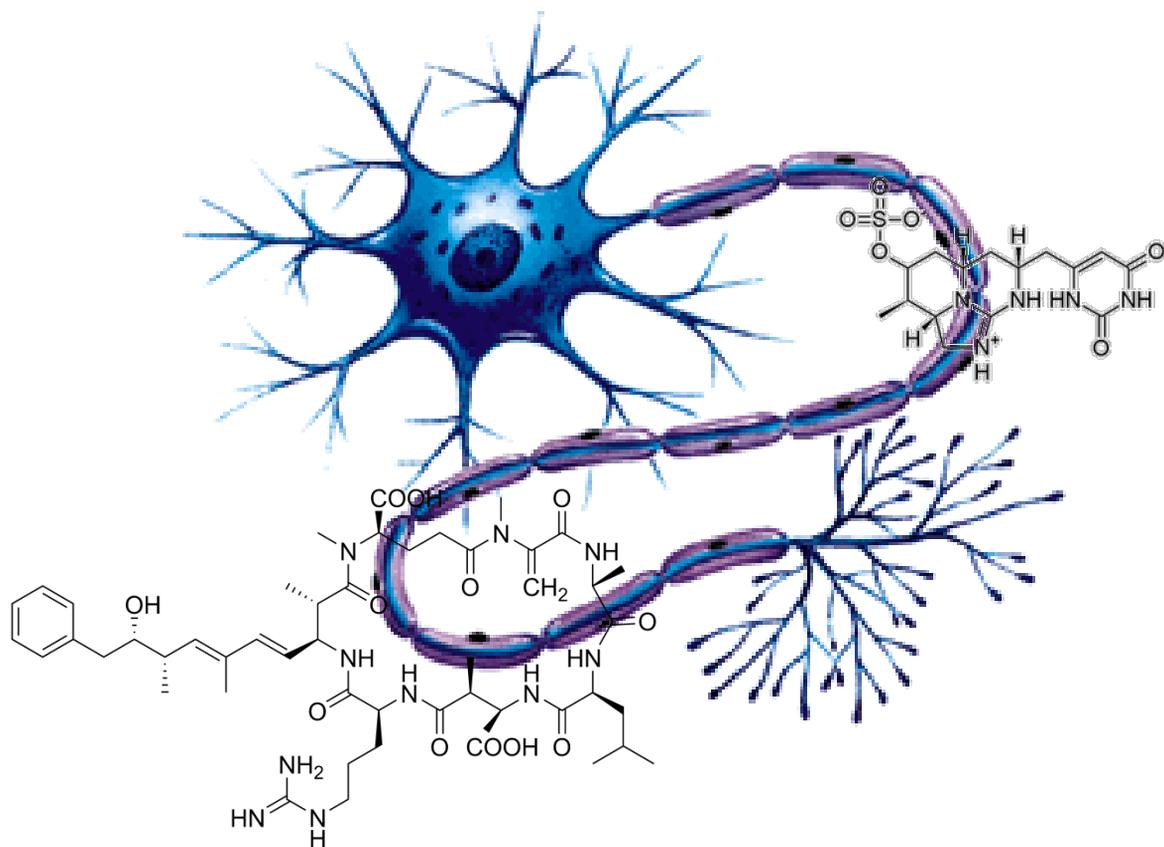


NEUROTOXICIDAD POR EXPOSICIÓN A MICROCISTINAS Y CILINDROSPERMOPSINA



Álvaro Díaz Ballesta

Grado en Farmacia



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

NEUROTOXICIDAD POR EXPOSICIÓN A MICROCISTINAS Y CILINDROSPERMOPSINA

Trabajo de Revisión Bibliográfica

Álvaro Díaz Ballesta

Facultad de Farmacia, Sevilla.

4 de julio 2016

Tutores

Dr. Daniel Gutiérrez Praena

Dra. Remedios Guzmán Guillén

Dpto. Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Área de Toxicología



Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

ÍNDICE

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1. Cianotoxinas	5
1.1.1. Microcistinas	6
1.1.2. Cilindrospermopsina	8
1.2. Vías de exposición a cianotoxinas	10
1.3. Efectos por exposición a cianotoxinas	10
2. Objetivos	10
3. Metodología	11
4. Resultados y discusión	12
4.1 Neurotoxicidad de las microcistinas	15
4.2. Neurotoxicidad de la cilindrospermopsina	19
4.3 Neurotoxicidad conjunta de microcistinas y cilindrospermopsina	23
5. Conclusiones	24
Bibliografía	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Floración cianobacteriana en forma de película en la superficie que evita la oxigenación del agua	5
Figura 2: Estructura general de las microcistinas	7
Figura 3: Estructuras de las cilindrospermopsinas	9
Figura 4: Representación gráfica de los resultados de las bases de datos	11
Figura 5: Imagen de la transmisión del impulso nervioso	13
Figura 6: Imagen de los canales iónicos	13
Figura 7: Principales dianas del SNC	14
Figura 8: Comparación estructural de hepatotoxina y neurotoxina	20
Figura 9: Compuestos guanidínicos procedentes de cianobacterias	22

Resumen

Las cianobacterias son bacterias fotosintéticas cuya distribución está ampliamente extendida. Presentes en diversos tipos de medios, incluidos suelos, agua de mar, y de forma destacada, en medios dulceacuícolas, estas cianobacterias pueden crecer o proliferar en diversos entornos, pero frecuentemente en aquellos que han sufrido la influencia del ser humano, entre las cuales cabe destacar la eutrofización de las aguas por enriquecimiento de estas y por aumentar el tiempo de exposición a la luz solar y su estancación. Muchas especies de cianobacterias tienen la capacidad de producir en su metabolismo sustancias tóxicas (cianotoxinas) que ejercen sus efectos en multitud de organismos, desde plantas y animales hasta los humanos. Las cianotoxinas, en especial las microcistinas (MCs) y la cilindrospermopsina (CYN), pueden alcanzar concentraciones que entrañen riesgos para la salud al entrar en contacto con ellas directa o indirectamente. Estas cianotoxinas provocan daños en diferentes órganos y tejidos, actuando como hepatotoxinas, citotoxinas, neurotoxinas o dermatotoxinas, entre otras. Aunque las MCs son ampliamente conocidas como hepatotoxinas y la cilindrospermopsina como una citotoxina, también se han observado efectos neurotóxicos por exposición a dichas toxinas. Las MCs inducen estrés oxidativo a nivel cerebral, hiperfosforilación e inhibición de la actividad proteín fosfatasa y cambios en el comportamiento y la actividad de peces, entre otras. Por contraposición, la neurotoxicidad de la CYN aún no está completamente estudiada, pero se ha demostrado que aumenta el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, inhibe la actividad acetilcolinesterasa e induce diferentes alteraciones histopatológicas en cerebro de diversos organismos acuáticos. Así, el objetivo de la presente revisión bibliográfica es describir el potencial neurotóxico de MCs y CYN en líneas celulares y diferentes modelos animales.

Palabras clave: cianobacterias, cianotoxinas, microcistinas, microcistina-LR, cilindrospermopsina, neurotoxicidad

1. Introducción

Las cianobacterias son un grupo de bacterias Gram negativas, antiguamente denominadas "algas verde-azuladas", que crecen en aguas eutrofizadas (Woese, 2002; Herrero y Flores, 2008). Estas cianobacterias son capaces de crear floraciones, crecimientos explosivos por la multiplicación de las cianobacterias producto del aumento de la concentración de nutrientes, las cuales son cada vez más frecuentes debido a la contaminación de las aguas en todo el planeta. Este deterioro del agua se produce por el aumento de nutrientes, entre ellos fósforo y nitrógeno, provenientes principalmente de aguas residuales que no han sido tratadas correctamente, y residuos de la industria agrícola y ganadera (Briand y cols; 2003). Dichas floraciones se encuentran principalmente en aguas tropicales y subtropicales (Hawkins y cols., 1985; Hayman, 1992), si bien hoy día pueden encontrarse en reservorios de agua por todo el mundo, desde la tundra ártica hasta desiertos (Chorus y Bartram, 1999; Doyle, 2006; Chatziefthimiou y cols., 2016).

Las cianobacterias poseen una serie de características que les aportan ciertas ventajas competitivas: en condiciones de poca luz, pueden mantener una tasa de crecimiento superior al resto de organismos fitoplanctónicos presentes (Chorus y Bartram, 1999); poseen vesículas gaseosas con las que regulan su flotabilidad y poder posicionarse donde la disponibilidad de luz y nutrientes sea óptima (Walsby y cols., 1989); poseen gránulos de reservas de fosfato y tienen poco requerimiento de nitrógeno. También influyen el pH y la temperatura, siendo las más idóneas entre los 20°C y 30°C, y un pH básico o neutro. Por esta razón, las épocas en las cuales estas floraciones se dan con mayor frecuencia son verano y otoño. Las floraciones de cianobacterias producen numerosos efectos secundarios tales como anoxia en el área de crecimiento al formar una película en la capa superior evitando así la oxigenación del agua (Fig. 1), ocasionando la muerte de algunos organismos acuáticos, la síntesis de sustancias que producen un olor y sabor desagradables, y principalmente la síntesis de cianotoxinas (Duy y cols., 2000; de Figuereido y cols., 2004).



Figura 1: Floración cianobacteriana en forma de película en la superficie del agua que evita la oxigenación del agua.

1.1. Cianotoxinas

Las cianotoxinas pueden clasificarse atendiendo a los órganos o sistemas donde ejercen sus efectos tóxicos:

1. Hepatotoxinas: su acción principal se produce en el hígado. Hay dos familias principales de cianotoxinas que afectan al hígado:
 - a) Microcistinas: producidas por un gran número de géneros, entre los que destaca *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* y *Oscillatoria*. Son las que mayor relevancia tienen a la hora de hablar de intoxicaciones en animales y humanos.
 - b) Nodularinas: producidas por el género *Nodularia*. Son péptidos cíclicos que inhiben las fosfatasa de proteínas serina y treonina (PP1 y PP2A), son precursores de tumores e inducen estrés oxidativo y apoptosis (Florczyk y cols., 2014).
2. Citotoxinas: pueden ejercer su acción sobre cualquier célula del organismo. Destaca principalmente la cilindrospermopsina (CYN). Producida por *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Chrysosporum ovalisporum* (denominada antiguamente *Aphanizomenon ovalisporum*), entre otras.
3. Neurotoxinas: ejercen su efecto tóxico sobre el sistema neuromuscular. Entre ellas se encuentran anatoxina-a (ATX-a) y anatoxina-a(s), producidas por diferentes especies de cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Microcystis* y *Oscillatoria*, así como la saxitoxina, producida por dinoflagelados marinos,

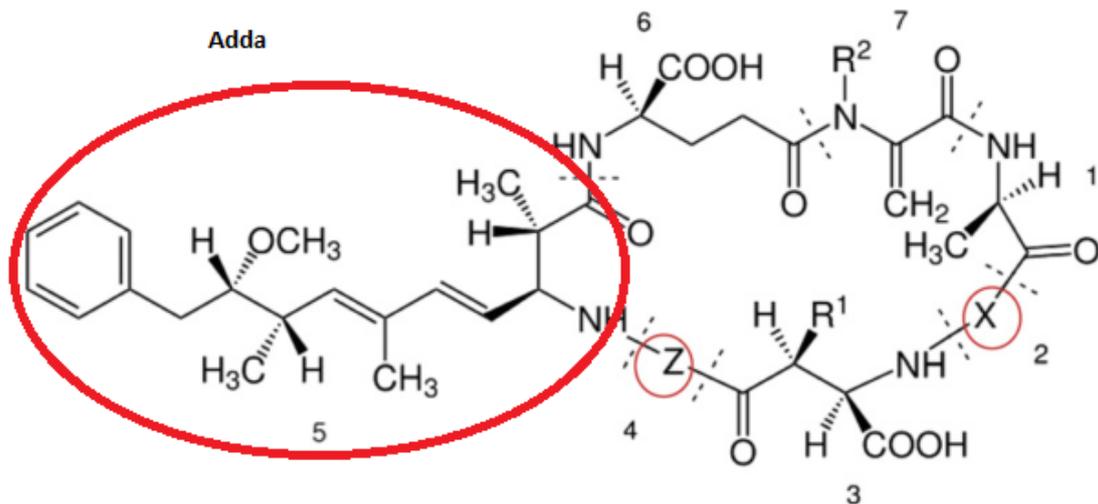
aunque también la producen cianobacterias como *Aphanizomenon flosaquae*, *Anabaena circinalis* y *Planktothrix spp.* La anatoxina-a es un alcaloide bicíclico que actúa como agonista potente de los receptores nicotínicos musculares y neuronales, produce despolarización en la membrana y desensibilización (Carneiro y cols., 2015). La anatoxina-a(s) es un éster cíclico de N-hidroxiguanina, cuya acción es la inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que cataliza a acetilcolina (ACh) (Molica y cols., 2005; Carneiro y cols., 2015).

4. Dermatotoxinas: destacan lyngbyatoxina A y aplysiatoxina, ambas producidas por diferentes especies de cianobacterias como los géneros *Lyngbya* y *Oscillatoria*.

Las primeras intoxicaciones humanas por consumo de agua contaminada con cepas tóxicas de cianobacterias fueron descritas en Australia, Inglaterra, China y Sudáfrica (WHO, 2003). El episodio más grave ocurrido fue en Brasil en el año 1996, donde murieron más de 50 pacientes sometidos a hemodiálisis en los que el agua utilizada estaba contaminada por cianotoxinas, concretamente con microcistina-LR (MC-LR) (Jochimsen y cols., 1998).

1.1.1. Microcistinas

Las microcistinas (MCs) son el grupo de cianotoxinas más extendido. En su mayoría están producidas por los géneros *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, y *Planktothrix* (Prieto y cols., 2007). Son heptapéptidos cíclicos que contienen tanto aminoácidos proteicos como no proteicos. Además poseen un aminoácido en posición C20 hidrofóbico conocido como Adda (3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico) (Fig. 2).



	Posición 4	Posición 2
MC-LR	Arginina	Leucina
MC-RR	Arginina	Arginina
MC-YR	Arginina	Tirosina

Figura 2: Estructura general de las microcistinas. Adaptado de Chorus y Bratram, 1999.

El aminoácido Adda es considerado el principal responsable de la toxicidad de las MCs ya que se une covalentemente al residuo de cisteína de la PP1 y PP2, produciendo su inhibición (Songs y cols., 2006). Existen más de 100 variantes de MCs, derivadas de diferentes modificaciones estructurales de los L-aminoácidos en las posiciones 2 y 4, siendo la más común la microcistina-LR (MC-LR), con un residuo de leucina (L) en la posición 2 y de arginina (R) en la posición 4 (Singh y cols., 2015). Otras variantes son la MC-RR, con las posiciones 2 y 4 ocupadas por residuos de arginina (R), y la MC-YR con un residuo de tirosina (Y) en la posición 2 y arginina (R) en la 4 (Fig. 2). Además, pueden sufrir hidroxilaciones, metilaciones y epimerizaciones que dan lugar a diferentes isoformas (Neilan y cols., 1999). Una misma cepa productora puede producir, además, más de una variante de MC a la vez, siendo más frecuentemente encontradas en el interior celular.

De entre las MCs citadas anteriormente, la MC-LR es la más tóxica y la más ampliamente estudiada (Sivonen y Jones, 1999). Después de ser ingerida, la MC-LR se transporta a través del íleon hacia el torrente sanguíneo (Falconer y cols., 1992) por donde llega al hígado, donde se concentra. Ahí atraviesa la membrana celular del

hepatocito mediante un transportador aniónico específico orgánico (OATP, por sus siglas en inglés). Dentro del hepatocito actúa como un potente inhibidor de las PP1 y PP2A mediante enlaces covalentes (Honkanen y cols., 1990), alterando así la arquitectura del hepatocito (Beasley y cols., 2000). También se ha demostrado que las MCs son inductoras de estrés oxidativo por la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) tanto *in vitro* (Nong y cols., 2007; Pichardo y cols., 2007; Puerto y cols 2009b, c, 2010; Zhang y cols., 2008), como *in vivo* (Ding y cols., 1998; Pflugmacher, 2004; Jos y cols., 2005; Prieto y cols., 2007, 2008, 2009; Atencio y cols., 2008; Wei y cols., 2008; Puerto y cols., 2009, 2011a,b). Las MCs también son precursoras de tumores, estando la MC-LR considerada como "posiblemente carcinogénica para humanos" (grupo 2B) por la Agencia Internacional de la Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) (www.iarc.fr). Además, también se ha demostrado que extractos del género *Mycrocystis* puede producir teratogénesis (Bu y cols., 2006).

1.1.2. Cilindrospermopsina

La cilindrospermopsina (CYN) es un alcaloide guanídic combinado con un resto hidroximetiluracilo (Ohtani y cols., 1992) (Fig. 3) que puede estar producido por diferentes especies de cianobacterias como *Anabaena bergii*, *Anabaena lapponica* y *Aphanizomenon flos-aquae* (Spoof y cols., 2006), *Chrysochlorum ovalisporum* (Banker y cols., 1997), *Cylindrospermopsis raciborskii* (Hawkins y cols., 1985), *Lyngbya wollei* (Seifert y cols., 2007), *Raphidiopsis curvata* (Li y cols., 2001) y *Umezakia natans* (Harada y cols., 1994).

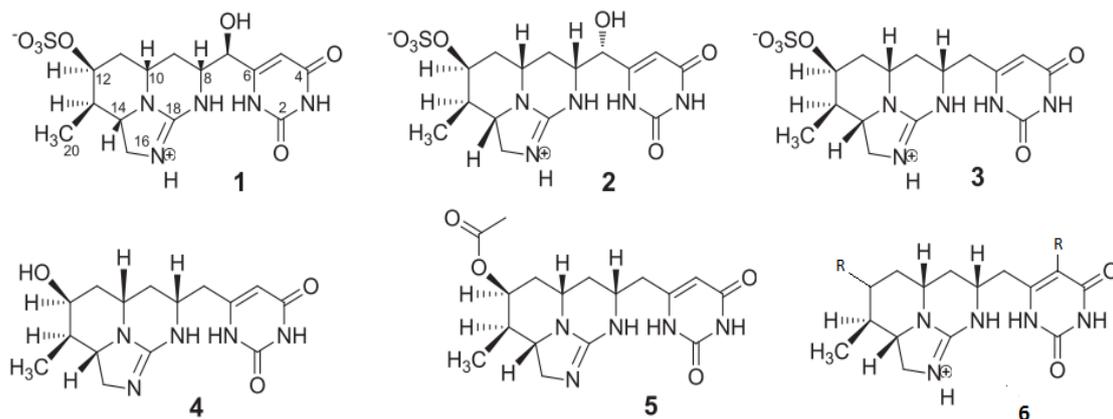


Figura 3: Diferentes variantes de cilindrospermopsinas: (1) cilindrospermopsina; (2) 7-epi-cilindrospermopsina; (3) 7-desoxi-cilindrospermopsina; (4) 7-desoxi-desulfo-cilindrospermopsina; (5) 7-desoxi-desulfo-12-acetylcilindrospermopsina; (6) estructura general de las CYN. Adaptado de Wimmer y cols. (2014).

En contraposición a la gran cantidad de variantes de MCs, las CYN tienen una variabilidad estructural bastante más reducida, con tan solo 5 variantes descritas (Wimmer y cols., 2014) (Fig. 3). Al contrario que otras cianotoxinas, la CYN se encuentra más frecuentemente de forma extracelular en el medio, alcanzando niveles en el agua de hasta un 90% (Norris y cols., 2001; Falconer y Humpage, 2005; Wormer y cols., 2008). Tras su ingesta a través del agua, la CYN tiene como diana principal el hígado, afectando a la síntesis proteica y de GSH y, además, se ha demostrado que el metabolismo de la CYN por el citocromo P450 implica una mayor toxicidad de la misma (Runnegar y cols., 1995; Frosco y cols., 2003, 2008; Metcalf y cols., 2004; Florczyk y cols., 2014). Tal y como se ha descrito anteriormente, la CYN ejerce un acción citotóxica, ya que puede dañar gran cantidad de órganos diferentes como son el hígado, riñón y tracto gastrointestinal, además puede causar hemorragias, dermatitis y neumonía entre otras patologías (Kiss y cols., 2002; Gutiérrez-Praena y cols., 2011; Wimmer y cols., 2014; Guzmán-Guillén y cols., 2015). En dichos órganos puede inducir carcinogenicidad debido a su actividad genotóxica ya que puede unirse al ADN de manera covalente, produciendo la rotura del mismo (Shen y cols., 2002). Se ha demostrado también la inducción de estrés oxidativo determinado por ERO y peroxidación lipídica (LPO), niveles de GSH, actividad glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPx), entre otras (Liebel y cols., 2001; Kiss y cols., 2002; Silva y cols., 2010; Gutiérrez-Praena y cols., 2013; Guzmán-Guillén y cols., 2015).

1.2. Vías de exposición a cianotoxinas

La exposición a cianotoxinas puede ocurrir de manera directa o indirecta. La exposición directa se refiere a la vía oral mediante su ingesta a través de agua contaminada, el contacto dérmico durante baños o natación, la inhalación de partículas en aerosoles en aguas de recreo o practicando deportes acuáticos, y de manera intravenosa por procedimientos médicos, aunque esta última es muy específica. La exposición de manera indirecta puede darse por consumo de productos de origen animal o vegetal que han sido expuestos a cianotoxinas y lo pueden acumular en sus tejidos. De todas, la vía oral es la más importante (Wood, 2016).

Las cianobacterias pueden encontrarse en aguas recreacionales o en aguas de consumo humano, por lo que las autoridades de Salud Pública tienen implantados programas de vigilancia sanitaria en este tipo de aguas (Chorus y Bartram, 1999; Martínez y cols., 2007).

1.3. Efectos por exposición a cianotoxinas

En cuanto a los efectos por la exposición de cianotoxinas se debe diferenciar entre síntomas primarios de tipo irritativo o alérgico, así como de tipo gastrointestinal (dolor abdominal, vómitos, diarrea) (Chorus y Bartram, 1999), y síntomas por la exposición a altas concentraciones de cianotoxinas, como son los daños hepático, citotóxico y neurotóxico (Gonseth y Martínez, 2005).

2. Objetivos

Esta revisión bibliográfica se centra en recopilar y revisar los mecanismos de acción y efectos adversos a nivel del sistema nervioso de dos cianotoxinas diferentes, MCs y CYN, ya que la información al respecto de ambas cianotoxinas es escasa. Así los diferentes objetivos que se plantean en la presente revisión bibliográfica son:

- Poner de manifiesto la actividad neurotóxica de MCs.
- Estudiar el estado del arte de la neurotoxicidad producida por CYN.

3. Metodología

Para la elaboración de la presente revisión bibliográfica se han empleado diversas bases de datos como fuentes de información, tales como PubMed (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), ScienceDirect (sciencedirect.com) y Google Académico (scholar.google.es).

Para la realización de la búsqueda bibliográfica se han empleado las siguientes palabras clave principales: *cyanobacteria*, *cyanotoxin*, *microcystin*, *cylindrospermopsin* y *neurotoxicity*. Como palabras clave secundarias se han usado: *oxidative stress*, *brain*, *acetylcholinesterase*, *neurological effects*, *neurological damage* y *protein phosphatase*.

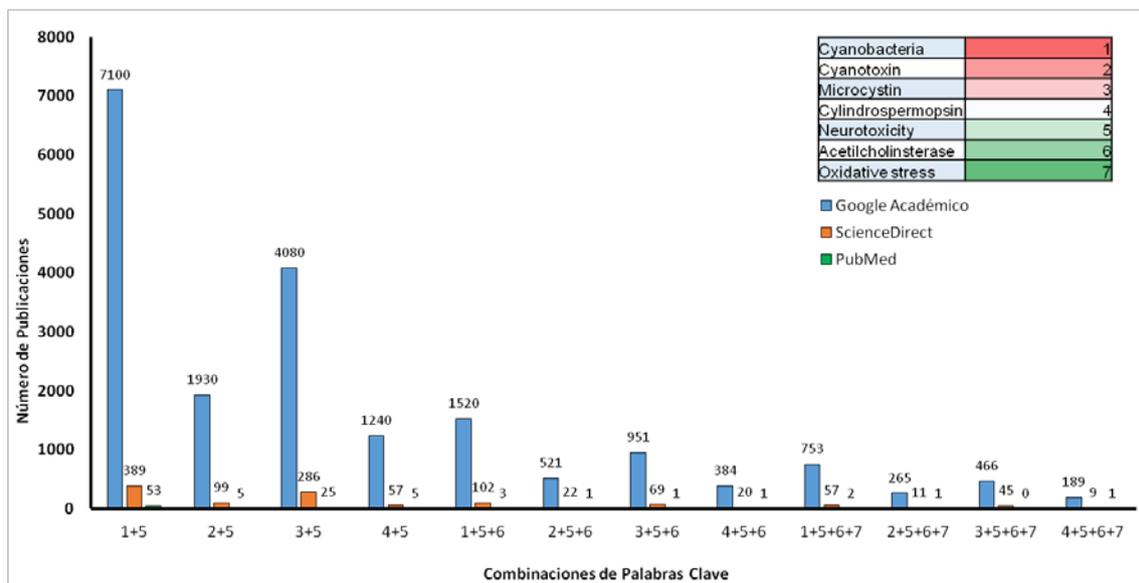


Figura 4: Recuento de artículos encontrados en las tres principales bases de datos usadas en función del número de palabras claves usadas.

En la figura 4 se observa cómo el número de artículos encontrados en las distintas bases de datos consultadas varía de forma decreciente en función del número de palabras clave usadas en la búsqueda. Nótese que Google Académico siempre presenta un número muy superior en comparación con las otras bases de datos, ya que su motor de búsqueda es mucho más amplio, y por tanto abarca a muchas más bases de datos pero a su vez es más inespecífico, ya que también realiza búsquedas eliminando alguna de las palabras claves empleadas en la búsqueda.

La búsqueda bibliográfica no se ha limitado a una franja de años específica, aunque sí se ha mostrado un mayor interés en los artículos más recientes. La referencia más antigua usada es la de Hawkins y cols. (1985), mientras que la más reciente es la de Takser y cols. (2016).

La mayor parte de la traducción de los diversos artículos se ha hecho en función de mis conocimientos del idioma, acudiendo al diccionario web Wordreference (www.wordreference.com), así como a los tutores para la consulta de cualquier duda de traducción y/o interpretación de los textos.

La revisión se fundamenta principalmente en el área de Toxicología, si bien presenta varios aspectos relacionados con otras áreas de conocimiento como son la Microbiología, la Bioquímica y la Fisiología.

4. Resultados y Discusión

El sistema nervioso es un sistema de comunicación rápida que abarca todo el organismo (Florczyk y cols., 2014). Su funcionamiento se basa en la generación de dos tipos de señales eléctricas, las cuales se detallan a continuación. Frente a un determinado estímulo (Fig. 5a), se produce una liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico que existe entre las neuronas (Fig. 5b), los cuales se unen a los receptores de las neuronas postsinápticas (Fig. 5c), produciéndose una respuesta consistente en una despolarización del potencial de unión, que a su vez, provoca un potencial de acción (Fig. 5d). Este potencial se desplaza rápidamente al final del axón, dando lugar, de nuevo, a una liberación de neurotransmisores (Kem, 2000).

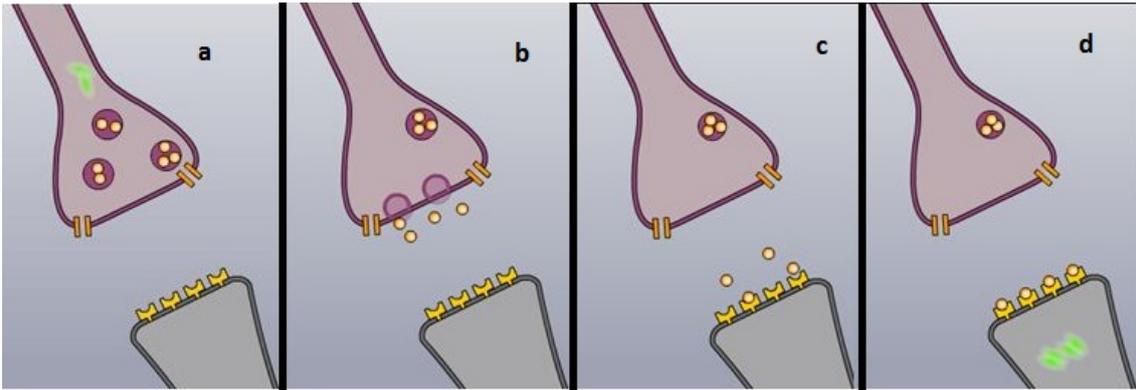


Figura 5: Representación de la transmisión de un impulso nervioso donde se detalla: a) transmisión del impulso nervioso a través del axón; b) liberación de los neurotransmisores al espacio sináptico; c) unión de los neurotransmisores a sus receptores; d) producción del potencial de acción.

Un potencial de acción implica la activación de dos canales iónicos diferentes: el canal de sodio selectivo y el canal de potasio (Fig. 6). En el músculo liso y muchas neuronas, los canales de sodio son sustituidos por canales de calcio dependientes de voltaje. Además, los iones de calcio que fluyen a través de estos canales intervienen en la liberación de neurotransmisores por exocitosis en el espacio sináptico de las terminaciones nerviosas (Kem, 2000).

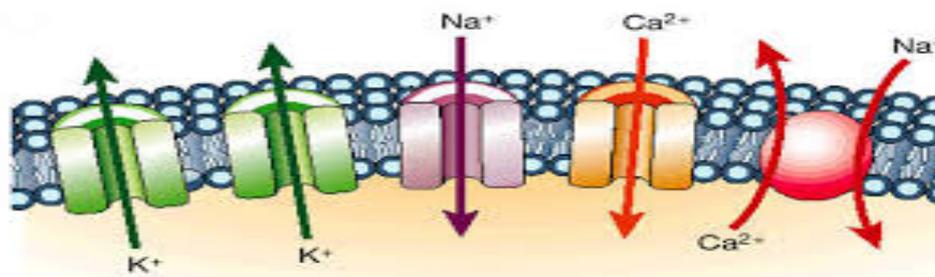


Figura 6: Imagen de los diferentes canales iónicos.

El sistema nervioso es una diana primaria para las toxinas, las cuales son capaces de interrumpir el correcto funcionamiento de todo el organismo (Aráoz y cols., 2010) (Fig. 7). La toxicidad solo se da cuando las toxinas son transportadas al interior de la célula, o bien, interactúan con los receptores o los canales específicos presentes en la membrana neuronal (Stillwell, 2013). Por lo tanto, casi todos los canales iónicos parecen ser un objetivo potencial de las toxinas naturales (Kem, 2000). Entre estas toxinas naturales se encuentran las cianotoxinas, de las cuales hay muchas con una ampliamente conocida actividad neurotóxica, como son saxitoxinas, anatoxina-a, homoanatoxina-a o nodularinas.

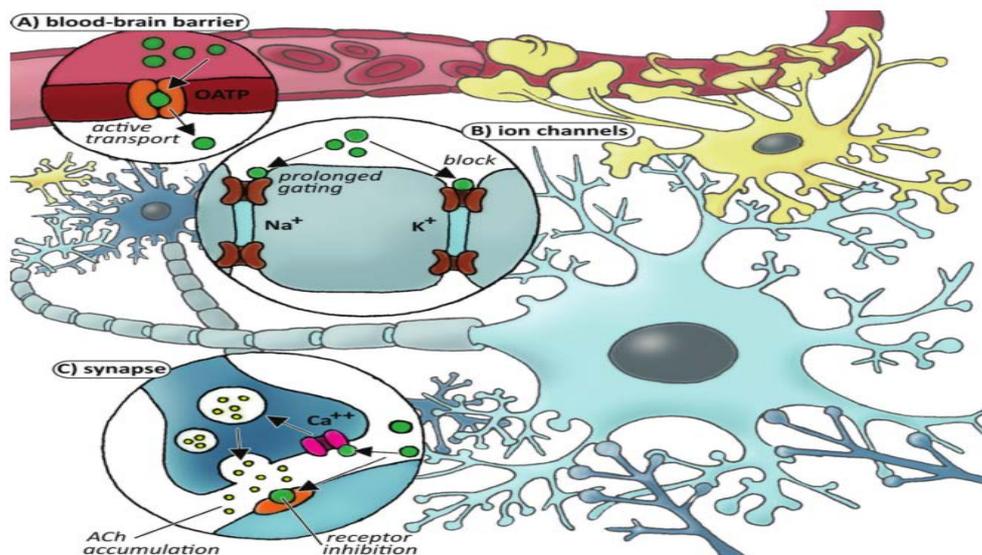


Figura 7: Principales dianas del sistema nervioso central de las cianotoxinas (ilustradas como círculos verdes).
a) Barrera hematoencefálica; b) Canales iónicos; c) Sinapsis. Tomado de Florczyk y cols. (2014).

La neurotoxicidad de las saxitoxinas radica en el bloqueo de los canales iónicos de sodio en la membrana celular del axón del nervio (van Apeldoorn y cols., 2007). Además, también se ha observado que estas toxinas pueden bloquear los canales de calcio (Su y cols., 2004). Los canales de sodio y de calcio están significativamente coordinados en la regulación de las vías de transducción de señales, incluyendo entre estas, la apoptosis y el ciclo celular, por lo que las saxitoxinas pueden afectar a los organismos a estos niveles (Belkacemi y cols., 2005). Las saxitoxinas también pueden afectar a las células lisas del músculo cardíaco al influir en los canales de potasio, lo que a su vez conduce a la alteración en el flujo de iones de la célula, conllevando a la alteración de la homeostasis celular (Wang y cols., 2003).

La anatoxina-a y la homoanatoxina-a son potentes agonistas de los receptores nicotínicos neuronal y muscular de ACh (Aráoz y cols., 2010). La anatoxina-a es un falso neurotransmisor que, al no ser degradado por la AChE, interactúa con el receptor nicotínico de manera continua, de forma que el canal permanece activo, lo que provoca un flujo constante de iones de sodio a las células, provocando la despolarización de la membrana (Valério y cols., 2010). Además, es capaz de inhibir de manera irreversible a la AChE y provocar así el aumento de la concentración de la ACh en el espacio sináptico, lo que tiene como consecuencia una estimulación continua del sistema neuronal (Molica y cols., 2005). La homoanatoxina-a aumenta la liberación de

ACh desde los nervios colinérgicos periféricos al provocar la apertura de canales neuronales endógenos dependientes de calcio de tipo L (Aas y cols., 1996; Lilleheil y cols., 1997).

Las nodularinas (NODs) requieren un transporte activo a través de la membrana celular, también pueden atravesar la barrera hematoencefálica usando, entre otros, un transportador Oatp/OATP (Feurstein y cols., 2010) o incluso algunos transportadores aún desconocidos. Los OATPs son miembros de la familia transportadora de solutos aniónicos orgánicos (SLCO). Estos SLCO median en la captación de una amplia diversidad de compuestos anfipáticos orgánicos como sales biliares, péptidos aniónicos, esteroides conjugados, hormona tiroidea y también ciertos medicamentos y xenobióticos (Florczyk y cols., 2014). Estos transportadores son independientes de los iones de sodio (Hagenbuch y Meier, 2004). Es conocido que algunos transportadores de iones orgánicos se expresan en diversos tejidos y otros se producen en un sólo tipo de órgano, como por ejemplo en el hígado y el cerebro (Fischer y cols., 2005).

Se pensaba que el transportador orgánico Oatp1b2 era específica del hígado de ratas y ratones pero un estudio demostró que sus transcripciones, así como las proteínas, se encontraban presentes en el cerebro (Fischer y cols., 2005). Se ha demostrado la expresión de cinco Oatps específicos de MCs en el ARNm en cerebro de roedores murinos, demostrando que están implicadas en la captación neuronal de MCs (Feurstein y cols., 2009, 2010).

4.1. Neurotoxicidad de las microcistinas

Al igual que las NODs, con quienes comparten parecido estructural, las MCs requieren un transporte activo para atravesar la membrana celular. El potencial neurotóxico de las diferentes variantes de MCs depende de la expresión y funcionalidad de los sistemas de transporte Oatps/OATPs en la barrera hematoencefálica (Feurstein y cols., 2010). Entre los efectos neurotóxicos que se han observado en peces expuestos a MCs, se encuentran cambios en el comportamiento y la actividad (Baganz y cols., 1998, 2004; Cazenave y cols., 2008; Kist y cols., 2011).

Dos especies de peces, *Danio rerio* (pez cebra) y *Leucaspis delineatus*, expuestas a un rango de concentraciones de 0,5-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ MC-LR, sufrieron una reducción significativa de la locomoción durante el día a concentraciones altas, mientras que la concentración más baja causó un aumento de la movilidad de los peces (Baganz y cols., 1998, 2004). Además, Los resultados mostraron diferencias en la actividad nocturna de ambas especies, viéndose reducida en *Danio rerio* tanto a las concentraciones más altas como las más bajas, y aumentadas en *Leucaspis delineatus* a las concentraciones más bajas. Además, los autores también encontraron que *Leucaspis delineatus* era significativamente más sensible a MC-LR, es decir, sufría los efectos de la toxina antes y durante más tiempo en comparación con *Danio rerio*. Estos resultados demuestran que las MCs son capaces de alterar los comportamientos y ritmos circadianos. Por otra parte, Cazenave y cols. (2008) estudiaron el impacto de MC-RR en el pez *Jenynsia multidentata*, demostrando una mayor actividad nocturna a las dosis más bajas (0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$), mientras que a dosis más elevadas (1 $\mu\text{g g}^{-1}$) no se observaron cambios significativos de la actividad natatoria. Estos cambios propusieron que la hiperactividad observada podría ser indicativa del estrés al que se encontraba sometido el pez, siendo esta hiperactividad un biomarcador de dicha toxicidad.

Un estudio realizado por Wang y cols. (2010a) mostró una sorprendente acumulación de MC-LR y una mejora en la actividad de la PP a nivel cerebral en *Danio rerio* después de 30 días de exposición a concentraciones entre 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los autores sugieren que la neurotoxicidad crónica de MC-LR podría inducir estrés oxidativo mediado por ERO y alterar las vías endocrinas de señalización, además de activar la vía de las PPs a través de la regulación por incremento de la PP2C en el cerebro del pez cebra. En concreto podría tratarse de una regulación positiva de PP2C α 2 tras la exposición a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR. No obstante, dosis letales (20 $\mu\text{g L}^{-1}$) de MC-LR inhibieron la actividad de la PP (Wang y cols., 2010a). La sobreexpresión de la PP2C α 2 conduce a la inhibición del ciclo celular en las fases G2/M, lo que inhibe la división celular, y a la apoptosis por medio de la vía de activación de la proteína quinasa p53 (Ofek y cols., 2003). La sobreexpresión de la PP2C α 2 podría estar involucrada en la interrupción de la vía de las proteínas quinasas AMPK y MAPK, lo que produce una

inhibición en la regulación del balance energético celular. Sin embargo, podría tratarse de un efecto compensatorio por parte de las células en respuesta al ataque de la toxina (Wang y cols., 2010b).

Además, esta exposición en el estudio de Wang y cols. (2010a) dio lugar a la alteración de los niveles de diferentes proteínas implicadas en el ensamblaje del citoesqueleto, transducción de señales, degradación proteica, metabolismo, transporte, apoptosis y traducción del ADN, además de otros trastornos en el citoesqueleto por la acumulación de tubulina plegable cofactor B (TFCB por sus siglas en inglés). La acumulación de dicha proteína produce una despolimerización en los microtúbulos, inhibición del crecimiento, daño en el axón, y en consecuencia, un importante deterioro neuronal (López-Fanarraga y cols., 2007). Los cambios en el citoesqueleto resultan en la pérdida de la estructura celular y además se crean obstáculos en la mitosis (Mezhoud y cols., 2008). Estas respuestas indican que la neurotoxicidad de la MC-LR en los peces es compleja y diversa, e involucra varias vías moleculares.

En el trabajo realizado por Wang y cols. (2010b) se observó un cambio en el proteoma del cerebro del pez cebra después de su exposición a MC-LR; asimismo también observaron que podría reducir los niveles de proteína Ywhai (perteneciente a la familia 14-3-3, un adaptador proteico específico de fosfoserina, que se une a la proteína Bad y previene la apoptosis). El descenso en la regulación de la proteína Ywhai produciría una liberación de proteína Bad fosforilada en el citoplasma, induciendo así una actividad pro-apoptótica.

Por otra parte, la exposición del nematodo *Caenorhabditis elegans* a MC-LR produjo cambios en la locomoción (Ju y cols., 2013). Estos autores encontraron pérdida neuronal y cambios morfológicos neuronales en las neuronas GABAérgicas, que tienen como neurotransmisor el GABA, cuya principal función es la inhibición de la excitabilidad neuronal del sistema nervioso, por lo que cambios en las neuronas GABAérgicas producirían una inhibición de la disminución de la excitación del sistema nervioso. No obstante, no observaron cambios en las neuronas colinérgicas, serotoninérgicas, dopaminérgicas o glutaminérgicas. Estos resultados mostraron una

potente neurotoxicidad de MC-LR, sugiriendo el diseño y planificación de nuevos estudios sobre la neurotoxicidad de las MCs. La prueba experimental que demuestre que las MCs son realmente capaces de causar efectos adversos en las neuronas puede provenir de estudios a nivel proteómico (Ju y cols., 2013).

El control de los biomarcadores de estrés oxidativo en los tejidos afectados son indispensables para indicar la complejidad de los efectos neurotóxicos producidos por las MCs (Ju y cols., 2013). Chen y cols. (2006) demostraron que la MC-LR afecta especialmente a la aldehído deshidrogenasa mitocondrial 2 (ALDH2) en cultivos celulares de hígado humano. De esta manera, en un ensayo posterior sobre *D. rerio* se observó una notable disminución en la expresión de la misma enzima (ALDH2) en el cerebro, lo cual coincidía con la expresión de la ALDH 9A1a (Wang y cols., 2010a). Estos daños provocan una disminución del metabolismo de los aldehídos, que es un claro indicador de daño en el ADN, inactivación enzimática o modificación proteica (Lindhal, 1992; O'Brien y cols., 2005).

Se han identificado seis proteínas diferentes en el hipocampo de ratas inducidas por MC-LR y que están implicadas, junto con la toxina, en el estrés oxidativo y en la respuesta apoptótica: proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de choque térmico (Hsp75), peroxirredoxina 2 (Prdx2), superóxido dismutasa (SOD) y fosfoproteína inducida por estrés (Stip1) (Li y cols., 2012). Los sistemas de defensa frente a ERO comprenden la inducción de estos marcadores (Hsp75, SOD y Prdx2). Posteriormente, los mismos autores demostraron la inducción de septina-5, internexina-a y sinucleína-a, conocidas por estar relacionadas con patologías neurodegenerativas y que podrían estar implicadas en la progresión del Alzheimer (Son y cols., 2005).

Por otra parte, Wang y cols. (2010a) demostraron que la isquemia transitoria en los cerebros de jerbo (*Dipus saggita*) disminuyó la expresión de ARNm de la beta-actina, debido al estrés oxidativo causado por MC-LR, coincidiendo con otros estudios que consideran la actina como objetivo directo de las modificaciones oxidativas (Fiaschi y cols., 2006; Lassing y cols., 2007). La beta-actina es una proteína mayoritaria de los filamentos de actina, presente en las áreas sinápticas donde desempeña un

papel importante en la adhesión celular, el crecimiento de neuritas (células nerviosas inmaduras) y la formación de sinapsis, además de estar involucrada en la liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico (Asanuma y cols., 1993; Sobue y Kanda, 1989). Esto demuestra que la disminución de los niveles de ARNm de beta-actina provoca estrés oxidativo, alteraciones del citoesqueleto o, incluso, muerte neuronal (Asanuma y cols., 1993).

Li y cols. (2012) demostraron que la MC-LR hiperfosforila a la proteína tau, la principal proteína de los microtúbulos neuronales asociados con el ensamblaje, la estabilización y el mantenimiento de la morfología normal de los microtúbulos axonales (Goode y cols., 1997). Los estudios han demostrado que la PP está involucrada en la regulación de la fosforilación de la proteína tau (Feurstein y cols., 2011). La inhibición de la actividad de la PP en las neuronas conlleva una hiperfosforilación y agregación de la proteína tau, provocando daños neuronales degenerativos y apoptosis, daño neuronal muy similar a los observados en el cerebro de pacientes con Alzheimer (Li y cols., 2012). Estos mismos autores también observaron deterioro de la memoria y de la función cognitiva en ratas expuestas a la MC-LR, deterioro que también se asocia con la enfermedad del Alzheimer como resultado de la inhibición de la PP.

Como resumen de los efectos neurotóxicos de las MCs, se puede destacar que son capaces de provocar cambios conductuales importantes, pérdida neuronal y cambios morfológicos severos. Producen inducción de estrés oxidativo e importantes cambios en el citoesqueleto, influyen en la actividad PP, producen hiperfosforilación de la proteína Tau y perturban la producción de energía y el metabolismo de los ácidos orgánicos.

4.2. Neurotoxicidad de la cilindrospermopsina

Aunque la CYN tiene un conocido efecto citotóxico, pocos son los trabajos donde se demuestra su actividad neurotóxica concretamente.

Un estudio llevado a cabo por Kiss y cols. (2002) sobre neuronas de dos especies de caracoles, *Helix pomatia* y *Lymnaea stagnalis*, demostró que tras exposición a CYN, había una notable disminución de la respuesta neuronal a la ACh, lo que disminuye la actividad del sistema nervioso. Estos datos no son de extrañar, ya que en cuanto a estructura química, la CYN está más relacionada con las neurotoxinas (saxitoxina), ya que presenta una mayor semejanza estructural con éstas que con las hepatotoxinas (MC-LR), como puede destacarse, por ejemplo, en la presencia de un núcleo de acetato guanidínico tanto en la CYN como en la saxitoxina, que como se verá posteriormente, está presente en las primeras etapas de la síntesis de algunas cianotoxinas neurotóxicas (Kiss y cols., 2002) (Fig. 8).

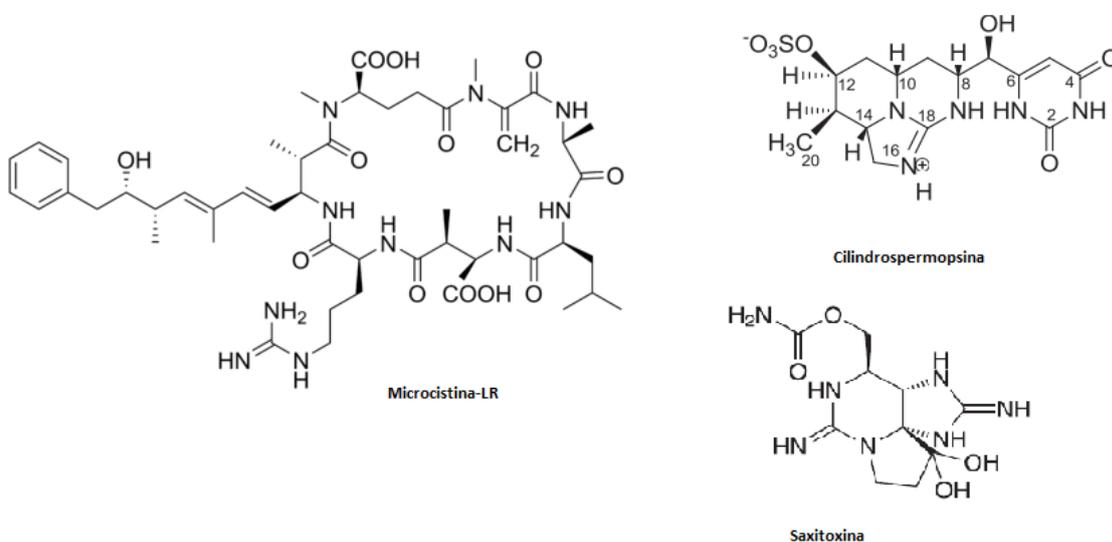


Figura 8: Comparación estructural de la CYN entre 2 compuestos: una hepatotoxina (MC-LR) y una neurotoxina (saxitoxina). Adaptado de Florczyk y cols. (2014)

Otro estudio demostró que los caimanes encontrados en el lago Griffin (Florida) durante una floración de *C. raciborskii* presentaban una respuesta clínica deprimida, reducción en la velocidad de la conducción nerviosa, degeneración axonal y necrosis en el mesencéfalo (Schoeb y cols., 2002).

Posteriormente, Zagatto y cols. (2012) estudiaron el efecto neurotóxico tras una inyección intraperitoneal del extracto de *C. raciborskii* en ratones de laboratorio. Dosis de 50 mg kg⁻¹ revelaron síntomas típicos de neurotoxicidad como temblores, ataxia, convulsiones y muerte por parada respiratoria en 1 ó 2 minutos. Además,

efectos de toxicidad aguda y crónica se observaron en *Daphnia similis* y *Ceriodaphnia dubia*, como inmovilización y reducción de la condición física, respectivamente; se observó toxicidad crónica en larvas de *Danio rerio* (Zagatto y cols., 2012).

El trabajo realizado por Saker y cols. (2003) mostró síntomas neurológicos en ratones al inyectar un extracto de *C. raciborskii* por vía intraperitoneal (1337-1572 mg kg⁻¹). Se observaron síntomas como piloerección, letargia y dificultades respiratorias que conducían a la muerte en un máximo de 24 horas tras su exposición.

Por otro lado, Guzmán-Guillén y cols. (2015) demostraron que los peces tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuestos a CYN presentaban neurotoxicidad por inhibición de la AChE y aumento en los niveles de LPO en cerebro. Más concretamente, se observó una inhibición de la actividad de la AChE del 35% y un incremento del 71% en la LPO después de una exposición a la toxina de 14 días. En este sentido, cuando se analizó el cerebro de los peces, se detectó la toxina en el 100% de las muestras analizadas en un rango de concentraciones de 0,83 a 5,48 ng/g, no obstante, no se observaron cambios macroscópicos que indicasen algún tipo de patología. Sin embargo, cuando las muestras de cerebro se estudiaron al microscopio óptico y electrónico se observaron procesos degenerativos e indicios de necrosis. Al microscopio óptico se observaron pequeñas neuronas necróticas y basófilos con bordes irregulares, además de procesos hiperémicos y hemorrágicos. La observación al microscopio electrónico del cerebro reveló alteraciones en el núcleo y el citoplasma de las neuronas, que muestran una densificación de la cromatina y vacuolas con bordes irregulares en el núcleo. La matriz citoplasmática aparece densificada, homogénea, oscura y con una fuerte vacuolización de todos los orgánulos membranosos. El neuropilo también mostró modificaciones vasculares, procesos hiperémicos, edema y microhemorragias.

El guanidinoacetato (GAA) es un compuesto estudiado por su implicación como intermediario en la síntesis de CYN, además puede afectar al sistema nervioso e inducir hiperhomocisteinemia, siendo un factor de riesgo cardiovascular (Barón-Sola y cols., 2015). La toxicidad del GAA ha sido atribuida a su capacidad de aumentar el número de ERO en diversos tejidos y la inhibición de la AchE en el córtex cerebral del gato común (*Felis silvestris catus*) (Mori y cols., 1996; Zugno y cols, 2008). De esta

manera, el sistema nervioso queda especialmente afectado por todas estas alteraciones. Además, el GAA actúa como un agonista de los receptores GABA_A neuronales y puede causar disfunción en las neuronas del globo pálido (Neu y cols., 2002).

Aunque los diferentes pasos implicados en la biosíntesis de CYN no están totalmente esclarecidos aún, hay evidencias genéticas y bioquímicas que indican que el GAA se forma en la primera etapa de la ruta metabólica debido a la actividad de una amidinotransferasa (Burgoyne y cols., 2000).

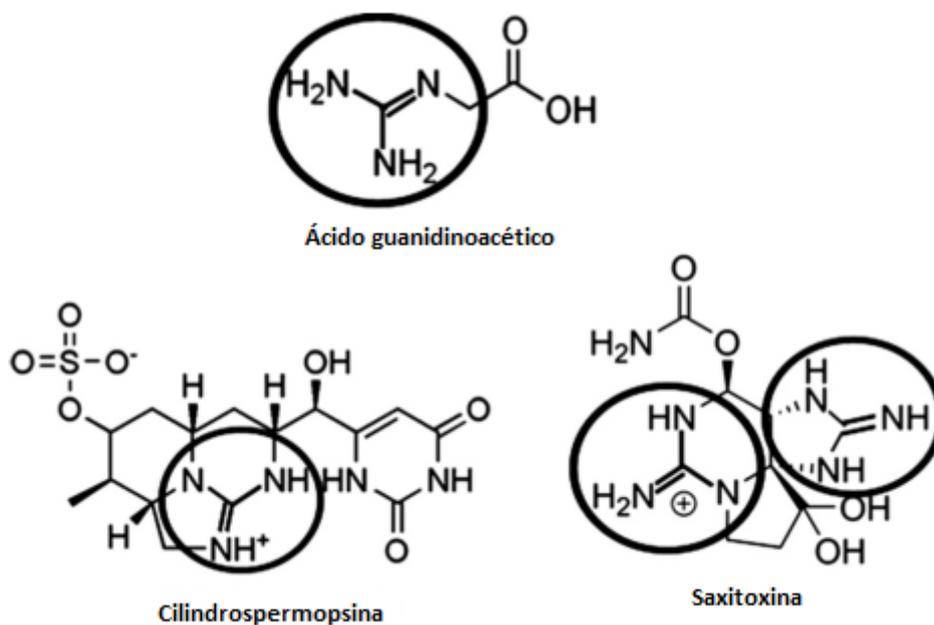


Figura 9: Ejemplos de compuestos guanidínicos sintetizados por cianobacterias. Adaptado de Barón-Sola y cols. (2015).

Barón-sola y cols. (2015) analizaron y compararon el contenido de GAA en cultivos de diversos tipos de cianobacterias, tanto productoras como no productoras de CYN. Los resultados obtenidos mostraron que el GAA se acumuló en todas las cepas estudiadas. Estos resultados mostraron la posibilidad de que el GAA contribuye a la toxicidad de las cianobacterias, y podría ser la causa de una mayor toxicidad en los extractos de cianobacterias en comparación con las cianotoxinas de manera aislada.

Si el GAA contribuye a la toxicidad de las cianobacterias, y forma parte de la síntesis de la CYN, es posible que esta también exerte efectos neurotóxicos similares

debido a las similitudes estructurales (Fig. 9). No obstante, no hay suficientes estudios que enfoquen al GAA como potenciador de la neurotoxicidad de la CYN.

Por lo tanto, como resumen de la neurotoxicidad de las CYN se destaca su capacidad de inhibir la actividad AchE, de aumentar la LPO y de inducir cambios histopatológicos importantes, como necrosis, procesos hiperémicos y microhemorrágicos.

Aunque actualmente existe cierta controversia sobre la neurotoxicidad de la CYN (Poniedziatek y cols., 2012) se deberían llevar a cabo más estudios en esta área para confirmar los efectos de la toxina a este nivel, de manera que la neurotoxicidad de la CYN no se puede excluir.

4.3. Neurotoxicidad conjunta de microcistinas y cilindrospermopsina

Aunque la mayoría de estudios referentes a los efectos tóxicos de las cianotoxinas se han llevado a cabo con exposiciones a las toxinas individuales, generalmente estas cianotoxinas no se encuentran aisladas en el entorno, ya que en los medios acuáticos donde proliferan las cianobacterias suelen concurrir varios tipos de especies productoras de diferentes toxinas (Florczyk y cols., 2014). Este hecho puede hacer variar la naturaleza y magnitud de los efectos en los organismos expuestos a las mismas, incluso producir un efecto sinérgico (Takser y cols., 2016).

Recientemente, Takser y cols. (2016) estudiaron los efectos, individualmente y en mezcla, de CYN, MC-LR y ATX-a, así como de la neurotoxina Beta-N-metilamino-L-alanina (BMAA), en la línea celular de murino RAW246.7. Observaron que la mezcla de CYN, MC-LR y ATX-a era más tóxica a nivel neuronal que la BMAA. Los resultados de este trabajo sugieren que la CYN tiene un potencial neuroinflamatorio importante, y que una mezcla de CYN, MC-LR y ATX-a es de 3 a 15 más potente en la inducción de apoptosis que estas toxinas de manera individual. La línea celular RAW246.7 ha sido propuesta como modelo de resultados inflamatorios de la neurodegeneración (Khono y cols., 2011; Collin-Osdoby y Osdoby, 2012), así como también han sido usadas las células BV-2 microgliales en estudios neuroinflamatorios (Henn y cols., 2009; Nelson y

cols., 2002). Ambas líneas han mostrado patrones similares en respuesta a la exposición a cianotoxinas, resultando más afectadas por CYN y por las mezclas de MC-LR, CYN y ATX-a. Ambas exposiciones mostraban una rápida muerte celular y producción de TNF- α en las células supervivientes, más que en exposiciones de MC-LR y ATX-a de manera individual (Takser y cols., 2016).

5. Conclusiones

Tras la revisión bibliográfica llevada a cabo, se puede concluir que:

- a) Las MCs son toxinas con gran actividad neurotóxica, capaces de provocar importantes cambios conductuales, pérdida neuronal y cambios morfológicos severos.
- b) Las MCs inducen estrés oxidativo a nivel cerebral y cambios en el citoesqueleto, provocando despolarización de los microtúbulos y daño axonal, entre otros.
- c) Las MCs influyen en la actividad PP, produciendo hiperfosforilación de la proteína Tau y perturbando la producción de energía y el metabolismo de los ácidos orgánicos en las neuronas.
- d) La CYN es capaz de afectar la respuesta neuronal frente a ACh, mediante la inhibición de la actividad AChE, aumentando los niveles de LPO y causando alteraciones histopatológicas a nivel cerebral.
- e) La mezcla de neurotoxinas demuestra que tiene un mayor potencial neurotóxico que dichas neurotoxinas de manera aislada, si bien los estudios a este respecto son muy escasos.

La dosis más baja de MC-LR a la que se ha detectado efecto ha sido a 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ en la especie *Jenynsia multidentata*. Con respecto a la CYN la concentración más baja con efecto aparente ha sido a 0,83 ng g^{-1} en la especie *Oreochromis niloticus*.

Como perspectivas futuras, sería interesante realizar más estudios y centrar más recursos en investigar la acción de las cianotoxinas de manera conjunta y no aislada, especialmente en busca de los efectos neurotóxicos, ya que es más común encontrar mezclas de cianotoxinas en el entorno que encontrarlas de manera aislada.

Además, también sería conveniente la realización de estudios que se centrasen en la acción sinérgica no sólo entre cianotoxinas, sino de estas cianotoxinas con compuestos intermediarios tales como el GAA.

Bibliografía

- Aas P, Eriksen S, Kolderup J, Lundy P, Haugen JE, Skulberg OM et al. Enhancement of acetylcholine release by homoanatoxin-a from *Oscillatoria formosa*. Environ Toxicol Pharmacol. 1996; 2: 223–232.
- Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. Toxicon. 2010; 56 (5): 813-898 .
- Asanuma M, N Ogawa, H Hirata, H Chou, Y Kondo, A Mori. Ischemia-induced changes in a-tubulin and b-actin mRNA in the gerbil brain and effects of bifemelane hydrochloride. Brain Res. 1993; 600: 243–248.
- Atencio L, Moreno I, Jos A, Pichardo S, Moyano R, Blanco A et al. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to Microcystis under laboratory conditions. Toxicon. 2008; 52(1): 1-12.
- Baganz D, Staaks G, Pflugmacher S, Steinberg CEW. Comparative study of microcystin-LR-induced behavioral changes of two fish species, *Danio rerio* and *Leucaspis delineatus*. Environ Toxicol Pharmacol. 2004; 19(6): 564–570.
- Baganz D, Staaks G, Steinberg CEW. Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. Water Res. 1998; 32(3): 948–952.
- Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Identification of Cylindrospermopsin in *Aphanizomenon Ovalisporum* (Cyanophyceae) Isolated From Lake Kinneret, Israel. J Pharmacol. 1997; 33(4): 613–616.
- Barón-Sola Á, Sanz-Alfárez S, del Campo FF. First evidence of accumulation in cyanobacteria of guanidinoacetate, a precursor of the toxin cylindrospermopsin. Chemosphere. 2015; 119: 1099–1104.
- Beasley VR, Lovell R A, Holmes KR, Walcott HE, Schaeffer DJ, Hoffmann WE, et al. Microcystin-LR decreases hepatic and renal perfusion, and causes circulatory

- shock, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascularly dosed swine. *J Toxicol Env Health A*. 200; 61: 281–303.
- Belkacemi L, Bédard I, Simoneau L, Lafond J. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: A review. *Cell Calcium*. 2005; 37(1): 1-8
- Briand J-F, Jacquet S, Bernard C, Humbert J-F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet Res*. 2003; 34(4): 361–77.
- Bu YZ, Li XY, Zhang BJ, Chung IK, Lee JA. Microcystins cause embryonic toxicity in mice. *Toxicol*. 2003; 48(8): 966–972.
- Burgoyne DL, Hemscheidt TK, Moore RE, Runnegar MTC. Biosynthesis of cylindrospermopsin. *J Org Chem*. 2000; 65(1): 152–156.
- Carneiro M, Gutiérrez-Praena D, Osório H, Vasconcelos V, Carvalho AP, Campos A. Proteomic analysis of anatoxin-a acute toxicity in zebrafish reveals gender specific responses and additional mechanisms of cell stress. *Ecotox Environ Safe*. 2015; 120(1): 93–101.
- Cazenave J, Nores ML, Miceli M, Díaz MP, Wunderlin DA, Bistoni MA. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res*. 2008; 42(4-5): 1299–1307.
- Chatziefthimiou AD, Metcalf JS, Glover WB, Banack SA, Dargham SR, Richer RA. Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. *Toxicol*. 2006; 114: 75–84.
- Chen T, Cui J, Liang Y, Xin X, Owen Young D, Chen C et al. Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicology*. 2006; 220(1): 71–80.

- 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.
- Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods in Mol Biol.* 2012; 816(1): 187–202.
- de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Gonçalves FJM, Pereira MJ. Microcystin-producing blooms: a serious global public health issue. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004; 59(2): 151–63.
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Ong CN. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ Res.* 1998; 78(1): 12–8.
- Doyle M. Nanotechnology: a brief literature review. *FRI.* 2006; 1: 1–10.
- Duy TN, Lam PK, Shaw GR, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2000; 163: 113–185.
- Falconer IR, Humpage AR. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *Int J Environ Res Public Health.* 2005; 2 (1): 43-50
- Falconer IR, Yeung DSK. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem Biol Interact.* 1992; 81(1-2): 181–196.
- Feurstein D, K Holst, A Fischer, DR Dietrich. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicol Appel Pharm.* 2009; 234: 247–255.
- Feurstein D, Kleinteich J, Heussner A H, Stemmer K, Dietrich DR. Investigation of microcystin congener-dependent uptake into primary murine neurons. *Environ Health Persp.* 2010; 118(10): 1370–1375.

- Feurstein D, K Stemmer, J Kleinteich, T Speicher, DR Dietrich. Microcystin congener- and concentration-dependent induction of murine neuron apoptosis and neurite degeneration. *Toxicol Sci.* 2011; 124: 424-431
- Fiaschi T, Cozzi G, Raugei G, Formigli L, Ramponi G, Chiarugi P. Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem.* 2006; 281(32): 22983–22991.
- Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharm.* 2005; 203(3): 257-263.
- Florczyk M, Łakomia A, Woêny M, Brzuzan P. Neurotoxicity of cyanobacterial toxins. *Environ Biotechnol.* 2014; 10(1): 26-43.
- Froschio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol.* 2003; 18(4): 243–251.
- Goode BL, PE Denis, D Panda, MJ Radeke, HP Miller, L Wilson, SC Feinstein. Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell.* 1997; 8: 353–365
- 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 Ángeles, Pichardo S, Moreno IM, Cameán AM. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem Toxicol.* 2013; 53: 139-152

- Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Cameán AM. Oxidative stress responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure cylindrospermopsin under laboratory conditions: Influence of exposure route and time of sacrifice. *Aquat Toxicol.* 2011; 105(1-2): 100–106.
- Guzmán-Guillén R, Manzano I L, Moreno I M, Ortega A I P, Moyano R, Blanco A, et al. Cylindrospermopsin induces neurotoxicity in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Aphanizomenon ovalisporum*. *Aquat Toxicol*, 2015; 161: 17–24.
- Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 2004; 447(5): 653–65.
- Harada K, Ohtani I, Iwamoto, K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M et al. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon.* 1994; 32(1): 73–84.
- Hawkins PR, Runnegar M T C, Jackson ARB, Falconer IR. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 50(5): 1292–1295.
- Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *Altex.* 2009; 26(2): 83–94.
- Herrero A, Flores E. *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution* | Book. 1^ª ed. Sevilla; 2008.
- Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M et al. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J Biol Chem.* 1990; 265(32): 19401–19404.

- Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardon DM, Cookson ST, Holmes CEM et al. Liver Failure and Death After Exposure To Microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Eng J Med.* 1998; 338(13): 873–878.
- Jos A, Pichardo S, Prieto, AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno I et al. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol.* 2005; 72(3): 261–271.
- Ju J, Ruan Q, Li X, Liu R, Li Y, Pu et al. Neurotoxicological evaluation of microcystin-LR exposure at environmental relevant concentrations on nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Pollut R*, 2013; 20(3): 1823–1830.
- Kem, WR. Properties and effects of natural toxins and venoms. En: Editor PL Williams, RC James, SM Roberts. *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications.* New York: John Wiley & Sons: 2000. P.409-432
- Kiss T, Vehovszky A, Hiripi L, Kovacs A. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comp Biochem Phys C.* 2002; 131(2): 167–176.
- Kist LW, Piato AL, Da Rosa JGS, Koakoski G, Barcellos, LJG Yunes et al. Acute exposure to microcystin-producing cyanobacterium *microcystis aeruginosa* alters adult zebrafish (*Danio rerio*) swimming performance parameters. *J Toxicol.* 2011;2011: 1-9
- Kohno S, Murata T, Sugiura A, Ito C, Iranshahi M, Hikita K et al. Methyl galbanate, a novel inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophage RAW264.7 cells. *J Nat Med*, 2011; 65(2): 353–359.
- Lassing I, Schmitzberger F, Björnstedt M, Holmgren A, Nordlund P, Schutt CE et al. Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin. *J Mol Biol.* 2007; 370(2): 331–48.

- Li G, Cai F, Yan W, Li C, Wang J. A proteomic analysis of MCLR-induced neurotoxicity: Implications for Alzheimer's disease. *Toxicol Sci.* 2012; 127(2): 485–495.
- Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu Y et al. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *J Physiol.* 2001; 37(6): 1121–1126.
- Liebel S, Oliveira CA, Silva RC, Ramsdorf WA, Cestari MM, Magalhães et al. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. *Toxicol in Vitro.* 2011; 25(7): 1493–1500.
- Lilleheil G, Andersen RA, Skulberg OM, Alexander J. Effects of homoanatoxin-A-containing extract from *Oscillatoria formosa* (Cyanophyceae/cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicon.* 1997; 35(8): 1275–1289.
- Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1992; 27(4-5): 283–335.
- Lopez-Fanarraga M, Carranza G, Bellido J, Kortazar D, Villegas JC, Zabala JC. Tubulin cofactor B plays a role in the neuronal growth cone. *J Neurochem.* 2007; 100(6): 1680–1687.
- Martínez G. Vigilancia de cianobacterias y microcistinas en puntos de baño del Área de Salud de Talavera de la Reina. *Revista de Salud Ambiental.* 2007; 7(1): 79
- Metcalf JS, Lindsay J, Beattie KA, Birmingham S, Saker MLK, Codd GA. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: Comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon.* 2002; 40(8): 1115–1120.
- Mezhoud K, AL Bauchet, S Château-Joubert, D Praseuth, A Marie, JC François et al. Proteomic and phosphoproteomic analysis of cellular responses in medaka fish (*Oryziaslatipes*) following oral gavage with microcystin-LR. *Toxicon.* 2008; 51: 1431–1439.

- Molica RJR, Oliveira EJA, Carvalho PVVC, Costa ANSF, Cunha MCC, Melo GL et al. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae*. 2005; 4(4): 743–753.
- Mori A, Kohno M, Masumizu T, Noda Y, Packer L. Guanidino compounds generate reactive oxygen species. *Biochem Mol Biol Int*. 1996; 40(1): 135–143.
- Neilan BA, Dittmann E, Rouhiainen L, Bass RA, Schaub V, Sivonen K et al. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol*. 1999; 181(13): 4089–4097.
- Nelson PT, Soma LA, Lavi E. Microglia in diseases of the central nervous system. *Ann Med*. 2002; 34(7-8): 491–500.
- Neu A, Neuhoff H, Trube G, Fehr S, Ullrich K, Roeper J et al. Activation of GABA(A) receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism. *Neurobiol Dis*. 2002; 11(2): 298–307.
- Nong Q, Komatsu M, Izumo K, Indo HP, Xu B, Aoyama et al. Involvement of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced cytogenotoxicity. *Free Radic Res*, 2007; 41(12): 1326–37.
- Norris RLG, Eaglesham GK, Shaw GR, Senogles P, Chiswell RK, Smith MJ et al. Extraction and purification of the zwitterions cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol*. 2001; 16(5): 391–396.
- O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol*. 2005; 35(7): 609–662.
- Ofek P, Ben-Meir D, Kariv-Inbal Z, Oren M, Lavi S. Cell Cycle Regulation and p53 Activation by Protein Phosphatase 2C α . *J Biol Chem*. 2003; 278(16): 14299–14305.

- Ohtani I, Moore RE, Runnegar MT. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green algae *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc.* 1992; 114: 7941–7942
- Pflugmacher S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquat Toxicol.* 2004; 70(3): 169–178.
- Pichardo S, Jos A, Zurita JL, Salguero M, Cameán AM, Repetto G. Acute and subacute toxic effects produced by microcystin-YR on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Toxicol in Vitro.* 2007; 21(8): 1460–1467.
- Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Moreno I, Cameán AM. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol.* 2007; 84(3): 337–345.
- Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno I, Cameán AM. Protective role of vitamin E on the microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol and Chem.* 2008; 27(5): 1152–9.
- Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno I, De Sotomayor M, Moyano R et al. Time-dependent protective efficacy of trolox (vitamin E analog) against microcystin-induced toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol.* 2009; 24(6): 563–579.
- Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Miguel-Carrasco JL et al. Subchronic effects of cyanobacterial cells on the transcription of antioxidant enzyme genes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicol.* 2011; 20(2): 479–490.
- Puerto M, Jos A, Pichardo S, Gutiérrez-Praena D, Cameán AM. Acute effects of pure cylindrospermopsin on the activity and transcription of antioxidant enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. *Ecotoxicol.* 2011; 20(8): 1852–1860.

- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán. Microcystin-LR induces toxic effects in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Arch Toxicol*. 2010; 84(5): 405–410.
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán. Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Toxicon*. 2009; 54(2): 161–169.
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán A. M. Oxidative stress induced by microcystin-LR on PLHC-1 fish cell line. *Toxicol Vitro*. 2009; 23(8): 1445–9.
- Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Moreno I, Jos A, Moyano R et al. Effects of dietary N-acetylcysteine on the oxidative stress induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Environ Toxicol Chem*. 2009; 28(8): 1679–86.
- Poniedziałek B, Rzymiski P, Kokociński M. Cylindrospermopsin: Water-linked potential threat to human health in Europe. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012; 34(3): 651–660.
- Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 1995; 49(2): 219–225.
- Saker ML, Nogueira ICG, Vasconcelos VM. Distribution and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) in Portuguese freshwaters. *Limnetica*. 2003; 22: 131–138.
- Schoeb TR, Heaton-Jones TG, Clemmons RM, Carbonneau DA, Woodward AR, Shelton D et al. Clinical and necropsy findings associated with increasing mortality among American alligators of Lake Griffin, Florida. *J. Wildlife Dis*. 2002; 39: 320–337.
- Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, Shaw G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the

- freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. Harmful Algae. 2007; 6(1): 73–80.
- Shen X, Lam PKS, Shaw GR, Wickramasinghe W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. Toxicol. 2002; 40(10): 1499–1501.
- Silva RC, Neto F, Oliveira CA, Azevedo SMFO, Magalhaes VF . Cylindrospermopsin effects on primary cultured hepatocytes of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. In: The 8th International Conference on Toxic Cyanobacteria, Istanbul, August 29th–September 4th ; 2010, pp. 188.
- Singh S, Rai PK, Chau R, Ravi AK, Neilan BA, Asthana RK. Temporal variations in microcystin-producing cells and microcystin concentrations in two fresh water ponds. Water Res, 2015; 69: 131–142.
- Sivonen K, Jones J. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Freshwater Biol. 2003; 48: 1540–1550
- Sobue K, Kanda K. α -Actinins, Calspectin (Brain Spectrin or Fodrin), and Actin Participate in Adhesion and Movement of Growth Cones. Neuron. 1989; 3(3): 311–319.
- Son JH, Kawamata H, Yoo MS, Kim DJ, Lee YK, Kim SY et al. Neurotoxicity and behavioral deficits associated with Septin 5 accumulation in dopaminergic neurons. J Neurochem. 2005; 94(4): 1040–1053.
- Song W, Teshiba T, Rei, K, O’Shea K E. Ultrasonically induced degradation and detoxification of microcystin-LR (Cyanobacterial Toxin). Environ Sci Technol 2005; 39(16): 6300–6305.
- Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepistö L, Metcalf JS et al. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). Environ Toxicol. 2006; 21(6): 552–560.

- Stillwell W. Membrane Transport. In *An Introduction to Biological Membranes*; 2013: 305–337.
- Su Z, Sheets M, Ishida H, Li F, Barry WH. Saxitoxin Blocks L-Type ICa. *J Pharm Exp Ther*, 2004; 308(1): 324–329
- Takser L, Benachour N, Husk B, Cabana H, Gris D. Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects in murine brain cells: potential implications for neurodegenerative diseases. *Toxicol Rep*.2016; 3: 180–189.
- Valério E, Chaves S, Tenreiro R. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. *Toxins*. 2010; 2(10): 2359-2410
- Van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nut Food Res*. 2007; 51(1): 7-60
- Walsby A E. Gas vesicles. *Microbiol Rev*. 1994; 58(1): 94–144.
- Wang J, Salata JJ, Bennett PB. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K⁺ channels. *J Gen Physiol*. 2003; 121(6): 583–598.
- Wang M, Wang D, Lin L, Hong H. Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) brains exposed to chronic microcystin-LR. *Chemosphere*. 2010; 81(6): 716–724.
- Wang M, LL Chan, M Si, H Hong, D Wang. Proteomic analysis of hepatic tissue of zebrafish (*Danio rerio*) experimentally exposed to chronic microcystin-LR. *Toxicological Sciences*. 2010; 113: 60–69.
- Wei Y, Weng D, Li F, Zou X, Young DO, Ji J et al. Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. *Apoptosis*. 2008; 13(8): 1031–1042.
- Wimmer KM, Strangman, WK, Wright JLC. 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin

analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. Harmful Algae. 2014; 37: 203–206.

Woese CR. On the evolution of cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(13): 8742–8747.

Wood, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. Environ Int. 2016; 91: 276–282.

World Health Organization. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Informe de un Grupo científico de la OMS. Ginebra: OMS; 1994.

Wormer L, Cirés S, Carrasco D, Quesada A. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. Harmful Algae. 2008; 7(2): 206–213.

Zagatto PA, Buratini SV, Aragao MA, Ferrao-Filho AS. Neurotoxicity of two *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) strains to mice, Daphnia and fish. Environ Toxicol Chem. 2012; 31_ 857–862.

Zhang H, Zhang J, Chen Y, Zhu Y. Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. Fish Physiol Biochem. 2008; 34(4): 307–312.

Zugno AI, Stefanello FM, Scherer EBS, Mattos C, Pederzoli CD, Andrade VM et al. Guanidinoacetate decreases antioxidant defenses and total protein sulfhydryl content in striatum of rats. Neurochem Res. 2008; 33(9): 1804–1810.