

Caracterització de neurotransmissors en larves de peixos zebra després de l'exposició a clorpirifós-oxon (CPO) mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS)

Daniel Tornero-Cañadas*, **Demetrio Raldúa**, **Romà Tauler**, **Cristian Gómez-Canela**

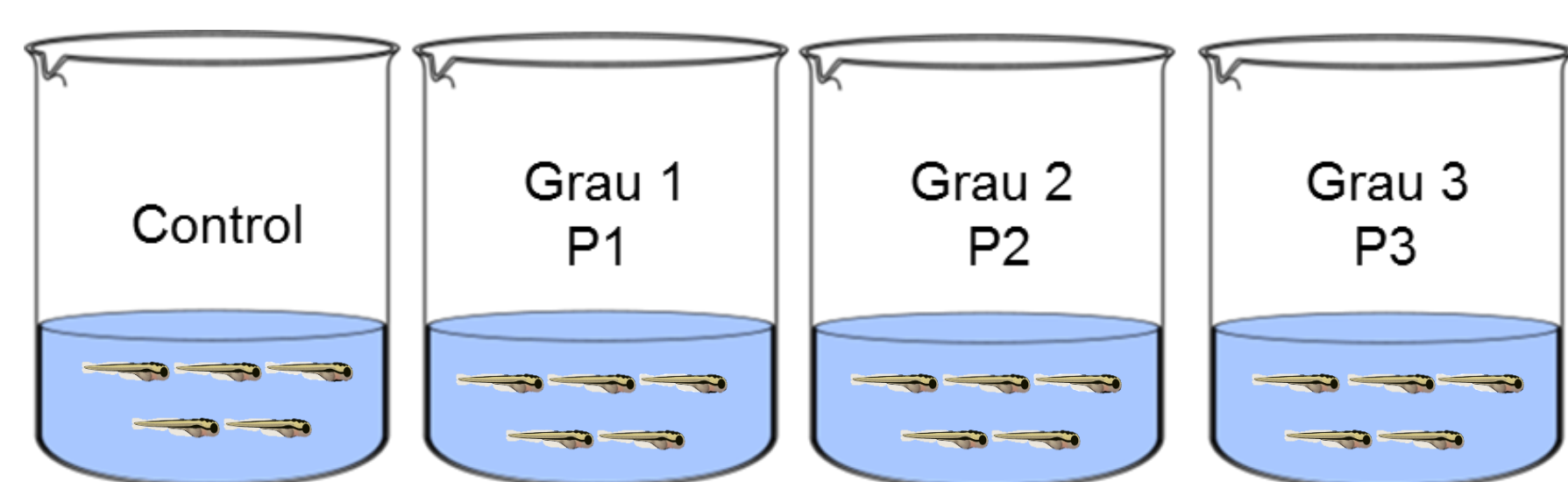
Departament de química ambiental (Institut de Diagnosi Ambiental y Estudios de l'Aigua- CSIC), Barcelona.

*dtorneca7@alumnes.ub.edu

INTRODUCCIÓ

Els neurotransmissors tenen un paper essencial en el desenvolupament del sistema nerviós central (SNC) ¹. Problemes en el metabolisme dels neurotransmissors induït per factors mediambientals durant el desenvolupament cerebral poden dur a terme diverses manifestacions neurològiques en la infància¹⁻². En aquest sentit, el peix zebra, un model vertebrat que ha incrementat el seu ús en neurobiologia i neurotoxicologia³, comparteix amb els mamífers els sistemes de neurotransmissió més comuns. Malgrat que els efectes dels compostos organofosforats en els sistemes colinèrgics en mamífers i peixos zebra són coneguts, s'ha trobat que aquests també poden perjudicar l'homeòstasi dels neurotransmissors en el cervell⁴. Tot i que hi ha molts estudis centrats en el desenvolupament de tècniques analítiques per a la investigació metabòlica⁵⁻⁷, només pocs s'han basat en la identificació del canvis dels perfils de neurotransmissors en organismes aquàtics després d'exposicions a contaminants ambientals⁴. Així doncs, l'objectiu d'aquest estudi és desenvolupar un mètode analític per a la determinació de 38 neurotransmissors utilitzant cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem. L'aplicació del mètode analític es va basar en l'exposició de larves de peix zebra a tres nivells de concentració de clorpirifós-oxon (CPO), un important organofosforat.

METODOLOGIA



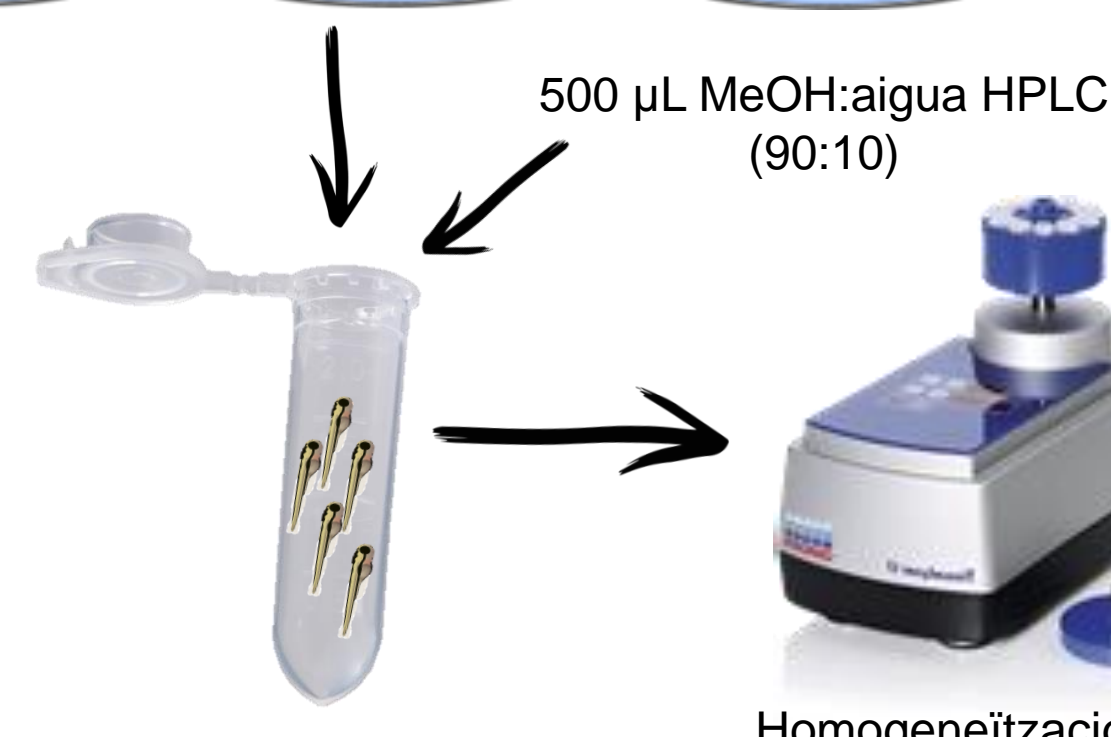
- Grau 1 → dosi lleu: 0.1 µM
- Grau 2 → dosi moderada: 1 µM
- Grau 3 → dosi severa: 4 µM

LC-MS/MS (Xevo TQD)



Condicions de l'espectre de masses

- Ionització electrospray : (ESI+)
- Rang de masses: 30-500 Da
- Voltatge d'extracció: 3 V
- Voltatge capil·lar: 3,5 V
- Voltatge de con: 5-50 V



Homogeneïtzació

Agitació 20 minuts en placa vibratòria

Centrifugació: 30 min 13000 rpm a 4 °C

Filtració

- Columna Synergi Polar-RP 80 Å (4.6x250 mm, 4 µm)
- Fases mòbils: MeOH + 0,1 % d'àcid fòrmic (A)
Aigua HPLC + 0,1% d'àcid fòrmic(B)
- Flux: 600 µL·min⁻¹

RESULTATS

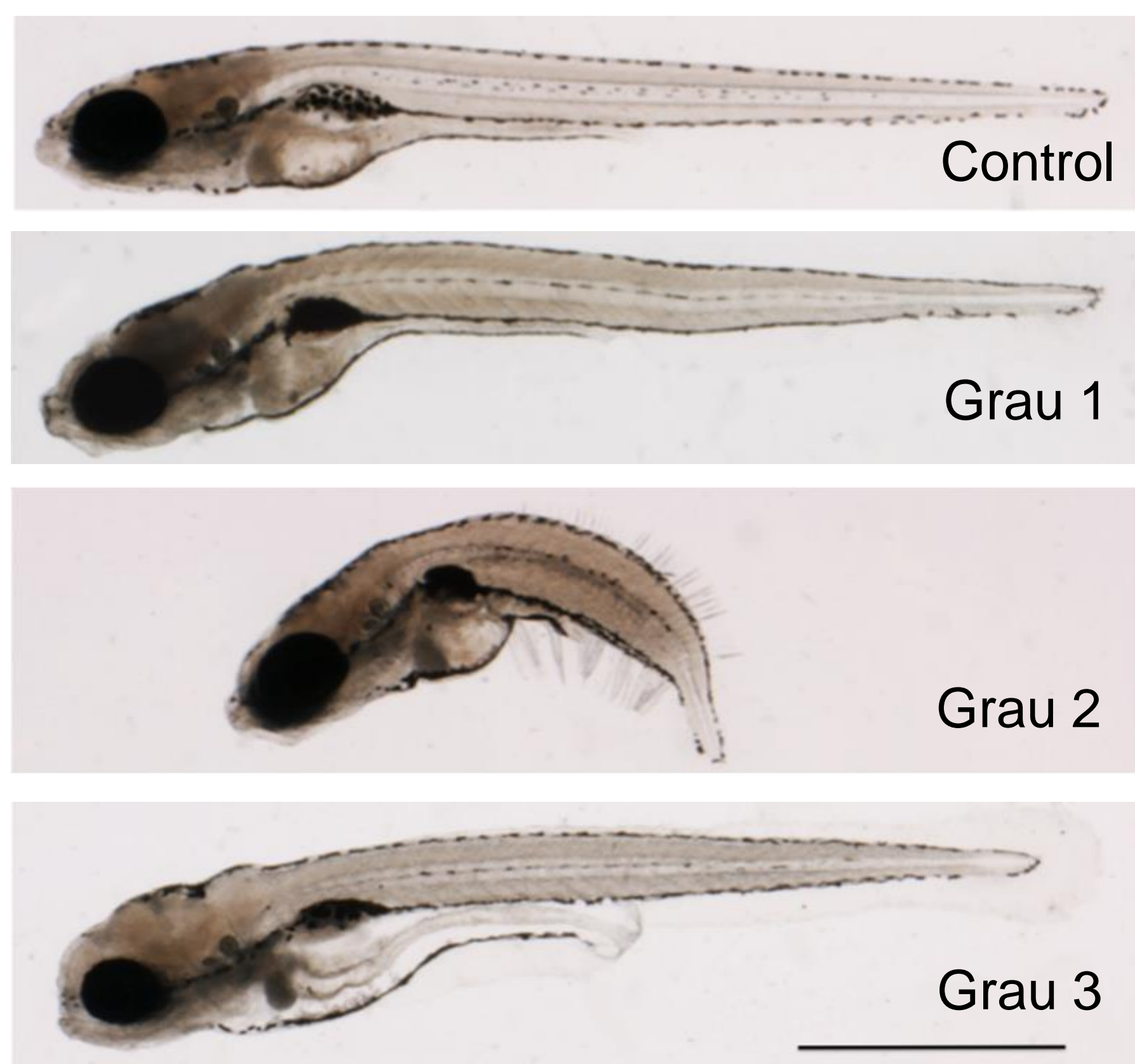


Fig. 1. Manifestacions fenotípiques dels peixos zebra després de l'exposició a diferents nivells de CPO.

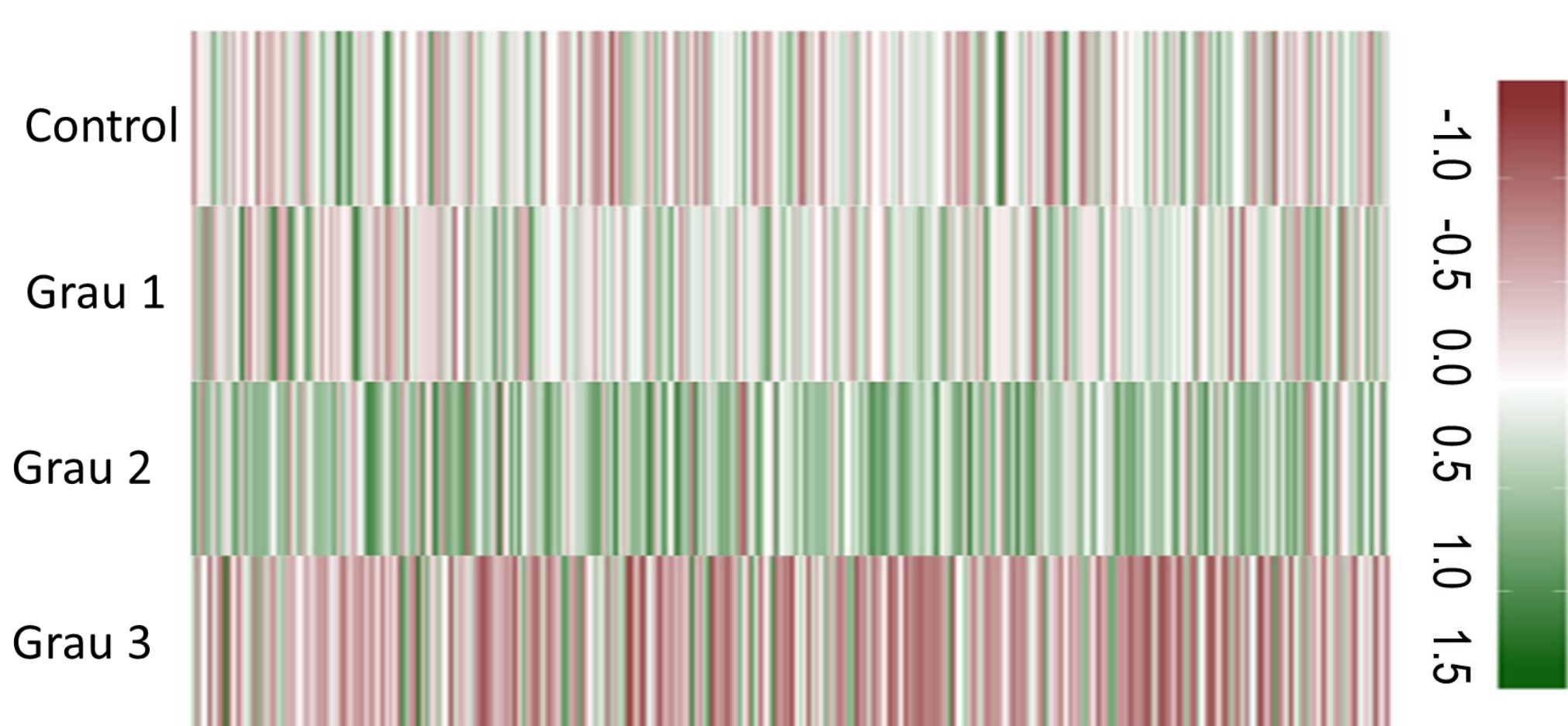


Fig. 2. "Heatmap" de la ruta d'interacció lligant-receptor neuroactiu.

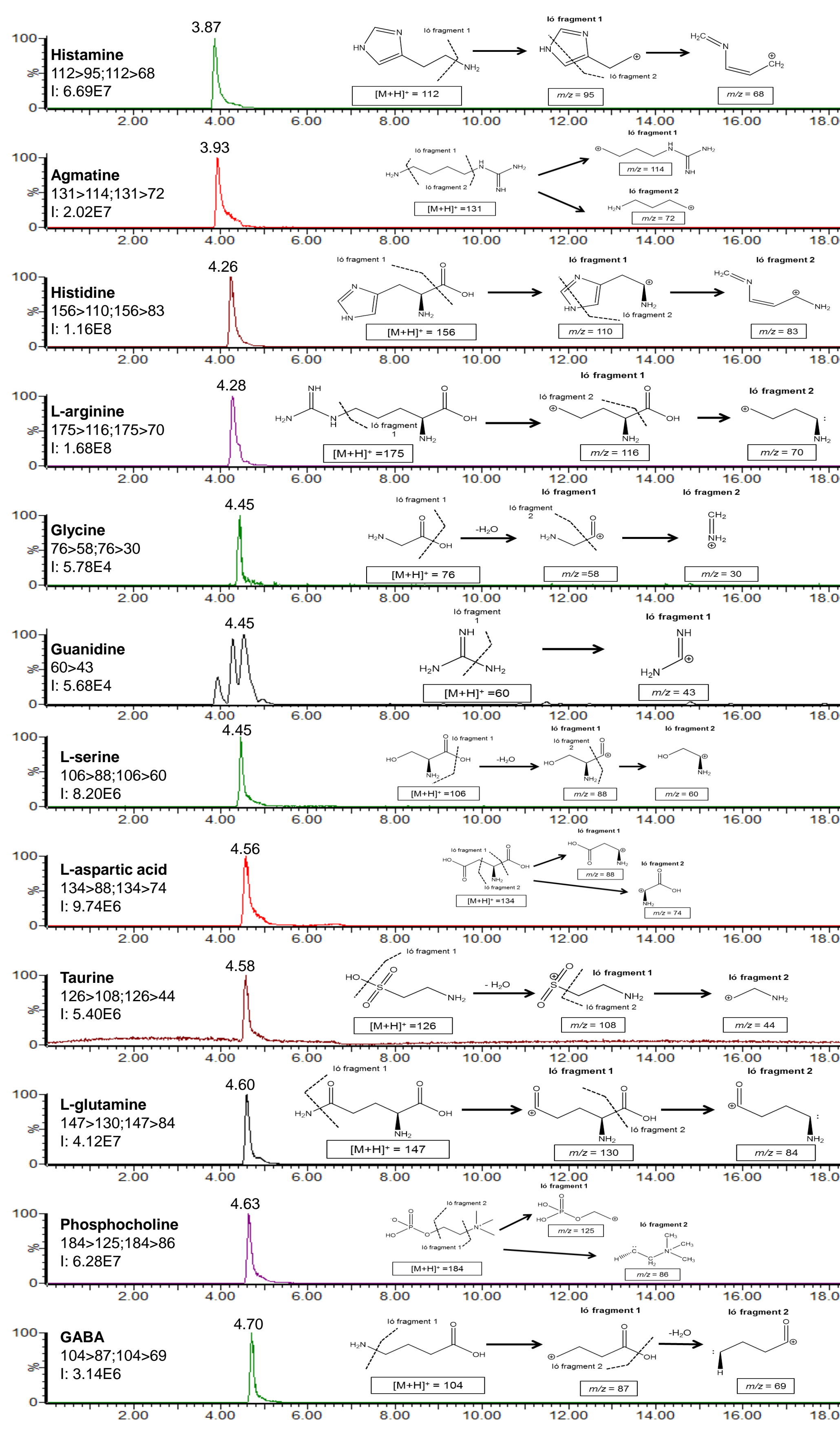


Fig. 3. Cromatogrames LC-MS/MS d'alguns neurotransmissors i patró de fragmentació.

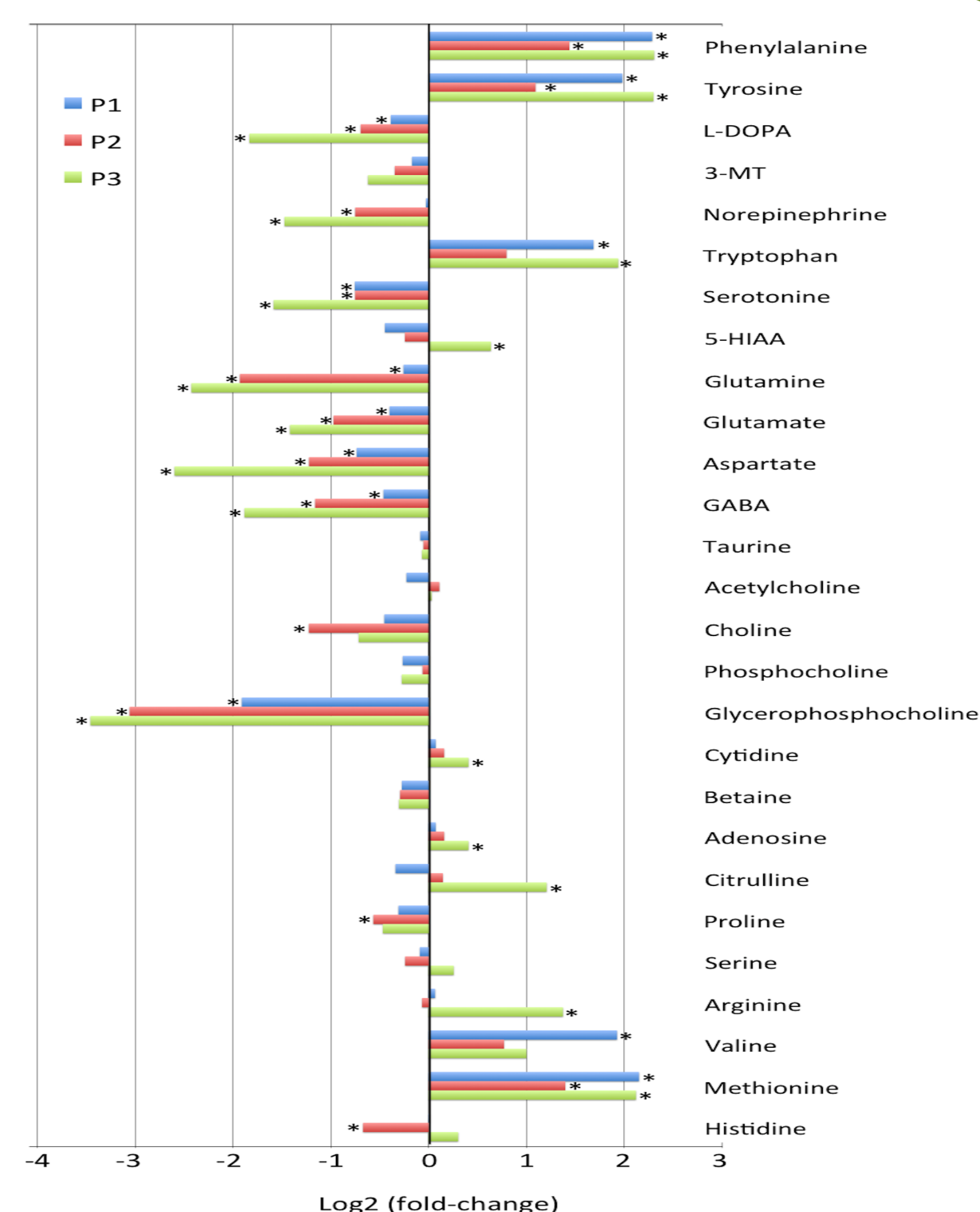


Fig. 4. "Log₂ fold change" dels 27 neurotransmissors detectats en larves de peix zebra. L'asterisc indica canvis significatius amb p<0.05.

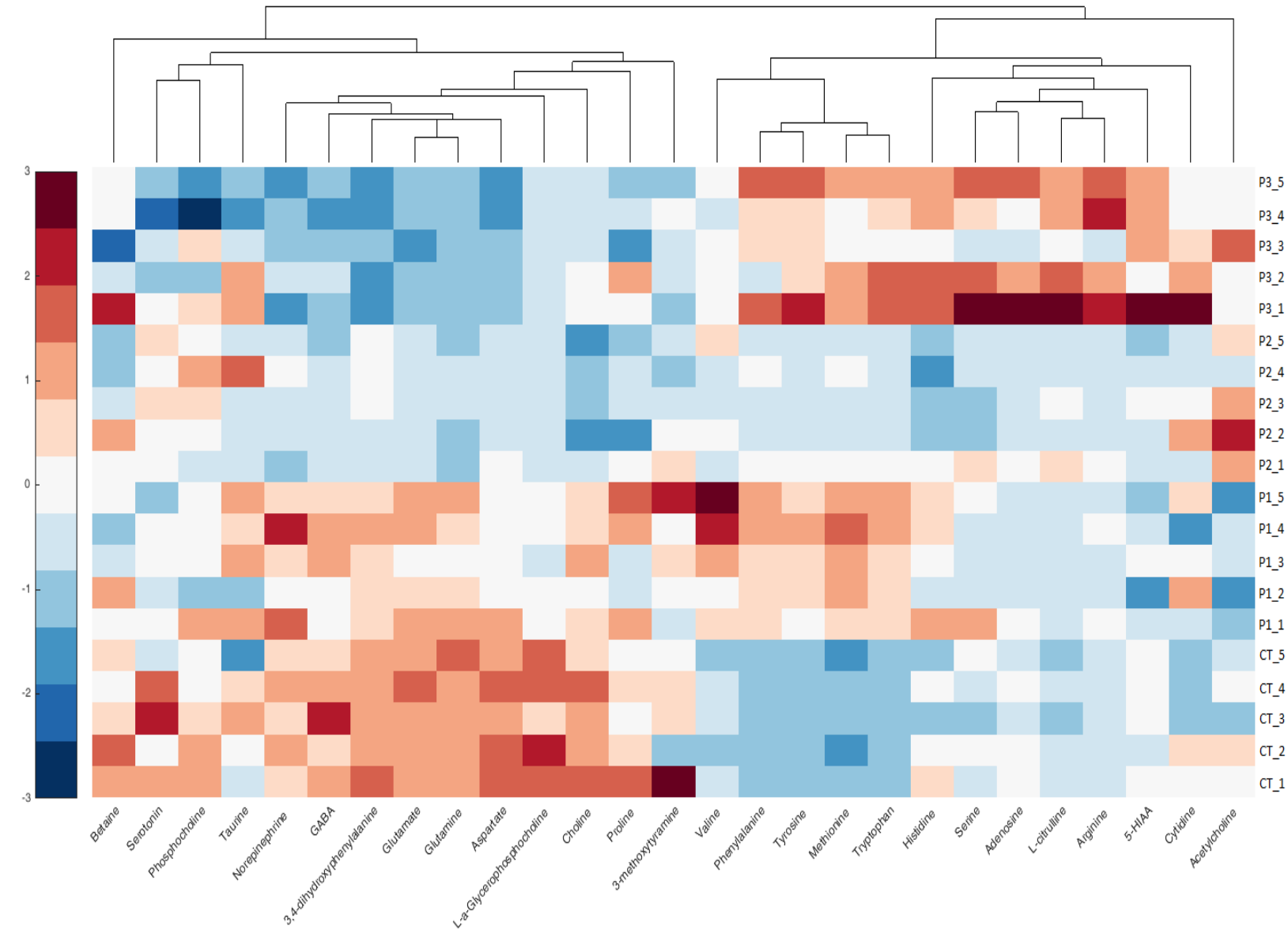


Fig. 5. Heatmap del nivells trobats en els neurotransmissors després de l'exposició de CPO a 3 nivells de concentració.

CONCLUSIONS

- S'ha desenvolupat un mètode analític ràpid, precís i robust per a la determinació de neurotransmissors en larves de peix zebra.
- Cada grau d'OPP (organophosphorated poisoning) va exhibir un perfil de neurotransmissors distintiu, consistent amb els canvis en les transcripcions relacionades amb la ruta d'interacció lligant-receptor neuroactiu descrita anteriorment.
- Els sistemes de neurotransmissió alterats en els models d'OPP van incloure catecolaminèrgics, serotoninèrgics, glutamatèrgics i GABAèrgics.
- El mètode analític desenvolupat és una eina eficaç per a la investigació de neurobiologia i neurotoxicologia utilitzant el peix zebra com a model.

REFERÈNCIES

1. Horzmann, K. and J. Freeman, *Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity*. *Toxics*, 2016. **4**(3): p. 19.
2. Kurian, M.A., et al., *The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes*. *The Lancet Neurology*, 2011. **10**(8): p. 721-733.
3. Raldúa, D. and B. Piña, *In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity*. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2014. **10**(5): p. 685-697.
4. Tufi, S., et al., *Changes in Neurotransmitter Profiles during Early Zebrafish (Danio rerio) Development and after Pesticide Exposure*. *Environmental Science & Technology*, 2016. **50**(6): p. 3222-3230.
5. Santos-Fandila, A., et al., *Analysis of 17 neurotransmitters, metabolites and precursors in zebrafish through the life cycle using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, 2015. **1001**: p. 191-201.
6. Lu, H., et al., *Comparative evaluation of software for deconvolution of metabolomics data based on GC-TOF-MS*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(3): p. 215-227.
7. Asiago, V.M., et al., *Early Detection of Recurrent Breast Cancer Using Metabolite Profiling*. *Cancer Research*, 2010. **70**(21): p. 8309.