

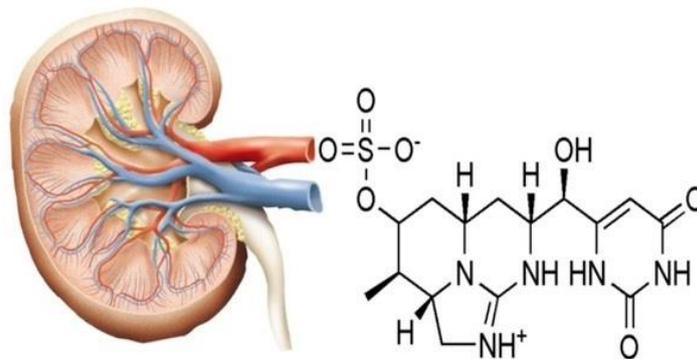
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA



“TRABAJO FIN DE GRADO”

“NEFROTOXICIDAD DE LA CILINDROSPERMOPSINA”



Alicia Martínez Ríos.



Trabajo de Fin de Grado. Revisión bibliográfica.

Grado en Farmacia.

“NEFROTOXICIDAD DE LA CILINDROSPERMOPSINA”

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal.

Área de Toxicología.

Tutora: Dra. Ángeles Mencía Jos Gallego.

Alumna: Alicia Martínez Ríos.

Facultad de Farmacia.

Universidad de Sevilla.

Julio 2021,

- **RESUMEN:**

Las cianobacterias son bacterias Gram negativas fotoautótrofas presentes en ecosistemas acuáticos, que suponen una amenaza para la salud humana y ambiental debido a la producción de floraciones. Éstas, a su vez, pueden producir también cianotoxinas, las cuales pueden actuar como hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas o dermatotoxinas. Entre las cianotoxinas de mayor interés se encuentran las microcistinas (MC) y la cilindrospermopsina (CYN) por su amplia distribución y toxicidad. La CYN puede causar daños en distintos órganos, tales como hígado o riñón, siendo este último objeto del presente estudio, es decir, el objetivo principal de esta revisión bibliográfica se centra en poner de manifiesto las alteraciones que produce la CYN a nivel renal.

Tras la realización de una búsqueda bibliográfica, se han seleccionado un total de veintiocho artículos en relación con la nefrotoxicidad de la CYN. Se evidencian efectos producidos como resultado de una exposición a CYN por diferentes vías tanto en modelos experimentales *in vivo* como *in vitro*, sin embargo, la nefrotoxicidad de CYN sigue siendo un tema aún poco estudiado. Los principales resultados observados incluyeron cambios histopatológicos, acompañados de variaciones en niveles de biomarcadores séricos tanto en organismos acuáticos como en mamíferos.

Por tanto, se considera que la CYN presenta un alto potencial nefrotóxico, siendo de interés abordar una investigación más profunda sobre su mecanismo de acción tóxica en este órgano.

- **PALABRAS CLAVE:** cianobacterias, cilindrospermopsina, toxicidad, nefrotoxicidad.

ÍNDICE

1. Introducción.....	5
1.1. Cianobacterias y cianotoxinas.....	5
1.2. Cilindropermopsina (CYN).....	6
1.3. Vías de exposición a cianotoxinas.....	8
1.4. Efectos inducidos por exposición a cianotoxinas.....	9
1.5. Sistema Renal. Riñones y su funcionamiento.....	9
1.5.1. Mecanismos básicos de nefrotoxicidad.....	11
2. Objetivos.....	12
3. Metodología.....	12
4. Resultados y discusión.....	13
4.1. Nefrotoxicidad de CYN en modelos experimentales <i>in vitro</i>	15
4.2. Nefrotoxicidad de CYN en modelos experimentales <i>in vivo</i>	18
4.2.1. Estudios en organismos acuáticos.....	19
4.2.2. Estudios en mamíferos.....	25
4.3. Discusión general.....	31
5. Conclusiones.....	31
6. Bibliografía.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS

Las cianobacterias son un conjunto de bacterias, conocidas comúnmente como algas verdes azuladas, las cuales comprenden un grupo de fotoautótrofos procariotas. Presentan propiedades intrínsecas de algas y bacterias. Se encuentran distribuidas en ambientes marinos y de agua dulce, formando parte de ecosistemas acuáticos (Culrann et al., 2002).

Floraciones tóxicas de cianobacterias aparecen en lagos, estanques y ríos eutrofizados de todo el mundo (Gomi, 2002). Según Chorus y Bartram, (1999), las poblaciones de cianobacterias pueden estar formadas por una única especie o por una variedad de especies, siendo algunas no tóxicas. Para confirmar la toxicidad de una determinada cepa, es necesario aislar un cultivo puro de esa cepa y cuantificar las concentraciones de toxina en dicho cultivo, así como purificar y caracterizar totalmente las toxinas.

El desarrollo de las cianobacterias está asociado a altas concentraciones de nutrientes debido a la eutrofización antropogénica, siendo el fósforo el predominante, el cual controla la proliferación. Sin embargo, la disponibilidad de nitrógeno podría ser una variable importante a tener en cuenta en especies que fijan o no nitrógeno. El fósforo total determina la capacidad de una masa de agua para generar florecimientos de cianobacterias (Chorus y Bartram, 1999).

Además, los efectos y consecuencias del cambio climático pueden contribuir al crecimiento de las mismas y crear un problema en la calidad del agua (Bláha et al., 2009).

Las cianobacterias presentan vesículas de gas que les posibilita la movilidad y posicionamiento según las condiciones óptimas de temperatura y nutrientes (Msagati et al., 2006).



Figura 1. Floraciones de cianobacterias: Situación que se puede mejorar a largo plazo.

(Fuente: Aubriot, L y Haakonsson, S. (2019) Cianobacterias. [ilustración]. Recuperado de <http://www.universidad.edu.uy/prensa/renderItem/itemId/44106>

Las cianotoxinas conforman un grupo diverso de compuestos producidos por cianobacterias, entre ellas distintos géneros como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia* etc. (Culrann et al., 2002).

En términos toxicológicos, se pueden clasificar en cuatro grupos, según su mecanismo de acción y los distintos órganos afectados por su toxicidad

- Hepatotoxinas: Dentro de este grupo, cabe destacar las microcistinas, siendo las más prevalentes en el medio ambiente y en mayores cantidades en la biomasa de cianobacterias. Pueden causar hepatotoxicidad.

- Neurotoxinas: Entre ellas, destacan alcaloides como anatoxina-a o saxitoxinas, inhibiendo a neurotransmisores y actuando como bloqueantes neuromusculares despolarizantes postsinápticos.

- Citotoxinas: Como la cilindrospermopsina. Son capaces de causar daños a diversos órganos y sistemas como hígado, corazón, riñones, estómago, o sistema vascular, entre otros.

- Dermatotoxinas: Se encuentran la Lyngbyatoxin-a y Aplysiatoxin, actuando como agentes inflamatorios que pueden causar irritación en la piel.

Las cianotoxinas pueden causar efectos graves tanto en la salud humana como en la ambiental. Existe una relación estrecha entre la bioacumulación de las cianotoxinas y la potencia de los efectos tóxicos (Chorus y Bartram, 1999).

1.2. CILINDROSPERMOPSINA

La cilindrospermopsina (CYN) es reconocida como una de las toxinas producidas por algas de agua dulce más importantes a nivel mundial. Cada vez es mayor su distribución en zonas templadas, de modo que aumenta la preocupación sobre los riesgos para la salud humana y ambiental (Kinnear, 2010).

Estas cianotoxinas estuvieron implicadas en múltiples intoxicaciones en el año 1979, en Palm Island, Australia, afectando a 148 personas, de las cuales, 138 fueron hospitalizadas (Sedan and Andrinolo, 2011). Por ello, se debe monitorear el agua superficial de distinto uso humano para poder detectar la presencia de especies tóxicas algales verdiazules (Poniedziątek et al., 2012).

Además de intoxicaciones humanas también presentan toxicidad medioambiental afectando a peces, ganado, plantas, etc. (de la Cruz et al, 2013). Se ha estudiado la bioacumulación de CYN en distintos organismos, entre ellos, cangrejos de río y mejillones y se observó que tendía a

acumularse en la masa visceral o en los tejidos musculares, lo cual sugiere la acumulación significativa de la cianotoxina, como resultado de la ingestión de células cianobacterianas y absorción directa de CYN del agua, tras una exposición a células enteras y no a liofilizados congelados (de La Cruz et al., 2013).

En cuanto a su estereoquímica, la toxina alcaloide cilindrospermopsina consiste en una guanidina tricíclica unida a un resto hidroximetiluracilo, por un puente hidroxilo (Ohtani et al., 1992). Debido a su carácter bipolar, la CYN es un compuesto altamente hidrosoluble. Las concentraciones de CYN disueltas en agua suelen ser más altas que las concentraciones intracelulares, que pueden constituir incluso más del 99% del total de CYN disponible, debido a que hasta el 90% del total de CYN se identifica fuera de las células (Díez-Quijada et al., 2021). Su peso molecular es de 415 Da (Culrann et al., 2002). Se conocen dos análogos, que son la 7-deoxi-cilindrospermopsina y 7-epicilindrospermopsina (Figura 2). El grupo hidroxilo en C-7 o la presencia del grupo sulfato tienen un efecto destacado en su actividad, sin embargo, el grupo hidroxilo es esencial para la misma. Además, el anillo de uracilo contribuye en la expresión de la actividad biológica de CYN. Si se establece una comparación con análogos sintéticos, se observa que aquellos con un grupo hidroxilo en C-7 producían toxicidad en las células humanas. Se sabe que un intermedio de la biosíntesis de CYN, el guanidinoacetato, es tóxico y puede acumularse en cepas individuales productoras de CYN (World Health Organization, 2020). Existe una correlación entre la presencia de grupos guanidina, uracilo e hidroxilo y los niveles de actividad. (Culrann et al., 2002).

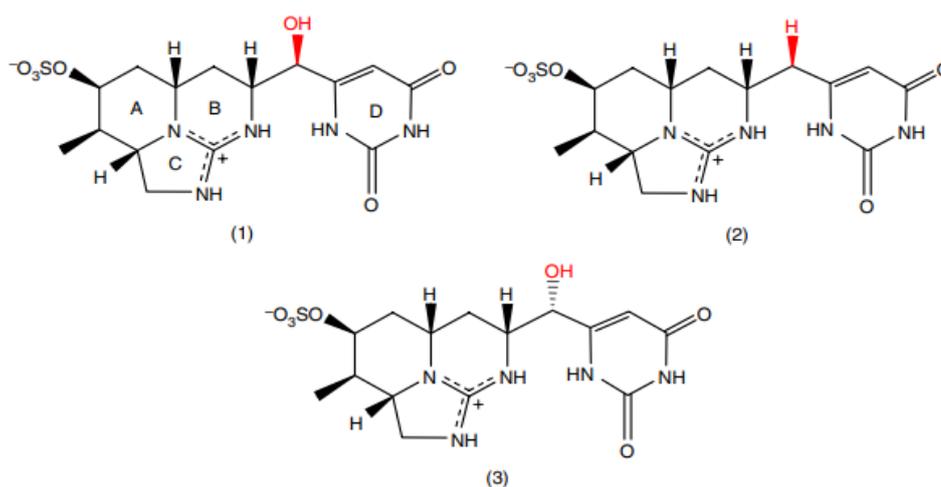


Figura 2. Las estructuras moleculares de cilindrospermopsina (1) y sus análogos 7-deoxi-cilindrospermopsina (2) y 7-epicilindrospermopsina (3). (Moreira et al., 2013).

El mecanismo de acción de la CYN se basa en la inhibición irreversible de la síntesis de proteínas eucariotas y la inhibición de la síntesis de glutatión (GSH) (Cartmell et al., 2017), lo cual conlleva a un aumento de estrés oxidativo. Asimismo, se ha sugerido que el metabolismo xenobiótico juega un papel crucial en la hepatotoxicidad de CYN. Así, se ha demostrado que el metabolismo de la CYN por el citocromo P450 implica una mayor toxicidad de la misma (Runnegar et al., 1995).

Es poco probable que la cianotoxina atraviese fácilmente la bicapa lipídica debido a su bajo peso molecular.

1.3. VÍAS DE EXPOSICIÓN A CIANOTOXINAS

En humanos, la exposición a cianotoxinas puede darse a través de la vía oral de forma directa por el consumo de agua o alimentos contaminados (alimentos de origen animal o vegetal, así como suplementos alimentarios de algas contaminados, los cuales están expuestos a cianotoxinas, almacenándolas en sus tejidos) pudiendo ocasionar hepatotoxicosis aguda o crónica. Se considera ésta la principal vía de exposición (Caméan et al., 2005). No obstante, también cabe destacar la vía dérmica, a través del agua de uso recreacional mediante la práctica de actividades deportivas, entre ellas, natación o por contacto directo con floraciones, originándose reacciones alérgicas (Chorus y Bartram, 1999). Según Moreira et al., (2013), se han llevado a cabo varios estudios para evaluar el potencial de irritación de la piel por la exposición a CYN en las aguas de baño.

Por último, la vía inhalatoria resulta ser minoritaria, por inhalación de partículas en aerosoles en aguas de recreo o por llevar a cabo la práctica de deportes acuáticos (Wood, 20016).

Debido a que las floraciones de cianobacterias tóxicas constituyen uno de los graves problemas en la salud humana y ambiental, relacionados con la eutrofización de agua potable y de lugares de recreo acuático, surge la necesidad de informar al personal involucrado en el cuidado de la salud, entre ellos médicos, enfermeros, etc., sobre las características y existencia de daños o intoxicaciones por cianotoxinas a través de diferentes vías de exposición, con el fin de que incluyan esta actividad como práctica diagnóstica en la población (Sedan y Andrinolo, 2011).

1.4. EFECTOS INDUCIDOS POR EXPOSICIÓN A CIANOTOXINAS

En relación a los efectos inducidos por exposición a cianotoxinas, son de interés los síntomas primarios de tipo irritativo o alérgico, así como los de tipo gastrointestinal (vómitos, náuseas, diarreas, dolor abdominal) (Chorus y Bartram, 1999). Debido a la exposición por contacto directo, afectando principalmente a los bañistas expuestos a cianotoxinas, se conocen reacciones alérgicas y tóxicas en la piel de distinta gravedad (Gonseth y Martínez, 2005).

Por otro lado, también se producen síntomas debido a la exposición a altas concentraciones de cianotoxinas, tales como daños hepáticos, citotóxicos y neurotóxicos (Yang et al., 2021)

Además, se ha demostrado que la CYN induce daño tisular, estrés oxidativo y daño al ADN en una variedad de órganos y tipos de células. La toxicidad *in vitro* de la CYN ha sido revisada por Pichardo et al., (2017).

La toxicidad de la CYN también se ha demostrado utilizando modelos *in vivo* (Humpage y Falconer, 2003; Chernoff et al., 2014), centrándose principalmente en su hepatotoxicidad. Sin embargo, dada la naturaleza hidrófila de la CYN, el riñón también podría considerarse un potencial órgano diana, ya que ésta se elimina por el riñón (Morales et al., 2018). Es de interés, por tanto, conocer la toxicidad de la CYN en el sistema renal.

1.5. SISTEMA RENAL. RIÑONES Y SU FUNCIONAMIENTO

Los riñones son los órganos principales del sistema urinario, los cuales presentan una forma característica, similar a un frijol. Se encuentran situados en los seres humanos en la parte posterior del abdomen a ambos lados de la columna vertebral (Moscoso et al., 2019). Son los encargados de producir la orina, la cual es conducida hasta la vejiga a través de los conductos excretores: cálices, pelvis renales y uréteres, para ser finalmente excretada al exterior a través de la uretra (Aranalde et al., 2015).

Según Moscoso et al., 2019, la función principal de los riñones es mantener la homeostasis del medio interno, estabilizando el volumen y las características fisicoquímicas mediante la formación de la orina. Este órgano cumple además otras funciones importantes a destacar:

- Regular el equilibrio hidroelectrolítico.
- Eliminar desechos a través de la orina.
- Mantener la osmolaridad de la sangre.

- Regular la presión arterial.
- Regular el equilibrio ácido-base.
- Secretar hormonas como la eritropoyetina, renina y calcitriol.
- Función metabólica, sintetiza glucosa a partir de aminoácidos y otros precursores.

Los riñones están revestidos por una cápsula fibrosa y constituidos por diferentes tipos de estructuras: la sustancia cortical, debajo de la cápsula fibrosa y la zona medular, la cual envuelve a la sustancia medular que penetra profundamente en ella, dando lugar a formaciones radiadas llamadas pirámides de Ferrein. La sustancia medular está formada por masas piramidales denominadas pirámides de Malpighi, las cuales presentan unas prolongaciones de la sustancia cortical que reciben el nombre de columnas de Bertín. Los riñones a su vez, contienen números ovillos microscópicos de capilares sanguíneos, los glomérulos. La sangre es recibida por los mismos, mediante la comunicación de arteriolas aferentes y eferentes. El glomérulo está envuelto por una membrana de doble pared, la cápsula de Bowman. Por el extremo opuesto, dicha membrana continúa por el túbulo renal. Ambos, glomérulo y cápsula de Bowman conforman el corpúsculo de Malpighi (Moscoso et al., 2019).

El túbulo renal que sale de la cápsula de Bowman, llamado túbulo proximal, se encarga de la reabsorción de sodio y agua filtrados, así como de la reabsorción de glucosa, fosfato, aminoácidos y otros solutos. Éste se prolonga en un largo tubo al que sigue un segmento en forma de U, el asa de Henle. Finalmente, al asa de Henle, sigue un túbulo distal que reabsorbe entre el 5% y el 8% del cloruro sódico filtrado, el cual desemboca en un túbulo colector, encargándose de la regulación final de la excreción de sodio, reabsorbe el 2-3% de sodio filtrado (Rennke y Denker, 2014).

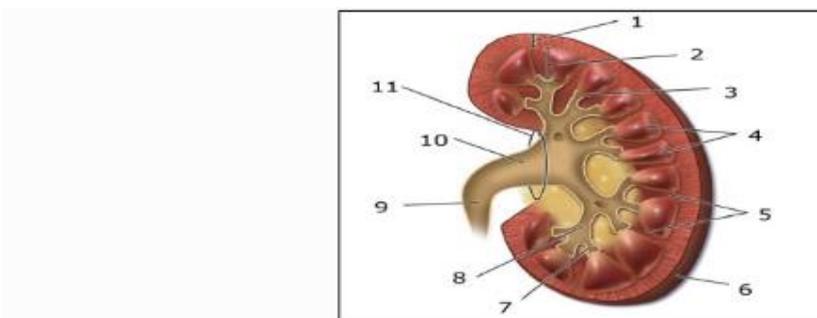


Figura 3. Esquema del riñón. (Rennke y Denker, 2014).

1. Corteza renal. 2. Médula renal. 3. Papila renal. 4. Pirámide renal. 5. Columna renal. 6. Cápsula fibrosa. 7. Cáliz menor. 8. Cáliz mayor. 9. Uréter. 10. Pelvis renal. 11. Hilio renal.

En la formación de la orina por el riñón intervienen tres procesos fisiológicos básicos: filtración, reabsorción y secreción.

En el proceso de filtración, se elabora un ultrafiltrado de plasma. Conforme avanza por el túbulo, el filtrado es modificado por la secreción de sustancias que las células de revestimiento del túbulo llevan desde el intersticio renal circulante hasta el filtrado dentro de la luz tubular, y por la reabsorción de sustancias eliminadas del filtrado tubular a través de las células (Aranalde et al., 2015).

1.5.1. MECANISMOS BÁSICOS DE NEFROTOXICIDAD

Según Moscoso et al., (2019), la mayoría de las deficiencias que afectan al riñón, ocurren por alguna lesión o envenenamiento en las nefronas, evitando que éstas puedan filtrar la sangre. Debido al gran número de nefronas existentes, las patologías renales se suelen manifestar pasados muchos años cuando gran parte de éstas están destruidas. Enfermedades como diabetes o hipertensión arterial pueden alterar el funcionamiento de los riñones. A su vez, los antecedentes familiares son un factor de predisposición que pueden causar alteraciones renales.

La mayoría de las enfermedades atacan a las nefronas e impiden que éstas eliminen los productos de desecho. Entre las patologías renales más comunes cabe destacar la agenesia renal. Es un defecto que ocurre en el desarrollo embrionario, que impide la formación correcta de uno o ambos riñones. Anomalías cromosómicas, el tabaquismo materno o el consumo de drogas juegan un papel importante en su aparición. Otra patología de interés es la glomerulonefritis, la cual afecta a la función y estructura del glomérulo (unidad funcional del riñón donde tiene lugar la depuración y filtración del plasma sanguíneo como primera etapa en el proceso de formación de la orina) y la estructura de las nefronas. Consiste en la inflamación del glomérulo o de los pequeños vasos sanguíneos del riñón. Puede presentarse con hematuria, proteinuria o como un síndrome nefrótico o una enfermedad renal crónica. Las células glomerulares, entre ellas los podocitos, intervienen en el proceso de inflamación (Moscoso et al., 2019).

Por otro lado, la litiasis renal se caracteriza por la formación de cálculos renales, siendo uno de los desórdenes más comunes en la población. Éstos son masas de cristales cuya formación depende de la composición de la orina o ciertas sustancias que favorecen el crecimiento de los

mismos. Están formados por sales minerales y ácidos que se encuentran en la superficie interna del riñón y se depositan en la orina, formando piedras debido a su acumulación.

Cuando los riñones no son capaces de filtrar adecuadamente las toxinas y sustancias de desecho de la sangre, aparece una patología denominada insuficiencia renal, la cual puede ser aguda o crónica. Las manifestaciones clínicas y analíticas dependerán del grado de pérdida de la función renal.

Por último, el diagnóstico de una nefropatía glomerular se basa en elementos clínicos y biológicos simples, tales como edemas, hipertensión arterial, proteinuria y hematuria etc. Conforman un grupo de enfermedades que se caracterizan por una pérdida de integridad de la membrana de filtración glomerular y aparición de elementos formes y macromoléculas en la orina, acompañada de una disminución de la capacidad depurativa del riñón (Dussol, 2015).

2. OBJETIVOS

La presente revisión bibliográfica está centrada en recopilar y revisar los datos e información disponibles acerca de la nefrotoxicidad, es decir daños renales, causados por la cianotoxina cilindrospermopsina (CYN).

El principal objetivo de este estudio se basa en poner de manifiesto las alteraciones a nivel renal producidas bajo diferentes condiciones de exposición a dicha toxina, en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, siendo el riñón un órgano muy susceptible a la exposición a CYN.

3. METODOLOGÍA

Para la elaboración de la presente revisión bibliográfica se han empleado diversas bases de datos y fuentes bibliográficas. Entre las principales bases de datos cabe destacar Pubmed, Science Direct, Scopus, Web of Science y Google Académico.

Para llevar a cabo dicha revisión se han usado palabras claves como “cyanobacteria”, “cylindrospermopsin”, “toxicity”. Además, se usaron palabras adicionales como “renal damage”, “kidney”, “*in vivo*” o “*in vitro*”.

La siguiente tabla, representa el nº de artículos encontrados en función de las distintas palabras clave empleadas.

	cyanobacteria	cylindrospermopsin	renal damage	CYN+kidney
Nº publicaciones				
PUBMED	31.071	563	36.484	39
SCIENCE DIRECT	51.666	1.281	263.750	347

No hubo acotación en cuanto a la franja de años, es decir, no se mostró interés por una franja de años específica, por lo que hubo un número considerable de artículos acerca de la temática a tratar.

La referencia más antigua recopilada corresponde al año 1992, (Ohtani et al., 1992), mientras que la más reciente corresponde al año 2021 (Díez-Quijada et al., 2021).

No obstante, también se llevó a cabo la búsqueda en otras fuentes bibliográficas tales como, capítulos de libros o tesis doctorales, de las cuales se ha extraído información de interés sobre el tema a estudiar.

Para la mayoría de los artículos recopilados, redactados en inglés, se precisó de su traducción al español, con ayuda de Word Reference (www.wordreference.com) y mis conocimientos sobre el idioma.

Además, para poder gestionar las distintas fuentes, se ha recurrido a “Mendeley” como herramienta de ayuda, para citar las diversas referencias, siendo éste un gestor de referencias bibliográficas bastante útil.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la realización de la búsqueda bibliográfica se han seleccionado un total de 28 artículos en relación con la nefrotoxicidad de CYN, por lo que se considera un tema aún poco estudiado. Estos artículos se han organizado en función de los modelos experimentales utilizados:

- a) Modelos experimentales *in vitro*.
- b) Modelos experimentales *in vivo*.
 - Estudios en organismos acuáticos.
 - Estudios en mamíferos.

Se ha procedido a organizarlos en tablas, primero aquellos estudios *in vitro*, seguidos de estudios *in vivo*.

Se ha seguido un orden cronológico en las distintas tablas, las cuales plasman los datos más importantes de la experimentación (tipo de cianotoxina, modelo experimental, ensayo, condiciones de exposición), principales resultados a nivel renal y sus respectivas referencias.

A continuación, se muestran los datos obtenidos sobre la nefrotoxicidad de CYN.

4.1. NEFROTOXICIDAD DE CYN EN MODELOS EXPERIMENTALES *IN VITRO*

Son escasos los estudios de toxicidad encontrados que hayan utilizado modelos *in vitro* representativos del riñón (Tabla 1). Tan sólo se han utilizado para este fin las células Vero, procedentes del riñón del mono verde africano y las células HEK293, renales humanas.

El tipo de cianotoxina empleada fue CYN pura y los estudios que se han realizado incluyen citotoxicidad, absorción y alteración de la expresión génica.

Froschio et al., (2009a), estudió la sensibilidad de diferentes líneas celulares a la exposición a CYN, destacando las células Vero. Al observar la citotoxicidad inducida por CYN, se concluyó que las células Vero producían una toxicidad retardada tras la exposición a corto plazo, siendo la línea celular renal menos sensible que las hepáticas, pero más sensible que la intestinal Caco-2.

Además, Froschio et al., (2009b), investigó la captación de CYN por células Vero, mediante la expresión de la llamada proteína verde fluorescente (GFP), cuyos niveles se determinaron tras la realización de un análisis de citometría de flujo de suspensiones de células Vero-GFP. Se comparó el efecto de CYN sobre los niveles de GFP celular con otros inhibidores de síntesis de proteínas, tales como cicloheximida (CHEX) o emetina. Además, las determinaciones de citotoxicidad se llevaron a cabo mediante el ensayo MTS. Los efectos citotóxicos inducidos por los inhibidores de la síntesis de proteínas se observaron a las 24 h, con concentraciones similares que mostraron también una reducción de los niveles GFP. Se demostró primero la potencia de los inhibidores de la síntesis de proteínas en un sistema libre de células, es decir, en ausencia de membrana celular. Posteriormente, se utilizaron células Vero-GFP y se observaron tanto una entrada retardada como una baja potencia, por lo que se considera que la captación de CYN así como su absorción por células Vero es limitada, aunque suficiente para inducir citotoxicidad (Froschio et al., 2009b).

En cuanto a las células HEK293, Díez-Quijada et al., (2019), observaron alteraciones en la expresión génica, tras la exposición a concentraciones subcitotóxicas de CYN pura. Igualmente, la expresión proteica también resultó alterada.

Tabla 1. Nefrotoxicidad de CYN en modelos experimentales *in vitro*.

Tipo de cianotoxina	Modelo experimental	Ensayo	Condiciones de exposición	Principales resultados	Referencia
CYN pura	Líneas celulares C3A, HepG2, NCI-N87, HCT-8, HuTu-80, Caco-2 y Vero.	Citotoxicidad: ensayo MTT	<p>→ 0,4 nM a 66 µM de CYN durante 24h.</p> <p>→ 0,25, 2,5, y 5 µM de CYN, durante 7 días.</p> <p>→ 0,01-22 µM de CYN, durante 1,2,4,6 o 24h (exposición a corto plazo)</p>	<p>Tras 24h las líneas celulares más sensibles a CYN fueron las hepáticas y la menos sensible Caco-2. Vero fue algo más sensible que Caco-2 (IC50 ~ 5 µM).</p> <p>En el experimento de 7 días, 2,5 y 5 µM CYN redujeron la viabilidad progresivamente y al 3er día ya de forma completa. 0,25 µM CYN no la redujo a ningún tiempo.</p> <p>En la exposición a corto plazo se observó una toxicidad retardada en Vero.</p>	(Froschio et al., 2009a)
CYN pura	Línea celular Vero	Monitorización de la captación de CYN por células Vero, mediante la expresión de proteína verde fluorescente (GFP)	Las células Vero-GFP se trataron con CYN (0,1-100 µM), CHEX (0,01-100 µM) o emetina (0,01-100 µM) durante 4h o 24h.	<p>CYN mostró un potente efecto inhibidor de proteínas en sistemas libres de células. Sin embargo, con células su potencia disminuyó, aunque la señal GFP fue reducida por todos los inhibidores de la síntesis de proteínas.</p> <p>La absorción de CYN por las células Vero es limitada, aunque suficiente para producir citotoxicidad.</p>	(Froschio et al., 2009b)
		Efectos inhibidores sobre la síntesis de proteínas			
		Ensayo de citotoxicidad MTS.			

CYN pura	Línea celular HEK 293	Alteraciones en la expresión génica. Genes evaluados: CYP1A1, CYP1A2, TP53, CDKN1A. Estrés oxidativo: SOD1, GPx1, CAT. Genes implicados en la apoptosis/supervivencia: BAX, BCL2.	Las células HEK293 fueron expuestas a 0,5 y 5 µg/mL de CYN durante 4 o 24 horas. Evaluación cuantitativa por q-PCR.	CYN podría inducir efectos y diferencias significativas en la expresión génica tras la exposición a la concentración más alta de la cianotoxina y durante el mayor tiempo de exposición (24 horas). Alteraciones en la expresión proteica tras la exposición a concentraciones subcitotóxicas de CYN.	(Díez-Quijada et al., 2019)
----------	--------------------------	--	--	--	-----------------------------

Líneas celulares C3A y HepG2 hepáticas humanas. NCI-N87 gástrica. HCT-8, HuTu-80, Caco-2 intestinales humanas. Vero, renal de mono verde africano.

HEK293 renal humana. CHEX: cicloheximida. CAT: catalasa. GPx: glutation peroxidasa. SOD1: superóxido dismutasa.

4.2. NEFROTOXICIDAD DE CYN EN MODELOS EXPERIMENTALES *IN VIVO*

En las tablas 2 y 3 se recogen todos los estudios publicados sobre la nefrotoxicidad de CYN en modelos experimentales *in vivo*.

Ratones y tilapias fueron los modelos experimentales más empleados.

Se utilizó CYN pura, cultivos o células liofilizadas de cianobacterias (*A.ovalisporum*, *C.raciborskii*) conteniendo CYN y extractos de cianobacterias conteniendo CYN, entre otros.

4.2.1. ESTUDIOS EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

Con respecto a los estudios en organismos acuáticos (10), en todos ellos se empleó la tilapia como modelo experimental y los tipos de ensayos que se llevaron a cabo incluyeron: valoración de cambios histopatológicos, aplicación de técnicas inmunohistoquímicas, ensayos de citotoxicidad, valoración del papel de quimioprotectores contra el estrés oxidativo y efectos de la depuración sobre biomarcadores séricos como peroxidación lipídica (LPO), oxidación de proteínas y de ADN, actividades enzimáticas, entre ellas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), alanina amino transferasa (ALT), etc.

De los resultados obtenidos se desprende que 1) la CYN alcanza el riñón, ya que se ha puesto de manifiesto su presencia por técnicas inmunohistoquímicas tras su administración i.p. (Guzmán-Guillén et al., 2013b). 2) Es capaz de producir alteraciones patológicas a nivel renal. Entre ellas, afecciones en los túbulos proximales y distales, nefropatías, necrosis celular, glomerulopatías, capilares fenestrados y dilatación de la cápsula de Bowman (Gutiérrez-Praena et al., 2012; 2014; Guzmán-Guillén et al., 2015; 2017). 3) Induce estrés oxidativo alterando distintos marcadores tanto a nivel bioquímico como molecular (Gutiérrez-Praena et al., 2013; 2014; Guzmán-Guillén et al., 2013a; 2013c, 2014; Ríos et al., 2014). 4) Que el estrés oxidativo inducido por CYN se puede prevenir/revertir por la acción de quimioprotectores (Guzmán-Guillén et al., 2013a; Gutiérrez-Praena et al., 2014). Y 5) Los procesos de depuración son eficaces para la recuperación de las lesiones inducidas por CYN (Guzmán-Guillén et al., 2014; 2017; Ríos et al., 2014).

Tabla 2. Nefrotoxicidad de CYN en modelos experimentales *in vivo*: estudios en organismos acuáticos.

Tipo de cianotoxina	Modelo experimental	Ensayo	Condiciones de exposición	Principales resultados	Referencia
CYN pura	Machos de Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Valoración de cambios histopatológicos en función del tiempo, tras una exposición aguda a CYN.	Exposición aguda a CYN (0 control y 200 µg/kg de pescado) vía i.p. y oral. Sacrificio a las 24h y 5 días tras la exposición.	- Vía oral y sacrificio a las 24 h: Se observó atrofia glomerular, cápsula de Bowman dilatada, disminución de la sección de los túbulos proximales y distales. - Vía oral y sacrificio a los 5 días: Parénquima renal atrófico, alargamiento en los procesos/pedícelos de los podocitos. - Vía i.p. sacrificio a las 24h/5 días: Hialinización del glomérulo, necrosis de cels.tubulares. Efectos más graves. Tasa de filtración glomerular (TFG) reducida.	(Gutiérrez-Praena et al., 2012)
CYN pura y células liofilizadas de <i>A. ovalisporum</i> conteniendo CYN y desoxi-CYN	Machos de Tilapia (<i>O.niloticus</i>)	Valoración del papel protector de la L-carnitina contra el estrés oxidativo. → Oxidación de lípidos, de proteínas y de ADN, actividad NADPH oxidasa, SOD, CAT, relación GSH/GSSG, producidos tras exposición a CYN.	Nueve grupos. G1: control. G 2 y 3: 400 µg CYN/kg de células liofilizadas y CYN pura, respectivamente G 4 y 7: 400 ó 880 mg/kg pescado de LC (21 días) G 5 y 6: 400 mg/kg LC (21 días) + 400 µg CYN/kg de células liofilizadas y CYN pura, respectivamente G 8 y 9: 880 mg/kg LC (21 días) + 400 µg CYN/kg de células liofilizadas y CYN pura, respectivamente.	Ambas dosis de LC: protección frente a LPO inducida por CYN. LC disminuyó los niveles de oxidación de proteínas (exposición a CYN pura) El tratamiento con LC (dosis más alta) redujo la oxidación del ADN (exposición a cels. liofilizadas de <i>A.ovalisporum</i>). Efectos protectores de LC, sobre la actividad GCS, SOD-CAT y relación GSH/GSSH. Efectos antioxidantes beneficiosos tras el aporte dietético con LC.	(Guzmán-Guillén et al., 2013a)

CYN pura	Machos de Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Actividad y expresión génica de las enzimas GSH-Px, y sGST.	Inyección con vehículo (grupo control y acuarios 3 y 4) Acuarios 1 y 2: dosis única de 200 µg/kg de CYN pura (sonda) Acuarios 5 y 6: Inyección i.p o por sonda gástrica de 200 ug/kg de CYN pura. Sacrificio tras 24h o 5 días.	Aumento significativo de la actividad sGST, en Tilapias expuestas por vía i.p. Ningún cambio de la actividad sGST, en Tilapias expuestas por sonda. Alteración en la expresión génica de la enzima GPx. Se observaron diferentes respuestas según el tipo de órgano, vía de exposición y tiempo de sacrificio.	(Gutiérrez- Praena et al., 2013)
CYN pura y células liofilizadas de <i>A. ovalisporum</i>	Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Técnicas inmunohistoquímicas.	Ensayo agudo: - Acuarios 1 y 5: grupo control vía oral - Acuarios 2 y 6: grupo control vía i.p. - Acuarios 3 y 7: 200 µg/kg de CYN pura vía oral y sacrificio a las 24h o 5 días. - Acuarios 4 y 8: 200 µg/kg de CYN pura vía i.p. y sacrificio a las 24h o 5 días. Ensayo crónico: - Acuarios 1 y 4: controles 7 y 14 días - Acuarios 2 y 5: 10 µg/L CYN 7 ó 14 días - Acuarios 3 y 6: 100 µg/L CYN 7 ó 14 días	Órgano más afectado hígado y luego riñón. Tinción de los túbulos contorneados proximales y distales tras la administración oral. Presencia de CYN en glomérulos tras la administración i.p. Inmunomarcaje diferente en riñón a distintas concentraciones de CYN. Fuerte tinción citoplasmática de los túbulos proximales, distales y glomérulos tras exposición durante 14 días.	(Guzmán- Guillén et al., 2013b)

Células liofilizadas de <i>A. ovalisporum</i> conteniendo CYN y desoxi-CYN	Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Estrés oxidativo. Marcadores: LPO, oxidación de proteínas y de ADN, GSH/GSSG, GST, GPx, SOD, CAT, GCS.	Dos grupos control 10 o 100 µg/L de CYN durante 7 ó 14 días. Exposición por inmersión	Aumento de la LPO renal en tilapias expuestas a la concentración más alta de CYN tras 7 o 14 días de exposición. Aumento en la oxidación de proteínas tras la exposición a 100 µg/L de CYN durante 14 días. Influencia del tiempo de exposición y concentración de CYN. Incremento en la oxidación del ADN tras la exposición a 10 µg/L de CYN durante 7 o 14 días. Disminución significativa de la actividad GST en el riñón, tras la concentración más alta de CYN (exp 14 días) Aumento de la actividad GPx en tilapias expuestas a la concentración más baja de CYN después de 14 días. Se observó en el riñón un aumento de la actividad SOD tras la exposición a 100 µg/L de CYN durante 7 días. Disminución en la actividad CAT, tras ambos periodos de exposición. El riñón es el órgano más sensible a CYN y desoxi-CYN.	(Guzmán-Guillén et al., 2013c)
Cultivo de <i>A. ovalisporum</i> conteniendo CYN	Machos de Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Depuración, actividad y expresión de ARNm de enzimas antioxidantes (GPx, sGST) tras exposición a concentraciones repetidas.	Grupo control 10 µg/L de agua, de un cultivo de CYN LEGE-X001, por inmersión durante 14 días y posterior depuración durante 0,3 y 7 días.	Los niveles sGST disminuyeron en el riñón, durante los primeros días de depuración y se restauraron posteriormente. Aumento considerable de la expresión génica de GPx. Mejora de la actividad sGST en Tilapias tratadas después de 7 días de depuración. Restauración de los efectos del estrés oxidativo a nivel renal después de la depuración.	(Ríos et al., 2014)
CYN pura o células liofilizadas de <i>A. ovalisporum</i>	Machos de Tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Valoración del papel protector de N-acetilcisteína sobre cambios histopatológicos inducidos en Tilapia	Exposición a 22 o 45 mg/pez/día de NAC durante 7 días. Tras el 7º día 200 µg/kg de CYN pura o células liofilizadas	Se observó atrofia del glomérulo, dilatación de la Caps. Bowman, membranas basales engrosadas, capilares fenestrados e hinchados. Tras el pretratamiento con NAC (ambas dosis), no hubo lesiones renales, parénquima renal normal.	(Gutiérrez-Praena et al., 2014)

(cepa productora de CYN)		Estudios inmunohistoquímicos.			
Extracto de una cepa de <i>A.ovalisporum</i>	Machos de Tilapia (<i>O.niloticus</i>)	Efectos de la depuración sobre biomarcadores oxidativos: LPO, oxidación de proteínas y de ADN, SOD, CAT, GSC, GSH/GSSG.	Tilapias se expusieron a un cultivo de <i>A.ovalisporum</i> LEGE-X-001 conteniendo CYN y a 10 µg/L de CYN durante 7 o 14 días. Periodos de depuración de 3 y 7 días. Exposición por inmersión	La LPO aumentó significativamente en el riñón tras 14 días de exposición. Un periodo de depuración de 7 días fue necesario para restaurar los niveles de LPO. Aumento en la oxidación del ADN en tilapias expuestas a CYN sin depuración. Tras 3 o 7 días de depuración, los valores de oxidación del ADN disminuyeron de forma considerable. Actividad SOD renal disminuida con ambas concentraciones de CYN, aumento de la actividad CAT tras 7 días de exposición. La actividad GCS en riñones disminuyó después de ambos periodos de depuración. Restauración a sus respectivos valores control.	(Guzmán-Guillén et al., 2014)
Células liofilizadas de <i>A.ovalisporum</i> productoras de CYN	Machos de Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Cambios histopatológicos.	Grupo control, 10 o 100 µg de CYN/L y 0,46 o 4,6 µg de desoxi-CYN/L durante 7 o 14 días. Exposición por inmersión	En general, se observó la presencia de glomerulopatía membranosa, atrofia capilar glomerular, hiperemia, tumefacción de los túbulos. Después de 14 días, pérdida de membrana basal, microhemorragias, dilatación de la cápsula de Bowman, capilares fenestrados del glomérulo y función renal degenerada.	(Guzmán-Guillén et al., 2015)
Cultivo de <i>A.ovalisporum</i> conteniendo CYN	Machos de Tilapia (<i>O.niloticus</i>)	Evaluación de cambios histopatológicos Capacidad depurativa para revertir lesiones	Exposición de Tilapias a 10 mg CYN/L de un cultivo de <i>A.ovalisporum</i> durante 14 días y depuración de 3 ó 7	Aparición de hiperemia, tumefacción de los túbulos proximales y distales, acompañada de necrosis celular, presencia de gotitas lipídicas en los glomérulos, y podocitos aparentemente normales. Estrés oxidativo, marcado por oxidación lipídica y proteica. Acción depurativa más rápida en riñón, posibilidad de una	(Guzmán-Guillén et al., 2017)

histopatológicas.

días.

mayor destrucción de la toxina en tejidos excretores
renales.

Reversibilidad de los efectos con la depuración.

CAT: catalasa. GCS: γ -glutamyl cisteína sintetasa. GPx: glutathion peroxidasa. GSH-Px: glutathion peroxidasa. GSH/GSSG: glutathion reducido/glutathion oxidado. GST: glutathion S-transferasa. LPO: peroxidación lipídica. SOD: superóxido dismutasa.

4.2.2. ESTUDIOS EN MAMÍFEROS

Se han recopilado un mayor número de artículos en relación con la nefrotoxicidad de CYN en mamíferos (15, Tabla 3), de ellos la gran mayoría emplea ratones como modelo experimental y sólo 2 utilizan ratas (Đorđević et al., 2017 y Díez-Quijada et al., 2021).

En estos estudios se usan tanto CYN pura como CYN procedente de extractos o bien cultivos de cianobacterias productoras. Las vías de exposición principales han sido la oral y la i.p., y los tiempos de exposición han sido muy variables.

Se han llevado a cabo estudios de citotoxicidad, carcinogenicidad, toxicidad oral, valoración de cambios histopatológicos, comparación toxicológica de varias cepas de *C. raciborskii*, valoración de biomarcadores enzimáticos, etc. No obstante, se pone de manifiesto que los estudios que utilizan protocolos oficiales (como los de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, OCDE) son minoritarios (tan sólo Díez-Quijada et al., 2021).

Muchos de estos estudios evidencian alteraciones histopatológicas (Terao et al., 1994; Ryde et al., 1997; Seawright et al., 1999; Bernard et al., 2003; Chernoff et al., 2011; 2014; 2018; Moraes and Magalhães, 2018; Díez-Quijada et al., 2021). Entre ellas destacan: inflamación intersticial, afectación con nefritis intersticial crónica, necrosis en la región proximal, dilatación de los túbulos, etc.

En cuanto al peso absoluto o relativo de los riñones, hay estudios que indican un aumento (por ejemplo, Humpage y Falconer, 2003; Sukenik et al., 2006), la ausencia de cambios (Rogers et al., 2007) o una disminución (Díez-Quijada et al., 2021). No obstante, hay que tener en cuenta el modelo experimental (rata/ratón), el sexo, la dosis y tiempo de exposición.

Se pone en evidencia que el riñón se ve afectado tras exposición a la CYN, siendo incluso para algunos autores el órgano más sensible (Humpage y Falconer, 2003).

Tabla 3. Nefrotoxicidad de CYN en modelos experimentales *in vivo*: estudios en mamíferos.

Tipo de Cianotoxina	Modelo experimental	Ensayo	Condiciones de exposición	Principales Resultados	Referencia
CYN pura	Ratones ICR	Niveles de proteínas, fosfolípidos y Cit-P450. Cambios histopatológicos.	→ Grupo 1: control → Grupo 2: 24 ratones inyección i.p de 0,2 mg/kg de peso corporal de CYN pura → Grupo 3: 12 ratones inyección i.p de 150 mg/kg de peso corporal de CHEX. Se sacrificaron tres ratones de cada grupo.	Riñones pálidos a las 48 horas de inyección. Numerosos racimos de retículo endoplasmático liso proliferado en el citoplasma de los túbulos. Abundantes gotas de grasa. Necrosis en la región proximal. Sin embargo, no hubo alteraciones renales en aquellos tratados con CHEX.	(Terao et al., 1994)
<i>C.raciborskii</i> CYN (Extractos de la Cepa AWT 205)	Ratones machos albinos suizos	Aislamiento, cultivo y toxicidad de CYN de una floración. Contenido cuantitativo de CYN por HPLC.	→ 1400 mg/kg de extracto de <i>C.raciborskii</i> por vía oral durante 24h. → 32 mg/kg de extracto de <i>C.raciborskii</i> por vía i.p durante 24h.	Se observó un aumento de eritrocitos en el glomérulo. Células con núcleos necrosados. Necrosis centrolobulillar. El daño renal parecía estar restringido al epitelio tubular. Tras 24h el lumen de los túbulos proximales se vio agrandado y se observó la presencia de grandes vacuolas con vesículas. Tras 24 h, agravamiento de los efectos.	(Ryde et al., 1997)
<i>C.raciborskii</i> CYN (<i>Woloszynska</i>)	Ratones machos	Análisis de toxicidad oral. Estudio histopatológico.	2,5 a 8,3 mg/kg de un cultivo tóxico de <i>C.raciborskii</i> Dosis única por sonda después de	Riñones hinchados con vacuolas citoplasmáticas de cels.epiteliales. Necrosis coagulativa periacinar en aquellos expuestos a 6,2 mg/kg de CYN	(Seawright et al., 1999)

			ayuno nocturno. Sacrificio a las 48-72h post-exposición.	Túbulos contorneados distendidos y material proteico granular. Necrosis con descamación en la luz de las cels epiteliales, así como necrosis tubular aguda isquémica. Hubo congestión de las regiones internas de la corteza suprarrenal. En general, baja perfusión tisular.	
CYN (Extracto de <i>C.raciborskii</i>)	Ratones machos albinos suizos	Prueba de carcinogenicidad tras la exposición a CYN Crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .	Grupo control: 27 ratones tratados con solución salina Grupo 1: Dos dosis orales de 1500 mg/kg del extracto de CYN a 53 ratones. Grupo 2: 3 dosis de 500 mg/kg del extracto de CYN al resto de ratones.	Se observó una sustancia refráctil de color amarillo dorado en el interior de las células del túbulo proximal. Aparición de 53 tumores en ratones expuestos y sacrificados después de 30 semanas.	(Falconer y Humpage, 2000)
Extractos de cianobacterias conteniendo CYN y CYN pura	Ratones machos	Determinación del NOAEL Valor de referencia para el agua potable Niveles de albúmina sérica y bilirrubina, ALP y ALT Toxicidad oral.	1º ensayo: 0-657µg/kg/día de extractos de cianobacterias que contenían CYN en agua potable durante 10 semanas. 2º ensayo: 0-240 µg/kg/día de CYN pura por vía oral durante 11 semanas.	Aumento del peso de los riñones (60-657 µg/kg/día El peso de las glándulas suprarrenales se incrementó a 120 µg/kg/día. NOAEL de 30 µg/kg/día de CYN.	(Humpage y Falconer, 2003)

<p>Extracto de un cultivo de <i>Raphidiopsis sp.</i> (cepa brasileña) <i>C.raciborskii</i> CYN</p>	<p>Ratones</p>	<p>Comparación toxicológica de diversas cepas de <i>C.raciborskii</i></p> <p>Evidencia de daños orgánicos</p> <p>Cuantificación y caracterización de la cianotoxina por métodos biológicos, enzimáticos y analíticos.</p>	<p>Grupo 1 y 2: control</p> <p>Grupos 3 y 4: inyección i.p. de 1 ml de extractos de cultivo de <i>Raphidiopsis sp.</i> Cepas brasileñas.</p> <p>Grupos 5,6,y 7: inyección i.p. de 1 ml de <i>C.raciborskii</i> <i>Australian</i> en 24h.</p> <p>Grupo 8: inyección de 1 ml de <i>C.raciborskii</i> cepa húngara.</p> <p>Exposición a cepas francesas, mexicanas y australianas.</p>	<p>Los túbulos renales mostraron necrosis celular severa, principalmente en los túbulos corticales.</p> <p>Los riñones exhibieron degeneración granular y necrosis por coagulación del epitelio tubular.</p> <p>Lesiones graves a nivel renal se observaron con la cepa australiana.</p>	<p>(Bernard et al., 2003)</p>
<p>Cultivo de <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> conteniendo CYN</p>	<p>Ratones machos y hembras</p>	<p>Peso relativo corporal de diversos órganos</p> <p>Variaciones en la secreción urinaria</p> <p>Variaciones de hematocrito</p> <p>Contenido en colesterol en RBC y plasma.</p>	<p>Grupo control: recibió un medio fresco para cianobacterias como fuente de agua potable.</p> <p>Grupo experimental: 100 a 550 µg/L de <i>A.ovalisporum</i> durante 42 semanas. (exposición diaria entre 10 y 55 µg/kg/día de CYN)</p>	<p>El peso de los riñones en ratones machos, fue mayor que el del grupo control tras una exp.prolongada.</p> <p>Además, la masa relativa del riñón, aumentó de forma gradual en función del tiempo. Esto podría derivar a una deshidratación. Sin embargo, en las hembras, los efectos renales no fueron tan significativos.</p> <p>LOAEL es de 20 µg/kg/día.</p>	<p>(Sukenik et al., 2006)</p>

CYN pura	Ratones (Swiss-Webster)	Estudio de viabilidad, peso corporal y cambios morfológicos, tras la exposición al final de la gestación.	Dosis de 0, 8, 16, 32, 64, 96 o 128 µg/kg de CYN pura al día en GD8-12. Las hembras fueron sacrificadas.	No se observaron efectos relevantes en la proporción riñón/peso corporal en las mediciones tanto maternas como fetales. La viabilidad y morfología fetal fueron normales en las camadas tras la administración de todos los niveles de dosis en los GD 8-12.	(Rogers et al., 2007)
CYN pura	Ratones hembras post-parto	Evaluación de la toxicidad y recuperación en la ratona embarazada Niveles de AAT, ALT, AST, BUN, y creatinina Lesiones histopatológicas	→ Grupo control: 0,1 ml de agua destilada en GD8-12 o GD13-17. → Inyecciones i.p. de 50 µg/kg de CYN pura durante 5 días en GD8-12 o GD13-17.	Marcadores séricos BUN (nitrógeno ureico en sangre) y creatinina elevados en el grupo GD8-12. Lesiones renales mínimas a moderadas, en madres tratadas en GD8-12 (inflamación intersticial). Afectación con nefritis intersticial crónica multifocal o necrosis epitelial tubular aguda. Los parámetros séricos recuperaron sus valores normales.	(Chernoff et al., 2011)
CYN pura	Ratones machos albinos suizos	Ensayo de citotoxicidad y genotoxicidad	50, 100 y 200 µg/kg de CYN pura vía i.p. 1, 2, 4 mg/kg de CYN pura vía oral (sonda) durante 24h.	Muerte de células renales tras la exposición a 100 y 200 µg/kg de CYN, 24h después de la inyección i.p. Tras una única dosis de 4 mg/kg de CYN, se observaron células epiteliales tubulares eosinofílicas dispersadas. Apoptosis y citotoxicidad renal más potente tras la administración por sonda.	(Bazin et al., 2012)

CYN pura	Ratonas preñadas	Toxicidad tras la exposición diaria a la cianotoxina Niveles de BUN, creatinina, proteína, glucosa, albúmina y parámetros hematológicos tales como hemoglobina, plaquetas y neutrófilos.	Dosis de 50 µg/kg de CYN pura diarias por vía i.p. Grupo GD8-12: 60 controles y 56 exp a CYN pura Grupo GD13-17: 24 controles y 48 exp a CYN pura Fueron sacrificados a los 3,6,13 días después de la 5ª dosis.	Se observó necrosis centrolobulillar e inflamación crónica. La relación riñón/peso corporal fue mayor en el grupo GD8-12. Necrosis tubular en el grupo GD8-12. En la franja externa de la médula, numerosos túbulos dilatados junto con epitelio tubular necrótico y desprendido. Hipoxia relacionada con hemorragia o deshidratación puede haber contribuido al aumento de BUN y creatinina.	(Chernoff et al., 2014)
<i>C.raciborskii</i> CYN	Ratas Wistar albinas	Ensayo de genotoxicidad Actividad antioxidante de AAST, ALT, ALP, GGT, ALB, SOD, GSH Y CAT. Cambios histopatológicos	→ Grupo 1: control negativo → Grupo 2: 300 mg/kg de EMS vía i.p (control positivo) → Grupo 3: 79-80 µg/kg peso corporal de <i>C.raciborskii</i> → Grupo 4: 1.500, 3.000, 6.000 o 12.000 µg/kg peso corporal de <i>C.raciborskii</i>	No se observó daño oxidativo a nivel renal, así como daños histopatológicos relevantes.	(Đorđević et al., 2017)
CYN pura	Ratones machos y hembras	Ensayo de toxicidad oral Concentraciones séricas de TBAs, ALT, ALP y de marcadores de lesión renal como BUN y creatinina Niveles de colesterol, proteína total, albúmina y glucosa sérica Parámetros hematológicos Evaluación histopatológica	0, 75, 150, 300 µg/kg de CYN pura, vía oral de forma subcrónica (90 días).	Los pesos absolutos y relativos en machos se incrementaron a todos los niveles de dosis. Caída importante de BUN en hembras tras la dosis de 150 µg/kg de CYN pura Parámetros séricos elevados en ambos sexos, excepto colesterol y triglicéridos. Cambios en túbulos corticales en machos, acompañado de inflamación epitelial. Se observó dilatación y basofilia de los túbulos. El grado de toxicidad renal mayor en machos que en hembras.	(Chernoff et al., 2018)

<i>C. raciborskii</i> y CYN pura	Ratones machos	Análisis del daño tubular renal Expresión de nefrina, proteínas urinarias (albúmina sérica) y enzimas tubulares LDH y GGT	→ Grupo control → 16, 32, 64 µg/kg de peso corporal de CYN pura Sacrificio a las 48h de exposición.	Se observó obstrucción parcial de la luz tubular. Aumento del espacio intersticial, así como un aumento del depósito de colágeno tras una dosis de 64 µg/kg de CYN, lo cual sugiere la posible aparición de fibrosis renal. No hubo cambios en la TFG, niveles de nefrina constantes (no afectación del glomérulo), sin embargo, se produjo un incremento en la excreción de proteínas urinarias, CYN podría interferir en el proceso de endocitosis. Función renal perjudicada debido a la acumulación de líquido intersticial. Modificación en niveles de LDH y GGT en el riñón.	(Moraes and Magalhães, 2018)
CYN pura	Ratas machos y hembras	Toxicidad oral, CYN en la dieta. Parámetros hematológicos: RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, PT, etc. Niveles de glucosa, urea, creatinina, bilirrubina, colesterol, AST, ALT, ALKP, ALB.	Dosis repetidas de 18,75, 37,5 y 75 µg/kg de peso corporal de CYN pura durante 28 días.	Disminución leve de la relación riñón/peso corporal en hembras expuestas a 18,75 µg/kg de CYN. Las ratas expuestas a la dosis más alta, presentaron cilindros hialinos finos en los túbulos proximales, aumento de la permeabilidad glomerular, degeneración de los túbulos renales con vacuolización y tinción citoplasmática. Disminución de BUN y colesterol. El riñón es el órgano más sensible a la cianotoxina.	(Díez- Quijada et al., 2021)

AAT: α 1-antitripsina. ALB: albúmina. ALP: fosfatasa alcalina. ALT: alanina amino transferasa. BUN: nitrógeno ureico en sangre. CAT: catalasa. GD: días de gestación. GGT: γ -glutamyl transferasa. GSH: glutatión reducido. HCT: hematocrito. HGB: hemoglobina. LDH: lactato deshidrogenasa. MCH: hemoglobina corpuscular media. MCV: volumen corpuscular medio. PT: protrombina. RBC: recuento de glóbulos rojos. SOD: superóxido dismutasa. TBAs: ácidos biliares totales.

4.3 DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios de nefrotoxicidad de CYN son más escasos que aquéllos realizados con otras cianotoxinas, como son las microcistinas (MC) según Shuaishuai et al., 2020.

Las microcistinas son las cianotoxinas más investigadas, mientras que la CYN, es una cianotoxina mucho más reciente, pero también de alto interés.

De entre los estudios que abordan la nefrotoxicidad de CYN, los que utilizan modelos experimentales *in vitro* son minoritarios (3) en comparación con los que utilizan modelos *in vivo* (25 en total, 10 en organismos acuáticos y 15 en mamíferos).

En los estudios *in vitro*, las líneas celulares renales utilizadas han sido las Vero y las HEK293. Los estudios *in vivo* localizados utilizan organismos acuáticos (10) y mamíferos (15). Los estudios *in vivo* no estaban centrados específicamente en el riñón, tratándose principalmente de ensayos de toxicidad general que incluyen al riñón entre los órganos a explorar. No obstante, de todos ellos se deduce que el riñón experimenta efectos tóxicos tras la exposición por distintas vías a CYN en sus diferentes formas (toxina pura, células de cianobacterias productoras, extractos, etc.)

De entre los efectos tóxicos observados destacan necrosis, nefropatías, cambios estructurales de las células tubulares, cambios en marcadores enzimáticos, etc.

Sin embargo, sería necesario profundizar más en los mecanismos de acción de estas cianotoxinas, y para ello realizar estudios adicionales en modelos experimentales *in vitro*, los cuales son escasos. También sería de interés conocer con más detalle las consecuencias de exposiciones prolongadas a dosis bajas de CYN pura, utilizando para ello modelos experimentales *in vivo*.

5. CONCLUSIONES

Tras llevar a cabo la presente revisión bibliográfica, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- I. Los efectos de CYN a nivel renal es un campo aún poco estudiado, y no se conocen en profundidad los mecanismos de acción tóxica implicados.
- II. Los estudios de nefrotoxicidad de CYN en modelos experimentales *in vitro*, son muy escasos.

III. Los cambios histopatológicos en los riñones son los principales resultados observados tras realizar distintos ensayos *in vivo*.

IV. La CYN puede inducir toxicidad renal independientemente de la vía de exposición (oral, i.p., inmersión).

Teniendo en cuenta investigaciones y perspectivas futuras, sería interesante incidir en estudios sobre mecanismos de acción responsables del daño inducido por la cianotoxina cilindrospermopsina, e indagar más sobre los efectos renales que pudiera ocasionar la exposición a la misma, así como estudiar cómo influye la CYN en el sistema renal, en distintos modelos experimentales.

6. BIBLIOGRAFÍA

Aranalde G, Mujica G, Agüero R, Velzi D. Fisiología Renal. 1º ed. Buenos Aires: Corpus; 2015.

Bazin E, Huet S, Jarry G, Hégarat L.Le, Munday JS, Humpage AR, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection. *Environ Toxicol.* 2012; 27(5): 277-84.

Bernard C, Harvey M, Briand JF, Biré R, Kryszewski S, Fontaine JJ. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ Toxicol.* 2003; 18(3): 176-86.

Bláha L, Babica P, Maršálek B. Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdisc Toxicol.* 2009; 2(2): 36-41.

Cameán AM, Moreno I, Jos A, Repetto G, Pichardo S, Prieto I. Cianobacterias y cianotoxinas: Necesidad de su control en el agua de consumo humano. *Rev Salud Ambient.* 2005; 5(2): 137-41.

Cartmell C, Evans DM, Elwood JML, Fituri HS, Murphy PJ, Caspari T, et al. Synthetic analogues of cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and their toxicological activity. *Toxicol in Vitro.* 2017; 44: 172-81.

Chernoff N, Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Malarkey DE, Bradfield CA, et al. Toxicity and recovery in the pregnant mouse after gestational exposure to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *J Appl Toxicol* 2011; 31(3): 242-54.

Chernoff N, Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Travlos GS, Malarkey DE, et al. The course of toxicity in the pregnant mouse after exposure to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin: Clinical effects, serum chemistries, hematology, and histopathology. *J Toxicol Environ Health Part A.* 2014; 77(17): 1040-60.

Chernoff N, Hill DJ, Chorus I, Diggs DL, Huang H, King D, et al. Cylindrospermopsin toxicity in mice following a 90-d oral exposure. *J Toxicol Environ Health Part A.* 2018; 81(3): 549-66.

Chorus I, Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E & FN Spon, London, New York. 1999.

Culrann H, Lys Ocyrn, Froscio S. (2002). Investigation of the mechanisms involved in cylindrospermopsin toxicity: Hepatocyte culture and reticulocyte lysate studies. (Tesis doctoral). Universidad de Adelaida.

De la cruz AA, Hiskia A, Kaloudis T, Chernoff N, Hill D, Antoniou MG. A review on cylindrospermopsin: The global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environ Sci.: Processes Impacts*. 2013; 15(11): 1979-03.

Díez-Quijada L, Gutiérrez-Praena D, Jos A, Cameán AM, Turkina VM et. al. Alteraciones proteómicas inducidas por la mezcla de cilindrospermopsina-microcistina-LR en células HEK293. Poster en Congreso. XXIII Congreso Español de Toxicología y VII Iberoamericano. Sevilla. 2019.

Díez-Quijada L, Moyano R, Molina-Hernández V, Cameán AM, Jos A. Evaluation of toxic effects induced by repeated exposure to Cylindrospermopsin in rats using a 28-day feeding study 2021; 151: 108-12.

Đorđević NB, Matic SL, Simić SB, Stanić SM, Mihailović VB, Stanković NM, et al. Impact of the toxicity of Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju on laboratory rats in vivo. *Environ Sci Pollut Res*. 2017; 24(14): 259-72.

Dussol B. Nefropatías glomerulares: orientación diagnóstica y evolución. *EMC Trat Med*. 2015; 19(4): 1-11.

Falconer IR, Humpage AR. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green Alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Adv Mat*. 2000; 1(5): 175-76.

Froschio SM., Cannon E, Lau HM, Humpage AR. Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by Vero cells. *Toxicon*. 2009a; 54(6): 862-68.

Froschio SM., Fanok S, Humpage AR. Cytotoxicity screening for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health Part A*. 2009b; 72: 345-49.

Gomi M. Recent advances of toxic cyanobacteria researches. *Chem Pharm Bull*. 1999; 45(3): 150-65.

Gonseth J, Martínez G. Propuesta de actuaciones ante la presencia de altas concentraciones de cianobacterias en aguas de baño. *Revista de Salud Ambiental*. 2005; 5(1): 98.

Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moyano R, Blanco A, Monterde JG, et al. Time-dependent histopathological changes induced in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012; 76(1): 102-13.

Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Puerto M, Cameán AM. Influence of the exposure way and the time of sacrifice on the effects induced by a single dose of pure Cylindrospermopsin on the activity and transcription of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase enzymes in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*. 2013; 90(3): 986-92.

Gutiérrez-Praena D, Risalde MA, Pichardo S, Jos A, Moyano R, Blanco A, et al. Histopathological and immunohistochemical analysis of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to cylindrospermopsin and the effectiveness of N-Acetylcysteine to prevent its toxic effects. *Toxicol*. 2014; 78: 18-34.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Vázquez CM, Vasconcelos VM, Cameán AM. The protective role of L-carnitine against cylindrospermopsin-induced oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat toxicol*. 2013a; 132: 141-50.

Guzmán-Guillén R, Gutiérrez-Praena D, Risalde MA, Moyano R, Prieto AI, Pichardo S, et al. Immunohistochemical approach to study cylindrospermopsin distribution in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different exposure conditions. *Toxins*. 2013b; 6(1): 283-303.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Vasconcelos VM, Cameán AM. Cyanobacterium producing cylindrospermopsin cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in subchronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*. 2013c; 90(3): 1184-94.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Moreno I, Ríos V, Vasconcelos VM, Cameán AM. Effects of depuration on oxidative biomarkers in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after subchronic exposure to cyanobacterium producing cylindrospermopsin. *Aquat Toxicol*. 2014; 149: 40-9.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Moreno I, Vasconcelos VM, Moyano R, Blanco A, et al. Cyanobacterium producing cylindrospermopsin cause histopathological changes at environmentally relevant concentrations in subchronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol*. 2015; 30(3): 261-77.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Moreno I, Ríos V, Moyano R, Blanco A, et al. Effects of depuration on histopathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to cylindrospermopsin. *Environ Toxicol*. 2017; 34(4): 1318-32.

Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol*. 2003; 18: 94-103.

- Kinnear S. *Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research*. Mar Drugs. 2010; 8: 542-64.
- Moraes ACN, Magalhães VF. Renal tubular damage caused by cylindrospermopsin (cyanotoxin) in mice. *Toxicol Lett*. 2018; 286: 89-95.
- Moreira C, Azevedo J, Antunes A, Vasconcelos V. *Cylindrospermopsin: Occurrence, methods of detection and toxicology*. J Appl Microbiol. 2013; 114: 605-620.
- Moscoso Gama JM, Mora Vega LA, Moreno Santos IP, Zambrano Fuentes LG. *Principales patologías del riñón*. 1º ed. Santa Fé: El Cid Editor; 2019.
- Msagati TAM, Siame BA, Shushu DD. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat Toxicol*. 2006; 78: 382-97.
- Ohtani I, Moore RE, Runnegar M. *Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the Blue-Green Alga Cylindrospermopsis raciborskii*. J AM Chem Soc. 1992; 114(20): 7941-42.
- Pichardo S, Cameán AM, Jos A. *In vitro toxicological assessment of cylindrospermopsin: A review*. Toxins. 2017; 9.
- Poniedziałek B, Rzymiski P, Kokociński M. *Cylindrospermopsin: Water-linked potential threat to human health in Europe*. Environ Toxicol. 2012; 34: 651-60.
- Rennke HG, Denker B. *Fisiopatología renal*. 4º ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2014.
- Ríos V, Guzmán-Guillén R, Moreno IM, Prieto AI, Puerto M, Jos A, et al. Influence of two depuration periods on the activity and transcription of antioxidant enzymes in tilapia exposed to repeated doses of Cylindrospermopsin under laboratory conditions. *Toxins* 2014; 6: 1062-79.
- Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Humpage AR, Falconer IR, Marr M, et al. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicol* 2007; 49: 855-64.
- Runnegar MT, Kong S-M, Zhong Y-Z, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 1995; 49(2): 219-25.
- Ryde W, Pharmacology E. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Science*. 1997; 35(3): 341-46.

Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR, Chiswell RK, Norris RL, Moore MR, et al. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environ Toxicol.* 1999; 14: 135-42.

Sedan D, Andrinolo D. Cianobacterias y cianotoxinas: Efectos en la salud humana. Casos informados y primeros acercamientos al estudio epidemiológico. *Cianobacterias Como Determinantes Ambientales de La Salud* 2011; 67-78.

Shuaishuai X, Xiping Yi, Wenya L, Chengcheng Z, Isaac YM, Fei Y, et al. A review of nephrotoxicity of microcystins. *Toxins.* 2020; 12(11): 1-27.

Sukenik A, Reisner M, Carmeli S, Werman M. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Long-term exposure to low doses. *Environ Toxicol.* 2006; 21: 575-82.

Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, et al. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon.* 1994; 32: 833-43.

Yang Y, Yu G, Chen Y, Jia N, Li R. Four decades of progress in cylindrospermopsin research: The ins and outs of a potent cyanotoxin. *J Hazard Mater.* 2021; 406: 124-653.

WHO (World Health Organization). Cyanobacterial toxins: cylindrospermopsins. *Pub Rev.* 2020; 2-16.

Wood, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. *Environ Int.* 2016; 91: 276-82.