importancia del epítopo ADDA en la respuesta inmune. Este hallazgo es relevante, ya que destaca cómo los epítopos específicos de MCs pueden modular la producción de anticuerpos y activar respuestas inmunitarias. Esto sugiere que las interacciones moleculares entre las MCs y el sistema inmunológico son fundamentales en la mediación de respuestas adaptativas.

Esta capacidad de las MCs para generar respuestas inmunes fue confirmada en un estudio poblacional realizado por Ruibal-Conti et al. (2019), donde se evaluaron los anticuerpos específicos como indicadores biológicos de la exposición crónica humana a MCs. Este estudio examinó la presencia de los isotipos IgE e IgG anti-MC-LR en sueros de residentes expuestos (GE) y no expuestos (GNE) a fuentes de agua contaminada con MCs. Los resultados mostraron que un 68% de los residentes expuestos presentaban anticuerpos IgE, y un 39% tenía anticuerpos IgG, mientras que sólo un 11% de los individuos no expuestos fueron positivos para estos isotipos. En general, el 77% de la población expuesta mostró al menos un tipo de anticuerpo positivo, lo que demuestra que la exposición crónica a MCs genera una respuesta inmune medible. Estas diferencias entre los grupos expuestos y no expuestos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), destacando la relevancia de los anticuerpos como marcadores de exposición crónica a MCs.

La exposición a MCs en esta población fue identificada a través de varias vías, como el consumo de agua y pescado contaminados, además del contacto recreativo con el agua del lago. Un 60% de las muestras de agua presentaron concentraciones detectables de MCs, y en un 47% de estas muestras las concentraciones superaron el límite de 1 µg/L recomendado por la OMS para el agua potable. Además, la población estuvo expuesta a cantidades de MCs que superaron la ingesta diaria tolerable (IDT), lo que combinado con la producción de anticuerpos, refuerza el potencial de estos como biomarcadores de exposición crónica. Además, es fundamental determinar si la cuantificación de estas sustancias puede proporcionar información adicional, como la duración de la exposición, y explorar su posible papel protector contra el desarrollo de síntomas de intoxicación.

3.4.2 Detección de Anticuerpos en el Diagnóstico de Exposición.

Considerando la necesidad de identificar biomarcadores adecuados para evaluar la exposición crónica a las MCs, la detección de anticuerpos específicos se está consolidando como una herramienta útil para complementar la detección.

El estudio de Ruibal-Conti et al. (2019) proporciona evidencia sólida de que la presencia de anticuerpos, en especial los isotipos IgE e IgG, puede ser utilizada como un indicador biológico de exposición prolongada. Este enfoque complementa los métodos bioquímicos convencionales, como la medición directa de MCs en matrices ambientales o biológicas, al detectar la respuesta inmunológica en individuos expuestos. Además, investigaciones recientes (Ferrari et al., 2022; Ruiz et al. (2024) apoyan esta línea de estudio, destacando que la cuantificación de anticuerpos específicos podría no solo reflejar el nivel de exposición, sino también funcionar como una prueba diagnóstica en la identificación de poblaciones afectadas. La detección de anticuerpos como IgG e IgE sugiere un contacto previo con la toxina, incluso en casos donde los síntomas clínicos son leves o están ausentes. Esto es especialmente útil para evaluar exposiciones crónicas o históricas, ya que la respuesta inmune puede persistir mucho después del contacto inicial, aun cuando los niveles de MCs hayan disminuido.

Este enfoque también sería útil en estudios epidemiológicos y de vigilancia de poblaciones cercanas a fuentes de agua contaminada. Los anticuerpos podrían actuar como biomarcadores tempranos de daño inducido por MCs, permitiendo la identificación de alteraciones en órganos como el hígado o los riñones antes de que se manifiesten los daños bioquímicos tradicionales.

Sin embargo, este campo aún está en desarrollo y enfrenta desafíos importantes. Es fundamental mejorar la especificidad de las pruebas para evitar reacciones cruzadas con otras toxinas, así como optimizar su sensibilidad para detectar niveles bajos de anticuerpos en exposiciones de baja intensidad. Además, la variabilidad en la respuesta inmune entre individuos dificulta la estandarización de los ensayos y requiere la definición de rangos de referencia basados en estudios poblacionales.

Otro punto a considerar es el tipo de anticuerpos a detectar, ya que podrían ofrecer información sobre diferentes fases de la exposición. La detección de anticuerpos IgM podría sugerir una exposición aguda reciente, dado que la IgM es el primer tipo de anticuerpo producido en respuesta a un nuevo antígeno.

Por otro lado, los anticuerpos IgG e IgE serían más indicativos de exposiciones crónicas o repetidas (Ferrari et al., 2022), ya que el cambio de isotipo a IgG es característico de una respuesta inmune más avanzada y de larga duración,

proporcionando una memoria inmunológica más duradera. La detección de estos isotipos es necesaria para poder establecer la temporalidad y magnitud de la exposición. Además, la detección de anticuerpos IgA podría ser de especial relevancia en contextos de exposición a través de la mucosa, como en la inhalación de aerosoles, dado que este tipo de anticuerpo está asociado con las superficies mucosas, lo que lo convierte en un marcador clave cuando se sospecha que la exposición se ha dado por vía respiratoria o gastrointestinal.

Dado esto, la evidencia sugiere que los anticuerpos serían útiles como marcadores de exposición MC-LR y, potencialmente, a otros tipos de microcistinas. Sin embargo, se requieren más investigaciones para afinar aspectos específicos. Este trabajo tiene como objetivo contribuir al desarrollo y perfeccionamiento de la técnica de detección de anticuerpos contra la MC-LR, explorando su potencial como herramienta de diagnóstico.

3.5 Determinación de Microcistina-Leucina-Arginina en Fluidos Humanos

La mayoría de los métodos de detección validados están diseñados para la detección de MC-LR en matrices como agua y alimentos (Smienk et al., 2007). Por ello, es fundamental establecer un método reconocido, sensible y específico que pueda ser aplicable de manera general para detectar la presencia de la toxina en el material biológico humano.

Como se ha mencionado, la detección directa de MC-LR en sangre presenta importantes desafíos debido a su corta vida media en plasma y su rápida biotransformación y eliminación del organismo (Palagama et al., 2018). Esto implica que, para una detección confiable de la toxina, son necesarios niveles elevados, lo cual es característico de casos de intoxicación aguda (Giannuzzi et al., 2011). En situaciones de exposición crónica o de menor intensidad, la concentración de MC-LR libre en sangre suele ser insuficiente para ser detectada mediante métodos convencionales (Guo et al., 2014). No obstante, la detección de metabolitos derivados de MC-LR puede constituir una estrategia útil para evaluar la exposición a esta toxina.

3.5.1 Métodos analíticos empleados en la determinación Microcistina-Leucina-Arginina en Fluidos Humanos

Se han desarrollado diversos métodos para la detección, identificación y cuantificación de la MC-LR; sin embargo, la mayoría se ha centrado en muestras ambientales. En este contexto, este trabajo revisa los ensayos aplicados en muestras biológicas humanas. Para facilitar la comprensión, se incluye una tabla comparativa con los aspectos clave de cada técnica, así como sus ventajas y limitaciones.(Tabla 1).

Tabla I. Revisión de Métodos Analíticos para Detectar MC-LR en Fluidos Humanos.

Método analítico	Matriz biológica	Analito detectado	Ventaja	Desventaja	LOD	Referencia
ELISA INDIRECTO	Suero humano	Anticuerpos específicos (IgG, IgE, IgM, IgA) contra (MC-LR)	Amplio rango de aplicación, detección rápida. Resistencia a los efectos de matriz	Falta de anticuerpos de amplio espectro; Es probable que se produzcan falsos positivos.	Dependiente del tipo de ELISA y anticuerpos usados	Ruibal-Conti et al. (2019).
KIT ELISA anti-ADDA	Suero humano	Toxina conjugada	Simples, robustos y sensibles	Falta de especificidad, detecta diversos congéneres, sobreestimación de las concentraciones	0,1 µg/L	Heussner et al. (2014).
LC/MS	Suero humano	Detecta y compuestos de MC-LR parentales	Permite un análisis estructural y ofrece alta selectividad, siendo útil para muestras con matrices complejas y bajo contenido.	El equipo tiene un alto costo, requiere personal especializado, presenta variaciones en las condiciones de prueba entre laboratorios	0,14 µg/L	Palagama et al. (2018).

Método analítico	Matriz biológica	Analito detectado	Ventaja	Desventaja	LOD	Referencia
IC-LC-MS	Orina	Detecta y cuantifican los compuestos de MC-LR parentales	Alta sensibilidad y selectividad, permite cuantificar concentraciones muy reducidas. Método adaptable para detectar otros congéneres	Costos elevados de anticuerpos; preparación de muestras laboriosa.	< 0.005 ng/mL (0.0100 ng/mL en orina)	Wharton et al. (2018)
IC-PPIA	Orina	Metabolito MCLR-Cys	Alta sensibilidad. Compatible con análisis de alto rendimiento y automatización	No permite distinguir entre homólogos específicos de MCs.La operación es compleja y costosa.	0,050–0,500 ng/ml.	Wharton et al. (2019)
PCR	Mucosa Nasal	ADN de cianobacterias	Alta sensibilidad, rapidez en la obtención de resultados, y aplicaciones en diversos tipos de muestras biológicas.	Técnica no cuantitativa, de baja especificidad, susceptible a contaminación y falsos positivos.	1–10 copias de ADN/mL (puede variar según condiciones del experimento).	Facciponte et al. (2018)

3.5.2 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

Los ensayos inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) son métodos ampliamente utilizados para la detección semicuantitativa de la MC-LR, debido a su simplicidad y rapidez. Estos ensayos se han mejorado mediante el desarrollo de anticuerpos específicos con alta sensibilidad para detectar MC-LR en diversas matrices, mostrando resultados prometedores (Xu et al., 2022). Por ejemplo, Zeck et al. (2001) diseñaron un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales dirigidos contra la fracción ADDA de la toxina, mientras que, en un estudio más reciente, Chen et al. (2020) desarrollaron un ELISA de sándwich abierto (OS-ELISA) con un límite de detección tan bajo como 85 pM. Sin embargo, la aplicación de estos ensayos ha estado limitada principalmente a la detección de MC-LR en muestras de agua, estudios ambientales, ganado (Brena et al., 2021) y en organismos acuáticos como las almejas (Baralla et al., 2016).

En un trabajo realizado por Heussner et al. (2014), se evalúan kits ELISA anti-ADDA disponibles comercialmente, diseñados para detectar diversos congéneres de microcistinas en suero humano, incluyendo MC-LR, MC-YR, MC-RR, MC-LA. Estos kits reconocen específicamente la fracción ADDA mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales, dependiendo de la presentación. Es importante destacar que estos kits ELISA anti-ADDA detectan directamente la presencia de microcistinas, calculando la interacción de la fracción ADDA. con los anticuerpos específicos.

Una de las principales limitaciones de estos kits es su baja especificidad, lo que impide diferenciar entre los diversos congéneres que contienen la fracción ADDA. Aunque su diseño permite detectar una amplia gama de microcistinas, esto puede generar imprecisiones, especialmente cuando se aplica en matrices complejas como el suero humano, donde no logran identificar de manera precisa la exposición a microcistina leucina arginina (MC-LR). Debido a esta incapacidad de distinguir entre congéneres, la técnica tiende a perder reproducibilidad en concentraciones bajas de la toxina, como las que se encuentran en casos de exposición crónica.

En contraste, los ensayos ELISA que cuantifican anticuerpos específicos en suero, como IgG, IgE, IgM o IgA contra MC-LR, pueden proporcionar una evaluación indirecta de la exposición crónica a la toxina al analizar la respuesta inmunológica del organismo. Esta metodología podría ofrecer una indicación más precisa del nivel de exposición, ya que los anticuerpos están directamente asociados con la exposición a la toxina en su forma libre.

En el estudio realizado por Ruibal-Conti et al. (2019) se desarrolló un ELISA de tipo indirecto, diseñado para detectar anticuerpos específicos contra MC-LR en suero humano. En este método, las placas de microtitulación fueron recubiertas con antígeno de MC-LR, y posteriormente se incubaron con sueros diluidos que contenían anticuerpos específicos contra la toxina. Los anticuerpos presentes en la muestra se unieron al antígeno, y se detectan mediante la adición de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, que reconoce específicamente a los anticuerpos humanos. La reacción enzimática posterior generó una señal colorimétrica que permitió cuantificar los niveles de anticuerpos específicos presentes en las muestras.

3.5.3 Ensayo de inhibición de la proteína fosfatasa

El ensayo de inhibición de la proteína fosfatasa se basa en la capacidad de la MC-LR para inhibir de manera específica las fosfatasas PP1 y PP2A. Esta inhibición permite medir la actividad enzimática residual como un indicador de la presencia y concentración de la toxina en las muestras. En sus primeras etapas, se desarrolló un ensayo colorimétrico de inhibición de fosfatasas que utilizaba sustratos como el fosfato de p-nitrofenilo (Sassolas et al., 2011). Al ser desfosforilados por las fosfatasas, estos sustratos generan un cambio de color, lo que permitía la detección de la actividad enzimática. Posteriormente, para mejorar la eficacia de este ensayo, se han desarrollado diversas variantes que optimizan su sensibilidad y especificidad.

En un trabajo realizado por Wharton et al. (2019), se presentó una mejora en la detección de microcistinas mediante la implementación de anticuerpos específicos para la fracción ADDA en un método denominado, inmunocaptura por inhibición de fosfatasa proteica (IC-PPIA), esta técnica se aplicó en orina humana recolectada de residentes en el sur de Florida, en áreas afectadas por floraciones de algas cianobacterianas.

El método IC-PPIA se basa en un enfoque de doble selectividad. En la primera fase, se utiliza un anticuerpo específico que se une selectivamente a las toxinas diana, reteniéndolas en una fase sólida y facilitando su separación de componentes interferentes, como metabolitos o moléculas pequeñas presentes en la muestra.

La segunda fase del ensayo evalúa la inhibición de la enzima fosfatasa proteica 2A (PP2A), que actúa como un objetivo celular para las MCs. La actividad de la PP2A es bloqueada específicamente por estas toxinas, y el grado de inhibición enzimática se mide al introducir un sustrato específico. Esta inhibición es directamente proporcional a la concentración de toxinas presentes en la muestra, permitiendo así cuantificar los niveles de MC.

Este enfoque fue aplicado a muestras de orina de 86 individuos reclutados durante una floración de algas en el sur de Florida. De estas muestras, tres resultaron positivas para MC-LR, con concentraciones de 0,052; 0,055 y 0,089 ng/mL, sugiriendo una posible exposición por inhalación, ya que los participantes no informaron contacto directo con aguas contaminadas.

En términos de ventajas y desventajas, el método IC-PPIA presenta varios aspectos a considerar. Entre las ventajas, se destaca su capacidad para detectar múltiples congéneres de microcistinas en un único ensayo, así como su enfoque en la actividad biológica de las toxinas. Sin embargo, es importante señalar que la técnica también presenta limitaciones, como la posibilidad de interferencias de otras moléculas que pueden inhibir la PP2A, lo que podría afectar la precisión de los resultados.

3.5.4 Cromatografía líquida-espectrometría de masas

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica analítica de alta precisión y sensibilidad, ampliamente utilizada para el análisis de microcontaminantes en matrices biológicas (España Amórtegui et al., 2023). Su capacidad para separar e identificar compuestos en mezclas complejas la ha establecido como una herramienta clave en estudios toxicológicos y de monitoreo ambiental, con implicaciones significativas en la identificación de microcistinas (Fernandes Rocha et al., 2024).

En este contexto, se han llevado a cabo diversos estudios que emplean LC-MS para la detección de MC-LR en fluidos biológicos. Por ejemplo, en el estudio realizado por Palagama et al. (2018) optimizaron los métodos de extracción en fase sólida para cuantificar seis microcistinas comunes en orina y plasma de ratón, así como en suero humano. Este estudio logró altos índices de recuperación, bajas desviaciones estándar relativas y límites de cuantificación reducidos (≤1 µg/L). Asimismo, en el estudio previamente desarrollado sobre los pescadores del lago Chaohu, se utilizó LC-MS para determinar la concentración de microcistinas en el suero. Este enfoque mostró una buena recuperación en el experimento de extracción.

En otro estudio, se desarrolló una variante del método de inmunocaptura cromatografía líquida de espectrometría de masas (IC-LC-MS) para la detección de microcistina-LR en orina (Wharton et al. 2018). Esta técnica integra un paso de inmunocaptura que facilita la captura selectiva de microcistinas mediante anticuerpos específicos. En este caso, se utiliza un anticuerpo diseñado para reconocer la porción conservada ADDA de las microcistinas, lo que permite la separación del analito y la eliminación de interferentes presentes en la muestra. Posteriormente, el analito

capturado se somete a separación en una columna de cromatografía líquida, aprovechando sus propiedades químicas. Finalmente, el analito se introduce en un espectrómetro de masas, donde es ionizado y analizado, proporcionando información precisa sobre su masa y permitiendo su cuantificación

A pesar de las ventajas que ofrecen estas técnicas —incluyendo su capacidad para el análisis estructural, excelente selectividad, y la posibilidad de realizar análisis cualitativos y cuantitativos precisos—, también presenta ciertas limitaciones. Por un lado, la operación de los equipos de LC-MS requiere personal altamente capacitado y un considerable tiempo para la interpretación de los datos, para el enriquecimiento y la limpieza de muestras se necesita una preparación compleja debido a su nivel de sensibilidad y selectividad, y además, la disponibilidad de equipos de LC-MS es limitada en muchas instalaciones debido a su elevado costo, lo que restringe su uso generalizado (Massey et al., 2020)

3.5.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR es una técnica fundamental en biología molecular que permite la amplificación específica de ADN, facilitando la detección de microorganismos en diversas matrices. Esta técnica se ha aplicado principalmente en el monitoreo de microcistinas en muestras ambientales (Ghosh et al., 2008) y en la identificación de genotipos de cianobacterias productoras de hepatotoxinas. Esta técnica permite detectar genes claves involucrados en la biosíntesis de estas toxinas, como *mcyA* y *mcyB*, que participan en las rutas metabólicas responsables de la producción de microcistinas (Bourne et al., 2005).

Un estudio reciente de Facciponte et al. (2018) exploró la aplicación de la PCR anidada (nested-PCR) en hisopados nasales, evaluando su viabilidad como método no invasivo para detectar cianobacterias en el tracto respiratorio superior. En este estudio, que incluyó a 77 participantes, se recolectaron muestras mediante hisopados nasales y se analizaron con una PCR específica para cianobacterias. Para la extracción de ADN, los investigadores utilizaron el *kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue*, que permite una purificación eficiente del ADN. La técnica de nested-PCR empleó cebadores específicos para la región 16S del ADN cianobacteriano: en la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores CYA359F y CYA781R, mientras que en la segunda ronda se utilizó el cebador 16SUR. Para asegurar la calidad de la muestra humana y la precisión del análisis, se incluyó como control positivo el gen β-globina. El protocolo de amplificación consistió en una primera fase de desnaturalización, alineación y extensión, seguida de una segunda amplificación para aumentar la sensibilidad y especificidad.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, lo que permitió confirmar la presencia de ADN cianobacteriano en las muestras.

La técnica de PCR utilizada en este estudio presenta varias ventajas significativas. En primer lugar, mostró una sensibilidad del 83% y un valor predictivo positivo (VPP) del 100%, lo que indica que es un método eficaz para identificar la presencia de cianobacterias en las vías respiratorias superiores. Esta alta sensibilidad y VPP hacen que la PCR sea una herramienta valiosa en la detección inicial de estas toxinas en las mucosas, lo que podría contribuir al monitoreo de la exposición ambiental a cianobacterias. Además, la facilidad y rapidez del procedimiento de PCR permiten un análisis no invasivo, lo que lo hace accesible para una amplia gama de pacientes.

Sin embargo, también hay desventajas importantes a considerar. A pesar de su utilidad, la PCR del hisopado nasal presentó una especificidad del 0%, lo que sugiere que, aunque puede detectar cianobacterias, no puede distinguir entre diferentes especies o cepas, lo que limita su capacidad para proporcionar información específica sobre el tipo de cianobacterias presentes. Esta falta de especificidad significa que la PCR nasal no puede considerarse un sustituto directo del análisis broncoscópico, que ofrece una evaluación más completa de las cianobacterias en las vías respiratorias. Asimismo, la metodología actual empleó un enfoque binario para la identificación de cianobacterias, lo que no proporciona datos cuantitativos sobre los niveles presentes en las muestras. Esto sugiere que se necesitan métodos adicionales, como la PCR cuantitativa, para obtener un análisis más preciso y detallado. Por último, el estudio no incluyó la secuenciación de especies específicas de cianobacterias, lo que impide hacer afirmaciones sobre el potencial de toxicidad asociado con las especies detectada.

La revisión de los métodos analíticos disponibles evidencia que no existe una estrategia única capaz de abordar de manera integral todos los escenarios de exposición. Las técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas permiten una identificación y cuantificación específicas de la toxina y sus congéneres; sin embargo, su aplicabilidad en estudios de exposición humana se ve limitada por los elevados costos del equipamiento, la complejidad operativa y los requerimientos de personal especializado. En este contexto, los métodos basados en determinación indirecta —como los ensayos inmunológicos dirigidos a anticuerpos específicos— adquieren relevancia como herramientas complementaria, particularmente en situaciones de exposición crónica o de baja intensidad, donde la detección directa de la toxina puede no ser factible, constituyendo este enfoque metodológico el eje central del presente trabajo, con potencial aplicación en el ámbito médico y epidemiológico.

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Población de voluntarios y procesamiento de muestras

Para la selección de muestras, se recolectaron muestras de sangre de 8 individuos pertenecientes al grupo expuesto (GE), quienes se asume que han estado en contacto constante con la toxina en distinta medida y grado (debido a su trabajo en zonas afectadas y a su lugar de residencia durante los últimos 2 años). Adicionalmente, se incluyeron 20 muestras de individuos del grupo no expuesto (GNE), quienes, presumiblemente, no han estado en contacto con la toxina, ya que su lugar de residencia se encuentra a más de 750 kilómetros de las áreas afectadas por el crecimiento de algas.

Las muestras de sangre fueron dejadas coagular a temperatura ambiente, y el suero fue separado por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos. Los sueros fueron separados, alicuotados y mantenidos a -20 °C hasta el momento de uso.

Para su uso en el ensayo de ELISA, todas las muestras fueron tratadas de manera uniforme de acuerdo con resultados previos del grupo de trabajo, diluyendo 5 µL de suero en 1000 µL de solución de Buffer salino Fosfato (PBS) con 1% de leche en polvo (p/v), logrando una dilución final de 1/200.

4.2. Producción de MC-LR conjugada a Albúmina de Suero Bovino

Para la preparación de la microcistina conjugada a una proteína *carrier* (seroalbúmina bovina, BSA), se utilizaron los siguientes materiales:

- **EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida)**: es un agente de acoplamiento utilizado para activar grupos carboxilo (–COOH) y facilitar su reacción con grupos amino ($–NH_2$). En este caso, se utiliza para unir la microcistina (MC-LR) a una proteína portadora como BSA.
- **NHS (N-hidroxisuccinimida)**: se utiliza junto con EDC para aumentar la eficiencia de la reacción de acoplamiento. Facilita la formación de enlaces amida entre el carboxilo activado de la microcistina y los grupos amino de la BSA.
- **MC-LR 1 mg**: es una variante específica de la microcistina, una toxina producida por cianobacterias. En este caso, es el antígeno que se quiere detectar mediante la técnica de ELISA.
- **BSA**: es una proteína común utilizada para conjugar con pequeños antígenos como la microcistina. La BSA ayuda a aumentar el tamaño molecular del antígeno, y en este caso mejora la unión a la placa de poliestireno que se emplea durante el ensayo de ELISA.

- **PBS 1X:** en su concentración de uso ("1X") es una solución tampón comúnmente utilizada en biología molecular y celular (Na_2PO_4/$HNaPO_4$ 20 mM, NaCl 0,9 % p/v, pH 7). Se utiliza para mantener un entorno constante de pH y osmolaridad en diversos experimentos. Su pH y salinidad son equivalentes a los del suero y el plasma sanguíneo.

El procedimiento para obtener el conjugado de microcistina con BSA utilizando los materiales mencionados antes, se describe paso por paso a continuación:

1. Poner a entibiar a temperatura ambiente el EDC, NHS, MC-LR y la BSA.
2. Preparar solución de BSA de 1 mg/ml en PBS 1X.
3. Pesar EDC 0,4 mg y NHS 0,6 mg, y agregarlos a 1 ml de solución de BSA.
4. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar MC-LR en relación equimolar con BSA (66,5 a 1). Es decir: 0,015 mg (15 µL de una solución stock de MC-LR 5 mg/ml en agua bidestilada).
6. Incubar 2 horas a temperatura ambiente.
7. Separar por columna de spin y reservar en freezer hasta el momento de uso.

4.3 ELISA indirecto para la detección de isotipos de inmunoglobulinas

El ensayo de ELISA fue puesto a punto para la detección de inmunoglobulinas totales específicas para MC-LR. En este trabajo, el objetivo fue reconfigurar las condiciones experimentales para detectar los distintos isotipos de inmunoglobulinas específicas para MC-LR, como son IgG, IgM, IgA e IgE.

No habiendo antecedentes de estos experimentos en el grupo de trabajo, se realizó una exploración de las posibles condiciones de reacción, utilizando dos configuraciones experimentales según los anticuerpos anti-isotipo disponibles. En los casos en que había disponible un anticuerpo anti-isotipo ya marcado con peroxidasa, se empleó un diseño en “dos capas”. En los casos en que el anticuerpo anti-isotipo no estaba marcado, se realizó un ensayo en “tres capas”.

A continuación, se describen ambos procedimientos, paso por paso.

1. **Sensibilización de placas de poliestireno.** De acuerdo con el esquema de siembra que se reproduce más adelante, se colocaron 100 µL de antígeno MC-LR-BSA en solución 1µg/mL con *buffer coating* (BC, solución tampón para estabilizar el antígeno, Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 50 mM, pH 9,2) en placas de poliestireno Nunc MaxiSorp. Las placas se incuban durante 1 hora a 37 °C y se lava cada pocillo tres veces con solución de lavado (PBS-Tween 20 0,05% v/v).

2. **Bloqueo.** Los sitios de unión inespecífica (que son los espacios que pueden haber quedado libres en la superficie de los pocillos de la placa de poliestireno, en los que cualquier proteína podría quedar retenida dando resultados falsos) se bloquean con una proteína inerte en la reacción, en este caso leche en polvo descremada al 3% p/v en PBS 1X y se incuba 1 hora a 37 °C. Las placas luego se lavan tres veces con solución de lavado

3. **Siembra de muestras.** Tanto las 8 muestras de personas expuestas como las 20 muestras de personas no expuestas se sembraron en una dilución 1/200 de acuerdo con el esquema de siembra que se reproduce más adelante en esta sección. Los pocillos utilizados como blanco de reacción recibieron buffer de dilución (BD, PBS con 1% de leche en polvo (p/v)) en lugar de muestras, se incuban 1 hs a 37° C y se procede a lavar los pocillos con SL.

4. **Incubación con anticuerpos anti-isotipo.** Esta etapa se realizó de manera diferente según si el ensayo fue de dos o tres capas. Las diferencias entre los dos diseños se describen a continuación.

4.4 Diseño de la placa

Se sembraron 4 placas en paralelo con este mismo diseño, para determinar por separado IgG, IgM, IgE, e IgA. Los bordes de la placa han sido descartados para su uso, para evitar el “efecto borde”, esto hace referencia a la variabilidad en la lectura de los resultados que se observa en la primera fila y columna de una placa de ELISA; esto se debe a que la primeras filas y columnas están más expuestas a las condiciones ambientales, como la temperatura, la humedad y la luz, lo que puede afectar la reacción enzimática y la lectura de los resultados (Figura 8).

Tratamiento de las muestras

Todas las muestras fueron tratadas de manera uniforme, diluyendo 5 µL de suero en 1000 µL de buffer diluyente (BD) de PBS con 1% de leche en polvo (p/v), logrando una dilución final de 1/200.

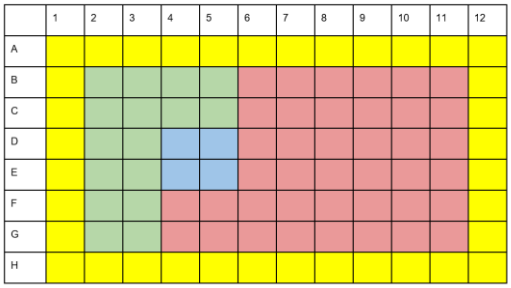


*Figura 7. Esquema de siembra de muestras y blancos. La **zona celeste**: representa la zona donde se sembraron los blancos. La **zona verde**: se destinó a la siembra de sueros de GE. La **zona roja**: sueros de GNE. La **zona amarilla**: se ha descartado su uso para evitar el “efecto borde”*

Ensayo en dos capas

En los ensayos dirigidos a la detección de inmunoglobulinas de tipo IgM e IgG, se utilizó un formato de dos capas en virtud de la disponibilidad de anticuerpos específicos contra IgM (Ac-anti-IgM, SIGMA: *Goat-anti-Human IgM-μH-, HRPO*) y contra IgG (Ac-anti-IgG, CAPPEL: *Goat-anti-Human IgG-Fc-, HRPO*) directamente conjugados con una enzima, peroxidasa (HRPO: *Horseradish Peroxidase,* peroxidasa de rábano picante). La ventaja de este formato es que no es necesario incluir una capa adicional, ya que los anticuerpos marcados permiten la detección directa de las inmunoglobulinas objetivo. El esquema de reacción se reproduce a continuación (Figura 9).

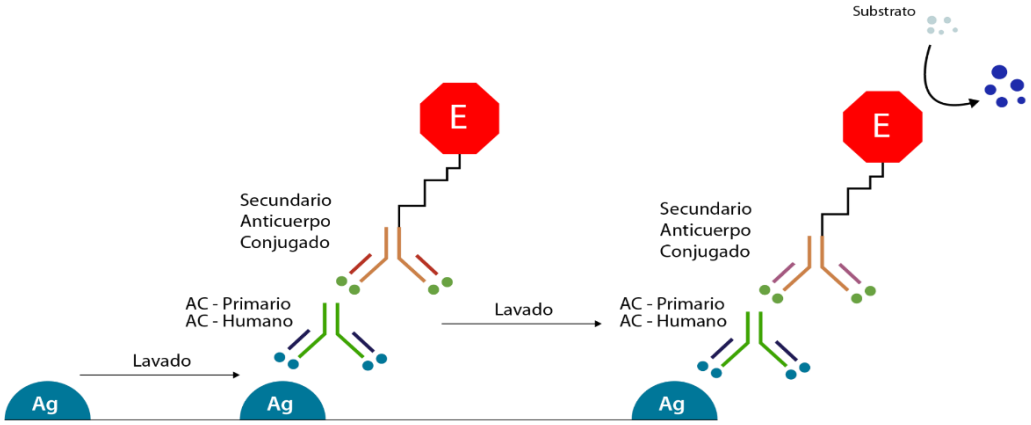


Figura 8. Esquema de reacción de ensayo de dos capas, para la detección de inmunoglobulinas IgG e IgM (Elaboración propia).

En el ensayo de dos capas, los anticuerpos conjugados anti-isotipo IgG e IgM se incubaron en dilución 1% v/v en BD, durante 1 h a 37 °C de temperatura. Al cabo de ese plazo, se procedió a lavar 3 veces con SL y luego al revelado de la reacción, que se describe más adelante.

Ensayo en tres capas

Este se emplea en los ensayos para la detección de inmunoglobulinas IgE e IgA. A diferencia de los ensayos para IgM e IgG, los anticuerpos primarios utilizados para IgE (VECTOR: *Goat-anti-human IgE*) e IgA (DAKO: *Rabbit-anti-human IgA*) no están conjugados con peroxidasa, lo que hace necesario un Ac extra para generar una señal detectable. Se introduce una capa adicional de anticuerpos secundarios, que actúan como puente entre los anticuerpos primarios y la enzima de detección (Figura 9). En el caso del ensayo para IgE, se emplea un anticuerpo anti inmunoglobulinas de cabra, generado en caballo y conjugado con peroxidasa (VECTOR: *Horse-anti-goat Ig, HRPO*).

De manera similar, para el ensayo de IgA, se utilizó un anticuerpo anti-IgA de conejo, generado en cabra y también marcado con peroxidasa (BETHYL: *Goat-anti-rabbit Ig, HRPO*). Estos anticuerpos secundarios permiten la detección indirecta de las inmunoglobulinas objetivo mediante la reacción enzimática de la peroxidasa, lo que finalmente genera una señal cuantificable.

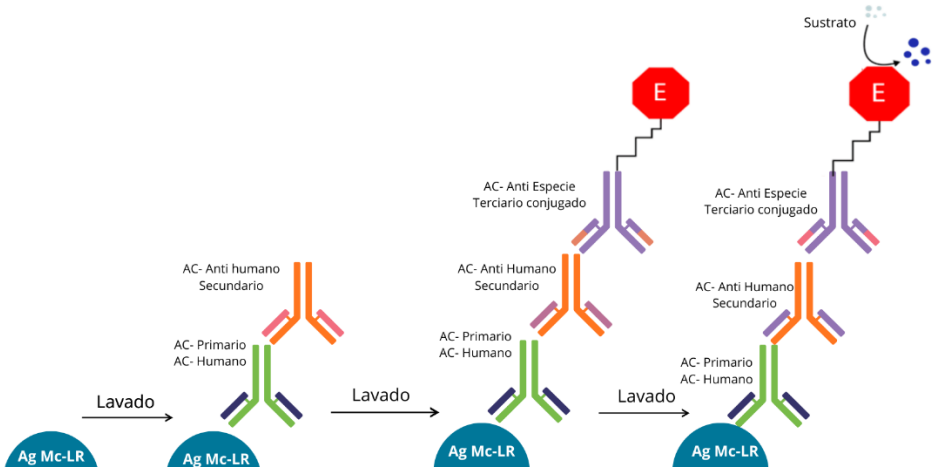


Figura 9. Esquema de reacción de ensayo de tres capas, para la detección de inmunoglobulinas IgE e IgA (Elaboración propia)

En el ensayo de tres capas, los anticuerpos anti-isotipo IgA e IgE se incubaron en BD, durante 1 h a 37°C de temperatura. Al cabo de ese plazo, se procedió a lavar 3 veces con SL y luego a la incubación con un tercer anticuerpo anti-especie, conjugado a HRPO. Estos anticuerpos se diluyeron en BD y se incubaron durante 1 h a 37°C de temperatura. Al cabo de dicho plazo, se lavaron los pocillos 3 veces con SL y se procedió al revelado de la reacción, que se describe más adelante.

4.5 Revelado de la reacción: desarrollo de color y lectura de resultados

Para el desarrollo del color se agregaron 100 µL del kit de revelada mezcla de dos reactivos A + B que aportan el sustrato y cromógeno (BD OptEIA), específico para la actividad de la enzima peroxidasa. La reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos a temperatura ambiente y en un lugar oscuro; dicho tiempo fue estipulado en función de la experiencia del grupo, aunque este periodo puede variar según la dinámica de la reacción.

Transcurridos los 30 minutos, se detuvo la reacción añadiendo 50 µL de H_2SO_4 4N. A continuación, la placa se colocó en un lector de microplacas (Murex, TECAN Instruments) ajustado a una longitud de onda de 450 nm para la lectura de los resultados. Posteriormente, se procedió al análisis de los datos. El valor de *cut-off* -cuando correspondía- se definió a partir del procesamiento de los resultados obtenidos en 20 sueros de control.

CAPÍTULO V. RESULTADOS

Se investigó la presencia de anticuerpos específicos contra MC-LR utilizando el ensayo ELISA. Los isotipos IgE, IgM, IgA e IgG anti-MC-LR se evaluaron en muestras de suero de residentes expuestos a la toxina GE y GNE.

Para interpretar los datos, se analizaron los valores crudos obtenidos en cada ensayo y se aplicó el test de Mann-Whitney para identificar si existían diferencias significativas ($p<0,05$). A partir de estos resultados, en el caso de rechazo de hipótesis nula se estableció el valor de *cut-off* para discriminar entre muestras positivas y negativas.

5.1 Procesamiento de los datos

El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante un enfoque sistemático que incluye varios pasos fundamentales. Inicialmente, se calcularon los promedios de las lecturas de los duplicados para cada muestra, con el fin de obtener un valor representativo. A continuación, se calculó el promedio de los valores correspondientes a los blancos para establecer un punto de referencia.

Una vez obtenidos estos promedios, se procedió a restar el valor de los blancos de cada muestra. Este ajuste permite corregir cualquier interferencia o ruido de fondo que pueda afectar la precisión y validez de los resultados. Tras la corrección, se utilizó el test de Mann-Whitney para evaluar si existían diferencias significativas entre los grupos analizados. Este enfoque estadístico es adecuado para comparar datos no paramétricos y proporciona información relevante sobre las diferencias entre los grupos expuestos y no expuestos.

5.2 Presentación de los resultados de cada Inmunoglobulina

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos para cada tipo de inmunoglobulina analizada en los GE y GNE.[1]

Resultados de IgG

En el caso de IgG, no se observó una diferencia significativa entre los grupos expuestos y no expuestos ($p>0,05$) según el test de Mann-Whitney. Los valores de

[1] *Nota general: Los datos de cada inmunoglobulina se presentan en el Anexo I, donde se pueden consultar las lecturas individuales de cada muestra.*

densidad óptica (DO) obtenidos fueron generalmente bajos, lo que sugiere una baja reactividad del conjugado utilizado.

Se observó que varios puntos, particularmente en el grupo expuesto, fueron descartados debido a que los valores de DO, tras restar el valor del blanco, resultaron negativos o muy próximos a cero.

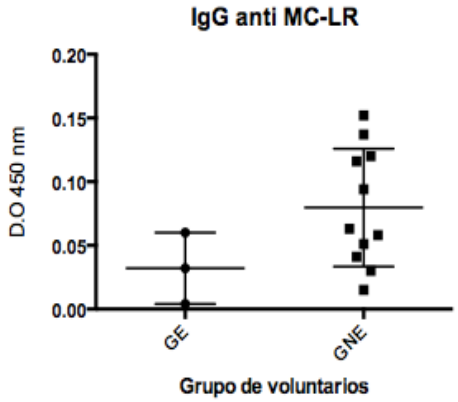


Figura 10. IgG anti-MC-LR en GE y GNE

Resultados de IgM

Por otro lado, para la IgM se observó una diferencia significativa entre los grupos expuestos y no expuestos ($p<0,05$) al comparar los niveles de IgM mediante el test de Mann-Whitney no paramétrico. Para discriminar entre sueros positivos y negativos, se estableció un *cut-off*, definido como el promedio más dos veces el desvío estándar.

A partir del *cut-off*, se identificaron varios sueros positivos en el GE, como (promedio 0,371), (promedio 0,387) y (promedio 0,416). En contraste, en el GNE, los valores fueron negativos o cercanos al *cut-off*, con el suero (promedio 0,303) identificado como un falso positivo.

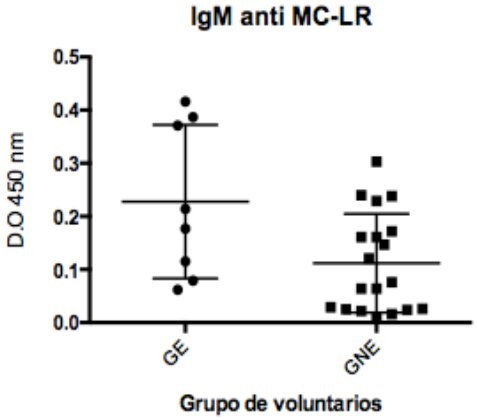


Figura 11. IgM anti-MC-LR en GE y GNE.

Resultados de IgE

En el análisis de la inmunoglobulina IgE, no se observó una diferencia significativa entre los grupos analizados (p>0,05). Al igual que en el caso de IgG, los valores de DO fueron predominantemente bajos, lo que sugiere una limitada reactividad del anticuerpo anti-especie utilizado en el ensayo.

Tras restar el valor del blanco, se descartaron varios puntos en ambos grupos que presentaron resultados negativos.

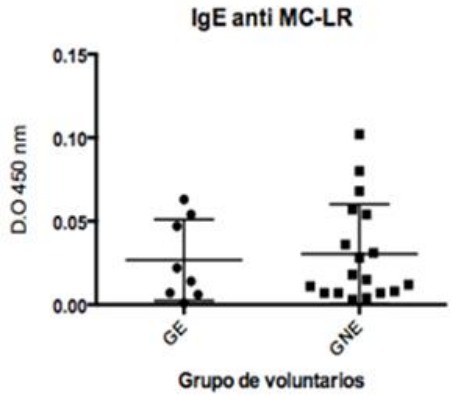


Figura 12. IgE anti-MC-LR en GE y GNE

Resultados de IgA

Finalmente, en el análisis de IgA, tampoco se detectaron diferencias significativas entre los GE y GNE (p>0,05). Aunque el conjugado utilizado ha sido probado como efectivo en otros ensayos, los valores obtenidos fueron bajos.

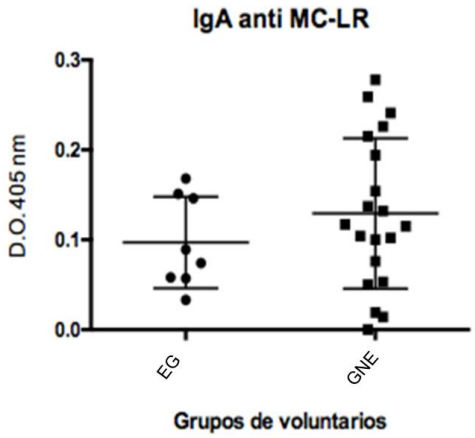


Figura 13. IgA anti-MC-LR en GE y GNE

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN

Los resultados experimentales de este estudio se dividen en dos categorías principales. En primer lugar, la evaluación de las inmunoglobulinas IgG e IgE específicas contra MC-LR produjo resultados no concluyentes, ya que varios sueros presentaron valores de DO negativos.

Por otro lado, los resultados relativos a IgM e IgA fueron válidos. En el caso de la IgM, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los GE y GNE, mientras que, en el caso de la IgA, no se encontraron diferencias significativas. A continuación, se discutirán los resultados obtenidos para estos dos isotipos específicos de anticuerpos contra MC-LR.

Aunque se asume comúnmente que la IgM está asociada a respuestas inmunes recientes, como sugieren Abbas, Lichtman y Pillai (2021), los resultados obtenidos en este estudio muestran que el grupo de exposición presenta niveles elevados de IgM en 3 de los 8 sueros analizados. Estos sueros corresponden a individuos que, en principio, no parecen haber estado expuestos recientemente a MC-LR, o al menos no es concluyente, lo que indica que la presencia de IgM específica no está necesariamente limitada a una respuesta aguda o inicial.

Este hallazgo puede explicarse por el hecho de que, en ciertos contextos, la IgM específica puede persistir más allá de la fase inicial de la respuesta inmune. Este fenómeno es común en las respuestas inmunes T-independientes, es decir, aquellas que no requieren la intervención de linfocitos T *helper* para inducir el cambio de isotipo, también conocido como *"switch"* de clase (Mond et al., 1995). En este tipo de respuestas, el sistema inmunológico sigue produciendo IgM de manera sostenida en cada nueva exposición al antígeno, sin que se produzca una conversión hacia otros isotipos, como ocurre en las respuestas T-dependientes.

La detección de IgM anti-MC-LR en individuos que probablemente no han sido expuestos recientemente, sino de manera crónica, sugiere que la respuesta inmune frente a MC-LR podría involucrar un componente T-independiente. Asimismo, estudios previos (Ruibal, 2019) han identificado la presencia de IgG anti-MC-LR, lo que indica la posibilidad de una respuesta T-dependiente en estos casos. Esto sugiere que la respuesta inmune frente a MC-LR podría ser de carácter mixto, combinando tanto

respuestas T-dependientes como T-independientes, o incluso ser predominantemente T-independiente, pero con un cambio parcial de isotipo mediado por mecanismos no dependientes de linfocitos T, como ha sido reportado en trabajos previos (Hjálmsdóttir et al., 2024). Este fenómeno de *"switch"* de isotipo está bien documentado en antígenos T-dependientes, como las proteínas, donde los linfocitos T *helper* facilitan la transición de la producción de IgM a otras inmunoglobulinas. Sin embargo, los antígenos no proteicos, como los polisacáridos, suelen inducir respuestas T-independientes, en las que se sigue produciendo IgM en cada nueva exposición, sin cambio de isotipo.

En relación con los resultados de IgA específica frente a MC-LR, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos. En ambos casos, la respuesta fue extremadamente baja, con valores que podrían sugerir una interacción inespecífica. Esto implica que, a pesar de que el ensayo fue técnicamente adecuado, ninguno de los sueros analizados parece contener IgA específica contra MC-LR, limitando la posibilidad de realizar conclusiones firmes sobre este isotipo. No obstante, se puede inferir que los sueros del GE no presentan niveles de IgA detectables, lo que sugiere que estos individuos probablemente no se expusieron al antígeno a través de las mucosas, si se considera que este isotipo está asociado principalmente a esa vía de exposición. Sin embargo, debido al reducido número de muestras, la ausencia de resultados positivos hace que cualquier conclusión deba considerarse preliminar y con cautela.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

Las floraciones tóxicas de cianobacterias constituyen un problema creciente para la salud humana, especialmente en regiones donde la infraestructura de tratamiento de agua es deficiente. La vigilancia continua de los niveles de microcistinas es esencial para evaluar el impacto de estas toxinas en la población, dado que la exposición a ellas puede provocar efectos adversos en la salud pública. En este contexto, si bien existen diversas metodologías analíticas empleadas para su detección, cada una tiene particularidades que condicionan su sensibilidad y aplicabilidad. Así, resulta especialmente relevante incorporar la detección de anticuerpos específicos contra MC-LR, que ofrece una aproximación relevante para comprender tanto el grado como la naturaleza de la exposición humana y las características de la respuesta inmunológica desencadenada.

En el presente estudio se analizaron los isotipos IgG, IgM, IgA e IgE en individuos expuestos y no expuestos. Los análisis estadísticos demostraron que únicamente la IgM presentó diferencias significativas entre ambos grupos. Esta respuesta sugiere un vínculo entre los niveles de IgM y la exposición al tóxico, coherente con la actividad laboral de los integrantes del GE. No obstante, la aparición de falsos positivos en el GNE indica que variables biológicas independientes de MC-LR pueden influir en la detección de este isotipo, lo que exige precaución al interpretar los resultados y resalta la necesidad de mejorar la estandarización del ensayo.

En contraste, los niveles de IgG, IgE e IgA no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En el caso particular de IgG, la baja sensibilidad del ensayo sugiere que el conjugado utilizado —anticuerpo o enzima— podría haber sido ineficaz, generando resultados no concluyentes y requiriendo la repetición del experimento con reactivos alternativos o mejorados. De manera similar, para la IgE la concentración utilizada del anticuerpo anti-especie no habría sido adecuada para detectar niveles específicos, recomendándose aumentar su concentración o emplear anticuerpos con mayor especificidad. En cuanto a IgA, la escasa reactividad del anticuerpo anti-especie limitó su detección; además, la ausencia de IgA detectable en el grupo expuesto permite plantear la hipótesis de que la vía de exposición a MC-LR no habría involucrado predominantemente las mucosas, aunque esta interpretación deberá corroborarse con estudios más amplios, reactivos alternativos y mejor diseñados.

En conjunto, estos resultados muestran que la detección de anticuerpos específicos representa una herramienta prometedora para el estudio de la exposición

humana a microcistinas, aunque su interpretación depende fuertemente de la calidad de los reactivos y de la adecuada estandarización de los ensayos.

Asimismo, este estudio resalta la necesidad de ampliar el tamaño muestral, incorporar cohortes con distintos niveles y vías de exposición, y optimizar las condiciones experimentales para obtener conclusiones más firmes, reproducibles y extrapolables.

Este trabajo constituye un primer paso hacia el desarrollo de metodologías inmunológicas aplicables a la vigilancia de toxinas ambientales, con potencial para fortalecer las estrategias de monitoreo sanitario en regiones afectadas por floraciones de cianobacterias.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS

Aguilera, A., Haakonsson, S., Martin, M. V., Salerno, G. L., & Echenique, R. O. (2018). Cianobacterias y cianotoxinas formadoras de floraciones en Argentina: una creciente preocupación ambiental y de salud. Limnológica, 69, 103–114. https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.10.006

Altaner, S., Puddick, J., Fessard, V., Feurstein, D., Zemskov, I., Wittmann, V., & Dietrich, D. R. (2019). Detección simultánea de 14 congéneres de microcistina a partir de muestras de tejido utilizando UPLC-ESI-MS/MS y dos microcistinas sintéticas deuteradas diferentes como estándares internos. Toxinas, 11(7), 388. https://doi.org/10.3390/toxins11070388

Andrinolo, D., & Sedan, D. (2017). Cianotoxinas: Farmacología y efectos de las principales toxinas presentes en Argentina. En Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud (cap. 3). Ministerio de Salud de la Nación.

Antoniou, M. G., Shoemaker, J. A., de la Cruz, A. A., & Dionysiou, D. D. (2008). LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO2 photocatalysis of microcystin-LR. Toxicon, 51(6), 1103–1118. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.01.008

Arman, T., Lynch, K. D., Goedken, M., & Clarke, J. D. (2021). Toxicokinetics, molecular toxicology, and pathophysiology of microcystins in preclinical rodent and human models. Toxins, 13(8), 537. https://doi.org/10.3390/toxins13080537

Baralla, E., Varoni, M. V., Sedda, T., Pasciu, V., Floris, A., & Demontis, M. P. (2016). Determination of microcystin LR in clams (Tapes decussatus) of two Sardinian coastal ponds (Italy). Marine Pollution Bulletin, 108(1 2), 317–320. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.022

Bogialli, S., Nigro Di Gregorio, F., Lucentini, L., Ferretti, E., Ottaviani, M., Ungaro, N., & Abis, P. P. (2017). A rapid liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry method to monitor cyanotoxins in freshwaters and drinking waters. Chemosphere, 169, 474-484. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.094

Bonilla, S. (2009). Cianobacterias planctónicas de Uruguay: manual para la identificación y medidas de gestión (Documento técnico del PHI-LAC, No. 16). UNESCO Oficina Montevideo y Oficina Regional de Ciencias para América Latina y el Caribe.

Bouaïcha, N., Miles, C. O., Beach, D. G., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N. Y., & Nguyen-Quang, T. (2019). Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. Toxins, 11(12), 714. https://doi.org/10.3390/toxins11120714

Bourne, D., Blakeley, R., & Jones, G. J. (2005). Desarrollo de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación in situ fluorescente para la detección de una cepa bacteriana que degrada la toxina cianobacteriana microcistina LR. Investigación Marina y de Agua Dulce, 10(12), 83-90. https://doi.org/10.1071/MF05083

Breidenbach, J. D., French, B. W., Gordon, T. T., Kleinhenz, A. L., Khalaf, F. K., Willey, J. C., Hammersley, J. R., Wooten, R. M., Crawford, E. L., Modyanov, N.

N., Malhotra, D., Teeguarden, J. G., Haller, S. T., & Kennedy, D. J. (2022). Microcystin LR aerosol induces inflammatory responses in healthy human primary airway epithelium. Environment International, 169, 107531. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107531

Brena, B., Font, E., Bonilla, S., & otros. (2021). Microcistina ELISA en agua y suero animal para una estrategia integrada de monitoreo ambiental. Revista Internacional de Ciencia Ambiental. https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1881073

Campos, A., & Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. International Journal of Molecular Sciences, 11(1), 268–287. https://doi.org/10.3390/ijms11010268

Carmichael, W. W., & Boyer, G. L. (2016). Impactos en la salud de las floraciones de algas nocivas cianobacterianas: implicaciones para los Grandes Lagos de América del Norte. Algas Nocivas, 54, 194-212.

Chen, H.-Q., Zhao, J., Li, Y., He, L.-X., Huang, Y.-J., Shu, W.-Q., Cao, J., Liu, W.-B., & Liu, J.-Y. (2018). Red de expresión génica regulada por la metilación del ADN y el microARN durante la transformación maligna inducida por microcistina-leucina arginina en células L02 de hepatocitos humanos. Cartas de Toxicología, 289, 42-53.

Chen, J., Xie, P., Li, L., & Xu, J. (2009). Primera identificación de microcistinas hepatotóxicas en el suero de una población humana expuesta crónicamente junto con indicios de daño hepatocelular. Ciencia Toxicológica, 108(1), 81-89. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp009

Chen, Y., Chen, K., Zhou, Y., Li, X., Mao, X., Wei, X., Xu, Y., Yang, W., Chen, G., & Liu, C. (2020). La microcistina-LR altera el metabolismo de la glucosa en las células β pancreáticas in vivo e in vitro. Cartas de Toxicología, 326, 106-113. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.017

Chorus, I., & Welker, M. (Eds.). (2021). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management (2nd ed.). CRC Press.

Díez-Quijada, L., Prieto, A. I., Guzmán-Guillén, R., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2019). Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. Food and Chemical Toxicology, 125, 106–132. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.042

España Amórtegui, J. C., Pekar, H., Retrato, M. D. C., Persson, M., Karlson, B., Bergquist, J., & Zuberovic Muratovic, A. (2023). LC MS/MS analysis of cyanotoxins in bivalve mollusks: Method development, validation and first evidence of occurrence… Toxins, 15(5), 329. https://doi.org/10.3390/toxins15050329

Facciponte, D. N., Bough, M. W., Seidler, D., Carroll, J. L., Ashare, A., Andrew, A. S., Tsongalis, G. J., Vaickus, L. J., Henegan, P. L., & Elijah, R. (2018). Identifying aerosolized cyanobacteria in the human respiratory tract: A proposed mechanism for cyanotoxin associated diseases. Science of the Total Environment, 645, 1003–1013. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.226

Ferrari, A., Ruiz, M. A., & Ruibal Conti, A. L. (2022). Antibodies as biomarkers: effect of microcystin exposure. En Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications (pp. 1–22). Springer.

Gehringer, M. M. (2004). Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. FEBS Lett., 57(1-3), 1-8.

Ghosh, S., Das, P., & Bagchi, S. N. (2008). Detección basada en PCR de floraciones de cianobacterias productoras de microcistina de la India central. Revista India de Biología Experimental, 46(1), 44-49.

Giannuzzi, L., Andrinolo, D., Echenique, R., Salerno, G. L., et al. (2009). Cianobacterias y cianotoxinas: Identificación, toxicología, monitoreo y evaluación de riesgo. Moglia Ediciones. ISBN 978-987-05-5749-4.

Giannuzzi, L., Sedán, D., Echenique, R., & Andrinolo, D. (2011). Caso agudo de intoxicación con cianobacterias y cianotoxinas en aguas recreativas de la represa de Salto Grande, Argentina. Drugs, 9(11), 2164-2175. https://doi.org/10.3390/md9112164

Guo, X., Chen, L., Chen, J., Xie, P., Li, S., He, J., Li, W., Fan, H., Yu, D., & Zeng, C. (2015). Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystin LR through the glutathione (GSH) pathway in SD rats. Environmental Science and Pollution Research, 22(23), 19273–19284. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5531-2

Heussner, A. H., Winter, I., Altaner, S., Kamp, L., Rubio, F., & Dietrich, D. R. (2014). Comparison of two ELISA based methods for the detection of microcystins in blood serum. Chemico Biological Interactions, 223, 10 17. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.08.014

Hilborn, E. D., Carmichael, W. W., Yuan, M., & Azevedo, S. M. F. O. (2005). A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. Toxicon, 46(2), 218-221.

Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J. S., Thistle, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E., Antunes, M. B., de Melo Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S., Azevedo, S. M. F. O., & Jarvis, W. R. (1998). Insuficiencia hepática y muerte tras exposición a microcistinas en un centro de hemodiálisis en Brasil. N. Engl. J. Med., 338(3), 873-878.

Kumar, P., Rautela, A., Kesari, V., Szlag, D., Westrick, J., & Kumar, S. (2020). Recent developments in the methods of quantitative analysis of microcystins. Journal of Biochemical Technology, 11(3). https://doi.org/10.1002/jbt.22582

Le Moal, M., Gascuel-Odoux, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., Moatar, F., Pannard, A., Souchu, P., Lefebvre, A., & Pinay, G. (2019). Eutrofización: ¿un vino nuevo en una botella vieja? Ciencia del medio ambiente total, 651(Parte 1), 1-11. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.139

Lee, S.-M., & Ryu, C.-M. (2021). Algae as new kids in the beneficial plant microbiome. Frontiers in Plant Science, 12, 599742. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.599742

Li, T., et al. (2023). Advances in investigating microcystin induced liver toxicity and underlying mechanisms. Science of the Total Environment, 861, 160474. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.160474

Li, X., Zhao, Q., Zhou, W., Xu, L., & Wang, Y. (2015). Efectos de la exposición crónica a la microcistina-LR en la replicación del ADN mitocondrial de los hepatocitos en ratones. Environmental Science & Technology, 49(7), 4665–4672. https://doi.org/10.1021/es5059132

Li, Y. W., Zhan, X. J., Xiang, L., Deng, Z. S., Huang, B. H., Wen, H. F., Sun, T. F., Cai, Q. Y., Li, H., & Mo, C. H. (2014). Analysis of trace microcystins in vegetables using solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography triple-quadrupole mass spectrometry. J Agric Food Chem, 62(49), 11827-11832. https://doi.org/10.1021/jf503249p

Liu, Y., Liu, S., Xu, C., Lin, M., Yihang, L., Shen, C., Liang, Y., Xing, S., Donglan, E., Lü, P., & Liu, X. (2021). Epitopes prediction for microcystin-LR by molecular docking. Ecotoxicology and Environmental Safety, 227, 112925. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112925

López, V., & Ríos, M. (2021). Estudio de microcistinas en las aguas del río Paraguay mediante una técnica de captura de anticuerpos. Biociencias Aplicadas, 14(1), 1-8.

Lu, S., & Kwan, K. S. (2008). Toxicidad de las floraciones de algas cianobacterianas en el sudeste asiático: un estudio sobre la salud pública. Revista de Salud Pública de Asia, 31(4), 837-850.

Massey, I. Y., Wu, P., Wei, J., Luo, J., Ding, P., Wei, H., & Yang, F. (2020). A mini review on detection methods of microcystins. Toxins, 12(10), 641. https://doi.org/10.3390/toxins12100641

Mena, J. L., Verdugo, C., & Esponda, I. (2021). Concentración de microcistina-LR en la sangre de pacientes con cáncer de hígado: un estudio de caso. Revista Internacional de Investigación Médica, 50(4), 352-356. https://doi.org/10.1007/s10156-021-00337-8

Michalak, I. (2013). Detoxificación de las microcistinas en el tratamiento de aguas residuales. Química del Medio Ambiente, 11(4), 401-411.

Miura, G. A., Robinson, N. A., Lawrence, W. B., & Pace, J. G. (1991). Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats. Toxicon, 29(3), 337–346.

Mohamad, A., & Zazali, M. (2022). Análisis de microcistinas en agua dulce y su correlación con la toxicidad de las cianobacterias: una revisión. Ciencia y Tecnología del Agua, 73(7), 1231-1246. https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.115921

Moreno, I., Repetto, G., & Cameán, A. (2003). Interés toxicológico de las microcistinas. Revista de Toxicología, 20(3).

Okello, W., Shimizu, K., & Watanabe, M. (2014). Análisis de microcistinas y nodularinas en aguas de lago utilizando HPLC y MS/MS. Toxinas, 6(7), 2392-2411. https://doi.org/10.3390/toxins6072392

Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Floraciones de algas nocivas en un entorno cambiante: una perspectiva sobre las implicaciones para la salud pública. Ciencia de la Tierra y el Medio Ambiente, 127, 219-228. https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2013.09.001

Palagama, D. S. W., Baliu Rodríguez, D., Muchacho, A., Levison, B. S., Kennedy, D. J., Haller, S. T., Westrick, J. A., & Hensley, K. (2018). Development and applications of solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry methods for quantification of microcystins in urine, plasma, and serum. Journal of Chromatography A, 1573, 66 77. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.023

Ponzoni, M. (2022). Aislamiento y caracterización de cianobacterias productoras de microcistinas en ambientes acuáticos de Argentina. Revista de Ecología y Conservación, 14(1), 1-10.

Robinson, N. A., Pace, J. G., Matson, C. F., Miura, G. A., & Lawrence, W. B. (1991). Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin LR in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 256(1), 176–182.

Rocha, M. F., Vieira Magalhães Ghiotto, G. A., Bergamasco, R., & Gomes, R. G. (2024). Cyanobacteria and cyanotoxins in the environment and water intakes: Reports, diversity of congeners, detection by mass spectrometry and their impact on health. Toxicon, 238, 107589. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107589

Roy Lachapelle, A., Solliec, M., Bouchard, M. F., & Sauvé, S. (2017). Detection of cyanotoxins in algae dietary supplements. Toxins, 9(3), 76. https://doi.org/10.3390/toxins9030076

Ruan, C., Wang, J., Qiu, H., Zhang, X., Liu, M., & Zhuang, S. (2021). Caracterización de microcistinas en organismos acuáticos mediante un método de detección de alto rendimiento. Toxinas, 13(4), 250. https://doi.org/10.3390/toxins13040250

Ruibal Conti, A. L., Ruiz, M. A., Rodriguez, M. I., Lerda, D., & Romero, M. D. (2019). Assessment of specific antibodies as biological indicators of human chronic exposure to microcystins. Ecotoxicology and Environmental Safety, 175, 236–242. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.071

Ruiz, M. A., Ferrari, A., Rodriguez, M. I., Flanagan, C., Lerda, D., Romero, M. D., Halac, S. R., & Ruibal Conti, A. L. (2024). Isotype profile of specific antibodies after chronic exposure to microcystins. Journal of Current Toxicology and Venomics, 4, 138–148. https://doi.org/10.2174/0126661217305048240902060516

Ruiz, M. A., Rodríguez, M. I., Ruibal Conti, A. L., González, I., Pellicioni, P., Biagi, M., & Lerda, D. (2010). Health effects from exposure to water with microcystins (Informe técnico). INA-CIRSA, Universidad Católica de Córdoba..

Saito, Y., Oka, A., & Ueno, Y. (2003). La microcistina-LR puede inducir el daño renal en ratas Sprague-Dawley. Toxicología y Farmacología Ambiental, 5(3), 160-170. https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.05.003

Schmidt, J. R., Wilhelm, S. W., & Boyer, G. L. (2014). The fate of microcystins in the environment and challenges for monitoring. Toxins (Basel), 6(12), 3354–3387. https://doi.org/10.3390/toxins6123354

Seegers, J. H., & Michalak, I. (2018). Variaciones estacionales en la concentración de microcistinas en aguas de embalses de la región de lo que fue la República Checa. Limnología, 48(3), 178-184. https://doi.org/10.1016/j.limno.2018.08.002

Shen, G., Yan, M., Wang, C., Meng, X., Xiang, Z., Qiu, Y., & Han, X. (2020). Microcystin leucine arginine induces liver fibrosis by activating the Hedgehog pathway in hepatic stellate cells. Toxicon, 177, 62–70. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.09.015

Smienk, H. G. F., Sevilla, E., Peleato, M. L., Razquin, P., & Mata, L. (2007). Validación de un kit para la detección de microcistinas en agua. Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos, 104-111

Song, Y., Xiaochang, L., & Ting, X. (2024). Exposure to microcystin LR promotes the progression of colitis associated colorectal cancer by inducing barrier disruption and gut microbiota dysbiosis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 282, 116750. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116750

Tsuji, Y., & Ueno, Y. (2012). Microcistinas en agua potable y sus efectos en la salud pública: un estudio del sistema de abastecimiento de agua de Tokio. Revista de Toxicología, 28(1), 11-16.

Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B., & Schrenk, D. (2012). Human and rat hepatocyte toxicity and protein phosphatase 1 and 2A inhibitory activity of naturally occurring desmethyl microcystins and nodularins. Toxicology, 293(1 3), 59–67. https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.12.011

U.S. Environmental Protection Agency. (2015). Health effects support document for the cyanobacterial toxin microcystins. EPA.

Valério, E., Chaves, S., & Tenreiro, R. (2010). Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: a review. Toxins, 2(10), 2359–2410. https://doi.org/10.3390/toxins2102359

Velázquez, A. M., & Aguirre, A. S. (2020). Aislamiento y caracterización de cepas de cianobacterias productoras de microcistinas de cuerpos de agua en la región de Yucatán, México. Revista de Microbiología, 56(3), 267-276. https://doi.org/10.1007/s00321-020-00554-1

Wang, X., Zhang, F., Hu, Z., Yang, Y., & Yu, Y. (2020). La microcistina-LR induce apoptosis en hepatocitos a través de la activación de vías de señalización específicas. Toxicología Experimental y Terapéutica, 33(2), 298-307. https://doi.org/10.1016/j.etp.2020.06.005

Wharton, R. E., Cunningham, B. R., Schaefer, A. M., Guldberg, S. M., Hamelin, E. I., & Johnson, R. C. (2019). Measurement of microcystin and nodularin activity in

human urine by immunocapture protein phosphatase 2A assay. Toxins, 11(12), 729. https://doi.org/10.3390/toxins11120729

Wharton, R. E., Ojeda Torres, G., Cunningham, B., Feyereisen, M. C., Hill, K. L., Abbott, N. L., Seymour, C., Lang, D., & Johnson, R. C. (2018). Quantification of microcystin LR in human urine by immunocapture liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chemical Research in Toxicology, 31(9), 898 903. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00126

Wiegand, C., & Pflugmacher, S. (2005). Efectos tóxicos de las microcistinas en células animales: un estudio sobre las células de hepatocitos. Toxicología y Farmacología Ambiental, 28(2), 157-164. https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.06.006

Wilkinson, G. M., & Johnson, R. A. (2024). Eutrophication of freshwater and coastal ecosystems. In Encyclopedia of Sustainable Technologies (2nd ed.). Springer.

Xu, Y., Zhang, T., Li, C., Wang, Y., Yu, S., Li, S., & Li, Y. (2022). Análisis de microcistinas en productos de origen acuático mediante espectrometría de masas de alta resolución: implicaciones para la seguridad alimentaria. Toxicología Alimentaria, 2(3), 130-140. https://doi.org/10.1016/j.foodtox.2021.101246

Yang, S., & Gao, K. (2021). Evaluación de los efectos de la microcistina-LR en la salud humana: un enfoque basado en la toxicidad y la exposición. Revista de Toxicología Aplicada, 39(4), 550-563. https://doi.org/10.1016/j.jat.2021.07.007

Zeck, A., Weller, M. G., Bursill, D., & Niessner, R. (2001). Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. Analyst, 126(11), 2002–2007. https://doi.org/10.1039/B105064H

Zhang, Y., Wu, H., & Zhang, Y. (2019). Detección de microcistinas en productos alimenticios mediante espectrometría de masas: un enfoque en la seguridad alimentaria. Journal of Food Safety, 39(2), e12636. https://doi.org/10.1111/jfs.1263

Zhou, M., Tu, W. W., & Xu, J. (2015). Mechanisms of microcystin LR induced cytoskeletal disruption in animal cells. Toxicon, 101, 92–100. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.05.005

ANEXO I: DENSIDADES ÓPTICAS Y TRATAMIENTO DE DATOS DEL ENSAYO ELISA

Tabla II. Datos crudos obtenidos de IgG

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.211	0.243	0.262	0.266	0.316	0.321	0.301	0.28	0.275	0.276	
C		0.226	0.142	0.195	0.209	0.172	0.205	0.167	0.213	0.238	0.243	
D		0.295	0.289	0.255	0.221	0.288	0.314	0.333	0.314	0.383	0.442	
E		0.303	0.338	0.263	0.302	0.287	0.335	0.352	0.357	0.334	0.426	
F										0.339	0.455	
G										0.369	0.383	
H												

Zona roja: *estos pocillos no se han logrado sensibilizar por desperfectos en la micropipeta.*

Tabla III. Datos crudos obtenidos de IgE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.194	0.267	0.212	0.184	0.185	0.282	0.215	0.199	0.182	0.195	
C		0.200	0.279	0.172	0.183	0.178	0.188	0.181	0.187	0.197	0.291	
D		0.189	0.176	0.174	0.174	0.169	0.205	0.178	0.188	0.178	0.247	
E		0.214	0.167	0.179	0.178	0.179	0.187	0.184	0.149	0.171	0.187	
F		0.177	0.19	0.173	0.17	0.178	0.182	0.172	0.385	0.188	0.201	
G		0.204	0.243	0.185	0.197	0.218	0.191	0.300	0.213	0.22	0.24	
H												

Tabla IV. Datos crudos obtenidos de IgA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.355	0.226	0.363	0.407	0.482	0.437	0.314	0.305	0.483	0.503	
C		0.311	0.272	0.280	0.253	0.224	0.173	0.257	0.249	0.251	0.316	
D		0.336	0.28	0.200	0.190	0.236	0.259	0.441	0.456	0.389	0.561	
E		0.438	0.321	0.257	0.289	0.292	0.281	0.397	0.304	0.315	0.383	
F		0.295	0.350	0.388	0.353	0.504	0.52	0.368	0.364	0.321	0.354	
G		0.408	0.396	0.436	0.34	0.376	0.291	0.355	0.317	0.412	0.443	
H												

Tabla V. Datos crudos obtenidos de IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.342	0.414	0.247	0.279	0.35	0.347	0.216	0.236	0.262	0.269	
C		0.425	0.406	0.587	0.648	0.537	0.472	0.223	0.238	0.222	0.232	
D		0.267	0.294	0.198	0.200	0.277	0.278	0.458	0.421	0.35	0.397	
E		0.571	0.574	0.207	0.201	0.461	0.421	0.428	0.432	0.224	0.226	
F		0.286	0.346	0.352	0.373	0.322	0.322	0.226	0.208	0.217	0.201	
G		0.66	0.516	0.335	0.39	0.182	0.217	0.201	0.246	0.232	0.299	
H												

Tabla VI. Datos obtenidos duplicados promediados (blancos restados): IgG

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		-0.033		0.004		0.058		0.030		0.015		
C		-0.076		-0.058		-0.072		-0.070		-0.020		
D		0.032				0.041		0.063		0.152		
E		0.060				0.051		0.094		0.120		
F										0.137		
G										0.116		
H												

Zona roja: *estos pocillos no se han logrado sensibilizar por desperfectos en la micropipeta.*

Tabla VII. Datos obtenidos duplicados promediados (blancos restados): IgE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.054		0.022		0.057		0.031		0.012		
C		0.063		0.001		0.007		0.008		0.068		
D		0.006				0.011		0.007		0.036		
E		0.014				0.007		-0.010		0.003		
F		0.007		-0.005		0.004		0.102		0.018		
G		0.047		0.015		0.028		0.080		0.054		
H												

Tabla VIII. Datos obtenidos duplicados promediados (blancos restados): IgA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.057		0.151		0.226		0.076		0.259		
C		0.058		0.033		-0.036		0.019		0.050		
D		0.074				0.014		0.215		0.241		
E		0.146				0.053		0.117		0.115		
F		0.089		0.137		0.278		0.132		0.104		
G		0.168		0.154		0.100		0.102		0.194		
H												

Tabla IX. Datos obtenidos duplicados promediados (blancos restados): IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.177		0.062		0.147		0.025		0.064		
C		0.214		0.416		0.303		0.029		0.026		
D		0.079				0.076		0.238		0.172		
E		0.371				0.240		0.229		0.024		
F		0.115		0.161		0.121		0.016		0.008		
G		0.387		0.161		-0.002		0.022		0.064		
H												

ANEXO II: NOTA DE ACEPTACIÓN DEL DIRECTOR Y CODIRECTORES

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CÁTEDRA TRABAJO FINAL
NOTA DE ACEPTACIÓN DEL DIRECTOR Y CODIRECTORES[2]

Córdoba, 29 de Octubre de 2024

Prof. Titular Trabajo Final

Dr. Juan Carlos Nicolás

S----------//----------D

De mi consideración:

Por la presente dejo constancia de mi aceptación como DIRECTOR/CODIRECTOR DE TRABAJO FINAL de la Carrera de Bioquímica, del alumno de los/as alumnos/as, CIAFFONI BERON DIANA VALENTINA DNI N° 42164381 y PAREDES ANDRÈS DNI N° 34711978 sobre el Trabajo Final cuyo título preliminar es CARACTERIZACIÓN DE LA EXPOSICIÓN HUMANA A MICROCISTINA-LR: REVISIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO ELISA

Por medio de la presente, EXPRESO cumplidas las instancias de supervisión, dando por finalizada mi actividad como director/co-director y AUTORIZO la presentación del Trabajo Final para su defensa final.

Firma Director	Firma Codirector	Firma Codirector
Marcia A. Ruiz	**Ana Laura Ruibal Conti**	**Alejandro Ferrari**
Aclaración Director	Aclaración Director	Aclaración Director