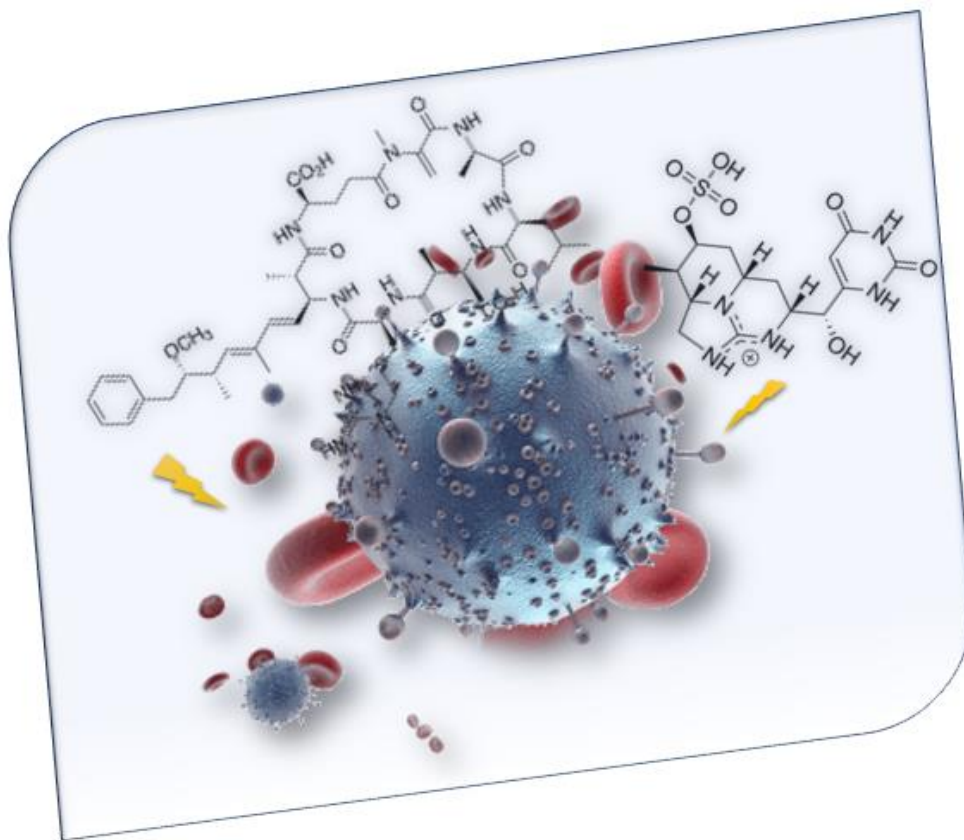




INMUNOTOXICIDAD INDUCIDA POR CIANOTOXINAS: MICROCISTINAS Y CILINDROSPERMOPSINA



María del Monte Benítez González

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla



Trabajo Fin de Grado de **carácter bibliográfico**

Grado en Farmacia

**“INMUNOTOXICIDAD INDUCIDA POR CIANOTOXINAS:
MICROCISTINAS Y CILINDROSPERMOPSINA”**

Tutoras: Dra. Ángeles Jos Gallego y Dra. María Puerto Rodríguez

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal.

Área de Toxicología.

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

María del Monte Benítez González

Julio de 2018

RESUMEN

Las cianobacterias son bacterias Gram negativas fotosintéticas capaces de producir floraciones a nivel mundial. Estas cianobacterias pueden producir también cianotoxinas perjudiciales para la salud de humanos, animales y plantas, y pueden actuar como hepatotoxinas, citotoxinas, neurotoxinas o dermatotoxinas. Las cianotoxinas de mayor interés son las microcistinas (MC) y la cilindrospermopsina (CYN) por su extensa distribución y toxicidad. Aunque se conoce que principalmente las MC son hepatotóxicas y la CYN citotóxica, se ha observado que pueden producir alteraciones en otros órganos y sistemas, de los cuales el sistema inmune está aún escasamente estudiado. La presente revisión tiene, por tanto, como objetivo poner de manifiesto en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* las alteraciones que se producen en el sistema inmune tras la exposición a estas cianotoxinas y la importancia que ello tiene en la respuesta inmunitaria. Tras la realización de una búsqueda bibliográfica se seleccionaron veintitrés y siete artículos relacionados con la inmunotoxicidad de MC y CYN, respectivamente. En ellos se evidencia el efecto de las MC sobre la proliferación de los linfocitos y la expresión de múltiples citoquinas, entre otros. Así mismo, se ha observado el efecto de la CYN sobre la viabilidad y capacidad de los linfocitos a pesar de que los estudios de inmunotoxicidad sobre ésta sean escasos. Por tanto, ambas cianotoxinas presentan potencial inmunotóxico que debería ser estudiado en mayor profundidad, especialmente en el caso de la CYN.

PALABRAS CLAVE: cianobacterias, microcistinas, cilindrospermopsina, inmunotoxicidad

ÍNDICE

1. Introducción.....	5
1.1. Cianobacterias y cianotoxinas.....	5
1.2. Microcistinas.....	7
1.3. Cilindrospermopsina.....	9
1.4. Sistema Inmune.....	10
2. Objetivos.....	12
3. Metodología.....	13
4. Resultados y discusión.....	14
4.1. Inmunotoxicidad inducida por MC.....	14
4.1.1. Efecto de las MC sobre los linfocitos.....	23
4.1.2. Efecto de las MC sobre la expresión de citoquinas.....	24
4.1.3. Cambios morfológicos producidos por las MC.....	24
4.1.4. Otros efectos producidos por las MC.....	25
4.2. Inmunotoxicidad inducida por CYN.....	25
4.3. Discusión general.....	26
5. Conclusiones.....	30
6. Bibliografía.....	31

ABREVIATURAS

Células NK	células Natural Killer
CINC-2 $\alpha\beta$	neutrófilos quimioattractores inducidos por citoquinas-2
ConA	conavalina A
ERO	especies reactivas de oxígeno
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
IFN-1	interferón-1
IFN- γ	interferón gamma
IL-	interleuquina
iNOS	óxido nítrico sintasa inducida
i.p.	intraperitoneal
LPS	lipopolisacáridos
NO	óxido nítrico
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
PNM	polimorfonucleares
TGF	factor de crecimiento β
TNF- α	factor de necrosis tumoral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS

Las cianobacterias son un conjunto de bacterias procariotas Gram negativas, conocidas comúnmente como algas verde-azuladas (Msagati et al., 2006). Estas cianobacterias son capaces de crear floraciones en lagos y embalses de agua dulce eutróficos, debido a que estas aguas contienen gran cantidad de nitrógeno y de fósforo que facilitarían su crecimiento (Chen et al., 2016, 2004). Además, como consecuencia de la contaminación antropogénica y el cambio climático su crecimiento se incrementa con respecto a otros grupos de fitoplancton (ej. diatomeas y algas verdes), al darse unas condiciones óptimas para su proliferación por el aumento de temperatura y altos niveles de CO₂ (Li et al., 2016; Rymuszka y Adaszek, 2013).

Las floraciones de cianobacterias se encuentran mayormente en regiones tropicales (Saker y Eaglesham, 1999), aunque debido a la contaminación de las aguas y al calentamiento global, hoy día se encuentran mundialmente distribuidas (Fig. 1), llegando a encontrarse incluso en ambientes extremos como en el ártico y el antártico (Aráoz et al., 2010). De hecho, las floraciones de cianobacterias son un problema endémico en países como China (Shen et al., 2003) (Fig. 2).



Figura 1: Distribución de cianobacterias a nivel mundial (Buratti et al., 2017)



Figura 2: Floración de cianobacterias en el lago Taihu (China) debido a la eutrofización de las aguas (Fuente: *elmundo.es ciencia y ecología*)

Las cianobacterias presentan una serie de características que les permiten tener ciertas ventajas sobre otros organismos, ya que poseen unas vesículas de gas que les posibilita moverse en el agua y posicionarse donde adquieran unas condiciones óptimas de temperatura y de nutrientes (Msagati et al., 2006; Walsby et al., 2006). Por ello, son capaces de proliferar en las capas superiores del agua produciendo anoxia en el área de crecimiento y ocasionando la muerte de organismos acuáticos (Yan et al., 2017). Además, pueden llegar a provocar un cambio en el color, olor y sabor del agua así como graves riesgos para la salud de humanos, animales y plantas por la producción de toxinas (Chen et al., 2016; Dörr et al., 2010).

Las toxinas producidas por las diferentes especies de cianobacterias son conocidas como cianotoxinas y pueden clasificarse según su mecanismo de acción en cuatro grupos (Codd, 2000; Codd et al., 2005; Mankiewicz-Boczek et al., 2011; Msagati et al., 2006):

- a) Hepatotoxinas: dentro de este grupo podemos encontrar microcistinas (agua dulce) y nodularinas (agua salada) que provocan hemorragias masivas, alteraciones en el hígado de mamíferos y, algunos efectos adversos en el riñón.
- b) Neurotoxinas: en este otro grupo podemos encontrar alcaloides como anatoxina-a o saxitoxina que pueden producir un bloqueo neuromuscular.

- c) Citotoxinas: destaca la cilindrospermopsina, inhibidor de la síntesis proteica. Causa lesiones necróticas generalizadas en mamíferos (hígado, pulmones, riñones, intestino, etc.) y en otros organismos.
- d) Dermatotoxinas: encontramos lyngbyatoxina A, apysiatoxina y lipopolisacáridos que pueden causar, principalmente, irritación de la piel e inducción de tumores.

De todas ellas, las más estudiadas son las microcistinas (MC) y la cilindrospermopsina (CYN) debido a su amplia distribución y toxicidad. Las MC, concretamente la microcistina-LR (MC-LR), junto con la CYN, fueron las responsables de la muerte de 70 pacientes que sufrían insuficiencia renal en el estado de Pernambuco (Brasil), debido a que el agua usada en la hemodiálisis estaba contaminada por estas cianotoxinas (Soares et al., 2006).

La exposición humana a cianotoxinas puede tener lugar a través de varias rutas. Así, además de la vía parenteral, también cabe destacar la dérmica (a través del baño o actividades recreativas acuáticas en aguas contaminadas) y, principalmente, la oral (al consumir agua de bebida o alimentos contaminados) suponiendo un peligro para la salud (Žegura et al., 2011) y un interesante objeto de estudio.

1.2. MICROCISTINAS

Las MC son producidas por los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* y *Oscillatoria* (Shen et al., 2003), entre otros. Son heptapéptidos cíclicos que poseen una estructura general compuesta por diferentes aminoácidos: D-alanina (posición 1), ácido D-metilaspártico (posición 3), 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienoico o Adda (posición 5), ácido D-glutámico (posición 6) y N-metildehidroalanina (posición 7), así como dos aminoácidos en la posición 2 y 4, que normalmente son L-aminoácidos (Chen et al., 2004) (Fig. 3).

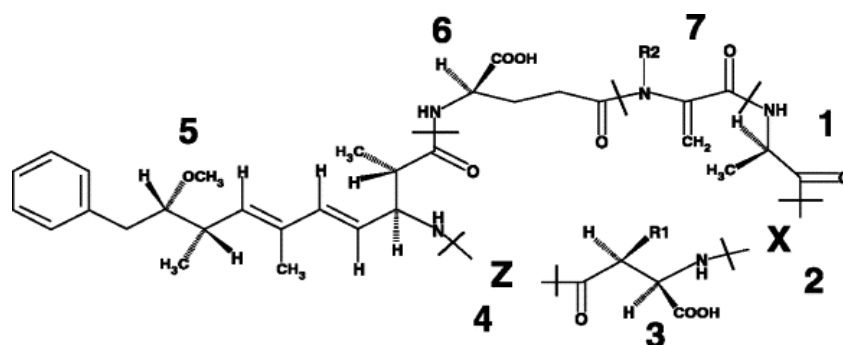


Figura 3: Estructura general de las MC (Chen et al., 2004)

Las MC son las cianotoxinas más extendidas y comprenden un grupo de más de 100 variantes estructurales (Spoof y Catherine, 2017), donde los aminoácidos de la posición 2 y 4 pueden cambiar, siendo la variante más común, y que más toxicidad presenta, la microcistina-LR (MC-LR), que contiene un residuo de leucina en la posición 2 y un residuo de arginina en la posición 4 (Kujbida et al., 2008). Otras variantes importantes son la microcistina-RR (MC-RR) que contiene en la posición 2 y 4 un residuo de arginina, y la microcistina-YR (MC-YR) que contiene un residuo de tirosina en la posición 2 y un residuo de arginina en la posición 4 (Kujbida et al., 2008; Zhong et al., 2017).

Según su mecanismo de acción son principalmente hepatotóxicas debido al aminoácido Adda, puesto que inhibe la actividad de las fosfatasa PP1 y PP2A tanto *in vivo* como *in vitro* causando cambios en la morfología y en la funcionalidad de los hepatocitos (Fontanillo y Köhn, 2018; Kujbida et al., 2006). Sin embargo, la hepatotoxicidad no es el único daño que pueden llegar a causar, ya que hay evidencias de que pueden producir estrés oxidativo y ser promotores de tumores (Gutiérrez-Praena et al., 2013). De hecho, en 2010 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a la MC-LR en el grupo 2B como "posiblemente carcinógeno para los humanos" (IARC, 2010). Además, diversos estudios han informado sobre la genotoxicidad producida por la MC-LR, que puede causar roturas en las cadenas del ADN, mutaciones de las bases, inducir daño oxidativo e interferir en las vías de reparación del daño del ADN (Liu y Le, 2015; Žegura et al., 2011). Asimismo, hay hallazgos que demuestran que las MC pueden inducir apoptosis de linfocitos humanos, pollos y peces provocando por tanto alteraciones de importancia en el sistema inmune de éstos (Zhang et al., 2006).

1.3. CILINDROSPERMOPSINA

La CYN es una cianotoxina emergente producida por los géneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Umezakia* y *Anabaena* (Aráoz et al., 2010; Codd, 2000), entre otros. La principal especie productora, de gran interés, es *Cylindrospermopsis raciborskii*, que llegó a causar un brote severo de hepatointeritis en 140 niños y 10 adultos en Australia (Humpage et al., 2000).

Con respecto a su estructura, la CYN es un alcaloide tricíclico con un resto guanidínico central combinado con un grupo hidroximetiluracilo (Ohtani et al., 1992; Pichardo et al., 2017) (Fig. 4). Sin embargo, por su estructura, existen pocas variantes siendo las más conocidas la 7-epi-cilindrospermopsina (7-epi-CYN), que ha demostrado toxicidad, y la 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxi-CYN), que parece no ser tóxica (Guzmán-Guillén et al., 2015; Rzymiski y Poniedziałek, 2014). Además, su estructura hace que sea una molécula altamente soluble en agua debido a su naturaleza zwitteriónica (Chiswell et al., 1999), es muy estable a la luz visible y ultravioleta y, puede soportar diferentes rangos de pH y de temperatura (Poniedziałek et al., 2012).

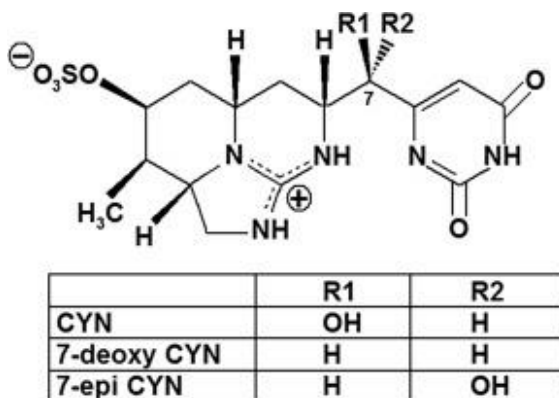


Figura 4: Estructura y análogos de CYN (Rzymiski y Poniedziałek, 2014)

Según su mecanismo de acción es citotóxica, afectando principalmente al hígado y llegando a causar lesiones en diferentes órganos (corazón, timo, bazo y riñones), al inhibir irreversiblemente la síntesis de proteínas (Gutiérrez-Praena et al., 2011a; Hercog et al., 2017; Young et al., 2008). Además, presenta actividad genotóxica al unirse de manera covalente al ADN (Maire et al., 2010; Shen et al., 2002), induce estrés oxidativo debido a la reducción de los niveles de glutatión (GSH) y de la enzima glutatión-S-transferasa (GST)

(Gutiérrez-Praena et al., 2011b) y, cuando CYN es metabolizada por el citocromo P450 su toxicidad en los hepatocitos es mayor (Pichardo et al., 2017). Asimismo, se ha observado que produjo toxicidad fetal en ratones provocando nacimientos prematuros o la muerte y, que provocó degeneración y necrosis de linfocitos, así como linfocitosis, aunque la inmunotoxicidad de CYN aún no está ampliamente estudiada (Poniedziałek et al., 2012).

1.4. SISTEMA INMUNE

El sistema inmune es la defensa natural del cuerpo contra infecciones y bacterias. Para ello, es necesario que las células que lo componen actúen correctamente generando una respuesta inmunitaria frente a cualquier estímulo extraño. Estas células realizarán funciones diferentes en la defensa del organismo y son, principalmente, linfocitos (B y T), células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos, linfocitos B) y células efectoras (granulocitos, macrófagos y linfocitos T). Según la función que desempeñen las células que lo componen, pueden darse dos tipos de respuesta inmune: inmunidad innata o natural e inmunidad adaptativa o adquirida. Los mecanismos de defensa innatos y los adquiridos actúan simultáneamente y muchos componentes del sistema inmune participan en ambos tipos de respuesta (Fig. 5) (Abbas et al., 2016).

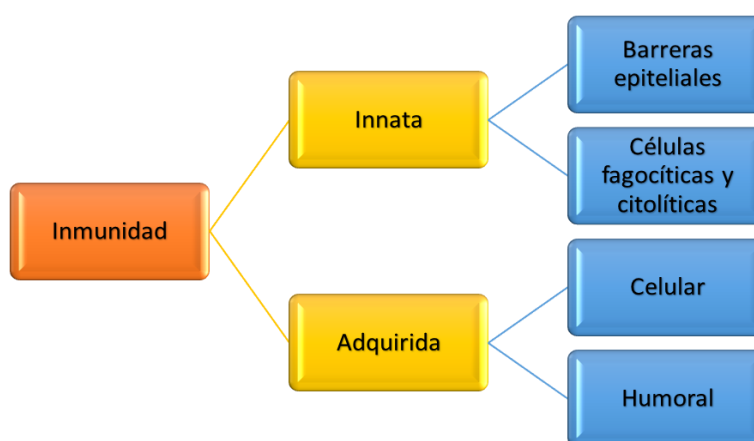


Figura 5: Tipos de inmunidad

La inmunidad innata es inespecífica y constituye la primera línea de defensa del organismo. El sistema inmunitario innato está compuesto por:

- Células epiteliales que proporcionan una barrera física formada por la queratina y el moco secretado por las células mucosas, y una barrera química al producirse péptidos antibióticos (ej. defensinas) y linfocitos T.
- Fagocitos, que son células que actúan una vez superada la barrera epitelial y se encargan de ingerir y producir la lisis de la sustancia invasora. Hay dos tipos de fagocitos: neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMN) estimulados por el factor estimulador de colonias (CSF), y monocitos que se diferencian en macrófagos en el tejido afectado. Los macrófagos realizan funciones importantes en la defensa del huésped puesto que producen citoquinas que van a regular la inflamación, destruyen sustancias extrañas y se encargan de la reparación tisular (Fig. 6).

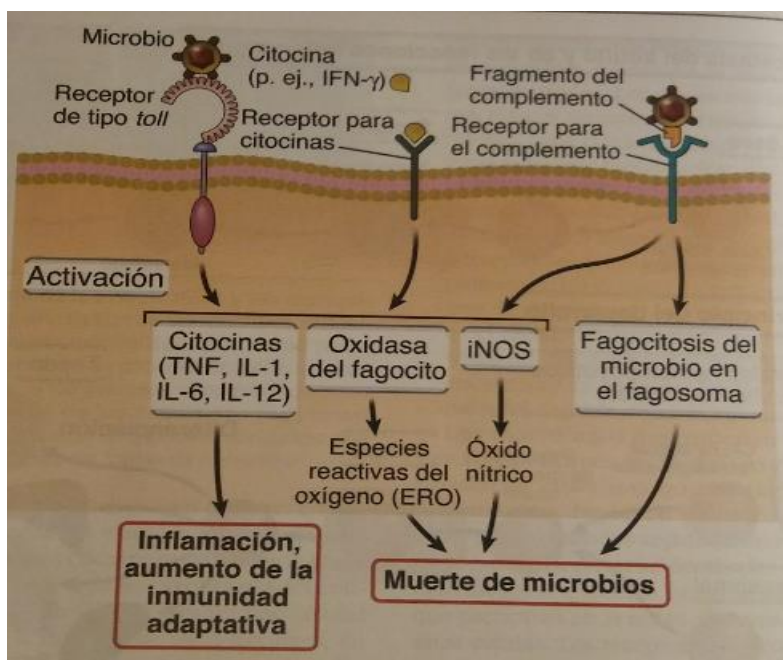


Figura 6: Activación y funciones de los macrófagos (Abbas et al., 2016)

- Células dendríticas encargadas de sintetizar numerosas citoquinas que van a mediar tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa.
- Linfocitos citolíticos naturales conocidos como células NK (células *natural killer*) que se encargan de destruir las células dañadas y las células infectadas. Además, van a responder a la liberación de interleuquina IL-2 (IL-2) por los macrófagos, secretando interferón γ (IFN- γ) que activará a su vez a éstos para eliminar las células fagocitadas.

Por otro lado, la inmunidad adaptativa es específica y más lenta debido a que es una defensa más especializada. Dentro de esta inmunidad podemos encontrar:

- Inmunidad humoral, formada por linfocitos B que van a favorecer la liberación de anticuerpos al torrente sanguíneo que reconocerán a los antígenos de la sustancia invasiva y ayudarán a detener y eliminarlas de la sangre, plasma y aparatos respiratorio y digestivo. Por tanto, se trata de un mecanismo de defensa contra las sustancias que actúan extracelularmente.
- Inmunidad celular, mediada por linfocitos T que se van a encargar de eliminar sustancias fagocitadas por los macrófagos (linfocitos T cooperadores) o destruir células infectadas (linfocitos T citotóxicos), por lo que a diferencia del anterior es un mecanismo de defensa contra sustancias intracelulares.

Estos aspectos básicos sobre el sistema inmune son necesarios para comprender cómo afectan las diferentes cianotoxinas en los diversos mediadores y tipos celulares implicados en la inmunidad innata y adaptativa.

2. OBJETIVOS

La presente revisión bibliográfica está centrada en recopilar y revisar los datos disponibles en la literatura científica sobre la inmunotoxicidad de diferentes cianotoxinas, concretamente MC y CYN. El objetivo principal será poner de manifiesto las alteraciones inducidas tras la exposición a estas cianotoxinas en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes biomarcadores específicos del sistema inmune y en sus propios componentes celulares.

3. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo la elaboración de la presente revisión bibliográfica se han empleado diversas bases de datos y fuentes bibliográficas. Las principales bases de datos usadas fueron ScienceDirect, PubMed y Google Académico llegando a utilizar hasta cuatro palabras claves para la búsqueda, tales como “microcystin”, “cylindrospermopsin”, “immunotoxicity” y “cyanobacteria”.

En la figura 7, se representa gráficamente cuál ha sido el número de publicaciones totales disponibles según las palabras claves de interés relacionadas con la inmunotoxicidad en la base de datos ScienceDirect.

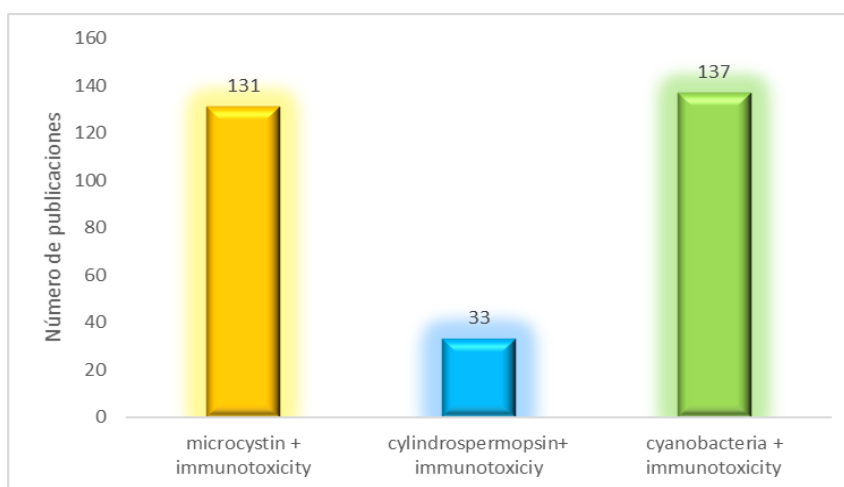


Figura 7: Volumen de artículos de CYN y MC en relación con las palabras claves

La búsqueda no se acotó a una franja de años, por lo que se puede comprobar que la inmunotoxicidad de estas cianotoxinas es un campo poco estudiado. Tras la lectura de los abstracts y/o títulos del total de artículos, finalmente se seleccionaron veintitrés sobre MC y siete sobre CYN. No obstante, se han tenido en consideración también otros artículos relativos a estas cianotoxinas no centrados en su inmunotoxicidad con el fin de completar la información.

Como fuentes bibliográficas se han usado también los textos “Inmunología básica” e “Inmunología celular y molecular” de los editores Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman y Shiv Pillai, respectivamente, para ayudar a comprender algunos aspectos básicos del

sistema inmune. Así como “Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis” de los editores Jussi Meriluoto, Lisa Spoof y Geoffrey A. Codd para completar la información sobre las cianobacterias y cianotoxinas.

Además, como herramienta de ayuda para gestionar las fuentes de información, así como para ordenar la bibliografía se ha usado “Mendeley”, un gestor de referencias bibliográficas, gracias a la realización de un curso de la biblioteca de la Universidad de Sevilla.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inmunotoxicidad de MC y CYN es un tema aún poco estudiado, lo que se demuestra por la baja cantidad de bibliografía científica disponible en las bases de datos. En la presente revisión se ha intentado recopilar todos los artículos de interés relacionados con este campo y se ha procedido organizarlos por orden cronológico en tablas, que plasmen los datos más importantes de la experimentación (modelo, ensayo, condiciones de exposición) y los principales resultados obtenidos.

4.1. INMUNOTOXICIDAD INDUCIDA POR MC

Las MC, por ser las cianotoxinas más extendidas, son de las que más se conoce su influencia en el sistema inmune (Tabla 1). Las principales MC que se usaron en los estudios fueron MC-RR, MC-YR y MC-LR, siendo esta última la más utilizada, así como extractos de floraciones que contienen principalmente MC-LR.

Los modelos experimentales empleados han sido tanto *in vivo* (roedores y peces) como *in vitro* (linfocitos, macrófagos y neutrófilos de peces, ratones, pollos y humano; líneas celulares, etc.) y los principales estudios que se llevaron a cabo fueron: linfoproliferación de linfocitos B y T, expresión de múltiples citoquinas pro y antiinflamatorias, evaluación de los cambios morfológicos y otros, tales como variación de los índices fagocíticos, viabilidad celular y fragmentación del ADN, niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y análisis de genes relacionados con el sistema inmune.

Tabla 1. Estudios de inmunotoxicidad realizados con MC.

Tipo de cianotoxina	Modelo experimental	Ensayo	Condiciones de exposición	Principales resultados	Referencias
MC-LR	Macrófagos de ratas Wistar	Expresión de IL-1 β , TNF- α	0,1, 0,3 y 1,0 mg/mL de MC-LR durante 1 h	Se produjo un aumento de la expresión de IL-1 β y TNF- α a todas las concentraciones.	(Rocha et al., 2000)
MC-LR	Esplenocitos y timocitos de ratón B6C3F1	Linfoproliferación inducida por mitógenos (LPS y ConA)	1-50 μ g de MC durante 30 min	Inhibición de la linfoproliferación de células B inducida por LPS dependiente de la concentración de MC. MC-YR inhibió la proliferación de linfocitos T inducida por ConA mientras que MC-LR no mostró ningún efecto.	(Yea et al., 2001)
MC-YR	Células EL-4 de timoma de ratón C57BL/6	Estabilidad del ARNm de IL-2 inducida por PMA		Las MC inhibieron la sobreexpresión de ARNm de IL-2 inducida por PMA en esplenocitos y timocitos, pero no tuvieron este efecto en células EL-4.	
Extracto de floración de cianobacterias que contiene MC-LR	Esplenocitos de ratón BALB/c	Medida de la capacidad de captación de los fagocitos periféricos Proliferación de linfocitos B y T inducida por mitógenos Respuesta de anticuerpos	Inyección i.p. de tres dosis 16, 32 y 64 mg de células de algas liofilizadas/kg peso de ratón durante 14 días que contenían 4.97, 9.94, 19.88 μ g equivalentes de MC/kg de peso corporal	Se observó una disminución de los índices de fagocitos a una dosis de 32 y 64 mg/kg, así como una disminución en la proliferación de linfocitos B inducida por LPS y una disminución de células plasmáticas productoras de anticuerpos. Inmunosupresión en el sistema humoral debido a la disminución de la proliferación de células B. No se afectó la linfoproliferación de células T inducidas por ConA.	(Shen et al., 2003)

MC-LR	Macrófagos peritoneales de ratones BALB/c machos	NO, iNOS y abundancia de ARNm de diversas citoquinas	Estimulación con 100 µg/L de LPS y exposición a 1-1000 nmol/L durante 24 h	Disminución dependiente de la concentración de los niveles de producción de NO, ARNm de iNOS, IL-1β y TNF-α, así como una disminución independiente de la concentración de los niveles de ARNm de GM-CSF e INF-γ.	(Chen et al., 2004)
MC-LR	Linfocitos de sangre periférica de pollo y humana cultivados <i>in vitro</i>	Producción de citoquinas. Proliferación de linfocitos T y B inducidos por mitógenos	1,10 y 25 µg/mL MC-LR durante 12, 24, 48 y 72 h	La MC-LR a la concentración más alta disminuyó la proliferación de células T y a todas las concentraciones inhibió la proliferación de células B. Aumentó en los linfocitos humanos la producción de IL-6 y se disminuyó la de IL-2.	(Lankoff et al., 2004)
Extracto de floración de cianobacterias que contiene MC-LR	Ratones BALB/c hembra	Expresión de múltiples citoquinas, incluidas las citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α e IL-6) y Th1/Th2 (IL-2, IL-4 e IL-10)	Inyección de 23, 38, 77 y 115 mg de células de algas liofilizadas/Kg de peso corporal que contenían, respectivamente, una concentración de equivalentes de MC de 7, 12, 24 y 36 µg/Kg de peso corporal	En comparación con el grupo control disminuyó el nivel de ARNm de IL-1β, TNF-α, IL-2 e IL-4 después de la inyección de todas las dosis, mientras que el nivel de IL-6 no se vio afectado y, el nivel de ARNm de IL-10 aumentó.	(Shi et al., 2004)
MC-LR	Macrófagos peritoneales de ratones BALB/c	Expresión de ARNm de iNOS y múltiples citoquinas (IL-1β, TNF-α, GM-CSF e IFN-γ)	Macrófagos inducidos se expusieron a 1-1000 nmol/L de MC-LR durante 6h	Disminución significativa de la expresión de ARNm de INOS, IL-1β, TNF-α, GM-CSF e IFN-γ en todas las concentraciones usadas.	(Chen et al., 2005)

<p>MC-LR [Asp³]-MC-LR extraídas de una cepa de <i>Microcystis panniformis</i></p>	<p>Neutrófilos humanos</p>	<p>Estudio de la migración, capacidad oxidativa y fagocítica</p>	<p>Migración: 0,01-1000 nM 60 min Capacidad oxidativa: 10, 100 nM, 5 min Capacidad fagocítica: 1 y 1000 nM, 10 y 15 min</p>	<p>Ambas MC aumentaron la migración de neutrófilos. Ambas toxinas indujeron la producción de ERO. En presencia de 1 nM de MC hubo un incremento de aproximadamente un 70% de fagocitosis. La concentración más alta no dio lugar a un incremento mayor.</p>	<p>(Kujbida et al., 2006)</p>
<p>MC-LR MC-RR</p>	<p>Linfocitos de la carpa (<i>Carassius auratus</i>)</p>	<p>Evaluación de cambios morfológicos Fragmentación de ADN</p>	<p>Exposición a 1-10 nM durante 2, 4, 6 y 8 h.</p>	<p>Se observaron cambios morfológicos en los linfocitos y se produjo apoptosis de los linfocitos dependiente del tiempo y de la concentración.</p>	<p>(Zhang et al., 2006)</p>
<p>MC-LR MC-LA MC-YR</p>	<p>Neutrófilos de ratas Wistar macho Neutrófilos humanos de voluntarios sanos</p>	<p>Viabilidad celular y fragmentación de ADN Ensayo de quimioluminiscencia para determinar los niveles de ERO Citoquinas: IL-8 (humano), CINC-2$\alpha\beta$ (rata) y TNF-α (humano y rata)</p>	<p>1-1000 nM de las diferentes MC durante 24 h</p>	<p>Se observó un mayor número de células con ADN fragmentado tras la exposición a MC-LA y MC-YR y se produjo un aumento significativo de CINC-2$\alpha\beta$ tras la incubación con MC-LR. Sin embargo, no se observó un cambio significativo en la producción de TNF-α ni en la generación de ERO intracelular. Se observó un aumento de la viabilidad de los neutrófilos con la presencia de MC-LA y MC-LR, pero no se alteró en presencia de MC-YR. La fragmentación del ADN no fue significativa. Además, se produjo un aumento de IL-8 por neutrófilos, un incremento de ERO extracelular y, no se observó un cambio significativo en la producción de TNF-α.</p>	<p>(Kujbida et al., 2008)</p>

MC-LR	Bazo y pronefros de carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	Evaluación de los cambios patológicos por microscopía electrónica de transmisión	Inyección i.p. de 50 µg/Kg de MC-LR Bazo y pronefros fueron diseccionados 1, 2, 7, 14 y 21 días después de la inyección i.p.	Se produjeron cambios patológicos en los linfocitos del bazo y en los linfocitos de los pronefros con recuperación de éstos tras los 21 días de la inyección. El bazo fue el órgano más sensible.	(Wei et al., 2008)
Extracto crudo conteniendo MC Extracto purificado conteniendo MC Extracto no conteniendo MC	Linfocitos de voluntarios sanos	Viabilidad celular (XTT) Genotoxicidad (ensayo cometa)	Viabilidad: incubación con extractos que contienen de 0-10 µg/mL de MC Genotoxicidad: extractos con MC entre 0-4 µg/mL durante 3 y 6 h	Se observó un efecto citotóxico y genotóxico en los linfocitos humanos tras la exposición al extracto crudo y purificado de cianobacterias. La mayor citotoxicidad se observa con el extracto purificado. En los resultados se aprecia la influencia de otros compuestos diferentes a MC presentes en los extractos.	(Mankiewicz-Boczek et al., 2011)
MC-LR	Leucocitos de la sangre y de la cabeza de riñón de carpa (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	PCR y análisis de la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias	0,01-0,1 µg/mL de MC-LR durante 4 h	Las células incubadas a baja concentración aumentaron la expresión de IL-1β y TNF-α. No se observó ningún efecto en la expresión de IL-10 ni de TGF-β. Las células de la cabeza de riñón incubadas a alta concentración mostraron una disminución de la expresión de IL-1β y de TNF-α y, un aumento en la expresión de TGF-β y de IL-10.	(Rymuszka y Adaszek, 2012)

MC-LR	Ratones	Análisis de la función fagocítica de glóbulos blancos Expresión de IL-6, IL-10 y TNF- α	Inyección i.p. de 0-25.000 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ durante 7 días	Se observó una disminución en el índice fagocítico de los macrófagos, pero no se observaron cambios significativos en el índice fagocítico de los leucocitos. Se produjo un aumento dependiente de la dosis de la expresión de IL-6 y disminución de la expresión de TNF- α . No se observaron cambios significativos en la expresión de IL-10.	(Huang et al., 2013)
Floración de cianobacterias que contenían MC	Hígado y timo de ratas (<i>Rattus norvegicus</i> var alba)	Histopatología del timo y del bazo y estudios de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica, bazo y timo	Control: ratas alimentadas con una dieta comercial sin carne de pescado. Grupo D,E: ratas alimentadas con una dieta comercial, 25% de carne de pescado sin cianobacterias y enriquecida con una biomasa de floración de cianobacterias que contiene una concentración de MC de 700 y 5000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de alimento. Grupo F: ratas alimentadas con una dieta comercial y 25% de carne de pescado procedente de una localidad con floraciones.	No se observaron cambios histológicos significativos. Se observó en sangre periférica que en el grupo D y E hubo un aumento de células NK y linfocitos T gamma-delta. Sin embargo, en los órganos linfoides hubo un aumento de los linfocitos T gamma-delta, linfocitos B y linfocitos T CD8+. En el grupo F hubo un aumento significativo en los linfocitos CD4+ y una disminución en los linfocitos CD8+.	(Palikova et al., 2013)

<p>MC-LR MC-RR</p>	<p>Carpa (<i>Carassius auratus</i>)</p>	<p>Evaluación de cambios morfológicos y de parámetros inmunológicos</p>	<p>Control: dieta sin cianobacterias</p> <p>Grupo 1: 20% de liofilizado de cianobacterias que contenían 5,64 mg/Kg de MC</p> <p>Grupo 2: 40% de liofilizado de cianobacterias que contenían 11,28 mg/Kg de MC</p>	<p>Se observaron cambios morfológicos en la cabeza del riñón en el grupo 1 y 2. Sin embargo, en el bazo no se observaron cambios significativos en ninguno de los dos grupos.</p> <p>Se produjo un aumento significativo de los fagocitos en ambos grupos.</p>	<p>(Qiao et al., 2013)</p>
<p>MC-LR Extracto de floraciones que contienen MC-LR</p>	<p>Linfocitos y fagocitos aislados de la sangre y de la cabeza de riñón de carpas (<i>Cyprinus carpio</i> L.)</p>	<p>Proliferación de linfocitos</p> <p>Expresión de ARNm de citoquinas pro y antiinflamatorias</p>	<p>Grupo 1: 25 µg/L de MC-LR pura</p> <p>Grupo 2: 25 µg/L del extracto que contiene MC-LR</p> <p>El agua se cambió y se aplicó la toxina diariamente. Se sacrificaron tras 1,3 y 5 días de exposición</p>	<p>No se observó cambio en la proliferación de linfocitos de las células aisladas de los peces expuestos a MC-LR. Sin embargo, en las células expuestas a MC-LR durante 3 y 5 días se observó una inhibición significativa en la proliferación de los linfocitos derivados de la sangre y riñones.</p> <p>Las células aisladas de la sangre expuestas al extracto mostraron un aumento de la expresión de ARNm de IL-1β en los días 3 y 5 y, en los tres días, de TNF-α e IL-10. No se observó cambio significativo en la expresión de TGF-β. En las células aisladas del riñón se observó un aumento de la expresión de IL-1β, TNF-α e IL-10 en los tres días.</p> <p>Las células aisladas del riñón mostraron un aumento de la expresión de IL-1β expuestas a MC-LR pura. No se observó cambio significativo en la expresión de otras citoquinas expuestas a MC-LR pura.</p>	<p>(Rymuszka y Adaszek, 2013)</p>

MC-LR	Linfocitos de carpa (<i>C. auratus</i>)	Viabilidad de los linfocitos Producción de ERO y apoptosis en inmunocitos	Incubación con 1 µg/L de MC-LR y diferentes concentraciones de quercetina durante 24 h	Se produjo un aumento de la viabilidad de los linfocitos a concentraciones altas de quercetina. Disminuyó significativamente la producción de ERO y de la apoptosis de los inmunocitos con concentraciones altas de quercetina.	(Zhang et al., 2014)
MC-LR	Pez cebra adulto (<i>Danio rerio</i>)	Expresión génica de citoquinas en bazo, intestino y branquias	120 peces se dividieron en cuatro grupos y fueron expuestos a 0, 1, 5 y 20 µg/L MC-LR durante 30 días	En el bazo se produjo un aumento significativo de los niveles transcripcionales del IFN-1 y IL-8 a las concentraciones más altas, mientras que a concentraciones más bajas se produce un aumento de la transcripción de IL-1β y TNF-α. Aumento drástico de los niveles de ARNm de IFN-1, IL-1β, IL-8 TGF-β y TNF-α en el intestino y en las branquias.	(Chen et al., 2016)
MC-LR	Carpa común (<i>C. carpio</i>)	Expresión génica de proteínas inflamatorias (IL-1β, TNF-α e IFN I)	Control: alimentado con una dieta normal Grupo 1: dieta normal e inyección i.p. de 150 µg/Kg de MC-LR. Sacrificio a las 0, 12, 24, 48 y 96h Grupo 2, 3 y 4: dieta con dosis de 0,5-2 g/kg de L-carnitina durante 4 semanas antes de la inyección de MC-LR	El grupo 1 mostró un aumento de la expresión de las proteínas inflamatorias. Los grupos 2,3 y 4 mostraron una reducción de los niveles de ARNm de las proteínas inflamatorias.	(Chen et al., 2017)

MC-LR	Pez cebra macho	Niveles de transcripción de los genes relacionados con el sistema inmune innato esplénico	0-30 µg/L de MC-LR durante 30 días	Se produjo un activación inflamatoria en los grupos de baja concentración (0.3, 1 y 3 µg/L) y una inhibición inmune en los grupos de alta concentración (10 y 30 µg/L).	(Lin et al., 2017)
MC-LR	Carpa herbívora	Análisis de los genes relacionados con el sistema inmune	Inyección intraperitoneal de 25, 75 y 100 µg/Kg de MC-LR y sacrificio tras 96 h	Se encontró que 61, 203 y 129 genes relacionados con el sistema inmune alteraron su expresión a 25, 75 y 100 µg/Kg de MC-LR, respectivamente. Esto indica una disrupción del sistema inmune.	(Wei et al., 2018)
Liofilizado de cianobacterias conteniendo MC-LR, MC-RR y MC-YR	Peces (<i>Megalobrama amblycephala</i>)	Acumulación de MC en órganos linfoides	Control: dieta con amoniac y sin cianobacterias Grupo 1: dieta con amoniac y 15% de liofilizado de cianobacterias que contenían 0,50 mg/g de MC-LR, 0,84 mg/g de MC-RR y 0,07 mg/g de MC-RR durante 30 días Grupo 2: dieta con amoniac y 30% del mismo liofilizado de cianobacterias durante 30 días	Se produjo un aumento de la concentración de MC dependiente de la concentración de amoniac en los órganos linfoides. Se observaron cambios morfológicos en los linfocitos del grupo 1 y 2 dependientes de la concentración de amoniac. Aumentó la actividad fagocítica en el grupo 1 y se produjo una disminución en el grupo 2.	(Xia et al., 2018)

4.1.1. EFECTO DE LAS MC SOBRE LOS LINFOCITOS

Los linfocitos son células blancas que reconocen antígenos extraños originando respuestas inmunitarias adquiridas. Se desarrollan principalmente en los órganos linfoides y, según donde maduren, se originarán dos tipos de linfocitos (linfocitos B y T) que tendrán diferentes funciones en la inmunidad. De manera que los linfocitos B madurarán en la médula ósea y serán mediadores de la inmunidad humoral mientras que los linfocitos T madurarán en el timo y serán mediadores de la inmunidad celular (Abbas et al., 2015). En la tabla 1 se muestran los diferentes ensayos que se han realizado para evaluar el efecto de las MC sobre los linfocitos. En los primeros estudios *in vitro* realizados se estimuló la producción de linfocitos con mitógenos y se comprobó que MC-LR y MC-YR inhibieron la proliferación de linfocitos B en los esplenocitos de ratón, pero en cambio, sólo MC-YR fue capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T a altas dosis (Yea et al., 2001). Otros autores también han comprobado que MC-LR ha disminuido la proliferación de linfocitos B mientras que la proliferación de linfocitos T no se ha afectado, ha disminuido sólo a dosis altas o pasados varios días tras la exposición (Lankoff et al., 2004; Rymuszka y Adaszek, 2013; Shen et al., 2003). Además, en otros estudios donde se alimentaron a ratas con floraciones de cianobacterias que contenían MC o con pescados contaminados con cianotoxinas se pudo comprobar cómo en las alimentadas con floraciones se había producido un aumento de linfocitos B y de diversos linfocitos T, mientras que en las alimentadas con pescados contaminados se produjo un aumento de los linfocitos T CD4+, que se encargan de activar a los linfocitos B, y una disminución de los linfocitos T CD8+, encargados de eliminar células afectadas (Palikova et al., 2013). Todo ello, nos lleva a pensar que las MC son capaces de producir inmunosupresión humoral al inhibirse o disminuirse los linfocitos B en los diferentes órganos y, serán capaces de producir inmunosupresión celular al inhibirse o disminuir los linfocitos T sólo cuando las concentraciones de MC sean altas y/o hayan pasado varios días tras la infección.

4.1.2. EFECTO DE LAS MC SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Las citoquinas son proteínas que se encargan de coordinar la respuesta del sistema inmunológico. Estas citoquinas pueden actuar sobre varias células del sistema inmune a la misma vez originando respuestas antagónicas. Las principales citoquinas que podemos encontrar son: interleuquinas (IL), factor de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN), factor estimulador de colonias (CSF) y quimiocinas (Abbas et al., 2015).

En la tabla 1 se incluyen diversos ensayos relacionados con la alteración de la expresión de varias citoquinas inducida por MC. Su expresión varía aumentando o disminuyendo en función de la dosis/concentración utilizada, de manera que en algunos ensayos se puede comprobar cómo a dosis bajas se estimula unos tipos de citoquinas y a dosis altas se inhiben. Sin embargo, siempre se ha observado que la interleuquina-2 (IL-2), importante para la proliferación y supervivencia de los linfocitos T así como para activar otro tipo de citoquinas, ha disminuido su expresión (Lankoff et al., 2004; Shi et al., 2004; Yea et al., 2001). Además, en la mayoría de los ensayos se ha producido una disminución en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , etc.) y de mediadores como iNOS o NO. Mientras que las citoquinas antiinflamatorias (TGF- β , IL-10, IL-4, etc.) han aumentado su expresión. Por tanto, se puede afirmar que las MC tienen influencia sobre los diferentes mediadores de la respuesta inmune afectando de esta manera a la respuesta inmune adaptativa.

4.1.3. CAMBIOS MORFOLÓGICOS PRODUCIDOS POR LAS MC

Las MC son capaces de generar cambios morfológicos en los linfocitos. Principalmente, en los estudios recopilados en la tabla 1 que incluyeron observación microscópica, las mitocondrias se volvieron edematosas, se observaban vacuolas en el citoplasma, compactación de la cromatina y deformación del núcleo (Qiao et al., 2013; Wei et al., 2008; Zhang et al., 2006). En otro estudio se demostró que se producían cambios morfológicos en los linfocitos cuando aumentaba la concentración de amoníaco, puesto que el amoníaco era capaz de concentrar las MC en los órganos linfoides (Xia et al., 2018). Estos cambios serán los responsables de que se pueda llegar a producir la apoptosis de los linfocitos.

4.1.4. OTROS EFECTOS PRODUCIDOS POR LAS MC

Las MC son capaces de disminuir los índices fagocíticos de los macrófagos a dosis altas (Huang et al., 2013; Shen et al., 2003). Además, pueden tener un efecto genotóxico y citotóxico sobre las células del sistema inmune (Mankiewicz-Boczek et al., 2011) y, favorecen la migración de los neutrófilos y su capacidad oxidativa (Kujbida et al., 2006). Con respecto al análisis de los genes se ha comprobado que de 457 genes, la MC alteraba la expresión de 61, 203 y 129 genes relacionados con el sistema inmune en función de la concentración (Wei et al., 2018). Asimismo, es importante resaltar el papel de la quercetina como protector del sistema inmune frente a la toxicidad de MC, puesto que tras tratar a las células con MC y quercetina, ésta aumentó la viabilidad de los linfocitos y disminuyó la apoptosis y la producción de ERO (Zhang et al., 2014). Estos resultados están de acuerdo con otros autores que han evaluado la acción beneficiosa de distintos antioxidantes sobre la toxicidad inducida por cianotoxinas (Guzmán-Guillén et al., 2017).

4.2. INMUNOTOXICIDAD INDUCIDA POR CYN

En la tabla 2 se recogen todos los estudios publicados sobre la inmunotoxicidad de la CYN a los que se ha tenido acceso. Los modelos experimentales que se utilizaron fueron principalmente *in vitro* y los tipos de ensayos que se llevaron a cabo fueron: viabilidad de linfocitos y neutrófilos, proliferación de linfocitos, actividad fagocítica, análisis del ciclo celular y expresión de citoquinas.

En ensayos previos, no enfocados en inmunotoxicidad, se comprobó que tras inyección intraperitoneal de 0.2 mg de CYN/Kg de ratón se producía degeneración y necrosis de los linfocitos en la capa cortical del timo (Terao et al., 1994). Así como linfocitosis en el bazo de ratones tras una exposición oral a una dosis única de CYN (Seawright et al., 1999). Mientras que en los ensayos posteriores se ha podido observar que CYN es capaz de inhibir la proliferación y viabilidad de neutrófilos y de linfocitos T y, afectar a la capacidad fagocítica incluso a dosis bajas (Poniedziałek et al., 2015, 2014b; Sieroslawska y Rymuszka, 2015). Otro hecho importante que se ha evaluado es cómo afecta la CYN al ciclo celular de linfocitos, de manera que es capaz de producir una disminución de células que entran en la fase G2/M provocando la detención de la fase G0/G1 y/o la fase S

prolongada (Poniedziałek et al., 2014b). Por último, se debe destacar la influencia de CYN sobre la expresión de citoquinas, ya que produce una sobreexpresión de TGF- β a dosis bajas y una sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α). Por tanto, aunque CYN sea la cianotoxina menos estudiada se puede observar que tiene efectos sobre el sistema inmune al ser capaz de inhibir o afectar a la capacidad fagocítica de las células y de modular la expresión de citoquinas.

4.3. DISCUSIÓN GENERAL

En la presente revisión se puede comprobar que los estudios de inmunotoxicidad sobre las MC son más amplios que los de CYN. Esto corrobora que las MC son las cianotoxinas más extensamente investigadas mientras que la CYN es una cianotoxina de reciente interés. Sin embargo, ambas han demostrado tener cierta influencia sobre el sistema inmune. Como se ha comprobado, principalmente afectan a elementos del sistema inmune que intervienen en la respuesta inmunitaria adaptativa e incluso producen alteraciones morfológicas sobre éstos. Los componentes celulares y mediadores más afectados son los linfocitos y las citoquinas, ambos necesarios para que se genere una respuesta inmune adecuada, ya que las citoquinas tendrán que actuar para que los linfocitos ejerzan su función principal. De manera que cuando las cianotoxinas, sobre todo las MC, influyen sobre la actividad de éstos se generará inmunosupresión, es decir, una reducción de la capacidad defensiva del organismo frente a agentes externos, e incluso se puede impedir la generación de anticuerpos que eviten posibles recaídas. Por tanto, será necesario profundizar en los mecanismos de acción que conllevan que los componentes del sistema inmune se vean afectados por las cianotoxinas, y en particular profundizar en los estudios inmunotóxicos de la CYN.

Tabla 2. Estudios de inmunotoxicidad realizados con CYN.

Tipo de cianotoxina	Modelo experimental	Ensayo	Condiciones de exposición	Principales resultados	Referencias
Cultivo de <i>C.raciborskii</i> conteniendo CYN	Ratones macho	Toxicidad oral aguda Estudio histopatológico	1 única dosis oral de un cultivo de <i>C.raciborskii</i> conteniendo 0.2% CYN	Dosis letal media de 4.4-6.9 mg/Kg equivalentes de CYN. Muerte a los 3-6 días tras la dosis. Entre las alteraciones patológicas se observó atrofia de la corteza del timo y de los folículos linfoides del bazo.	(Seawright et al., 1999)
CYN	Neutrófilos de sangre periférica humana	Ensayo de actividad fagocítica Número de células y ensayo de viabilidad	0,01-1 µg/mL de CYN durante 1h	No se observó un efecto significativo sobre la actividad fagocítica de los neutrófilos. No se produjo un efecto significativo sobre el número de neutrófilos. Además, las células se mantuvieron viables.	(Poniedziałek et al., 2014a)

CYN	Linfocitos de sangre periférica humana	Proliferación celular. Viabilidad y análisis del ciclo celular	0,01-1 µg/mL de CYN durante 0, 6, 24 y 48 h	<p>La proliferación celular se inhibió significativamente tras el uso de la concentración más alta de CYN después de 6, 24 y 48 h.</p> <p>Se produjo una disminución significativa de la viabilidad de los linfocitos T a las concentraciones más altas a las 0, 6, 24 y 48h. La mayor alteración en la viabilidad celular se observó en los linfocitos expuestos a CYN después de 24 h.</p> <p>A las concentraciones más altas y después de 6, 24 y 48h se produjo una disminución del número de células que entraron en la fase G2/M por lo que se indujo la detención de G0 / G1 y/o la fase S prolongada.</p>	(Poniedziałek et al., 2014b)
CYN <i>C.raciborskii</i> no productora de CYN	Linfocitos y neutrófilos humanos de donantes sanos	Viabilidad de linfocitos y neutrófilos Proliferación de linfocitos	<p>Grupo 1: se expuso a las células a tres concentraciones de la cepa no productora de CYN</p> <p>Grupo 2: se expuso a las células a 0,01, 0,1 y 1 µg/mL de CYN</p>	<p>Disminución de la viabilidad de neutrófilos y linfocitos en las muestras tratadas con el extracto de <i>C.raciborskii</i> no productora. En las muestras tratadas con CYN no se observó necrosis ni apoptosis. Disminución de la proliferación de linfocitos T en las muestras tratadas con el extracto y, disminución significativa a concentraciones altas en las células tratadas con CYN. Se observan efectos tóxicos debidos a sustancias desconocidas distintas a CYN.</p>	(Poniedziałek et al., 2015)

CYN	Leucocitos de carpa común (<i>C. carpio</i>)	Actividad fagocítica Expresión de citoquinas.	0,05-1 µg/ml de CYN durante 24 h	Se produjo una disminución en la actividad fagocítica de las células a concentraciones altas. Además, se observó una sobreexpresión del ARNm de IL-1β y TNF-α. A las concentraciones más bajas se observó una sobreexpresión de TGF-β que no se observó a concentraciones altas y no se observó la sobreexpresión de ARNm de IL-10.	(Sieroslawska et al., 2015)
CYN	Línea celular de leucocitos de carpa (CLC)	Capacidad fagocítica	0,1-10 µg/ml de CYN durante 48 h	La capacidad fagocítica se afectó incluso a bajas concentraciones por lo que las células perdieron su capacidad de engullir bacterias.	(Sieroslawska y Rymuszka, 2015)

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de la presente revisión bibliográfica son las siguientes:

- I. Los efectos de MC y CYN sobre el sistema inmune es un campo aún poco estudiado de los que sólo se conoce su influencia en algunas células y mediadores, sin conocer en profundidad los mecanismos de acción tóxica subyacentes.
- II. Las MC son las cianotoxinas más extendidas y, por tanto, más estudiadas también en lo que respecta a su potencial inmunotóxico. Los estudios sobre la inmunotoxicidad de la CYN son muy escasos.
- III. Las MC son capaces de generar inmunosupresión al afectar a diversas células y mediadores que participan en el sistema inmune.
- IV. La CYN ha demostrado tener influencia sobre el sistema inmune, pero los estudios son escasos por lo que no se puede concluir que produzca inmunosupresión.

En lo que respecta a investigaciones futuras, sería de interés explorar los mecanismos de acción responsables del daño inducido por las MC en las células y mediadores del sistema inmune. Igualmente, se debería estudiar más a fondo cómo afecta la CYN al sistema inmune puesto que los estudios son bastante escasos. Además, se podrían investigar los potenciales efectos sinérgicos derivados de la exposición conjunta a ambas cianotoxinas.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Inmunología celular y molecular. 8ª ed. Barcelona: Elsevier Inc; 2015.

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Inmunología básica. Funciones y trastornos del sistema inmunitario. 5ª ed. Barcelona: Elsevier Inc; 2016.

Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 2010;56:813-28.

Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol* 2017;91:1049-130.

Chen C, Liu W, Wang L, Li J, Chen Y, Jin J, et al. Pathological damage and immunomodulatory effects of zebrafish exposed to microcystin-LR. *Toxicon* 2016;118:13-20.

Chen T, Shen P, Zhang J, Hua Z. Effects of microcystin-LR on patterns of iNOS and cytokine mRNA expression in macrophages in vitro. *Environ Toxicol* 2005;20:85-91.

Chen T, Zhao X, Liu Y, Shi Q, Hua Z, Shen P. Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR. *Toxicology* 2004;197:67-77.

Chen XM, Guo GL, Sun L, Yang QS, Wang GQ, Zhang DM. Modulatory role of L-carnitine against microcystin-LR-induced immunotoxicity and oxidative stress in common carp. *Fish Physiol Biochem* 2017;43:1081-93.

Chiswell, R.K.; Shaw, G.R.; Eaglesham, G.K.; Smith, M.J.; Norris, R.L.; Seawright, A.A.; Moore, M.R. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol.* 1999, 14, 155–165.

Codd GA. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol Eng* 2000;16:51-60.

Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:264-72.

Dörr FA, Pinto E, Soares RM, Feliciano de Oliveira e Azevedo SM. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon* 2010;56:1247-56.

El Gobierno chino planea cerrar 2.150 fábricas para limpiar las aguas de un lago | elmundo.es. *El Mundo Cienc y Ecol* 2007.
<http://www.elmundo.es/elmundo/2007/07/09/ciencia/1183973049.html> (accedido 11 de mayo de 2018).

Fontanillo M, Köhn M. Microcystins: Synthesis and structure–activity relationship studies toward PP1 and PP2A. *Bioorg Med Chem* 2018;26:1118-26.

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* 2011a;105:100-6.

Gutiérrez-Praena D, Jos Á, 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;53:139-52.

Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos Á, María Cameán A. Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011b;74:1567-72.

Guzmán-Guillén R, Manzano IL, Moreno IM, Ortega AIP, Moyano R, Blanco A, et al. Cylindrospermopsin induces neurotoxicity in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Aphanizomenon ovalisporum*. *Aquat Toxicol* 2015;161:17-24.

- Guzmán-Guillén R, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Prieto AI, Pichardo S, Jos Á, et al. Potential use of chemoprotectants against the toxic effects of cyanotoxins: A review. *Toxins (Basel)* 2017;9:1-36.
- Hercog K, Maisanaba S, Filipič M, Jos Á, Cameán AM, Žegura B. Genotoxic potential of the binary mixture of cyanotoxins microcystin-LR and cylindrospermopsin. *Chemosphere* 2017;189:319-29.
- Huang X, Zhang Y, Xiao W, Ye X, Zhong Q, Gu K. Comparison of response indices to toxic microcystin-LR in blood of mice. *Chemosphere* 2013;92:563-9..
- Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2000;472:155-61.
- Kujbida P, Hatanaka E, Campa A, Colepicolo P, Pinto E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:273-7.
- Kujbida P, Hatanaka E, Campa A, Curi R, Poliselli Farsky SH, Pinto E. Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR. *Toxicon* 2008;51:1274-80.
- Lankoff A, Carmichael WW, Grasman KA, Yuan M. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes in vitro. *Toxicology* 2004;204:23-40.
- Li W, Xu X, Fujibayashi M, Niu Q, Tanaka N, Nishimura O. Response of microalgae to elevated CO₂ and temperature: impact of climate change on freshwater ecosystems. *Environ Sci Pollut Res* 2016;23:19847-60.
- Lin W, Hou J, Guo H, Qiu Y, Li L, Li D, et al. Dualistic immunomodulation of sub-chronic microcystin-LR exposure on the innate-immune defense system in male zebrafish. *Chemosphere* 2017;183:315-22.

- Liu Q, Le XC. Genotoxic effects of microcystins mediated by nitric oxide and mitochondria. *J Environ Sci* 2015;31:206-8.
- Maire M-A, Bazin E, Fessard V, Rast C, Humpage AR, Vasseur P. Morphological cell transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells by the cyanotoxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 2010;55:1317-22.
- Mankiewicz-Boczek J, Palus J, Gagała I, Izydorczyk K, Jurczak T, Dziubałtowska E, et al. Effects of microcystins-containing cyanobacteria from a temperate ecosystem on human lymphocytes culture and their potential for adverse human health effects. *Harmful Algae* 2011;10:356-65.
- Msagati TAM, Siame BA, Shushu DD. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat Toxicol* 2006;78:382-97.
- Ohtani, I.; Moore, R.E.; Runnegar, M.T. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green Alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 7941–7942.
- Palikova M, Ondrackova P, Mares J, Adamovsky O, Pikula J, Kohoutek J, et al. In vivo effects of microcystins and complex cyanobacterial biomass on rats (*Rattus norvegicus* var. alba): Changes in immunological and haematological parameters. *Toxicon* 2013;73:1-8.
- Pichardo S, Cameán AM, Jos A. In vitro toxicological assessment of cylindrospermopsin: A review. *Toxins (Basel)* 2017;9.
- Poniedziałek B, Rzymiski P, Karczewski J. Cylindrospermopsin decreases the oxidative burst capacity of human neutrophils. *Toxicon* 2014a;87:113-9.
- Poniedziałek B, Rzymiski P, Kokociński M. Cylindrospermopsin: Water-linked potential threat to human health in Europe. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012;34:651-60.
- Poniedziałek B, Rzymiski P, Kokociński M, Karczewski J. Toxic potencies of metabolite(s) of non-cylindrospermopsin producing *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from temperate zone in human white cells. *Chemosphere* 2015;120:608-14.

Poniedziałek B, Rzymiski P, Wiktorowicz K. Toxicity of cylindrospermopsin in human lymphocytes: Proliferation, viability and cell cycle studies. *Toxicol Vitro* 2014b;28:968-74.

Qiao Q, Liang H, Zhang X. Effect of cyanobacteria on immune function of crucian carp (*Carassius auratus*) via chronic exposure in diet. *Chemosphere* 2013;90:1167-76.

Rocha MF, Sidrim JJ, Soares AM, Jimenez GC, Guerrant RL, Ribeiro RA, et al. Supernatants from macrophages stimulated with microcystin-LR induce electrogenic intestinal response in rabbit ileum. *Pharmacol Toxicol* 2000;87:46-51.

Rymuszka A, Adaszek Ł. Cytotoxic effects and changes in cytokine gene expression induced by microcystin-containing extract in fish immune cells - An invitro and invivo study. *Fish Shellfish Immunol* 2013;34:1524-32.

Rymuszka A, Adaszek Ł. Pro- and anti-inflammatory cytokine expression in carp blood and head kidney leukocytes exposed to cyanotoxin stress - An in vitro study. *Fish Shellfish Immunol* 2012;33:382-8.

Rzymiski P, Poniedziałek B. In search of environmental role of cylindrospermopsin: A review on global distribution and ecology of its producers. *Water Res* 2014;66:320-37.

Saker ML, Eaglesham GK. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon* 1999;37:1065-77.

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

Shen PP, Zhao SW, Zheng WJ, Hua ZC, Shi Q, Liu ZT. Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. *Toxicol Lett* 2003;143:27-36.

Shen X, Lam PK., Shaw G., Wickramasinghe W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 2002;40:1499-501.

- Shi Q, Cui J, Zhang J, Kong FX, Hua ZC, Shen PP. Expression modulation of multiple cytokines in vivo by cyanobacteria blooms extract from taihu lake, China. *Toxicon* 2004;44:871-9.
- Sieroslawska A, Rymuszka A. Effects of cylindrospermopsin on a common carp leucocyte cell line. *J Appl Toxicol* 2015;35:83-9.
- Sieroslawska A, Rymuszka A, Adaszek Ł. Effects of cylindrospermopsin on the phagocytic cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Appl Toxicol* 2015;35:1406-14.
- Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhães VF, Hilborn ED, et al. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Toxicol* 2006;21:95-103.
- Spoof L, Catherine A. Appendix 3: tables of microcystins and nodularins. En: Meriluoto J, Spoof L, Cood G.A, editors. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. 1^a ed. Chichester, West Sussex : John Wiley & Sons, Inc., 2017. p.526-537
- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ito, E., Watanabe, M., 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32, 833–843
- Walsby AE, Schanz F, Schmid M. The Burgundy-blood phenomenon: A model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New Phytol* 2006;169:109-22.
- Wei LL, Liu Y, Zhong S, Wu H, Ruan J, Liu M, et al. Transcriptome analysis of grass carp provides insights into the immune-related genes and pathways in response to MC-LR induction. *Aquaculture* 2018;488:207-16.
- Wei LL, Sun BJ, Nie P. Ultrastructural alteration of lymphocytes in spleen and pronephros of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) experimentally exposed to microcystin-LR. *Aquaculture* 2008;280:270-5.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer [en línea]. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: <https://www.iarc.fr/>

Xia H, Song T, Wang L, Jiang L, Zhou Q, Wang W, et al. Effects of dietary toxic cyanobacteria and ammonia exposure on immune function of blunt snout bream (*Megalabrama amblycephala*). . *Fish Shellfish Immunol* 2018.

Yan X, Xu X, Wang M, Wang G, Wu S, Li Z, et al. Climate warming and cyanobacteria blooms: Looks at their relationships from a new perspective. *Water Res* 2017;125:449-57.

Yea SS, Kim HM, Oh HM, Paik KH, Yang KH. Microcystin-induced down-regulation of lymphocyte functions through reduced IL-2 mRNA stability. *Toxicol Lett* 2001;122:21-31.

Young FM, Micklem J, Humpage AR. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol* 2008;25:374-80.

Žegura B, Štraser A, Filipič M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 2011;727:16-41.

Zhang H, Wu Y, Fang W, Wang D. Regulatory effect of quercetin on hazardous microcystin-LR-induced apoptosis of *Carassius auratus* lymphocytes in vitro. *Fish Shellfish Immunol* 2014;37:278-85.

Zhang J, Zhang H, Chen Y. Sensitive apoptosis induced by microcystins in the crucian carp (*Carassius auratus*) lymphocytes in vitro. *Toxicol Vitro* 2006;20:560-6.

Zhong Q, Sun F, Wang W, Xiao W, Zhao X, Gu K. Water metabolism dysfunction via renin-angiotensin system activation caused by liver damage in mice treated with microcystin-RR. *Toxicol Lett* 2017;273:86-96.