

Universidad de Sevilla



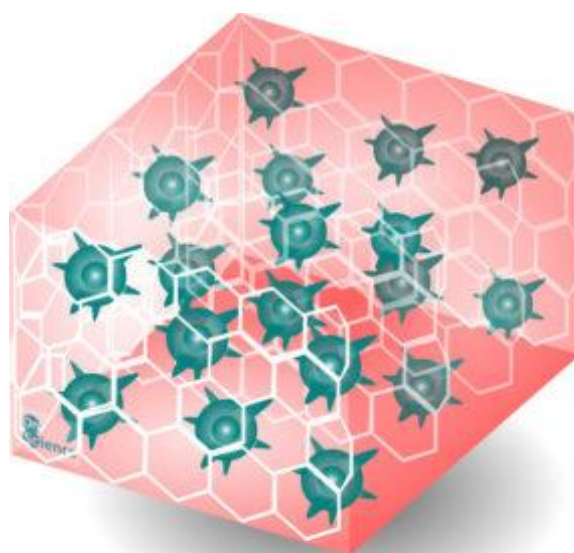
Facultad de Farmacia



MODELOS AVANZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA TOXICIDAD
IN VITRO Y SU APLICACIÓN A CIANOTOXINAS.

María de las Mercedes Recio Remón

Grado en Farmacia



Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia



Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

MODELOS AVANZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA TOXICIDAD
IN VITRO Y SU APLICACIÓN A CIANOTOXINAS.

María de las Mercedes Recio Remón.

Aula 0.2. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

4 de Julio 2022.

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Área de Toxicología

Tutoras:

Dra. Ana María Cameán Fernández

Dra. Leticia Diez-Quijada Jiménez

Trabajo de Revisión Bibliográfica

RESUMEN

Las cianotoxinas son toxinas producidas por diferentes especies de cianobacterias, cuya proliferación está aumentando en los últimos años como consecuencia del cambio climático, y diferentes factores ambientales y humanos. Por ello, el estudio de las mismas ha adquirido un mayor peso en la última década como consecuencia de los efectos perjudiciales que tienen tanto en el hombre como en el medioambiente. La necesidad de nuevas investigaciones que permitan dilucidar los rangos de toxicidad, los efectos y sus consecuencias hacen que el desarrollo y empleo de nuevos modelos *in vitro* sea cada vez necesario. Dichos modelos, nos permiten obtener resultados semejantes a lo que sucedería en el organismo humano, teniendo dichos estudios cada vez más peso, y por lo tanto siendo cada vez más utilizados. Por lo cual, en los últimos años se ha potenciado el uso de estos nuevos modelos para el estudio de la toxicidad *in vitro*, con el objetivo de obtener el máximo rendimiento y donde los esferoides y organoides se abren paso entre los modelos bidimensionales (2D). En consecuencia, la presente revisión tiene por objetivo recoger la información existente en la literatura científica acerca de los nuevos modelos tridimensionales (3D), en referencia a sus ventajas e inconvenientes, así como sus formas de obtención, con especial atención en los esferoides y organoides. Del mismo modo, se pretende recopilar y revisar la información disponible sobre los estudios realizados con cianotoxinas, y en concreto Microcistinas (MCs) y Cilindrospermopsina (CYN) mediante el empleo de modelos 3D. Los resultados obtenidos tras la realización de esta revisión, han mostrado que los modelos 3D ofrecen resultados más fiables y más precisos y cercanos a la realidad de lo que lo hacen los modelos 2D, siendo necesario el desarrollo de nuevos modelos, cada vez más optimizados y completos.

Palabras clave: Cianotoxinas, modelos celulares 3D, esferoides, organoides, Toxicología

ABSTRACT

Cyanotoxins are toxins produced by different species of cyanobacteria, whose proliferation is increasing in recent years as a result of climate change, and different environmental and human factors. For this reason, the study of them has acquired more importance in the last decade as a consequence of the detrimental effects they have both on man and on the environment. The need of new research that allows elucidating the ranges of toxicity, the effects and their consequences makes the development and use of new *in vitro* models increasingly necessary. These models allow us to obtain similar results to what would happen in the human body, these studies having more and more importance, and therefore being used more and more. Therefore, in recent years the use of these new models for the study of *in vitro* toxicity has been promoted, with the aim of obtaining maximum performance and where spheroids and organoids make their way between two-dimensional (2D) models. Consequently, this review aims to collect the existing information in the scientific literature about the new three-dimensional (3D) models, in reference to their advantages and disadvantages, as well as their methods of obtaining, with special attention to spheroids and organoids. In the same way, it is intended to collect and review the information available on the studies carried out with cyanotoxins, and specifically Microcystins (MCs) and Cylindrospermopsin (CYN) through the use of 3D models. The results obtained after carrying out this review have shown that 3D models offer more reliable and more precise results that are closer to reality than 2D models, making it necessary to develop new models that are increasingly optimized and complete.

Keywords: Cyanotoxins, 3D cell model, spheroids, organoids, Toxicology.

ÍNDICE

1. Índice de Figuras y Tablas.....	1
2. Índice de abreviaturas.....	2
3. Introducción.....	4
3.1. Cultivos 3D.....	5
3.2. Esferoides.....	8
3.3. Organoides.....	10
3.4. Cianotoxinas.....	12
4. Objetivos de la revisión.....	16
5. Metodología.....	16
6. Resultados y discusión.....	17
7. Conclusiones.....	29
8. Bibliografía.....	30

1. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Organoides tisulares.....	10
Figura 2. Organoides de células madre.....	11
Figura 3. Estructura general de las MCs.....	13
Figura 4. Estructura general de la CYN.....	16
Figura 5. Histograma de frecuencias de los artículos encontrados clasificados por años.....	17
Tabla 1. Resumen de los estudios realizados sobre la toxicidad de las MCs y CYN mediante el empleo de modelos <i>in vitro</i>	18
Tabla 2. Resumen de los estudios realizados sobre la toxicidad de Noc A y PAB mediante el empleo de modelos <i>in vitro</i>	26

2. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AB: Azul alamar.

BCL: Linfoma de células B.

BMAA: β -metilamino-L-alanina.

CFDA-AM: Éster acetoximetílico de diacetato de 5-carboxifluoresceína.

CYN: Cilindropermopsina.

CYP450: Citocromo P-450.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DSB's: Rotura de la doble cadena.

ECM: Célula-matriz extracelular.

ELISA: Enzimoimmunoanálisis de adsorción.

EMC: Esferoides multicelulares.

FDA: Food and Drugs Administration.

HCC: Carcinoma hepatocelular.

HCT: Carcinoma de colon humano.

HDP: Placas colgantes.

HepG2: Células de carcinoma hepatocelular humano.

HIF: Factor inducible por hipoxia.

HL1-1: Células madre de hígado humano adulto.

hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa humana.

ICC: Inmunocitoquímica.

LSC: Célula madre hepática.

LSD: Células madre hepáticas adultas humanas.

MAPK: Proteína Quinasa activada por mitógenos.

MCF: Carcinoma de mama humano.

MCs: Microcistinas.

MC-LR: Microcistina-LR.

MC-RR: Microcistina-RR.

MDR: Proteínas resistentes a múltiples fármacos.

MEC: Matriz extracelular.

MTS: Sal de Tetrazolio.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NocA: Nocuolina A.

NR: Rojo neutro.

Nrf2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2.

OATP: Sistema de transportadores de aniones orgánicos.

OATP1B1: Sistema de transportadores de aniones orgánicos tipo 1B1.

OATP1B3: Sistema de transportadores de aniones orgánicos tipo 1B3.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAB: Portoamidas A y B.

PP: Proteínas serina/treonina.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RC: Respiración celular.

TRME: Éster etílico de tetrametil-rodamina.

WB: Transferencia Western.

2D: Dos dimensiones/bidimensional.

3D: Tres dimensiones/tridimensional.

3. INTRODUCCIÓN

Los modelos animales, en particular los roedores, han sido utilizados a lo largo de la historia con fines científicos en investigación clásica al tener estructuras fisiológicas similares a las del hombre, lo cual permitía conocer el funcionamiento de los sistemas orgánicos, por las similitudes entre los sistemas fisiológicos de diferentes especies animales y el ser humano (Rodríguez, 2007). Sin embargo, recientemente la consideración de los aspectos éticos de la investigación, su limitación en cuanto a viabilidad y su elevado coste han delimitado su uso (Saglam-Metiner et al., 2019; Weinhart et al., 2019).

Existen otros motivos que limitan su uso ya que, a pesar de la eficacia y seguridad de los estudios preclínicos, se han demostrado algunos de sus inconvenientes (Weinhart et al., 2019). Entre las posibles razones podríamos destacar la caracterización de los modelos relevantes, es decir, las diferencias interespecies relacionadas con los humanos tales como la anatomía, patología (fisiología) e inmunología (Weinhart et al., 2019). Como consecuencia de la falta de concordancia y los problemas de reproducibilidad, el papel del uso de modelos animales preclínicos ha sido cuestionado (Weinhart et al., 2019).

Con el objetivo de solventar estos problemas éticos, las técnicas convencionales de cultivo celular *in vitro* en dos dimensiones (2D) se han convertido en importantes herramientas para el estudio de fármacos y enfermedades de acuerdo con el principio de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) descrito por Russell y Burch en 1959 (Saglam-Metiner et al., 2019).

Actualmente, se puede comprobar que existe todavía un gran camino por recorrer, ya que aún no se han dejado de utilizar los animales en experimentación, al ser necesarios para la evaluación de diferentes sustancias siguiendo protocolos internacionales de experimentación, como los existentes en la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OECD) (<https://www.oecd.org/>).

No obstante, los sistemas de cultivo 2D formados en placas de cultivo tisular se emplean en numerosas ocasiones para el estudio de fármacos *in vitro*, así como sus aplicaciones, al tener bajo coste y ser fácilmente controlables (Saglam-Metiner et al., 2019). Por el contrario, los sistemas 2D no tienen las características de los sistemas tridimensionales (3D) que hace que sea más difícil hacer aproximaciones a la realidad. Por tanto, el mayor problema presentado por los cultivos convencionales en 2D es la ausencia de matriz extracelular (MEC), la cual es la encargada de la comunicación entre las células formadoras de la matriz que participa directamente en las propiedades

mecánicas de los tejidos. Además, hay que tener en cuenta que también tienen diferente crecimiento celular *in vivo* puesto que no migran en respuesta a cambios y señales bioquímicas (Saglam-Metiner et al., 2019).

En el caso de los medicamentos recientemente desarrollados, pocos son aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para su administración, ya que está directamente relacionado con los resultados que se obtienen de los ensayos *in vitro* e *in vivo* dentro de los ensayos preclínicos, ya que los cultivos 2D no reflejan la complejidad estructural de la célula ni la variedad celular, lo cual limita su relevancia fisiológica (Saglam-Metiner et al., 2019).

Avances recientes en biología celular, técnicas de microfabricación, bioingeniería y desarrollo de tejidos han contribuido al desarrollo de los sistemas de cultivos celulares 3D, lo que ha permitido abrir un nuevo camino de exploración científica (Saglam-Metiner et al., 2019). Los cultivos 3D proporcionan condiciones más favorables a nivel fisiológico, anatómico y estructural de los tejidos, las cuales están más próximas a las condiciones *in vivo* (Saglam-Metiner et al., 2019). Además, estos sistemas permiten reproducir las condiciones genéticas y microambientales de la MEC, con más exactitud, aportando resultados *in vitro* más fiables y cercanos a la realidad, lo cual ha hecho que sean potenciales sustitutos de los modelos celulares 2D (Saglam-Metiner et al., 2019).

A lo largo de las últimas dos décadas, los modelos *in vitro* han evolucionado y han perseguido tener un mayor rendimiento para la evaluación de la toxicidad (Nieskens & Sjögren, 2019). Con objeto de llegar a un cambio de paradigma en la predicción de la toxicidad, dos pilares han resultado fundamentales: la búsqueda de un mayor reflejo de la realidad fisiológica y el establecimiento de puntos de toxicidad apropiados donde centrar el estudio. Estos últimos, son establecidos mediante computación junto con la aplicación de nuevos biomarcadores de los modelos de cultivo que permiten aumentar la sensibilidad y relevancia clínica en la predicción de la toxicidad inducida *in vitro* (Nieskens & Sjögren, 2019).

3.1.CULTIVOS 3D.

Por norma general, las células madre tienen la cualidad de cultivarse con relativa facilidad. Sin embargo, los métodos de cultivo de células madre más empleados eran los cultivos 2D, ya que permitían la obtención de grandes cantidades de células para la investigación. Estos cultivos no son un buen reflejo de las células madre en el organismo, que son microambientes que están compuestos, además de células madre, de células

estromales de apoyo, MEC y factores de crecimiento. Del mismo modo, muchas propiedades beneficiosas de las células madre pueden disminuir o incluso desaparecer en estos cultivos 2D (Ylostalo, 2020). Por lo tanto, dado que las células se comportan estructural y funcionalmente de forma diferente al sembrarse en sustratos 2D que en gruesos sustratos 3D, los investigadores han estado buscando preparaciones óptimas de células madre para aplicaciones clínicas que reflejaran con mayor fidelidad lo que ocurre *in vivo*, lo cual llevó al desarrollo del cultivo 3D de células madre. Estos cultivos son ambientes creados artificialmente en el cual, las células biológicas crecen e interactúan con un entorno en 3D (Ylostalo, 2020).

Los modelos de órganos 3D se han ido posicionando cada vez con más importancia como nuevos sistemas para la realización de pruebas preclínicas y alternativas a pruebas animales, ya que a lo largo de los años se han desarrollado muchos modelos de tejidos *in vitro* (Weinhart et al., 2019).

Los cultivos 3D proporcionan interacciones más completas, ya que reproducen las interacciones que se dan *in vivo* entre las células y entre la matriz de forma más acorde a las interacciones reales; así pues, aportan muchas características únicas y deseables. Por otro lado, el cultivo de células madre en este tipo de cultivo, puede emplear varias matrices, además de las células, para soportar las estructuras complejas (Ylostalo, 2020).

Dentro de los cultivos 3D, uno de los primeros en desarrollarse fue el cultivo de explantes, el cual consiste en el cultivo de un fragmento de tejido extraído de un ser vivo en un medio artificial de crecimiento, formados por geles o membranas semipermeables mediante la adición de solución isotónica o medio nutritivo que permite preservar la estructura celular y tisular inicial (Caleffi et al., 2021).

Otros sistemas, que cada vez están teniendo una mayor importancia en investigación y desarrollo en los últimos tiempos han sido: andamios, bioimpresión 3D, órganos en chips, esferoides y organoides (Saglam-Metiner et al., 2019).

En el estudio de los sistemas 3D existen dos esquemas generales a seguir (Saglam-Metiner et al., 2019; Caleffi et al., 2021).

- ❖ “De arriba hacia abajo” o con andamios previamente preparados de origen orgánico e inorgánico en función del objetivo de estudio. Los andamios son estructuras porosas 3D compuestas por biomateriales que favorecen el intercambio de gases, el suministro de nutrientes y los factores de crecimiento pudiendo asimismo ser empleados para

vehiculizar sustancias en diferentes terapias (Saglam-Metiner et al., 2019; Caleffi et al., 2021).

Los más utilizados son los hidrogeles, derivados de polímeros naturales o sintéticos, que su principal característica es la capacidad de formar agregados celulares aislados que crecen dentro del propio gel siendo útil para determinados tipos de ensayos (Saglam-Metiner et al., 2019; Caleffi et al., 2021).

Los andamios sólidos, por el contrario, tienen la ventaja de poder soportar fuerzas mecánicas y la posibilidad de ser diseñados y elaborados en base a las necesidades del microambiente requerido para el estudio, lo cual favorece que las condiciones de reproducibilidad sean más próximas a la realidad. A pesar de las ventajas de los andamios sólidos, es cierto que tienen ciertas limitaciones ya que requieren de suturas para su trasplante al huésped (Saglam-Metiner et al., 2019; Caleffi et al., 2021).

- ❖ “De abajo hacia arriba” o sin andamios, donde las células individuales se utilizan como bloques de construcción, basándose en dos características fundamentales de las células que son: la capacidad de autoorganización y la de autoensamblaje sin influencias externas (Saglam-Metiner et al., 2019; Caleffi et al., 2021).

Dentro de esta línea de construcción 3D encontramos a su vez tres técnicas:

1. La técnica de lámina celular que está basada en la diferencia de temperatura controlada con una placa termosensible, para así controlar la adhesión por la hidrofobicidad superficial que permite la implantación directa al huésped, sin andamios, preservando las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (ECM), haciendo esto que se parezca más a las interacciones que se dan en la realidad (Caleffi et al., 2021).

2. Los matraces colgantes, que dispensan una gota de suspensión celular en una placa de Petri, donde las células cuelgan debidos a la tensión superficial y se agregan espontáneamente. Sin embargo, la principal desventaja de estos es la laboriosidad del proceso y la necesidad de tejido de calidad disponible para realizar el ensayo (Caleffi et al., 2021).

3. Los matraces giratorios, los cuales, son más empleados a gran escala donde las células se cultivan como agregados multicelulares en una suspensión agitada, esto permite garantizar la oxigenación, así como el aporte y distribución de nutrientes (Caleffi et al., 2021).

Al hablar de cultivos 3D, los más estudiados han sido los esferoides y los organoides que si bien a primera vista son términos que suelen ir asociados como si fueran sinónimos, no lo son en realidad (Caleffi et al., 2021).

En el caso de un organoide, hay una asociación entre al menos varios tipos de células epiteliales y mesenquimales que representan, por tanto, varios tejidos que conforman un órgano, por ejemplo, mini-pulmones (Caleffi et al., 2021). Por otro lado, el término esferoide se asocia al uso de múltiples células caracterizadas por ser células adherentes que pertenecen a solo un tipo de células epiteliales que se adhieren para formar un único tejido, por ejemplo, el muscular y esferoides tumorales (Caleffi et al., 2021).

3.2.ESFEROIDES.

Los esferoides son agregados celulares esféricos heterogéneos autoorganizados de 400 a 500 μm , que se crean a través de la producción de una suspensión o monocapa de un tipo de células que permiten crear la estructura y función de un tejido 3D (Saglam-Metiner et al., 2019).

A pesar del creciente uso de los esferoides celulares en ingeniería tisular para la regeneración de los tejidos y órganos, lo cual ha permitido la extrapolación de sus funciones hasta el cribado de alto rendimiento, en farmacología y toxicología presentan ciertas dificultades, las cuales suponen desafíos clínicos, entre los que se incluyen la heterogeneidad celular, la baja estabilidad estructural y la diferenciación celular incontrolada (Kim et al., 2022).

Entre las ventajas principales de los esferoides se encuentran la capacidad de proporcionar un entorno 3D con contacto estrecho entre las células, y gracias a sus propiedades regenerativas, la rapidez en su proceso de producción y el alto rendimiento que presentan hacen que se posicionen como componentes básicos en ingeniería tisular (Laschke & Menger, 2017). Los esferoides se han terminado convirtiendo en bloques de construcción altamente llamativos para la ingeniería tisular, ya que los avances más recientes permiten las producciones automatizadas de alto rendimiento y la posibilidad de fusión para la generación de macrotejidos más grandes siendo igualmente factibles (Laschke & Menger, 2017). Gracias a ello y debido a las técnicas de preacondicionamiento *in vitro*, y los sistemas de cocultivo, se ha conseguido la mejora de las funciones de los esferoides, de sus propiedades, así como sus aplicaciones. Con todo esto se ha visto mejorada la capacidad regenerativa (Laschke & Menger, 2017).

Los sistemas esferoides tienen ventajas debido a la geometría y el uso de protocolos bien definidos, la capacidad de cocultivo, la sostenibilidad a largo plazo, las interacciones fisiológicas célula-célula y ECM, la reproducibilidad, la similitud de expresión de genes y proteínas y también imitando los modelos *in vivo* (Saglam-Metiner et al., 2019).

El primer modelo esferoide fue creado en 1970 y a partir de entonces, se han desarrollado diferentes tipos de modelos basados en células enfermas y sanas. Existen, 3 modelos para la creación de esferoides (Saglam-Metiner et al., 2019):

1. Mediante la utilización de placas colgantes (HDP). Este método se basa en agregar gotas de suspensiones celulares en un medio de baja densidad, lo cual genera una suspensión viscosa donde las células terminan por unirse entre sí de forma natural (Rodríguez Pereira et al., 2020.).
2. Mediante el uso de biorreactores. Estos son utilizados para el cultivo de explantes que se basan en la tendencia natural de las células para agregarse. En este caso la agregación celular se consigue por efecto gravitatorio (Meseguer et al., 2020.).
3. Placas de baja adherencia. Mediante el uso de polímeros sintéticos que son biocompatibles con las estructuras que forman las membranas celulares, como consecuencia, no se adhieren con alta fuerza a la superficie de la placa (Meseguer et al., 2020.).

Además, la vida se desarrolla en 3D, por lo tanto, las relaciones celulares que existen en el organismo son tridimensionales. Es por ello, que los modelos de estudios en 3D son capaces de dar resultados más próximos a la realidad. Esto hace que los posteriores estudios *in vivo* que se realicen tengan la posibilidad de tener mayores tasas de éxito (Laschke & Menger, 2017). Por el contrario, en anteriores estudios donde se utilizaban modelos de estudios 2D, la interacción de las células crecidas establece una relación más superficial, lo que supone una comparación más próxima al cultivo de células en una placa de Petri que a las células en el organismo, es decir, se asemejan más al comportamiento que se da en ensayos *in vitro* realizados en placa de Petri que a lo que realmente podría suceder en el organismo en condiciones normales. Por ello, los modelos de cultivo 3D permiten reflejar con mayor exactitud lo que realmente ocurre en el organismo (Laschke & Menger, 2017).

El desarrollo de estos puntos de vista acerca de los esferoides puede hacer que se abra camino a la producción estandarizada, lo que permita la utilización de sustitutos de

tejidos o llegar a la implantación de órganos completos gracias a los avances en el campo y al desarrollo de todas las técnicas (Laschke & Menger, 2017).

3.3.ORGANOIDES

Los organoides son cultivos de tejidos 3D autoorganizados derivados de células madre que sirven como representaciones miniaturizadas de órganos del cuerpo humano, gracias a la presencia de múltiples tipos de células específicas del órgano al que imitan organizándose de forma similar a como lo hacen las células de nuestro cuerpo en dicho órgano, y cumpliendo las mismas funciones que los órganos específicos (Van Berlo et al., 2021).

Los organoides se caracterizan por ser técnicas de cultivo para el crecimiento de células 3D que son específicas de la persona, con células madre o tejidos genómicamente definidos con capacidad de autoorganizarse, permitiendo recrear la microanatomía *in vivo* (Saglam-Metiner et al., 2019). De este modo, quedan representadas la complejidad y estructuras naturales, que además son modelos cuyo papel a lo largo de los últimos años se ha ido afianzando (Saglam-Metiner et al., 2019).

Por lo común, se estudian organizados en dos grupos. Por un lado, los organoides tisulares y por el otro, los de células madre.

Los organoides tisulares son cultivos mesenquimales de células epiteliales sin células estromales y MEC, células adultas multipotentes que presentan morfología similar a los fibroblastos y con plasticidad hacia diversas líneas celulares diferentes (condrocitos, osteocitos, etc). En éstos el órgano que servirá de base para el crecimiento del cultivo es el órgano cebador que se separa en fragmentos de tejidos y se cultiva con una estructura de matriz (Saglam-Metiner et al., 2019).

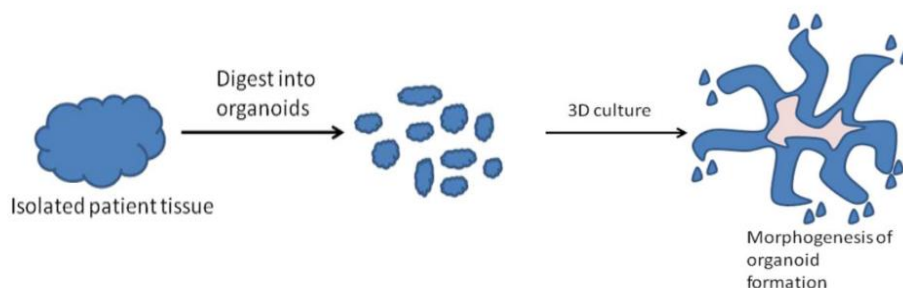


Figura 1: Organoides tisulares. Imagen tomada de Saglam-Metiner et al., (2019).

Por otro lado, encontramos los organoides de células madre, los cuales crecen a partir de células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas o células madre adultas restringidas a los órganos que queremos sintetizar (Saglam-Metiner et al., 2019).

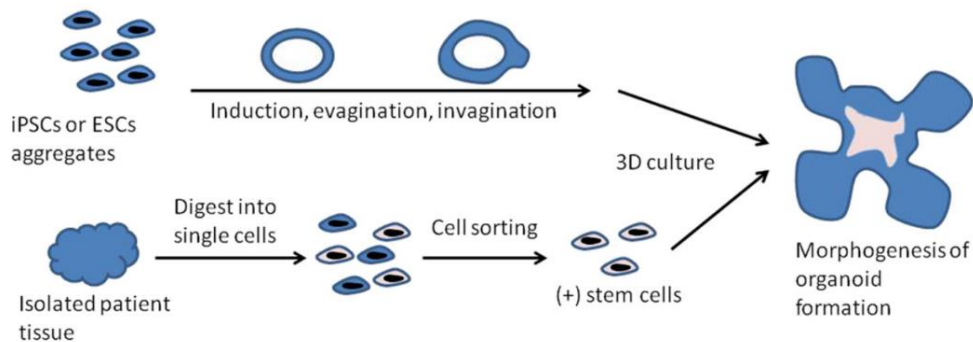


Figura 2: Organoides de células madre. Imagen tomada de Saglam-Metiner et al., (2019).

Por añadidura de que pueden ser producidos a partir de múltiples materias primas, el fenotipo y cariotipo de los organoides se mantienen estables. Es por lo que esta estructura ha pasado a ser un modelo valioso para el estudio de la biología de células madre, la organogénesis, la patología humana, etc. Además, la especificidad genética del órgano de la persona, la capacidad de asemejar a la complejidad y estructura *in vivo*, así como la posibilidad de realización de pruebas a largo plazo son las ventajas que los hacen tan importantes (Saglam-Metiner et al., 2019).

En contraposición, encontramos ciertas desventajas como son: problemas éticos (principalmente asociados al empleo de células madre embrionarias), el factor económico y el factor tiempo (debidos a la lentitud en el desarrollo); la limitación de vida media; la dificultad para alcanzar la madurez *in vivo*, así como las dificultades en las técnicas disponibles para resolverlos, jugando todo ello en su contra (Saglam-Metiner et al., 2019).

Así como los esferoides tienen una vida relativamente larga, en el caso de los organoides no fue hasta el 2006 cuando se creó el primer organoide. Se trataba de un organoide hepático creado a base del reclutamiento de hepatocitos en estructuras vasculares endoteliales cultivado en un Matrigel (Van Berlo et al., 2021).

Este modelo tuvo una gran ventaja frente a los “gold standard” (que hasta la fecha habían sido los esferoides) para el estudio de investigaciones *in vitro* del hígado, los hepatocitos primarios cultivados, y es que estos organoides ofrecían la posibilidad de ser cultivados durante más de dos meses con actividad citocromo-P-450 (CYP450) (Lou & Leung, 2018).

3.4.CIANOTOXINAS

Las cianobacterias son un grupo de antiguos microorganismos fotosintéticos que están presentes en todas partes y que se caracterizan por la producción de metabolitos secundarios que tienen aplicaciones generalizadas (Sousa et al., 2020).

Las cianotoxinas, son los metabolitos secundarios tóxicos producidos por las cianobacterias, y abarcan una amplia gama de compuestos, que incluye péptidos cíclicos y alcaloides, que pueden ser hepatotóxicos, citotóxicos, genotóxicos o neurotóxicos (Kaloudis et al., 2022). Son microorganismos muy versátiles, ya que se han desarrollado pudiendo adaptarse a las diferentes condiciones de los entornos que habitan (Sousa et al., 2019).

Se clasifican de modo general según su mecanismo de acción y su estructura química. En función de su objetivo toxicológico, es decir, según el órgano o sistema en el cual ejercen su toxicidad, se pueden clasificar en 4 grupos (Sanseverino et al., 2017.):

- Hepatotoxinas: Microcistinas y Nodularina.
- Citotoxinas: Cilindrospermopsina.
- Neurotoxinas: Anatoxinas, Saxitoxinas, β -metilamino-L-alanina (BMAA).
- Dermatotoxinas: Lipopolisacárido, Lingbiatoxinas, Aplisiatoxina.

En función de su estructura química, se clasifican en tres grupos (Sanseverino et al., 2017):

- Péptidos cíclicos: Microcistinas y Nodularina.
- Compuestos heterocíclicos (alcaloides): Cilindrospermopsina, Anatoxina, Saxitoxina, Lingbiatoxinas, Aplisiatoxina.
- Compuestos lipídicos: Lipopolisacáridos.

Su capacidad para producir metabolitos secundarios ha hecho que se reconozcan interesantes aplicaciones a nivel biotecnológico como los bioplásticos, productos farmacéuticos, anticancerígenos, antibióticos o antiprotozoarios, entre otras (Sousa et al., 2019). Sin embargo, las cianotoxinas pueden causar efectos tóxicos tanto en el hombre como en el medio ambiente (Díez-Quijada et al., 2019a).

Entre las cianotoxinas descritas hasta la fecha, vamos a centrarnos en las Microcistinas (MCs) y la Cilindrospermopsina (CYN).

Las MCs son el grupo mejor descrito y diverso de cianotoxinas, representando uno de los grupos más peligrosos de hepatotoxinas a nivel medioambiental (Raska et al., 2018; Díez-Quijada et al., 2019b). Las MCs pueden ser producidas por diferentes géneros

de cianobacterias como *Microcystis*, *Planktothrix* y *Dolichospermum*, entre otras (Catherine et al., 2017). En su mayoría son intracelulares, pero es posible que estén presentes extracelularmente como consecuencia de la lisis de las floraciones de cianobacterias (Díez-Quijada et al., 2019a).

El número de variantes de MCs ha aumentado en los últimos años, aunque se ha demostrado que algunas de estas variantes minoritarias tienen actividades diferentes, no obstante, la información que se tiene de ellas aún es escasa (Raška et al., 2019). Dentro de las MCs, MC-LR y MC-RR son de los congéneres más investigadas, siendo MC-LR la variante más frecuentemente reportada, altamente peligrosa y ampliamente estudiada en el ámbito toxicológico principalmente (Raska et al., 2018).

En relación con su estructura, las MCs son heptapéptidos cíclicos con la siguiente estructura: D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda-Arg⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷, donde X y Z son los aminoácidos variables, D-MeAsp es el ácido D-eritro-β-metilaspártico, Adda es el ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2-6-8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico y Mdha es N-metildehidroalanina. Cabe destacar que el ciclo Adda es único para cianobacterias (Díez-Quijada, 2019b). Los residuos de L-amino ácidos en las posiciones 2 (X) y 4 (Z) son los que permiten la aparición de las diferentes variantes de MCs (Díez-Quijada et al., 2019b).

En el caso de MC-LR, tiene un residuo de Leucina (L) y Arginina (R) en las posiciones 2 y 4, respectivamente, siendo el congénere más estudiado, debido a su toxicidad, ubicuidad y prevalencia (Díez-Quijada et al., 2019b). Sin embargo, en función de los aminoácidos presentes en las posiciones 2 y 4, la toxicidad de las MCs puede diferir, tal y como es el caso de otros congéneres minoritarios de MCs que han mostrado tener un perfil toxicocinético y toxicodinámico diferente (Díez-Quijada et al., 2019b).

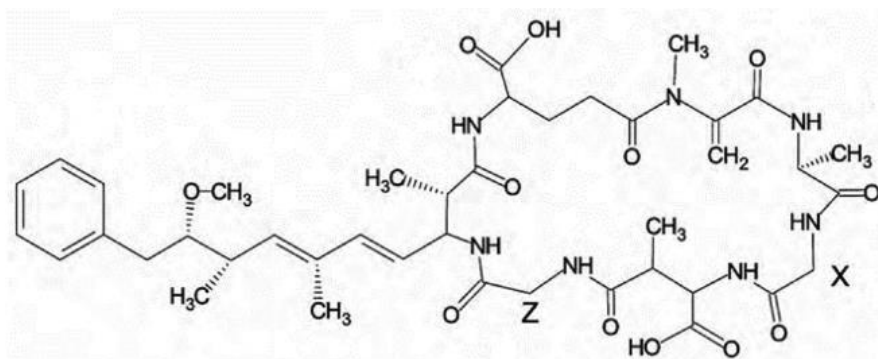


Figura 3: Estructura general de MCs. Tomada de Díez-Quijada et al., (2019a).

La toxicidad de las MCs se produce por su captación por un sistema de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos multiespecíficos (OATPs), este sistema de transporte se expresa en diferentes tejidos, lo cual hace que se haya observado toxicidad por estas cianotoxinas en diferentes órganos y no solo a nivel hepático (Raska et al., 2018).

En relación a su mecanismo de acción, se sabe que las MCs inhiben a las fosfatasa de proteínas serina/treonina (PP), y especialmente PP1 y PP2A mediante enlace covalente (Díez-Quijada et al., 2019b).

La alta proliferación de MCs tanto en agua dulce como en agua salada se ven aumentadas y favorecidas con el cambio climático y a las actividades antropogénicas. Como consecuencia de ello, se detectan comúnmente en ecosistemas acuáticos, contaminando aguas recreativas, aguas potables para consumo doméstico y por extensión puede derivar en la contaminación de alimentos irrigados o regados con estas aguas (Raska et al., 2018). La intoxicación por altas dosis de MCs se manifiesta en el hígado principalmente, a través de hemorragias hepáticas, shock hemorrágico, pudiendo desembocar en la muerte, mientras que, las exposiciones crónicas derivan en tumores. Esto ha hecho que las MCs formen parte de un grupo de hepatotoxinas ambientales altamente relevantes, que, por su peligrosidad, han sido altamente estudiadas (Raska et al., 2018). Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido el valor guía en su última revisión para agua de consumo humano en 1,0 µg/L para MC-LR (OMS 2020), sin embargo, no se han definido valores de orientación específicos para otros congéneres. El valor de referencia es provisional, ya que se refiere únicamente a la MC-LR, la base de datos es limitada, y se están generando datos nuevos sobre la toxicidad de las cianotoxinas (OMS 2020).

En el caso de CYN, se trata de una cianotoxina que como consecuencia del cambio climático y al enriquecimiento de nutrientes en el agua, está en aumento dado que puede ser producida por diferentes especies de cianobacterias como *Anabaena sp.*, *Aphanizomenon sp.*, *Chrisosporum ovalisporum*, *Rhaphisiopsis raciborskii*, *Lyngbya wollei* etc.(Hercog et al., 2020). A pesar de que sus productores son especialmente nativos de zonas subtropicales, es cierto que se han desplazado a zonas más templadas detectándose en regiones de América del Norte y Europa, en aguas interiores y embalses para el suministro de agua lo que implica que se han desplazado a aguas más templadas y puede suponer un riesgo para la salud humana (Hercog et al., 2020).

Los seres humanos pueden exponerse a las CYN por exposición cutánea y por inhalación principalmente, aunque es la vía oral la que destaca por excelencia, ya sea por deglución accidental o por la ingestión de agua potable contaminada, pudiendo ocurrir, al igual que en el caso de las MCs, con el empleo de estas aguas para uso profesional, recreativo o doméstico (Hercog et al., 2020).

La CYN es un alcaloide tricíclico que está formada por una guanidina tricíclica unida a un grupo hidroximetiluracilo (Pichardo et al., 2017). La presencia del grupo hidroxipuracilo unido a su esqueleto carbonado tricíclico, llevó a los investigadores a sugerir una posible interacción con los ácidos nucleicos (Raška et al., 2019; Hercog et al., 2020).

Aunque los órganos diana de la toxicidad por MCs y por CYN son el hígado y el riñón, en el caso de CYN, muchos otros pueden verse afectados, de ahí su clasificación como citotoxina. Entre los mecanismos de acción tóxica de CYN se encuentran la inhibición de la síntesis de proteínas y glutatión, así como la inducción de estrés oxidativo y capacidad genotóxica (Hercog et al., 2020). La inhibición en la síntesis de glutatión produce la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la peroxidación lipídica (Hercog et al., 2020).

En cuanto a su capacidad genotóxica, se ha mostrado que causa efectos genotóxicos en sistemas metabólicamente activos lo que significa que se requiere activación metabólica al ser pro-genotóxico, por acción del CYP450, para que se produzcan los efectos genotóxicos y citotóxicos, aunque dicha vía metabólica sigue sin estar clara. Esta actividad genotóxica, termina produciendo roturas del ADN y daño cromosómico (Hercog et al., 2020). Las enzimas del CYP450 son hemoproteínas encargadas de procesos de desintoxicación de xenobióticos, participan en el metabolismo celular y homeostasis. Por ello la inducción o inhibición de las enzimas del CYP450 es fundamental para el metabolismo de compuestos químicos externos (fármacos, toxinas...) o sustratos endógenos. Estas enzimas pueden ser activadas transcripcionalmente través de mecanismos mediados por receptores y dando como resultado la biotransformación de determinados compuestos que puede resultar en la bioactivación de compuestos químicos ambientales en productos potencialmente cancerígenos (Hercog et al., 2020). Sin embargo, ni la OMS ni el Codex Alimentarius hacen mención sobre las CYN y sus valores admisibles en agua.

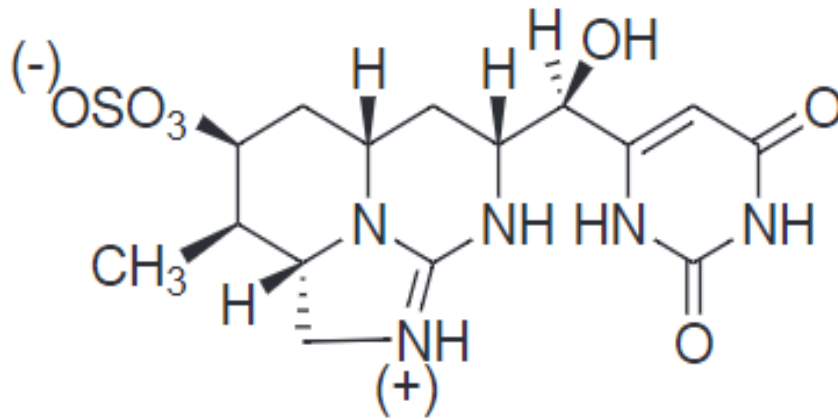


Figura 4: Estructura general de la CYN. Tomada de Nyoni et al., (2017).

4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido llevar a cabo una revisión bibliográfica en la que se recopile y revise la información disponible en la literatura científica sobre los modelos *in vitro* desarrollados hasta la fecha para la evaluación de la toxicidad de diferentes sustancias, y en concreto la aplicación específica de dichos modelos al estudio de la toxicidad de las cianotoxinas, al ser la información disponible sobre su toxicidad es escasa. Es por ello que los objetivos perseguidos en la presente revisión se centran en:

- Estudio de los modelos avanzados para la evaluación de la toxicidad *in vitro*.
Aplicación de los modelos avanzados al estudio de la toxicidad *in vitro* de las cianotoxinas.

5. METODOLOGÍA

Se han empleado diferentes bases de datos científicas como fuentes de información para la redacción de la presente revisión bibliográfica, entre las cuales encontramos Science Direct, PubMed y Google Académico.

Las palabras claves utilizadas para la búsqueda de información bibliográfica fueron: “3D cell model”, “spheroids”, “stem cells”, “organoids”, “toxicology”, “cyanotoxins”, “cylindrospermopsin”, “microcystins”.

La búsqueda bibliográfica se ha limitado a una ventana de años que abarca desde 2017 al 2022, ya que así se asegura la novedad de la información aquí recopilada, así como su actualidad en el ámbito de la detección de la toxicidad de determinadas

sustancias *in vitro*. La referencia más antigua es Chuah & Zink, (2017) y la más actual Kaloudis et al., (2022).



Figura 5: Histograma de frecuencias de los artículos encontrados clasificados por años.

Por otro lado, ha sido fundamental el empleo de páginas web de referencia, como lo son OMS y FDA, las cuales han sido consultadas con objeto de determinar valores estipulados como límites permitidos en diferentes medios. Estas son referenciadas a lo largo de la revisión y recogidas en la bibliografía.

Así mismo la traducción de los artículos empleados y citados ha sido hecha basándome en mis propios conocimientos del idioma, no obstante, se ha empleado el diccionario WordReference como apoyo. Además de lo ya mencionado, los tutores han sido pieza clave para la consulta de dudas, así como para la interpretación de los artículos empleados para elaborar la presente revisión acerca del estudio de los nuevos modelos para estudios *in vitro*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A continuación, nos vamos a centrar en el análisis y discusión de los estudios realizados para la determinación y descripción de la toxicidad *in vitro* de MCs y CYN, así como los modelos empleados para dicho fin.

Tabla 1: Tabla resumen de los estudios realizados sobre la toxicidad de MCs y CYN *in vitro*.

Toxina	Modelo experimental	Ensayos realizados	Rango de concentraciones y condiciones de exposición	Principales resultados	Referencia
Estándar puro CYN y MC-LR.	Modelo de esferoides 3D de la línea celular HL1-hT1, obtenida por inmortalización con hTERT de HL1-1	Ensayos en monocapa, esferoides pequeños (250 células/ esferoide) y grandes (4000 células/ esferoide) de viabilidad y crecimiento celular por medición en tiempo real de la impedancia celular. Además, se ensayó la viabilidad también por combinación de ensayos metabólicos tradicionales que evalúan la RC y actividad deshidrogenasa, esterasa e integridad de la membrana.	Se ensayaron concentraciones de exposición por debajo de 10 $\mu\text{mol/L}$, para CYN y MC-LR. En monocapa se hicieron mediciones a las 96, 168, 336h. Los pequeños esferoides iniciales, se estudiaron a las 24, 96, 168, 264 y 336h (14 días) de exposición. Los esferoides más grandes, se estudiaron a las 96 y 168h de exposición.	En monocapa, MC-LR no indujo citotoxicidad ($\text{EC}_{50} > 10 \mu\text{M}$), CYN inhibió el crecimiento celular y la viabilidad (48-96h; $\text{EC}_{50} 5,5 \mu\text{M}$). En esferoides pequeños se inhibió crecimiento y viabilidad por ambas cianotoxinas ($\geq 0,1 \mu\text{mol/L}$), con alteraciones a nivel superficial. En esferoides grandes, se redujo la viabilidad por ambas cianotoxinas a las 96h (EC_{50} : $0,04 \mu\text{M}$ -MCs y EC_{50} : $0,1 \mu\text{M}$ -CYN)	(Basu et al., 2018)
Estándar puro MC-LR	Línea celular de tallo hepático humano HL1-1 inmortalizadas con hTERF, dando HL1-hT1.	Ensayos de viabilidad celular con tres indicadores: AB, CFDA-AM y NR, Captación de MC-LR y actividad MAPK mediante WB. Formación de ROS por ensayo CellROX. Evaluación del daño en el ADN por DSB's mediante ICC.	Se partió de una solución madre 500 μM de MC-LR en H_2O estéril y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Las concentraciones finales empleadas para las pruebas fueron $0,01\text{-}10 \mu\text{M}$ durante 48h.	No se afectó el crecimiento ni viabilidad de los cultivos tras 48h a la concentración máxima probada ($10 \mu\text{M}$). Las condiciones de exposición que mostraron bandas en WB no alteraron la expresión ni la actividad de las quinasas. No indujo aparición ni mantenimiento de ROS.	(Raska et al., 2018)

				No se alteró la expresión del gen inducible por estrés ATF3 en células tratadas con MC-LR. La acumulación de MCs se produjo probablemente por mecanismos independientes de OATP y MDR generando variaciones cuali y cuantitativas.	
Estándar puro CYN	Cultivo en monocapa de la línea celular HL1-hT1 en material plástico de cultivo de tejidos.	Análisis de citotoxicidad mediante medición de la impedancia celular. Análisis de estrés oxidativo mediante CellRox y medición de ROS. Análisis de genotoxicidad mediante ICC. Análisis de activación de MAPK.	Se partió de una solución madre 500µM de MC-LR en H ₂ O estéril y se almacenó a -20 °C. Para las sucesivas pruebas se emplearon concentraciones en el rango 0,1-5 µM durante 48-120h.	CYN generó toxicidad y aumentó la muerte celular a las 24-48h de exposición a concentraciones mayores de 1µM, a concentraciones inferiores detuvo el crecimiento, pero no se observó muerte celular. El daño citotóxico se generó por la estimulación de vías de señalización y transcripcionales críticas para la regulación y no por estrés oxidativo inducido por CYN.	(Raška et al., 2019)
Estándar de puro CYN.	Modelo avanzado 3D esferoides formados por flotación forzada	Ensayos de crecimiento y viabilidad celular por MTS. Influencia sobre proliferación celular, alteración del ciclo celular y DSB's mediante citometría de flujo. Estudio de los	Se preparó una solución madre de CYN de 0,5 mg/ml en metanol al 50% y se almacenó a -20 °C. Posteriormente se emplearon las siguientes concentraciones 0,125-	Se observó una reducción del tamaño de los esferoides la cual fue dosis dependientes. CYN afecto al ciclo celular en fase G1.	(Hercog et al., 2020)

	de células HCC, línea HepG2.	genes implicados en metabolismo de xenobióticos, respuesta al daño de ADN, apoptosis y estrés oxidativo.	0,25-0,5 µg/mL con exposición de un tiempo máximo de 72h.	No se determinó inducción de DSB's en comparación con el control. Desregulación de los genes implicados en la codificación de enzimas de la fase I, genes implicados en proliferación celular y apoptosis.	
--	------------------------------	--	---	---	--

Abreviaturas: AB: azul alamar. CFDA-AM: éster acetoximetílico de diacetato de 5-carboxifluoresceína. CYN: cilindrospermopsina. DSB's: rotura de la doble cadena. HepG2: células de carcinoma hepatocelular humano. HL1-1: células madre de hígado humano adulto. HCC: carcinoma hepatocelular. hTERT: telomerasa transcriptasa inversa humana. ICC: análisis inmunocitoquímico. MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos. MCs: microcistinas. MC-LR: microcistina LR. MDR: proteínas resistentes a múltiples fármacos. MTS: Sal de Tetrazolio. NR: rojo neutro. OATP: transportadores de aniones orgánicos. RC: respiración celular. ROS: especies reactivas de oxígeno. WB: transferencia Western.

Algunos estudios epidemiológicos revelan la relación tanto de la incidencia de daño hepático agudo y crónico como de las enfermedades hepáticas, por ejemplo, el carcinoma hepatocelular (HCC), con el consumo de agua proveniente de fuentes contaminadas con cianotoxinas por la presencia de floraciones bacterianas productoras de las mismas. Gracias a que los conocimientos a nivel hepático son cada vez mayores, se ha podido llevar a cabo el desarrollo de diferentes modelos experimentales que permitan el estudio de la toxicidad (Raska et al., 2018).

Se ha demostrado que modelos nuevos para el estudio *in vitro* como la línea celular HL1-1 de células madre hepáticas adultas (LSC) y sus derivados inmortalizados son útiles para estudios de promotores de tumores hepáticos (Raska et al., 2018). No obstante, la caracterización de las características fenotípicas y celulares son fundamentales para la extracción de conclusiones toxicológicas de los efectos observados *in vitro* (Raska et al., 2018). Según estos autores, no existían diferencias significativas en la expresión génica entre la línea celular HL1-1 no inmortalizada y las células HL1-hT1, lo cual sugiere que las inmortalizadas con hTERT conservan las características fenotípicas determinantes. Por tanto, la inmortalización exitosa con hTERT de LSC puede ser un foco prometedor para la formación de líneas celulares permanentes de células madre que pueden ser empleadas para la construcción de modelos *in vitro*.

Este mismo estudio, demostró diferencias en las respuestas celulares inducidas por MC-LR en HL1-hT1 de LSC en comparación con los hepatocitos primarios HepG2 de HCC. Las células del cultivo carecían de expresión de genes OATP del tipo OATP1B1 y 1B3 que son los encargados de la captación de MC-LR por los hepatocitos (Raska et al., 2018). Además, es posible que existan diferencias cualitativas y cuantitativas por parte de los hepatocitos en la captación de la toxina en función del grado de expresión de OATP1B1 y 1B3. Se valoró que la falta de expresión fuese debida a una ausencia general de los marcadores en dichos cultivos; sin embargo, se encontró que, en ambas, a pesar de la existencia de otras variantes de OATP que podían estar implicados, dados los resultados obtenidos, se sugiere que el proceso de captación de MCs era independiente de estos transportadores a pesar de poder tener cierta implicación. Podrían verse implicados otros mecanismos de transporte de membrana, como endocitosis o pinocitosis (Raska et al., 2018). Por otro lado, y teniendo en cuenta las variaciones en la absorción de las toxinas, la expresión de las proteínas resistentes a múltiples drogas (MDR), relacionadas por estudios realizados con la quimiorresistencia del cáncer también podría

desempeñar un papel importante en el proceso de expulsión de MC-LR en las células corporales (Raska et al., 2018).

Las investigaciones sobre los mecanismos de hepatotoxicidad realizados *in vivo* o en cultivos de hepatocitos primarios de roedores o líneas celulares humanas, centrados en el estrés oxidativo y daño al ADN inducidos por CYN mostraron una fuerte respuesta citotóxica de las células HL1-hT1 durante las 20 a 48 h de exposición a 2,5 a 5 μM de CYN (Raška et al., 2019). Esto desencadenó pérdida de adhesión celular, desprendimiento y muerte celular. En adición, en hepatocitos primarios los efectos citotóxicos generados por CYN causaron asimismo inhibición de síntesis proteica, aumento en la formación de ROS, peroxidación lipídica, daño al ADN y alteraciones del ciclo celular y apoptosis (Raška et al., 2019). De forma análoga, la exposición las concentraciones subcitotóxicas (0,12–1,2 μM) durante tiempos superiores a 12-72h llevaron a inestabilidad genómica y daño al ADN (Raška et al., 2019). Por otro lado, CYN indujo una activación del factor de transcripción de MAPK ERK1/2 y p38 activados por mitógenos, y aumentó el factor de transcripción ATF3 relacionado con el estrés, lo cual derivó en que las LSC no se vieron afectadas por la genotoxicidad y estrés oxidativo generado por CYN, sino por la activación de vías de señalización y transcripcionales que medían la regulación celular, la proliferación, estrés, respuesta y supervivencia celular. Sin embargo, los efectos citotóxicos de CYN fueron más notables en los estudios realizados en células HL1-hT1 cultivadas en cultivos tridimensionales, donde estimulan la diferenciación hepática de las células hepáticas (Raška et al., 2019).

En el estudio realizado por Raska et al., (2018) observaron como en el caso de células HLQ-hT1, que expresaban características de células madre hepáticas adultas humanas (LSD) cultivadas en cultivo monocapa tras la exposición a concentraciones de CYN alrededor de 1 μM no indujo efectos citotóxicos, genotóxicos ni estrés oxidativo en comparación con HepG2 de HCC. Esto es porque las células HL1-hT1 indiferenciadas presentan una expresión significativamente menor de marcadores de hepatocitos diferenciados que HepG2, pero sí se inhibieron procesos celulares relacionados con la obtención de energía, lo cual disminuyó el crecimiento a las 72h de exposición

Sin embargo, los cultivos monocapa *in vitro* de líneas de células hepáticas imitaban pobremente las principales funciones específicas de los hepatocitos y predecían inadecuadamente los efectos hepatotóxicos de MC-LR y CYN (Basu et al., 2018). La utilización de cultivos 3D de esferoides en este caso sin andamios, mediante el empleo de células de tallo hepático de la línea celular HL1-hT1 inmortalizados con telomerasa se

emplearon para evaluar el potencial hepatotóxico de MC-LR y CYN. En cultivos monocapa de células HL1-hT1, MC-LR no indujo efectos citotóxicos a concentraciones inferiores a 10 μM en las primeras 96h, mientras que CYN inhibió el crecimiento y la viabilidad celular a las 48h-96h de exposición a 0,5–0,6 μM (Basu et al., 2018).

Por otro lado, los esferoides tanto grandes como pequeños, de las células HL1-hT1 se volvieron sensibles a concentraciones más bajas ambas de cianotoxinas, donde, el crecimiento y la viabilidad y crecimiento de los esferoides pequeños fueron detectados en rangos de concentración de 0,01-0,1 μM (Basu et al., 2018). Además, se asociaron con ampollas y desintegración en la superficie del esferoide. Los daños hepatoesferoides y la reducción de la viabilidad también se observaron en esferoides maduros grandes; sin embargo, los rangos de concentración a los cuales se observaron fueron menores para MCs. Los valores a partir de los cuales se vio afectada la viabilidad de los esferoides grandes fue para MCs de 0,04 μM , pero para CYN se mantuvo, no observándose alteraciones por efecto de las cianotoxinas por debajo de 0,01 μM (Basu et al., 2018).

Los cultivos de esferoides de células madre de hígado humano adulto HL1-hT1 presentan una sensibilidad a cianotoxinas similar a los cultivos de hepatocitos primarios, proporcionando además una herramienta simple, práctica y rentable, que se puede usar de manera efectiva en la investigación ambiental y toxicológica, incluida la evaluación del potencial hepatotóxico y seguimiento de diversas muestras contaminadas con cianobacterias tóxicas (Basu et al., 2018).

Los estudios toxicocinéticos emplean células hepáticas ya que se consideran la mejor aproximación a la situación *in vivo*; no obstante, los esferoides generados a partir de líneas celulares de hepatocitos parecen igualmente útiles para el estudio y determinación de la toxicidad *in vitro* (Hercog et al., 2020).

Por otro lado, los modelos clásicos de células cultivadas en 2D muestran una correlación altamente menor que hace que se estén quedando obsoletos. Los modelos 3D además conservan su viabilidad, morfología y funcionalidad celular a lo largo del estudio, es decir, permiten las exposiciones prolongadas (Hercog et al., 2020).

No obstante, a pesar de la existencia de pruebas que respaldan una representación más fidedigna por parte de los modelos 3D en respuesta a tóxicos dentro de estudios de toxicidad *in vitro*, se hace necesario ver como responden dichos modelos a la toxicidad (Hercog et al., 2020).

En el estudio realizado por Hercog et al., (2020), se utilizó el modelo avanzado de células 3D elaborado a partir de células HepG2 para el estudio de CYN (Hercog et al.,

2020). Al someter los esferoides HepG2 a CYN durante las primeras 72h, los esferoides disminuyeron la tasa de crecimiento dependiendo de la dosis de exposición. Sin embargo, una vez estabilizado el tamaño, CYN inhibió el crecimiento de los esferoides en un 8% tras esas 72 primeras horas que se tradujo en una disminución del área de un 31%. Por tanto, se concluyó que afectaba no solo a la superficie sino también a la integridad ya que estos esferoides eran menos compactos que el control.

En cuanto a la superficie de los esferoides expuestos a CYN se agitaba y desintegraba, lo cual ya se conocía por estudios anteriores realizados en monocapa donde se registró una unión menos firme de las células a la superficie de las placas de cultivo y entre sí, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con esferoides. Esto se traduce en cambios en la morfología celular y en los enlaces intracelulares (Hercog et al., 2020). La exposición de los esferoides en las primeras 72h no redujo la viabilidad celular, no observándose diferencias significativas en los diferentes estudios realizados sobre la misma entre los esferoides con CYN y el control. También se observó una mayor supervivencia celular en 3D que en 2D de HepG2 revelando que los cultivos 3D son más resistentes a la apoptosis inducida por medicamentos. Además, se observa un patrón *in vivo* similar de quimiorresistencia al de los cultivos 3D (Hercog et al., 2020).

Los estudios realizados sobre los efectos de CYN sobre el ciclo celular por citometría de flujo llevados a cabo por Hercog et al., (2020), revelaron que el aumento de células 3D HepG2 en G0/G1 tras la exposición a CYN apareció a concentraciones $\geq 0,25\mu\text{g/mL}$, además no se debió al aumento de células no proliferantes (G0) sino que refleja un paro en el ciclo celular en fase G1. Es en la fase G1 donde se lleva a cabo los procesos de replicación de ADN, así como finalización de la división celular, lo cual implica que las células estaban dividiéndose menos (Hercog et al., 2020). En este mismo estudio, se probó una fuerte regulación al alza de genes sensibles al daño al ADN lo cual, confirma la actividad genotóxica de CYN. Además, enzimas metabólicas de fase I y II se regularon al alza tras la exposición a CYN, lo cual confirma la activación de la toxina. El modelo experimental de células 3D HepG2 utilizado en el estudio puede contribuir a un estudio de la genotoxicidad de compuestos químicos, no solo para el estudio de las cianotoxinas producidas por cianobacterias, ya que reflejan lo que ocurre en el organismo frente a la exposición de forma más fiable.

En la mayoría de los artículos sobre el estudio de MCs, en especial MC-LR revisados, las concentraciones de esta última variante fueron inferiores al valor guía de la OMS (1,0 $\mu\text{g/L}$ para MC-LR). Además, varían en su abundancia y concentración según

la especie de *Microcistina spp.* que la produjera. También se demostró variedad en función de la etapa de proliferación celular en la que se encontraba donde más del 90% de las cianotoxinas fueron intracelulares durante el período de floración. Esto significa que las MCs podrían liberarse y permanecer en el agua aumentando los riesgos para la salud humana (Díez-Quijada, et al., 2019b).

Como se muestra en la tabla 1, la mayoría de los estudios se realizaron sobre células hepáticas como HepG2 y hepatocitos humanos y de rata dado que, la mayor toxicidad ejercida por las MCs se focaliza a nivel del hígado, son hepatotoxinas potentes. A pesar de ello, es cierto que pueden afectar otros órganos como el intestino o células del cuello uterino (Díez-Quijada, et al. 2019a).

Tabla 2: Resumen de los estudios realizados sobre la toxicidad de Noc A y PAB *in vitro*.

Toxina	Modelo experimental	Ensayos realizados	Rangos de concentración y condiciones de experimentación	Principales resultados	Referencia
Oxadiacina Noculina extraída de Nodularia sp. LEGE 06071.	EMC (3D) y monocapa (2D) de las líneas celulares HTC116wt y MCF7wt.	Ensayo Glucosa/Galactosa, exposición a las 24h de concentraciones de 25 mM y 10 mM respectivamente. Ensayo de viabilidad a las 24h e incubación 48h, posterior adición MTT 0,05mg/mL durante 3h. Evaluación de los cristales formados por microscopia previa disolución en DMSO. Análisis de incubación de Nrf2 y HIF, probando NocA en un ensayo de concentración-respuesta, incubación en un sistema de análisis de células vivas durante 48h. Control de apoptosis por ELISA. Inmunoblot o WB. Medición de los niveles de ATP después de un período de exposición de 2h y medición por luminiscencia.	Para el ensayo Glucosa/Galactosa, concentraciones de Noc A 10 μ M durante 48h. Exposición a las 24h de NocA 10 μ M e incubación 48h en el ensayo de viabilidad. Concentración de hasta 10 μ M para el análisis de Nrf2 y HIF. Concentraciones de NocA de hasta 10 μ M, con diluciones 1:2 tras 2h de exposición.	Noc A fue citotóxico contra células del cáncer de colon y las inmortalizadas en las condiciones experimentales. Se demostró inducción de apoptosis en células HCT116 mediada mecanismos resistentes a la sobreexpresión de enzimas de la familia BCL. Se demostró la capacidad de causar autofagia y una disminución de la respiración mitocondrial medida por diferentes parámetros a la hora de exposición.	(Sousa et al., 2019)
Portoamidias A y B aisladas de cianobacterias del	Células HCT116 y RPE ^{1hTERT} cultivadas en monocapa (2D) y EMC	Ensayo de viabilidad en monocapa con MTT, posterior incubación con formación de cristales que fueron	0,04-10 μ M durante un máximo de 48h, variando las horas de exposición	Se demostró sensibilidad muy similar a PAB en células HCT116 y RPE-1hTERT, sin	(Sousa et al., 2020)

género <i>Phormidium sp.</i>	(3D), células no cancerígenas y larvas de pez cebra.	disueltos en DMSO y en esferoides con MTT, azul tripan y fosfatasa ácida. Ensayo de permeabilización. Tinción con TMRE para el ensayo de variación de la polaridad de la membrana mitocondrial. Ensayo con ToxGlo de la integridad de la membrana y de los niveles de ATP. Prueba de estrés mitocondrial. Ensayo toxicológico de larvas de pez cebra.WB. Análisis de apoptosis con ELISA.	para el ensayo de viabilidad celular en monocapa. Exposición hasta 10 μ M durante 1h, y, durante 6h a concentraciones de 5-10 μ M para la medición de la polaridad de la membrana mitocondrial. Concentraciones de 10-5-2,5-1,25-0,625-0,3125-0,156 μ M para TexGlo.	embargo, penetró mejor en los esferoides multicelulares, dando un IC ₅₀ cuatro veces mayor que en monocapa. Además, se probó una absorción independiente de la energía puesto que no hubo toxicidad a 4° y 37°C. PAB disminuyó la producción de ATP, la reparación mitocondrial y la hiperpolarización de la membrana mitocondrial.	
--	--	---	--	--	--

Abreviaturas: BCL: Linfoma de células B. EMC: esferoides multicelulares. DMSO: dimetilsulfóxido. ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción. HCT: de carcinoma de colon humano. HIF: factor inducible por hipoxia. MCF: carcinoma de mama humano. MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. NocA: Noculina A. Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2. PAB: Portoamidas A y B. TRME: Éster etílico de tetrametil-rodamina. WB: transferencia Western.

Como hasta ahora hemos comentado, los productos naturales pueden ser fuentes útiles en el descubrimiento y desarrollo de medicamentos. Aunque los estudios se han centrado principalmente en las aplicaciones de MCs y CYN, hemos incluido en esta revisión otros productos, destacando la Oxadiacina Nocuolina A (Noc A) y las Portoamidas A y B (PAB).

La tabla 2 recoge a modo resumen un análisis de los estudios realizados acerca de las PAB y de la Oxadiazina Noc A.

Para el estudio de los oxadiazoles y oxadiazinas que han atraído la atención recientemente gracias a sus posibles aplicaciones anticancerígenas la oxadiazina Noc A se aisló previamente de la cepa cianobacteriana *Nodularia sp.* LEGE 06071. Se han examinado sus efectos citotóxicos contra diferentes cepas de la línea celular de cáncer de colon HCT116 a la línea celular inmortalizada hTERT RPE-1 (Sousa et al., 2019). Para ello, se utilizó el modelo esferoide tumoral multicelular (EMC), cuya complejidad está a caballo entre los tumores *in vivo* y los cultivos celulares monocapa, los cuales permitieron exponer que la oxadiazina Noc A muestra actividad antiproliferativa en las células del cáncer de colon cultivadas (Sousa et al., 2019). La respuesta de HCT116 a concentraciones variables de Noc A mostró que a concentraciones superiores a 5 μM se generó un aumento de los esferoides (Sousa et al., 2019). Además, la pérdida de fluorescencia en los estudios realizados indicó una viabilidad reducida sobre la capa de esferoides. Es decir, Noc A afectó a la viabilidad e indicó la apoptosis de las células HCT116 cultivadas como EMC (Sousa et al., 2019). Los ensayos de apoptosis realizados concluyeron que a concentraciones de Noc A cercanas a la IC_{50} se conseguía el mecanismo que daba los efectos antiproliferativos (Sousa et al., 2019). No obstante, a pesar de la común asociación de medicamentos antiproliferativos con la inducción de una respuesta de estrés oxidativo se examinó la respuesta a Noc A de la línea celular HTC116 dejando ver que tras 48h de exposición, la actividad antiproliferativa no estaba asociada al estrés oxidativo (Sousa et al., 2019). Por otro lado, los estudios de autofagia realizados pusieron de manifiesto que está se daba a concentraciones de Noc A entre 1,25-2,5 μM a las 18h de exposición. Por tanto, el estudio concluía que existían efectos antiproliferativos de Noc A asociados a la fosforilación oxidativa (Sousa et al., 2019).

Otros compuestos cianobacterianos que también tienen peso y son, por tanto, dignos de mención, son las PAB. Para su estudio se centraron en la función mitocondrial por manipulación del potencial de membrana mitocondrial (Sousa et al., 2020).

Las PAB son péptidos cíclicos aislados de la cepa *Phormidium sp.* Sousa et al., (2020) evaluaron su actividad antiproliferativa en células HTC116 mediante el estudio de viabilidad. Las PAB redujeron la viabilidad de células de cáncer de colon HTC116 cultivadas en monocapa y EMC. No obstante, PAB penetró en el EMC en mayor medida, lo cual generó una IC₅₀ cuatro veces mayor que en cultivos monocapa. Sin embargo, la toxicidad fue similar en el rango de temperatura de 4°C a 37°C, sugiriendo que la absorción es independiente de la energía de exposición, aunque su exposición sí que disminuyó la producción de energía en forma de ATP, las tasas de respiración mitocondrial, así como la hiperpolarización de la membrana mitocondrial (Sousa et al., 2020). Es importante destacar que el estudio ha permitido reflejar que las PAB actúan como toxinas mitocondriales sobre células cancerígenas y no cancerígenas y que además ejercieron toxicidad sistémica sobre las larvas de pez cebra (Sousa et al., 2020). Por lo tanto, su posible aplicación en un futuro dependerá de que estudios posteriores arrojen luz sobre la posibilidad de dirigir dicha toxicidad demostrada sobre células cancerosas sin afectar a las no cancerosas para así poder evadir los efectos secundarios que se generarían (Sousa et al., 2020).

7. CONCLUSIONES

Las cianotoxinas representan a día de hoy un foco de peligrosidad, dada su creciente distribución por nuevas zonas produciendo toxicidad que afecta no solo a los seres humanos.

Los estudios que se han realizado en cultivos 3D han demostrado tener una mayor cercanía a las funciones celulares *in vivo* que los cultivos celulares 2D pareciéndose más a la organización de tejidos y órganos del cuerpo humano. Sin embargo, en la revisión realizada podemos ver como aún no es el modelo experimental empleado por excelencia a pesar de que establece mejores interacciones célula-célula y ECM.

Los modelos celulares 3D han demostrado que su uso facilita la evaluación toxicológica *in vitro* de diferentes compuestos químicos, obteniendo resultados más fiables y cercanos a los modelos *in vivo*. Siendo de utilidad en la evaluación toxicológica de las cianotoxinas.

Del mismo modo, sería conveniente el uso de los modelos tridimensionales con el propósito de completar el perfil toxicológico de diferentes sustancias, entre las que se encuentran las cianotoxinas como MC-RR, Noc A y PAB, y así poder obtener una mejor comprensión de su toxicidad, y por lo tanto implicaciones en la salud del hombre.

Además, desde un punto de vista global, se puede observar la carencia de estudios de todas las cianotoxinas en modelos celulares tridimensionales, así como, la ausencia de estudios sobre mezclas de cianotoxinas que se centrasen en la actividad sinérgica que pueden abrir futuras líneas de investigación.

Por tanto, los ensayos de toxicidad *in vitro* siguen siendo una herramienta de peso para el estudio de los perfiles toxicológicos de las cianotoxinas.

8. BIBLIOGRAFÍA

Basu A, Dydowiczová A, Čtveráčková L, Jaša L, Trosko JE, Bláha L, et al. Assessment of Hepatotoxic Potential of Cyanobacterial Toxins Using 3D *in Vitro* Model of Adult Human Liver Stem Cells. *Environmental Science and Technology*. 2018 Sep 4; 52(17):10078–88.

Caleffi JT, Aal MCE, Gallindo H de OM, Caxali GH, Crulhas BP, Ribeiro AO, et al. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. *Life Sciences*. Elsevier Inc.; 2021; 286.

Catherine A, Bernard C, Spooof L, Bruno M. Microcystins and Nodularins. En: Meriluoto J, Spooof L y Codd GA, editores. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. 1ª ed. United States of America. 2017.p . 110-126.

Chuah JKC, Zink D. Stem cell-derived kidney cells and organoids: Recent breakthroughs and emerging applications. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. 2017; 35: 150–67.

Díez-Quijada L, Prieto AI, Guzmán-Guillén R, Jos A, Cameán AM. Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd; 2019a; 125: 106–32.

Díez-Quijada L, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Llana-Ruiz-Cabello M, Jos A, Cameán AM. Microcystin-RR: Occurrence, content in water and food and toxicological studies. A review., *Environmental Research*. Elsevier Ltd; 2019b; 168: 467-489.

Hercog K, Štampar M, Štern A, Filipič M, Žegura B. Application of advanced HepG2 3D cell model for studying genotoxic activity of cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environmental Pollution*. 2020 oct 1; 265.

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338066/WHO-HEP-ECH-WSH-2020.6-eng.pdf>

<http://publicacionesoficiales.boe.es>

Kaloudis T, Hiskia A, Triantis TM. Cyanotoxins in Bloom: Ever-Increasing Occurrence and Global Distribution of Freshwater Cyanotoxins from Planktic and Benthic Cyanobacteria. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2022 Apr 8;14 (264).

Kim MJ, Jeoung YJ, Kim HY, Kim SY, Kim JY, Park JW, et al. Cell spheroids containing bioactive molecule-immobilized porous particles with a leaf-stacked structure. *Chemical Engineering Journal*. Elsevier Ltd; 2022 Feb 1; 429.

Laschke MW, Menger MD. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2017; 35: 133–44.

Lou YR, Leung AW. Next generation organoids for biomedical research and applications. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2018; 36: 132–49.

Meseguer J, Esteban Á, Mulero V, Cuesta A, Sepulcre MP. Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Revista Eubacteria*. 2015; 34: 15-20.

Nieskens TTG y Sjögren AK. Emerging *In Vitro* Systems to Screen and Predict Drug-Induced Kidney Toxicity., *Seminars in Nephrology*. W.B. Saunders; 2019; 39: 215–26.

Nyoni H, Mamba B, Msagati T AM. Development of a silicone-membrane passive sampler for monitoring cylindrospermopsin and microcystin LR-YR-RR in natural Waters. *Physics and Chemistry of the Earth* Elsevier Ltd. 2016: 1-12.

Raska J, Ctverackova L, Dydowiczova A, Sovadinova I, Blaha L, Babica P. Tumor-promoting cyanotoxin microcystin-LR does not induce procarcinogenic events in adult human liver stem cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018 Apr 15; 345: 103–13.

Raška J, Čtveráčková L, Dydowiczová A, Sovadinová I, Bláha L, Babica P. Cylindrospermopsin induces cellular stress and activation of ERK1/2 and p38 MAPK pathways in adult human liver stem cells. *Chemosphere*. 2019 Jul 1; 227:43–52.

Rodríguez Pereira C. 2020. Estudio y caracterización de andamios 2D y 3D funcionalizados con RGD-cys-D1 para su aplicación en ingeniería de tejidos en el tratamiento de lesiones de cartílago articular humano. (Tesis doctoral inédita). Departamento de biología celular y molecular. Universidad de A Coruña.

Saglam-Metiner P, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Bioengineering-inspired three-dimensional culture systems: Organoids to create tumor microenvironment. *Gene*. Elsevier B.V.2019; 686: 203–12.

Sabella Sanseverino, Diana Conduto António, Robert Loos and Teresa Lettieri; Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection; EUR 28624.

Sousa ML, Preto M, Vasconcelos V, Linder S, Urbatzka R. Antiproliferative effects of the natural oxadiazine nocuolin A are associated with impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation. 2019. *Frontiers in Oncology*. 2019; 9 (224): 1-13.

Van Berlo D, Nguyen VVT, Gkouzioti V, Leineweber K, Verhaar MC, van Balkom BWM. Stem cells, organoids, and organ-on-a-chip models for personalized *in vitro* drug testing. *Current Opinion in Toxicology*. Elsevier B.V. 2021; 28: 7–14.

Weinhart M, Hocke A, Hippenstiel S, Kurreck J, Hedtrich S. 3D organ models- Revolution in pharmacological research,? *Pharmacological research*. Elsevier Ltd Academic Press. 2019; 139: 446–51.

Ylostalo JH. 3D Stem Cell Culture. *NLM (Medline)*. 2020; 9: 1-3.