

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Farmacia

“EFECTOS DE LAS CIANOTOXINAS SOBRE LA REPRODUCCIÓN Y EL DESARROLLO”

Trabajo de Revisión Bibliográfica

Celia María Vázquez Rodríguez

Facultad de Farmacia, Sevilla

Julio de 2018

Tutoras

Ana María Cameán Fernández

María Llana Ruiz-Cabello

Dpto. Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Área de Toxicología



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	- 2 -
1.1. Clasificación de cianotoxinas	- 3 -
1.1.1. Microcistinas	- 4 -
1.1.2. Cilindrospermopsina.....	- 6 -
1.2. Rutas potenciales de exposición	- 7 -
2. OBJETIVOS.....	- 8 -
3. METODOLOGÍA	- 8 -
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 10 -
4.1. Microcistinas.....	- 10 -
4.1.1. Efectos sobre la reproducción.....	- 10 -
4.1.1.1. Estudios <i>in vitro</i>	- 10 -
4.1.1.2. Estudios <i>in vivo</i>	- 13 -
4.1.1.2.1. Estudios en mamíferos	- 13 -
4.1.1.2.1.1. Extractos crudos de microcistinas.....	- 13 -
4.1.1.2.1.2. Microcistinas puras (-LR).....	- 14 -
4.1.1.2.2. Estudios en peces.....	- 15 -
4.1.2. Efectos sobre el desarrollo.....	- 17 -
4.2. Cilindrospermopsina	- 21 -
4.2.1. Efectos sobre la reproducción.....	- 21 -
4.2.2. Efectos sobre el desarrollo.....	- 24 -
5. CONCLUSIONES.....	- 27 -
6. BIBLIOGRAFÍA.....	- 29 -

ABREVIATURAS

- **ACh:** Acetilcolina
- **AChE:** Acetilcolinesterasa
- **Adda:** Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico
- **ALP:** Fosfatasa alcalina
- **CAT:** Carnitina–acilcarnitina translocasa
- **CYN:** Cilindrospermopsina
- **CYP-450:** Citocromo P-450
- **Cyt c:** Citocromo C
- **DL₅₀:** Dosis Letal 50
- **DOPAC:** Ácido dihidrofenilacético
- **E2:** Estradiol
- **ERO:** Especies Reactivas de Oxígeno
- **ES:** Células madre embrionarias
- **FIV:** Fecundación *in vitro*
- **FSH:** Hormona foliculoestimulante
- **GABA:** Ácido γ -aminobutírico
- **GH:** Hormona del crecimiento
- **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropina
- **GPX:** Glutación Peroxidasa
- **GR:** Glutatioón Reductasa
- **GSH:** Glutación
- **GST:** Glutación-S Transferasa
- **hCG:** Gonadotropina coriónica humana
- **HPG:** Hipotálamo-Pituitaria-Gónada
- **HPT:** Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides
- **I.p.:** Intraperitoneal
- **I.v.:** Intravenoso
- **IARC:** Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
- **IC₅₀:** Concentración Inhibitoria del 50 %
- **ICM:** Masa Celular Interna
- **IDA/TDI:** Ingesta Diaria Admisible/Tolerable
- **IGF:** Factor de crecimiento insulínico
- **IL:** Interleucina
- **LDH:** Lactato deshidrogenasa
- **LH:** Hormona luteinizante
- **LOEC:** Mínima concentración de observación de efecto
- **MC:** Microcistina
- **MDA:** Malondialdehído
- **M-Dha:** N-metildehidroalanina
- **mEs:** Células madre embrionarias de ratón
- **MMP:** Metaloproteinasas
- **NOAEL:** Nivel de efectos adversos no observados
- **NOEC:** Concentración sin efecto observado
- **OATp:** polipéptidos transportadores de ácidos orgánicos
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PP1:** Proteína fosfatasa 1
- **PP2a:** Proteína fosfatasa 2a
- **RE:** Retículo endoplasmático
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **SOD:** Superóxido dismutasa
- **T3:** Triyodotironina
- **T4:** Tiroxina
- **TH:** Hormona tiroidea
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral
- **TP:** Tiempo de protrombina
- **UV:** Ultravioleta
- **VTG:** Vitelogenina
- **γ -GCS:** γ -Glutamilcisteina sintasa

RESUMEN

Las cianobacterias son microorganismos procariotas fotosintéticos que se desarrollan en aguas eutrofizadas. Algunas de las especies de estos organismos acuáticos son capaces de producir metabolitos secundarios con carácter tóxico, llamados cianotoxinas, que generan una gran preocupación en términos de salud pública. La exposición humana a estas toxinas puede producirse a través de la vía dérmica o inhalatoria; por ejemplo, en aguas de recreo, o mediante la vía oral, en la que cobra especial importancia la transmisión a través de la cadena alimentaria. Entre las cianotoxinas más estudiadas por su toxicidad se encuentran las microcistinas (MCs) y la cilindrospermopsina (CYN). El objetivo del presente trabajo ha sido realizar una revisión bibliográfica de la literatura científica existente sobre la toxicidad de MCs y CYN en los procesos de reproducción y desarrollo. En general, las MCs han demostrado afectar, en mamíferos y peces, a la viabilidad de las células reproductoras al producir estrés oxidativo, lesiones celulares y aumento de la apoptosis; así como, también afectan a órganos sexuales tanto masculinos como femeninos. A su vez, ya sea por transmisión parental o por exposición directa, los efectos sobre el desarrollo en la descendencia pueden ser desde retraso del crecimiento y desarrollo, malformaciones, y alteraciones endocrinas, hasta una menor supervivencia. Por otro lado, aunque los efectos de las CYN no han sido estudiados con tanta profundidad, esta toxina también ha demostrado producir efectos citotóxicos en células reproductivas. Asimismo, la CYN produce sobre el desarrollo, al igual que las MCs, alteraciones del crecimiento, deformaciones en la descendencia, e incluso aumento de la mortalidad.

Palabras clave: cianobacteria, cianotoxina, reproducción, desarrollo, cilindrospermopsina (CYN), microcistina (MC), especies, efectos.

1. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, o también llamadas algas verdeazuladas, son microorganismos procariotas fotosintéticos, clasificados como bacterias Gram-negativas (Humbert, 2009; Gutiérrez-Praena et al., 2013). Su morfología es muy variada pudiendo llegar a ser desde organismos unicelulares (esféricas, ovoideas y cilíndricas) a pluricelulares (coloniales y filamentosas). La distribución de estos microorganismos es mundial, siendo más frecuentes en climas tropicales y subtropicales (Gutiérrez-Praena et al., 2013). Se pueden encontrar tanto en ecosistemas marinos, como de agua dulce (ríos, lagos, lagunas, estuarios) y terrestres. A las especies que crecen en medios acuáticos se les conoce como especies pelágicas, y a las que lo hacen unidas a rocas, arena o plantas, como especies bentónicas (Humbert, 2009). Además, pueden vivir en ambientes con temperaturas extremas, como en las aguas de fuentes minerales con temperaturas de 74 °C, o en lagos antárticos, con temperaturas que rondan los 0 °C (Puschner y Humbert, 2007; Lucena, 2008). Siendo el intervalo de temperaturas de 18°C-25°C en el que mayor crecimiento se produce, las temperaturas más bajas (10°C) o más altas (30°C) de éstas suponen una limitación de dicho crecimiento (García, 2009). Por tanto, las estaciones más favorables para su crecimiento son el verano y finales de otoño.

En los ecosistemas acuáticos, el predominio de cianobacterias acontece cuando las condiciones ambientales son apropiadas para su proliferación. Por ejemplo, en ambientes eutrofizados (Fig. 1) caracterizados por altas concentraciones de nutrientes minerales (principalmente compuestos nitrogenados y fosfatados) (Humbert, 2009). Este aumento de materia inorgánica lleva a un aumento de microorganismos desintegradores, tanto en el agua como en los sedimentos, los cuales terminan agotando el oxígeno disuelto, favoreciendo la actividad fotosintética de las cianobacterias.



Figura 1: Ejemplo de un ambiente acuático eutrofizado (Chen et al., 2016)

Asimismo, bajo estas condiciones anaeróbicas, la disponibilidad de nitrógeno y fósforo aumentan, lo que favorece aún más el crecimiento masivo de cianobacterias (Lucena, 2008). Este proceso rápido de eutrofización, no deja de ser una consecuencia más del impacto antrópico en los ecosistemas acuáticos, como los vertidos de efluentes domésticos, industriales y agrícolas (Chatziefthimiou et al., 2016; Cha et al., 2017). Dicho proceso de eutrofización, ayudado por el aumento de la temperatura y los periodos de alta luminosidad, aminoran la calidad del agua, ya que disminuye la proporción de oxígeno disuelto y la biodiversidad acuática, así como también afecta a las características organolépticas debido a la producción de compuestos aromáticos

volátiles. Además, la eutrofización aumenta la magnitud de microalgas y cianobacterias y, por último y no menos importante, se acrecienta la producción de toxinas (Lucena, 2008).

Además, existen otros factores que influyen en la abundancia de cianobacterias, la temperatura del agua (Puschner y Humbert, 2007) y el tiempo de residencia de las cianobacterias en ésta. Mientras que la temperatura es un agente estable, el tiempo de residencia sí que varía de un ambiente a otro dependiendo de la dinámica hidrológica. De forma que el tiempo de residencia parece ser un mejor indicador de la presencia y abundancia de cianobacterias que la temperatura (Cha et al., 2017).

Asimismo, algunas cianobacterias son productoras de una amplia gama de metabolitos secundarios que se caracterizan por su comprometida toxicidad, conocidos con el nombre de cianotoxinas (Rajneesh et al., 2017), entre las que destacan por su mayor estudio e impacto las microcistinas (MCs) y cilindrospermopsina (CYN) (He et al., 2016). La existencia de estas cianotoxinas presenta efectos adversos a nivel mundial, tanto económicos como ecológicos (Cha et al., 2017) sobre la pesca, acuicultura, agricultura y de interés sanitario para humanos y animales (Gutiérrez-Praena et al., 2013; Corbel et al., 2014).

1.1. Clasificación de cianotoxinas

Las cianotoxinas pueden clasificarse en cinco categorías en función de su órgano diana: hepatotoxinas (MCs, nodularinas y CYN), neurotoxinas (saxitoxinas, Anatoxina-a (s), Anatoxina-a y Homoanatoxina-a), citotoxinas (CYN), dermatoxinas y toxinas potencialmente irritantes (Lipopolisacáridos) (Humbert, 2009; Rajneesh et al., 2017).

En el interior de las células se halla un alto porcentaje de cianotoxinas (toxinas intracelulares) (Corbel et al., 2014; Walls et al., 2018), siendo menor la magnitud liberada al agua (toxinas extracelulares) (He et al., 2016). Sin embargo, las citadas endotoxinas pueden liberarse al medio cuando se produce el envejecimiento o la muerte de la célula, ya sea de forma natural o no (Lucena, 2008; Corbel et al., 2014). Por este motivo, es importante la precaución en el tratamiento del agua para así no provocar la muerte de la célula y la posterior liberación de cianotoxinas (Lucena, 2008). Si bien, se considera que las MCs quedan retenidas en el interior de las células en mayor medida que la CYN (Gaget et al., 2017).

Estas algas son capaces de producir, como defensa a la agresión de un organismo superior (Lucena, 2008), más de una toxina diferente de manera simultánea (García, 2009). Sin embargo, la toxicidad de una floración de cianobacterias es imposible de conocer *a priori*, ya que incluso dentro del florecimiento de una única especie la producción de toxinas puede variar, es decir,

puede haber una mezcla de cepas tóxicas y no tóxicas (García, 2009; Humbert, 2009). Para detectar e identificar las diferentes toxinas producidas, y por consiguiente la toxicidad de la floración, será necesario la aplicación de métodos analíticos adecuados (Puschner y Humbert, 2007).

El presente trabajo se centra en el estudio de la toxicidad que producen sobre la reproducción y el desarrollo dos tipos de cianotoxinas: las microcistinas y la cilindrospermopsina.

1.1.1. Microcistinas

Las microcistinas son cianotoxinas ampliamente distribuidas que florecen en todos los continentes (Harke et al., 2016). Son producidas por especies de cianobacterias pertenecientes a los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* y *Hapalosiphon* (Rajneesh et al., 2017). A su vez, estas cianotoxinas son las que se encuentran más frecuentemente en los medios acuáticos en concentraciones lo suficientemente elevadas como para suponer un riesgo para la salud pública (García, 2009). Sin embargo, no todas las cepas producen MCs, considerándose toxicológicamente significativas únicamente aquellas que poseen genes para su producción (Puschner y Humbert, 2007).

En cuanto a su estructura, son heptapéptidos cíclicos constituidos por siete aminoácidos, entre los que se incluyen varios D-aminoácidos y dos aminoácidos inusuales, como son la N-metildehidroalanina (M-Dha) y un β -aminoácido hidrófobo conocido como Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico (Adda). De manera que la estructura general de las MCs es (-D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷-) (Fig. 2), donde los L-aminoácidos variables, X y Z, situados en las posiciones 2 y 4, varían, determinando así el sufijo en la nomenclatura de más de 100 variantes de MC (Rajneesh et al., 2017). Además de estos dos grupos, presenta dos radicales (R1 y R2) y dos posiciones desmetiladas (3 y 7) lo que también contribuye a la gran variedad de MCs (Humbert, 2009).

El congénere de MC más común es MC-LR, que se caracteriza por la presencia de leucina (L) y arginina (R) como L-aminoácidos en las posiciones 2 y 4, respectivamente. MC-LR es la hepatotoxina más potente y estudiada de las diferentes variantes conocidas de MC (Rajneesh et al., 2017). Otros congéneres de MC que también han sido estudiados en profundidad son MC-RR con el aminoácido arginina en las posiciones 2 y 4, y MC-YR con los aminoácidos tirosina y arginina en dichas posiciones (Gutiérrez-Praena et al., 2013).

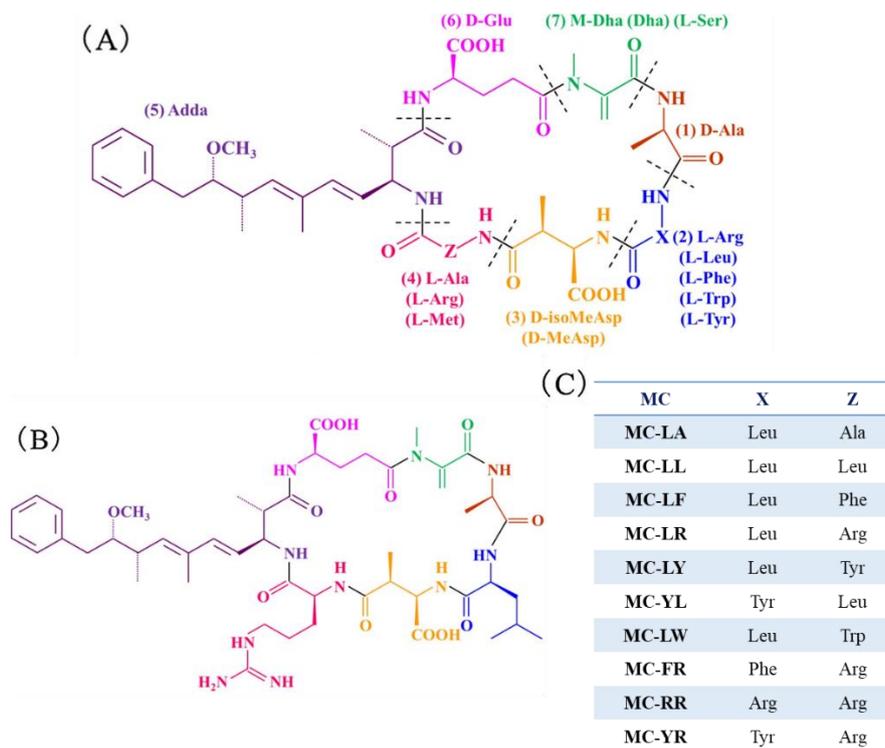


Figura 2: Estructura química de MCs. (A) Estructura general de las MCs. X y Z, en las posiciones 2 y 4, son L-aminoácidos variables y determinan el sufijo en la nomenclatura de MCs. (B) Microcistina-LR (MC-LR) contiene los aminoácidos leucina (L) y arginina (R) en las posiciones variables 2 (X) y 4 (Y), respectivamente. (C) Sustituyentes X e Y de las MCs más frecuentes. Modificado de: Chen et al., 2016.

Estas hepatotoxinas van desde moléculas altamente tóxicas como las anteriormente citadas MC-LR, con DL_{50} (i.p. en ratones) = $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ o MC-RR con DL_{50} (i.p. en ratones) = $600 \mu\text{g kg}^{-1}$, hasta MC prácticamente no tóxicas (Humbert, 2009; He et al., 2016).

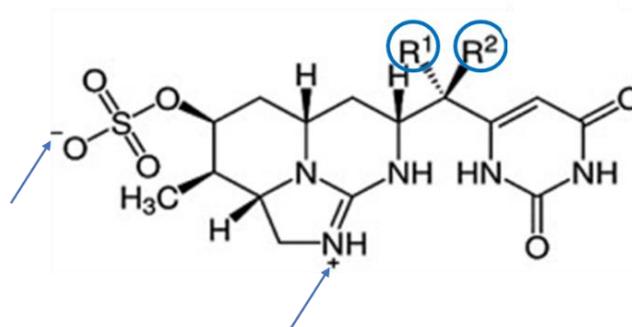
Por otra parte, mientras que su absorción tiene lugar en el intestino delgado (Puschner y Humbert, 2007), la distribución de las MCs en órganos y tejidos se lleva a cabo por transporte facilitado mediante los receptores de membrana de la familia de los polipéptidos transportadores de ácidos orgánicos (OATp) (Gutiérrez-Praena et al., 2013; He et al., 2016). Una vez en el interior de la célula, las MCs se unen covalentemente a las proteínas fosfatasa 1 (PP1) y 2a (PP2a) inhibiéndolas (Chen et al., 2016), induciendo hepatotoxicidad en mamíferos y otros vertebrados, dado que primordialmente afectan a los hepatocitos de manera dosis dependiente (Harke et al., 2016; Rajneesh et al., 2017). Además, las MCs pueden llegar a bioacumularse tanto en vertebrados como en invertebrados acuáticos, incluyendo peces y zooplancton; por lo que hay una mayor probabilidad de que estas cianotoxinas circulen por la cadena trófica (Gutiérrez-Praena et al., 2013).

Dosis bajas de MCs generan cambios progresivos en el tejido hepático, lo que provoca una inflamación crónica, entre otros efectos, (Humbert, 2009) desembocando en una sintomatología caracterizada por hemorragia intrahepática, destrucción de estructuras hepáticas, necrosis de hepatocitos y degeneración (Lin et al., 2018). Aunque el hígado es el órgano en el que se acumulan las MCs en mayor porcentaje, también pueden llegar a acumularse en riñones e intestino cuando la exposición es a MC-LR (Humbert, 2009) produciéndose efectos nefrotóxicos y síntomas gastrointestinales como vómitos y diarrea (Puschner y Humbert, 2007) e incluso necrosis del epitelio de la mucosa nasal como resultado de la inhalación de MC-LR (García, 2009). Asimismo, MC-LR presenta actividad promotora de tumores, tanto es así, que fue clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) como posiblemente carcinógeno 2B (IARC, 2010).

1.1.2. Cilindropermopsina

La cilindropermopsina se produce generalmente por géneros de cianobacterias como *Cylindropermopsis* (*Cylindropermopsis raciborskii*), *Anabaena*, *Aphanizomenon* (*Aphanizomenon ovalisporum*), *Umezakia* (*Umezakia natans*), *Lyngbya* y *Raphidiopsis* (*Raphidiopsis curvata*) (Humbert, 2009; He et al., 2016). Se trata de un alcaloide tóxico constituido por un resto de hidroximetil-uracilo unido a un grupo de guanidina sulfatada con un anillo de pirimidina esencial para los efectos tóxicos (Fig. 3). De manera que la forma no tóxica de la molécula se obtendría modificando dicho anillo, como es el caso del derivado desoxicilindropermopsina (Humbert, 2009; Rajneesh et al., 2017). Además de este derivado no tóxico, existe otro derivado, el 7-epicylindropermopsina, que sí presenta toxicidad (Humbert, 2009).

En el rango típico de pH de las aguas naturales, la CYN es un zwitterión (dado que la molécula presenta una carga positiva y otra negativa) por lo que es soluble en agua (He et al., 2016). Por este motivo, a diferencia de las MCs, la CYN es principalmente una toxina extracelular (Pearson et al., 2016).



ESTRUCTURA	RADICALES
Cilindrospermopsina	R ¹ : H / R ² : OH
7-epi-cilindrospermopsina	R ¹ : OH / R ² : H
Deoxicilindrospermopsina	R ¹ : H / R ² : H

Figura 3: Estructura general de CYN y congéneres.

Modificado de: Gutiérrez-Praena et al., 2013.

La CYN tiene varias vías de acción tóxica: inducción de la formación de aductos de ADN, roturas de la cadena de ADN o rotura del huso cinetocoro y pérdida cromosómica. Dicha toxicidad está mediada por la inhibición del glutatión (GSH), la síntesis de proteínas y los metabolitos producidos por citocromo P-450 (He et al., 2016; Pearson et al., 2016). Al igual que las MCs, son cianotoxinas hepatotóxicas y nefrotóxicas que llegan a producir un aumento en los niveles de colesterol en plasma e hígado, así como también producen necrosis tubular (Sukenic et al., 2006). Del mismo modo, también pueden llegar a inducir daño en timo, corazón, glándulas suprarrenales, intestino y pulmones. La CYN sí que muestra cierta actividad genotóxica *in vitro* e *in vivo* (Puschner y Humbert, 2007; Humbert, 2009; Rajneesh et al., 2017).

Su DL₅₀ (i.p. en ratones) es de 2,1 mg kg⁻¹, 30 veces superior a la producida por vía oral (Lucena, 2008; Pearson et al., 2016). La intoxicación va seguida de síntomas como dolor de cabeza, fiebre, diarrea, anorexia, respiración irregular e incluso muerte (Humbert, 2009; He et al., 2016). Por último, a partir de datos experimentales, se ha podido concluir que la acción de la CYN es más lenta y que su toxicidad y estabilidad son menores, en comparación con las MCs (Humbert, 2009).

1.2. Rutas potenciales de exposición

Entre las principales vías de exposición a MCs y CYN en humanos se encuentran la vía oral, la dérmica y la inhalatoria (Lucena, 2008). En cuanto a la exposición por vía oral, puede producirse en primer lugar, a través de la ingesta de agua contaminada con células cianobacterianas productoras de toxinas o con las propias toxinas libres (Humbert, 2009); en segundo lugar, por el consumo de animales o plantas que han acumulado toxinas en su organismo,

transfiriendo estas cianotoxinas a través de la cadena alimentaria (García, 2009; Gutiérrez-Praena et al., 2013; Corbel et al., 2014). Este proceso de bioacumulación ocurre cuando las concentraciones de toxinas son más altas en el tejido o ser vivo que en el ambiente, debido a la absorción de dichas toxinas (Gutiérrez-Praena et al., 2013). Respecto a la vía inhalatoria y dérmica, la salud humana puede verse comprometida, al igual que en la vía oral, bien por la inhalación o por el contacto directo con las cianobacterias o cianotoxinas (Lucena, 2008).

Estos hechos pueden ocurrir de manera accidental o por la práctica de deportes acuáticos (natación, buceo, remo...) (Funari et al., 2017). Asimismo, las características organolépticas del agua contaminada con cianobacterias son tan desagradables que la probabilidad de que ocurra su ingesta es muy baja, puesto que los bañistas evitan su contacto (Lucena, 2008). Por todo esto, las referencias de intoxicaciones con cianotoxinas son más frecuentes en animales que en humanos, debido a su comportamiento y tendencia a la exposición de forma natural (Puschner y Humbert, 2007).

El valor de referencia para MC-LR establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 1998), siendo la única cianotoxina para la cual la OMS ha establecido parámetros de referencia (Harke et al., 2016). A su vez, la Ingesta Diaria Tolerable o Admisible (IDA o TDI) se define como “la cantidad de una sustancia potencialmente peligrosa que puede ser consumida diariamente durante toda la vida con riesgos insignificantes de efectos adversos para la salud”, siendo de $0,04 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para MC-LR (WHO, 1998) y $0,03 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para CYN (Humpage y Falconer, 2003).

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es realizar una revisión y puesta al día de los efectos sobre la reproducción y el desarrollo de MCs y CYN existentes en la bibliografía científica durante el período 2013-2018. En este estudio se destacan los aspectos más relevantes desde el punto de vista toxicológico.

3. METODOLOGÍA

Para la realización de la presente revisión bibliográfica, se ha llevado a cabo, en primer lugar, una búsqueda general para la contextualización del tema y para adquirir los conocimientos previos necesarios. En segundo lugar, se procedió a la búsqueda de pautas para la realización de un Trabajo de Fin de Grado. Se encontró un tutorial online llamado “Tutorial para la elaboración de Trabajos Fin de Grado y Fin de Máster de la Facultad de Farmacia” publicado por la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla en Diciembre de 2015, el cual aportó, junto con la

información proporcionada por las profesoras tutoras, bases claras sobre las que establecer el presente escrito.

La búsqueda bibliográfica se ha llevado a cabo utilizando bases de datos como Science Direct (sciencedirect.com), Google Académico (scholar.google.es) y el amplio catálogo proporcionado por la Universidad de Sevilla, llamado Fama+ (fama.us.es). Para poder acceder a la lectura y descarga completa de los artículos ha sido necesaria la identificación como usuario de la Universidad de Sevilla, la cual posee la licencia para ello.

Para realizar la búsqueda se ha acotado el rango de resultados delimitando el periodo de fechas desde el año 2013 hasta el año 2018 (Fig. 4), aunque, de manera excepcional, se han incluido artículos menos recientes considerando la importancia de la información que aportaban. Además se han empleado las siguientes palabras clave tanto en español como en inglés: *cyanobacteria*, *cyanotoxin*, *reproduction*, *development*, *cylindrospermopsis*, *microcystis*, *species*, *effects* y la combinación de ellas.

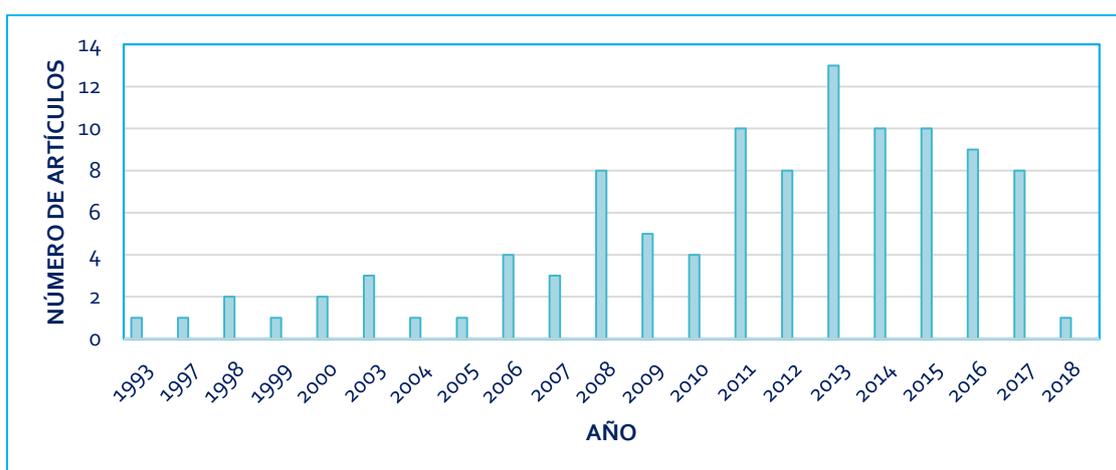


Figura 4: Gráfico indicativo de la proporción de artículos relevantes en función del año.

Una vez obtenidos los artículos resultantes de la búsqueda, se ha facilitado su lectura y comprensión en inglés utilizando la herramienta de traducción de Google Chrome, así como el diccionario en línea WordReference.

A partir de ahí, se procedió a la lectura de los mismos, leyendo en primer lugar el resumen del artículo a partir del cual, junto con los criterios de selección anteriormente citados (rango de fechas y palabras clave), se decidió si era relevante o no para el tema de estudio que nos ocupa, realizando así el primer cribado. A partir de ahí se llevó a cabo la lectura de todos los artículos considerados relevantes, y se procedió al subrayado de lo importante de cada artículo y

posteriormente la redacción del texto teniendo en cuenta todo lo anteriormente citado. El orden de la redacción del mismo ha sido introducción, objetivos, metodología, resultados y discusión, conclusiones y resumen, finalizando el artículo con la portada e índice. El apartado de bibliografía se ha ido realizando a medida que se incluían citas bibliográficas en el texto.

Por último, a medida que iba finalizando cada apartado del texto, las profesoras tutoras llevaban a cabo la corrección de la misma y la posterior puesta en común para modificar o mejorar los aspectos necesarios.

La presente revisión, fundamentada en el área de Toxicología, está centrada en el estudio de diversos aspectos relacionados con la toxicidad de cianobacterias sobre el desarrollo y la reproducción por lo que se enlaza con otras áreas de conocimiento como la Bioquímica o la Fisiología.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las últimas investigaciones sobre cianobacterias han evidenciado la capacidad de sus cianotoxinas para interferir en las vías de señalización de diferentes receptores intracelulares, lo cual afecta a diversos procesos fisiológicos como la regulación hormonal, la reproducción y el desarrollo, causando estragos relevantes tanto en invertebrados como vertebrados, incluidos los humanos (Jonas et al., 2015). Basándonos en este hecho, a continuación se exponen los resultados obtenidos del estudio de los efectos de las MCs y CYN sobre la reproducción y el desarrollo.

4.1. Microcistinas

4.1.1. Efectos sobre la reproducción

Ante la evidente disminución de fertilidad tanto en animales como en humanos en los últimos tiempos, en gran medida vinculado con la exposición ambiental (Chen et al., 2011; Pant et al., 2013), numerosos estudios han tratado de investigar lo sucedido. Algunos de ellos, evidenciaron que el segundo órgano diana de mayor importancia para las MCs es el sistema reproductor (Chen y Xie, 2005), acumulándose ésta en testículos (Wang et al., 2008; Zhao et al., 2012; Wang et al., 2013a) y ovarios (Papadimitriou et al., 2012; Wu et al., 2014), lo cual implica toxicidad reproductiva (Yang et al., 2013; Lone et al., 2015).

4.1.1.1. Estudios *in vitro*

En la Tabla 1 se exponen los resultados observados para los estudios *in vitro*. Las espermatogonias son las células espermatogénicas más inmaduras en el proceso de espermatogénesis en los testículos maduros. Sin embargo, la MC-LR es capaz de acceder a ellas,

lo que disminuye la viabilidad de la propia célula espermatogénica, afectando al proceso reproductivo, tal y como demostraron Zhou et al. (2012) y Wang et al. (2013a). Como hemos citado anteriormente, las células de Sertoli son la diana de MC-LR en términos de toxicidad reproductiva masculina (Yi et al., 2011; Zhang et al., 2011; Li y Han, 2012; Chen et al., 2013; Wang et al., 2013a; Zhou et al., 2015) cuyo objetivo es proporcionar los nutrientes necesarios para que se produzca la espermatogénesis, así como también construir una barrera sangre-testículo para impedir que sustancias tóxicas penetren en las células germinales en desarrollo (Su et al., 2011). De manera que esta es la explicación de que el daño que se produzca en estas células conlleva un daño en la capacidad reproductora masculina. Además, la exposición a MC-LR produce estrés oxidativo y lesión celular (Yi et al., 2011; Zhang et al., 2011; Li y Han, 2012; Chen et al., 2013). Asimismo, en este tipo de estudios *in vitro*, se observaron procesos de apoptosis, al aumentar la relación Bax/Bcl-2 y la activación de la caspasa-3 en la cascada apoptótica (Chen et al., 2013).

Por otra parte, una alteración en las células de Leydig puede deteriorar la capacidad reproductiva masculina, tal y como comprobaron Li et al. (2008) al exponer estas células a MC-LR y observar una disminución en la producción de testosterona y un aumento del estrés oxidativo, por aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Según estos autores, el estrés oxidativo observado fue responsable de la apoptosis inducida por la citada cianotoxina. De manera que nuevamente estos efectos conducen a toxicidad reproductiva. Sin embargo, otros estudios (Ding et al., 2006; Wang et al., 2012; Xiong et al., 2014) evidenciaron que MC-LR no ingresó en las células de Leydig y, por tanto, no produjo efectos tóxicos en ellas, ya que no observaron que las cianotoxinas se distribuyeran en dichas células. Por consiguiente, no actuaron directamente sobre la síntesis de testosterona, si no que la disfunción producida en las células de Leydig es un efecto indirecto al daño del eje hipotálamo-pituitaria-gónada (HPG) producido por MC-LR.

MODELO EXPERIMENTAL	TOXINA	VÍA DE EXPOSICIÓN	DOSIS	EFECTOS TÓXICOS	REFERENCIAS
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	25; 50; 100 μ M	\uparrow Índices mitóticos, anafases y husos mitóticos anormales, células poliploides, apoptosis y necrosis	Lankoff et al., 2003
	Extractos de floraciones de cianobacterias				
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	1; 10; 20 μ g ml ⁻¹	\downarrow Capacidad de reparación del daño del ADN y \uparrow frecuencia de micronúcleos inducidos por la apoptosis de los rayos UV	Lankoff et al., 2006
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,5; 5; 50; 500 nM	\downarrow Viabilidad celular, apoptosis, \downarrow testosterona, \uparrow ERO, \uparrow MDA, \downarrow SOD	Li et al., 2008
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	1; 2; 5; 10; 20; 50 μ M	Apoptosis y necrosis, \downarrow células mitóticas, interrupción de la formación de cromosomas, daño del citoesqueleto	Gácsi et al., 2009
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,15; 1,5; 15 μ g L ⁻¹	\uparrow ERO, \downarrow SOD	Yi et al., 2011
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,5; 1; 10; 20 μ g ml ⁻¹	\downarrow Viabilidad celular, apoptosis, \uparrow p53, \uparrow Bax, \downarrow Bcl-2, \uparrow actividad caspasa-3	Zhang et al., 2011
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,5; 5; 50; 500 nM	\downarrow Viabilidad celular, \uparrow MDA, \downarrow SOD, \uparrow ERO, \downarrow MMP, apoptosis, \uparrow caspasa-3, \uparrow caspasa-9	Li y Han, 2012
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	1; 10; 100; 250; 500; 750; 1000 nM	Sin citotoxicidad	Wang et al., 2012
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,5; 5; 50; 500 nM	\downarrow Viabilidad celular, apoptosis, \downarrow capacidad antioxidante total, \uparrow ERO, \uparrow MMP, \uparrow Ca ²⁺ , modulación de la expresión de OATps	Zhou et al., 2012
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,5; 5; 50; 500 nM	\downarrow Viabilidad celular, \downarrow integridad de la membrana celular, \uparrow LC3, \downarrow Bcl-2, \uparrow ctc, \uparrow caspasa-3	Chen et al., 2013b
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,5; 1; 2,5; 10; 15 μ g ml ⁻¹	\downarrow Viabilidad celular, \downarrow eficiencia de formación de colonias, \downarrow CAT, \uparrow MDA, \uparrow ERO, \downarrow MMP, apoptosis, \uparrow p53, \uparrow Bax, \downarrow Bcl-2	Yang et al., 2013
<i>In vitro</i>	MC-RR	Cultivo en medio	20; 40; 60; 80 μ g ml ⁻¹	Hormesis, proliferación celular, apoptosis, modulación de NF- κ B y sus genes	Chen et al., 2014
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	2,5; 5; 10 μ g ml ⁻¹	Detención de fase G2 / M	Li et al., 2014
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	1; 10; 100; 250; 500; 750; 1000 nM	Sin citotoxicidad	Xiong et al.; 2014
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,5; 5; 50; 500; 1000; 10.000; 100.000 nM	\downarrow Viabilidad celular, alteración de 101 microRNAs, incluida la regulación negativa de miR-96	Zhou et al., 2014
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	2,5; 5; 10 μ g ml ⁻¹	\downarrow Viabilidad celular, \uparrow ERO, \downarrow MMP, \downarrow SOD, \uparrow MDA, \downarrow GR, \downarrow GPX, \uparrow caspasa-3, apoptosis	Xue et al., 2015
<i>In vitro</i>	MC-LR	Cultivo en medio	0,5; 5; 50; 500 nM	\downarrow Viabilidad celular, alteración de 115 microRNAs y 2494 genes, \uparrow MAPK11, \downarrow tubulina, \downarrow ZO-1, \downarrow oclusión	Zhou et al., 2015

Tabla 1: Resumen de la toxicidad reproductiva de MCs en estudios de mamíferos *in vitro*.

4.1.1.2. Estudios *in vivo*

4.1.1.2.1. Estudios en mamíferos

4.1.1.2.1.1. Extractos crudos de microcistinas

En la Tabla 2 se exponen los resultados observados para los extractos crudos de MCs. En primer lugar, Ding et al. (2006), demostraron que la exposición intraperitoneal (i.p.) a extractos celulares de *Microcystis* conlleva una disminución en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, entre otros efectos, lo que implica la consolidación de los efectos perjudiciales de las MCs sobre la reproducción.

Por otra parte, se conoce con seguridad, que el gen c-jun se trata de un regulador positivo de la proliferación celular, y que además es capaz de inducir otros reguladores positivos del avance del ciclo celular. A su vez, el gen c-fos, presenta actividad oncogénica con mayor sobreexpresión en células tumorales y el gen c-myc codifica un factor de transcripción implicado en la proliferación celular y la carcinogénesis (Chen et al., 2016). De esta forma, Li et al. (2009), descubrieron que la administración de extractos crudos de *Microcystis* en ratas, provocan una sobreexpresión de los genes c-myc, c-jun y c-fos en testículos, lo que puede desembocar una mayor actividad en la promoción de tumores. Sin embargo, Xiong et al. (2009), mostraron su desacuerdo al descubrir que, bajo la misma administración de estos extractos en ratas, tenía lugar un proceso de apoptosis en las células germinales de los testículos. Dicha alteración en la apoptosis, se relacionó con la regulación a favor del aumento de los genes del complejo Fas/FasL, el cual se expresa principalmente en las células de Sertoli. Por todo esto, concluyeron que las MCs afectan directamente a dichas células, debido a la apoptosis producida (Xiong et al., 2009). Estos resultados, concuerdan con los propuestos por Li et al. (2011c), quienes confirmaron la inducción de apoptosis en los testículos de ratas Wistar tras la exposición a MCs. Estos autores, observaron un aumento de p53 (Proteína supresora de tumores) y Bax (Proteína pro-apoptótica), y una disminución de Bcl-2 (Encargada del bloqueo de la muerte celular), proteínas que contribuyen a la vía apoptótica dependiente de mitocondrias.

MODELO EXPERIMENTAL	TOXINA	VÍA DE EXPOSICIÓN	DOSIS	EFFECTOS TÓXICOS	REFERENCIAS
<i>In vivo</i>	Extractos celulares de <i>Microcystis</i>	I.p.	3,33; 6,67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ MCs	↓ Peso absoluto de testículos, ↑ peso relativo de testículos, ↓ peso absoluto y relativo del epidídimo, ↓ motilidad y viabilidad del esperma, daño microestructural	Ding et al., 2006
<i>In vivo</i>	Extractos crudos de MCs	I.v.	86,7 $\mu\text{g MC-LR eq kg}^{-1}$	↑c-fos, ↑ c-jun, ↑ c-myc	Li et al., 2009
<i>In vivo</i>	Extractos crudos de MCs	I.v.	80,5 $\mu\text{g MC-LR eq kg}^{-1}$	Apoptosis, inducción del sistema Fas / FasL	Xiong et al., 2009
<i>In vivo</i>	Extractos crudos de MCs	I.p.	12,5 $\mu\text{g MC-LR eq kg}^{-1}$	Daño ultraestructural, ↑ MDA, ↑ H ₂ O ₂ , ↑ CAT, ↑ SOD, ↑ GPX, ↑ GST, ↑ GSH	Liu et al., 2010
<i>In vivo</i>	Extractos crudos de MCs	I.v.	80 $\mu\text{g MC-LR eq kg}^{-1}$	Modulación de CAT, Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, GR, γ -GCS, transcripción GPX4	Xiong et al., 2010
<i>In vivo</i>	Extractos de floraciones de cianobacterias	I.p.	225; 300; 375; 450 mg células algas liofilizadas kg^{-1}	Daño estructural	Li et al., 2011a
			3; 6; 12 mg células algas liofilizadas kg^{-1}	↑MDA, ↓CAT	
<i>In vivo</i>	Extractos crudos de MCs	I.v.	87 $\mu\text{g MC-LR eq kg}^{-1}$	Modulación de la transcripción de 14 GST	Li et al., 2011b
<i>In vivo</i>	Extractos crudos de MCs	I.v.	87 $\mu\text{g MC-LR eq kg}^{-1}$	↑p53, ↑ Bax, ↓Bcl-2	Li et al., 2011c

Tabla 2: Resumen de la toxicidad reproductiva de extractos crudos de MCs en estudios de mamíferos *in vivo*.

4.1.1.2.1.2. Microcistinas puras (-LR)

En la Tabla 3 se muestran los resultados observados para las MC-LR puras. Análogamente a Ding et al. (2006), Li et al. (2008) llegaron a la conclusión de que la exposición de ratas a MC-LR pura deriva en una disminución de la motilidad espermática e incremento de la tasa de anormalidad espermática. Asimismo, observaron una disminución de los niveles de testosterona sérica, de hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) al dañar el eje HPG y, por tanto, disminuir la expresión de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), resultados que coinciden con los observados por Chen et al. (2011) y Wang et al. (2012). Este daño focalizado en los testículos fue estudiado por Wang et al. (2013a), los cuales observaron que MC-LR se transporta directamente a los mismos, concretamente a la pared tubárica de los túbulos seminíferos, en los que se encuentran las espermatogonias y las células de Sertoli en mayor proporción, por lo que son estas células las principales células diana de MC-LR en los testículos. Respecto a los estudios realizados en hembras, Wu et al. (2014) fueron los únicos investigadores que informaron de la toxicidad de MCs sobre la reproducción en mamíferos. Principalmente se produjeron cambios patomorfológicos en el ovario, una reducción en el número de folículos primordiales y en los niveles de progesterona, lo cual, al igual que en los machos, también hace evidente la potencial toxicidad reproductiva de las MCs.

Continuando con los efectos apoptóticos de MCs, Wang et al. (2013b) y Zhou et al. (2013), tras exponer ratones a MC-LR por vía i.p., observaron una alteración en la apoptosis celular dependiente de la dosis y la duración. Sin embargo, al igual que Li et al. (2009), también revelaron un aumento en la expresión de los genes c-myc, c-jun y c-fos, lo que evidencia la potencial carcinogenicidad de MC-LR para los testículos.

MODELO EXPERIMENTAL	TOXINA	VÍA DE EXPOSICIÓN	DOSIS	EFFECTOS TÓXICOS	REFERENCIAS
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	3; 6; 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$	↑ Enlaces cruzados ADN-proteína, ↑ número de micronúcleos	Dong et al., 2008
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	5; 10; 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$	↓ Peso absoluto y relativo de testículos, ↓ motilidad espermática, ↑ anomalía espermática, ↓ concentración espermática, daño microestructural, cambio en los niveles de testosterona, FSH y LH	Li et al., 2008
<i>In vivo</i>	Oral	MC-LR	1; 3,2; 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	↓ Calidad del esperma, ↓ testosterona, ↑ FSH, ↑ LH, daño microestructural, apoptosis	Chen et al., 2011
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	34,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	↓ ALP, ↓ GST, ↓ LDH, ↑ MDA, ↑ proteína carbonilo, ↑ SOD	Saad et al., 2012
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	3,75; 7,5; 15; 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Modulación de GnRH1, Fsh β , transcripción de Lh β , cambio en los niveles de testosterona, FSH y LH	Wang et al., 2012
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	1; 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	↓ Peso relativo del testículo, daño microestructural y ultraestructural, hinchazón mitocondrial y daño del ADN, ↓ testosterona, ↑ FSH, ↑ LH, ↑ ERO, modulación de la transcripción de genes del citoesqueleto y mitocondria	Chen et al., 2013a
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	3,75; 7,5; 15; 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Daño microestructural, apoptosis, ↑ Bax, ↑ c-myc, ↑ c-jun, ↑ c-fos, ↑ caspasa-3, ↑ caspasa-8, ↑ p53, ↑ p-Bcl-2	Wang et al., 2013b
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	50; 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Daño microestructural, ↓ peso absoluto y relativo de testículos, ↓ diámetro tubular seminífero, apoptosis, ↓ proliferación de células espermatoogénicas, ↑ c-kit, ↑ TH2B, ↑ TP2	Zhou et al., 2013
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	3,75; 7,5; 15; 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	↓ Espermatozoides epididimarios, ↓ testosterona, ↓ LH, ↓ LH β y transcripción GnRH1	Xiong et al., 2014
<i>In vivo</i>	I.p.	MC-LR	5; 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	↓ Peso relativo del ovario, ↓ folículos primordiales, ↓ ciclo estral anormal, ↓ progesterona	Wu et al., 2014

Tabla 3: Resumen de la toxicidad reproductiva de MC-LR pura en estudios de mamíferos *in vivo*.

4.1.1.2.2. Estudios en peces

Trinchet et al. (2011) tras exponer peces medaka a MC-LR, observaron daños estructurales tanto en los túbulos seminíferos como en los ovarios, debido al incremento de las divisiones celulares anormales que llegan a producir la muerte celular. Como consecuencia del efecto producido sobre los ovarios, que deriva en un deterioro del tejido gonado-somático y reducción del almacenamiento del vitelo, el número de huevos engendrados fue mucho menor (Tabla 4). A su vez, Qiao et al. (2013) demostraron que en el pez cebra (*Danio rerio*), las hembras,

presentan mayor sensibilidad a la toxicidad inducida por MC-LR que los machos, observándose incluso un aumento en la tasa de apoptosis en los ovarios. Asimismo, Zhao et al. (2015b) tras exponer peces cebra hembra a MC-LR, obtuvieron resultados que sugieren la posibilidad de efectos transgeneracionales, debido a la disminución de la tasa de fertilización y de eclosión.

Por otra parte, la exposición MC-LR también conlleva a estrés oxidativo, tal y como hemos mencionado con anterioridad. Sin embargo, Hou et al. (2014) descubrieron que el ovario tiene la capacidad de poner en marcha un mecanismo antioxidante mediado por glutatión (GSH) para contrarrestar los efectos oxidativos inducidos por MC-LR, recuperando por tanto su estructura histológica normal.

Por último, Zhao et al. (2012) investigaron los efectos de MC-RR, que a pesar de presentar menor toxicidad en general que MC-LR (Chen et al., 2016) causa daño estructural en los testículos de pez cebra. Éstos también mostraron un rápida respuesta por parte de su sistema de defensa al estrés oxidativo, al igual que describieron Hou et al. (2014) para peces hembra expuestos a MC-LR.

MODELO EXPERIMENTAL	TOXINA	VÍA DE EXPOSICIÓN	DOSIS	EFECTOS TÓXICOS	REFERENCIAS
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inmersión	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	↓ Éxito y actividad de desove	Baganz et al., 1998
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inmersión	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Daño microestructural y ultraestructural, ↓ áreas de ovarios, ↓ huevos engendrados	Trinchet et al., 2011
<i>In vivo</i>	MC-RR	I.p.	2.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$	↑ MDA, ↑ H_2O_2 , ↑ SOD, ↑ CAT, ↑ GST, ↑ GPX, ↑ GSH, daño ultraestructural, alteración de proteínas	Zhao et al., 2012
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inmersión	1; 5; 10; 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	↓ Capacidad de eclosión, daño microestructural, ↓ E2, cambio de nivel de VTG y transcripción, apoptosis	Qiao et al., 2013
<i>In vivo</i>	MC-LR	I.p.	50; 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Daño microestructural, ↑ MDA, ↑ CAT, ↑ GPX, ↓ GST, ↓ GSH, modulación de CAT1, SOD1, GPX1a, GSTr1	Hou et al., 2014
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inmersión	2; 10; 50 $\mu\text{g L}^{-1}$	Crecimiento y maduración de los ovocitos pre-vitelogénicos anormales, ↓ huevos engendrados, ↓ éxito de la fertilización, ↓ incubabilidad, cambio de E2, testosterona y VTG, modulación de la transcripción de los genes del eje HPG	Zhao et al., 2015b

Tabla 4: Resumen de la toxicidad reproductiva de MCs en peces.

4.1.2. Efectos sobre el desarrollo

A nivel general, los efectos de las MCs, tanto sobre la reproducción como sobre el desarrollo, suponen una gran preocupación, principalmente sobre los organismos acuáticos, ya que desarrollan su vida en cuerpos de agua contaminados por la citada cianotoxina (Hou et al., 2017). De hecho, las gónadas se consideran como el segundo órgano diana de las MCs, después del hígado (Chen y Xie, 2005). Por tanto, suponen un riesgo público para la salud, ya que actualmente los tratamientos convencionales del agua solo son capaces de eliminar las células cianobacterianas, lo que permite que las cianotoxinas queden disueltas en el agua potable (Meneely y Elliott, 2013). Finalmente, cabe destacar que Fawell et al. (1999) citó el NOAEL (nivel de efectos adversos no observados) de MCs, referente a la toxicidad del desarrollo, con un valor de $40 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

En primer lugar, es un hecho que las MCs se acumulan en las gónadas de vertebrados e invertebrados lo que hace evidente la transmisión parental de MCs a la descendencia (Cheng et al., 2017), de acuerdo al estudio realizado por Zhao et al. (2015a, 2016). En éste se descubrió que la exposición perinatal puede causar la transferencia de MC-LR de la madre a la descendencia e inducir efectos adversos, tales como la disrupción del citoesqueleto, estrés del RE, estrés oxidativo en el cerebro y alteración del equilibrio redox de las crías de rata (Tabla 5). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Liu et al. (2014) que observaron retraso del crecimiento y alteraciones en el sistema inmune en los embriones F1 de pez cebra (Tabla 5), a pesar de que no habían sido expuestos directamente a tal toxina.

Asimismo, se ha probado que la exposición a MC-LR causa disfunción tiroidea en ratones (Zhao et al., 2015c). Por otro lado, se ha observado una disminución en los niveles de la hormona tiroidea (TH), (responsable del desarrollo, crecimiento, metabolismo y reproducción) y una transcripción de genes anormales vinculados con el eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas (HPT) en la especie de pez cebra *Danio rerio* expuestos a MC (Yan et al., 2012; Xie et al., 2015). La importancia de dicho eje reside en que es el encargado de la homeostasis tiroidea, además de que es parte del sistema endocrino encargado de regular tanto el metabolismo tiroideo, como el desarrollo temprano del organismo (Cheng et al., 2017).

Chen et al. (2017) llevaron a cabo una investigación, también con peces cebra, expuestos a concentraciones de MC-LR de 0, 1, 5 y $25 \mu\text{g L}^{-1}$ y posteriormente se evaluó la toxicidad transgeneracional. Los criterios de valoración incluidos fueron malformación, frecuencia cardíaca (latidos 30 s^{-1}), eclosión, supervivencia y longitud corporal, y se analizaron los niveles de TH en las generaciones F0 y F1, obteniéndose los resultados descritos en la Tabla 5. De manera que, acorde a los resultados, la exposición de los padres a concentraciones de MC-LR ambientalmente

relevantes produce una evidente alteración endocrina en los niveles de TH, lo que conduce a retraso del crecimiento en las larvas F1, resultado que concuerda con el anteriormente descrito por Liu et al. (2014). Otra explicación posible a la disminución de los valores de T4 (tiroxina) y T3 (triyodotironina) en las larvas puede ser la propia alteración tiroidea parental que induce la exposición a MC-LR, la cual tiene un impacto desfavorable sobre el sistema endocrino tiroideo de la descendencia.

Por otra parte, Li et al. (2015) y Zhao et al. (2015a) llevaron a cabo estudios que evidenciaron que la exposición perinatal a MC-LR producía la acumulación de dicha cianotoxina en el cerebro de las crías de rata Swiss albino, lo que conlleva efectos adversos sobre su neurodesarrollo, como el tamaño reducido del cerebro. Además, Zhao et al. (2015a) mostraron que la transferencia de MC-LR a la descendencia podría alterar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en las crías de rata, lo que evidencia que el sistema de neurotransmisores también se ve afectado por la toxicidad de las MC-LR, hecho que también fue observado para las larvas del pez cebra por Wu et al. (2016).

De manera que Wu et al. (2017) basándose en estas observaciones, plantearon la posibilidad de que la neurotoxicidad del desarrollo fuera un importante factor a estudiar en la toxicidad transgeneracional producida por MC-LR. De hecho, cabe pensar que la neurotoxicidad puede desembocar en un cambio de producción o función de neurotransmisores como dopamina, ácido γ -aminobutírico (GABA), ácido dihidrofenilacético (DOPAC), serotonina y acetilcolina (ACh) (Bradner et al., 2013; Irons et al., 2013). Por lo tanto, para ratificar que la exposición de los progenitores a concentraciones ambientalmente relevantes de MC-LR (0, 1, 5 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$) podría originar neurotoxicidad en las larvas F1, se llevaron a cabo una serie de estudios sobre el anteriormente citado pez cebra.

Concluidos dichos estudios se pudo conocer que, tras la exposición parental, se detectó la presencia de MC-LR en las larvas F1 de pez cebra, por lo que se pudo confirmar, una vez más, que la MC-LR se transfiere de los padres a la descendencia, tal y como expusieron Liu et al. (2014), Li et al. (2015), Zhao et al. (2015a, 2016), Chen et al. (2017) y Cheng et al. (2017). Así como también se pudo corroborar que dicha exposición parental puede conducir a retrasos graves del crecimiento y malformaciones en embriones o larvas F1, lo que hace indicar nuevamente que MC-LR produce toxicidad en el desarrollo para el pez cebra. Asimismo, esta exposición de los progenitores a MC-LR desencadenó una reducción de la locomoción, lo que generó una hipoactividad en las larvas F1 del pez cebra, posiblemente debida a una disminución de los niveles de neurotransmisores (dopamina, DOPAC y serotonina) (Tabla 5). De hecho, la reducción de los niveles de DOPAC (metabolito de la dopamina), muestra como origen la disminución de los

niveles de dopamina en las larvas F1, la cual interviene en el control motor, la motivación y el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas. Mientras tanto, la disminución de serotonina también contribuye, ya que sus funciones son cognitivas, incluyendo la memoria y el aprendizaje. Además, otro posible mecanismo que interviene en la neurotoxicidad del desarrollo es la afectación del sistema colinérgico, en el que se produce una modificación de la actividad de la AChE (Tabla 5), enzima esencial para el desarrollo normal de las neuronas y músculos en la etapa temprana de vida del pez cebra. Por último, dicha transferencia parental de MC-LR, podría afectar al desarrollo del sistema nervioso central (SNC) debido a las anomalías de la expresión génica, lo cual afecta a la regulación del citoesqueleto, a la sinaptogénesis y a la maduración neuronal.

Análogamente, Hou et al. (2017) han llevado a cabo estudios para evaluar la posible interferencia de MCs sobre el eje hormona del crecimiento/factor de crecimiento insulínico (GH / IGF) y, por tanto, sobre el desarrollo gonadal en el pez cebra, ya que la hormona hipofisaria GH es partícipe de procesos fisiológicos de peces como la función inmune (Pérez-Sánchez, 2000), reproducción (Le Gac et al., 1993) y crecimiento (Peng y Peter, 1997). Además, dicha hormona hipofisaria, estimula la síntesis y la secreción en hígado, gónadas y músculos de IGF-I y IGF-II (Vong et al., 2003; Eppler et al., 2007); los cuales tienen efectos sobre el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Todo parece indicar que también pueden estar involucrados en el desarrollo gonadal de peces, ya que está demostrado que participan en la regulación de la espermatogénesis y la maduración de los ovocitos (Baroiller et al., 2014). Para ello, Hou et al. (2017) llevaron a cabo la exposición de las crías de pez cebra a concentraciones de 0; 0,3; 3 y 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR. Los resultados recogidos en la Tabla 5, demuestran que la exposición a MC-LR de la descendencia de pez cebra, produce la condensación de la cromatina en el hígado y en el cerebro, lo que suprime la transcripción de los genes al dificultar el acceso de los factores de transcripción. De manera que este hecho puede desembocar en cambios transcripcionales de los genes relacionados con el desarrollo, como son el *gh* cerebral y *igf1* hepático. Además, los resultados también evidenciaron que la desregulación de la secreción de IGF hepático fue paralela a la alteración de la hormona GH. Así pues, lo que se produce es un menor número de huevos engendrados y una menor calidad de espermatozoides, lo que supone un desafío para la incubación y desarrollo de embriones de la especie. Asimismo, indican que la reducción del ARNm de los genes *gh* y *igf1* es más notable en machos que en hembras, por lo que la supresión de síntesis de GH y IGF-I será mayor en los machos de peces cebra, siendo el retraso del desarrollo más grave en los testículos que en los ovarios.

Por último, y acorde a los efectos de las MCs sobre el desarrollo, Zhang et al. (2017) llevaron a cabo un estudio cuyo objetivo fue analizar el impacto de las MC-LR sobre el desarrollo de la próstata en la descendencia masculina, cuyos padres habían sido expuestos a dicha

cianotoxina. Para este estudio se utilizaron ratones BALB/c, los cuales fueron expuestos a 0, 1, 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR. Una vez recopilados todos los resultados obtenidos (Tabla 5), pudo concretarse que MC-LR puede acumularse en los tejidos prostáticos de ratones teniendo un efecto dependiente de la dosis, por lo que la toxina interfiere directamente en el desarrollo de la próstata, resultado de acuerdo con los obtenidos por Chen y Xie (2005) y Cheng et al. (2017). Además, las MCs, al ser potentes inhibidores de las proteínas PP1 y PP2a, pueden interactuar sobre diversas dianas moleculares, causando la hiperfosforilación de proteínas clave en el control de la apoptosis (Chen et al., 2016). De manera que, en el grupo de ratones de exposición más prolongada (90 días), encontramos un gran número de células apoptóticas que bloquean la cavidad glandular bloqueando la descarga, lo que provoca retención. De la misma forma, la inflamación crónica que acontece puede disminuir la expresión de E-cadherina y mediante el estrés oxidativo, conducir a un daño tisular, modificaciones del ADN postraduccional e inducción de neoplasia prostática (Naber y Weidner, 2000). Además, al disminuir la expresión de las enzimas MMP-2 y MMP-9, endopeptidasas responsables de la remodelación de la matriz extracelular (Nagle, 2004), tuvo lugar una deposición de colágeno en el estroma prostático, desembocando en una fibrosis prostática.

Igualmente, la MC-LR también demostró influir de manera indirecta sobre los niveles de testosterona, como resultado de la disfunción de las células de Leydig tras el daño producido sobre el eje HPT. Dado que la MC-LR disminuye la expresión de la GnRH, no se detectaron niveles de FSH y LH en los grupos expuestos a dicha toxina, por lo que los niveles de testosterona disminuyeron. Además, el desarrollo prostático está regulado por los niveles de andrógenos (testosterona) y estrógenos (Ellem y Risbridger, 2010), por lo que el equilibrio de estas dos hormonas es la pieza fundamental para asegurar un correcto desarrollo de la próstata y el mantenimiento de la función normal de la misma, de manera que el desequilibrio endocrino causado, provoca una disfunción en el desarrollo de la misma.

MODELO EXPERIMENTAL	TOXINA	VÍA DE EXPOSICIÓN	DOSIS	EFECTOS TÓXICOS	REFERENCIAS
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inmersión directa	1; 5 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	Retraso del crecimiento y alteraciones del sistema inmune en embriones F1 de pez cebra	Liu et al., 2014
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inyección intraperitoneal	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 1 vez al día durante 4 semanas	Disrupción del citoesqueleto, estrés oxidativo del cerebro y RE, alteraciones del equilibrio redox, daño oxidativo e incremento de las ERO en el hígado de ratas Sprague-Dawley descendientes	Zhao et al., 2015a, 2016
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inmersión directa	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	- ↓ supervivencia, ↓ tasa de eclosión, ↓ frecuencia cardíaca, ↓ longitud corporal, ↓ niveles de T4 en larvas F1 de pez cebra; ↓ niveles de dopamina, ↓ DOPAC, ↓ serotonina, ↓ de la actividad de AChE en peces cebra. -↑ de la tasa de malformación en peces cebra. -Retraso del crecimiento en larvas F1 de pez cebra.	Cheng et al., 2017; Wu et al., 2017

			25 µg L ⁻¹	- ↓ supervivencia, ↓ tasa de eclosión, ↓ frecuencia cardíaca de larvas F1, ↓ longitud corporal, ↓ niveles de T4 en hembras F0 (en varones no se apreciaron variaciones), ↓ niveles de T4 en huevos y larvas F1; ↓ niveles de T3 en larvas F1; ↓ niveles de dopamina, DOPAC y serotonina, ↓ actividad de AChE en peces cebra. -↑ de la tasa de malformación en peces cebra. -Retraso del crecimiento en larvas F1 de pez cebra.	
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inmersión directa	1 µg L ⁻¹	- ↓ Supervivencia, ↓ tasa de eclosión y ↓ longitud corporal en peces cebra. - Grupo de 30 días: ↓ niveles de estradiol en suero; ↑ niveles de testosterona en la descendencia de ratones BALB/c -Grupo de 90 días: ↓ niveles testosterona sérica y ↓ conversión de andrógenos a estrógenos en suero en la descendencia de ratones BALB/c	Cheng et al., 2017; Wu et al., 2017; Zhang et al., 2017
<i>In vivo</i>	MC-LR	Inmersión directa	3 µg L ⁻¹	- Retraso en el desarrollo y maduración de los oocitos de pez cebra - Desarrollo testicular retardado en pez cebra	Hou et al., 2017
			30 µg L ⁻¹		
<i>In vivo</i>	MC-LR	Oral	10 µg L ⁻¹	- Déficit de peso de la descendencia en ratones BALB/c -Grupo 30 días: proliferación celular retardada y desarrollo prostático deteriorado; ↓ niveles de estradiol en suero; ↑ niveles de testosterona en la descendencia de ratones BALB/c -Grupo 90 días: trastorno generalizado del desarrollo e hiperplasia epitelial prostática; ↓ niveles testosterona y ↓ conversión de andrógenos a estrógenos en la descendencia de ratones BALB/c -Trastorno generalizado del desarrollo e hiperplasia epitelial prostática en la descendencia de ratones BALB/c	Zhang et al., 2017
			50 µg L ⁻¹	- Grupo 30 días: proliferación celular retardada y desarrollo prostático deteriorado; ↓ niveles de estradiol; ↑ niveles de testosterona en la descendencia de ratones BALB/c -Grupo 90 días: desprendimiento y necrosis de células epiteliales prostáticas; trastorno generalizado del desarrollo e hiperplasia epitelial prostática; inflamación crónica en los tejidos prostáticos (↑ IL-6 y ↑ TNF-α); ↓ niveles testosterona sérica y ↓ conversión de andrógenos a estrógenos en suero en la descendencia de ratones BALB/c -Trastorno generalizado del desarrollo e hiperplasia epitelial prostática en la descendencia de ratones BALB/c	

Tabla 5: Efectos sobre el desarrollo inducidos por MCs.

4.2. Cilindrospermopsina

4.2.1. Efectos sobre la reproducción

Existen estudios que respaldan la capacidad de la CYN para causar toxicidad reproductiva en mamíferos (Rogers et al., 2007). Por este motivo Humpage y Falconer (2003) estudiaron la toxicidad oral de CYN en ratones albinos suizos y definieron el NOAEL de CYN como 30 µg kg⁻¹ día⁻¹ y el valor de concentración segura de CYN en agua potable como 1 µg L⁻¹, así como también describieron la TDI cuyo valor ha sido citado con anterioridad. En la presente sección, aunque la

revisión se ha centrado en los años 2013-2018, ha sido necesario ampliar el rango temporal hasta el año 2008 por la ausencia de trabajos que estudien este aspecto. No obstante, han sido encontrados tres estudios que se basan específicamente en la investigación de la toxicidad de la CYN sobre la reproducción.

En cuanto a los resultados observados *in vitro*, Young et al. (2008), evaluaron los efectos de CYN sobre las células de la granulosa humana derivadas de la Fertilización *In Vitro* (FIV) incubándolas con CYN y/o gonadotropina coriónica humana (hCG) durante exposiciones de 2-72 horas con concentraciones de CYN de 0,0625-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y de 1-1000 mUI ml^{-1} de hCG. En este estudio, las exposiciones más cortas a CYN y el aumento de concentraciones de 0-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, no afectaron significativamente a la viabilidad de las células de granulosa, por lo que no se evidenciaron signos de citotoxicidad. Sin embargo, como era de esperar, exposiciones más prolongadas a concentraciones de hasta 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ sí demostraron que CYN es citotóxica para las células de granulosa humana provocando una disminución significativa en el número de células viables y produciendo, como consecuencia, una inhibición de la producción de progesterona dependiente de la dosis (Tabla 6). En relación a las alteraciones hormonales, la concentración más baja de CYN utilizada en este estudio, 0,0625 $\mu\text{g ml}^{-1}$, provocó una disminución significativa en la producción de progesterona después de una exposición de 24 horas a pesar de que dicha concentración aun no provocó citotoxicidad (Tabla 6). Curiosamente, los resultados obtenidos en ratones son diferentes a los obtenidos en ratas por Chong et al. (2002), los cuales mostraron una mayor resistencia de las ratas a los efectos citotóxicos de CYN. La explicación de dichas diferencias reside en la desigualdad del perfil de CYP-450 de cada tipo de célula que conlleva a la producción de diferentes metabolitos, aunque también puede deberse a diferencias en la actividad de CYN, en los protocolos de aislamiento, etc. De igual importancia, las células de la granulosa expuestas *in vitro* a hCG experimentaron por la acción de dicha hormona, un aumento de la producción de progesterona y estrógenos. Sin embargo, aunque la exposición conjunta a CYN y hCG no produjo un aumento de la citotoxicidad, ni afectó significativamente a la producción de estrógenos, sí que lo hizo en la producción de progesterona reduciendo su liberación a partir de la sexta hora de exposición. Asimismo, la exposición de las células a CYN durante 24 horas, no causó una inhibición significativa de la producción de estrógenos, que sí fue observada tras la exposición de 72 horas. Por lo que estos resultados indican que las concentraciones séricas elevadas de CYN pueden producir toxicidad reproductiva.

Además, conviene destacar que, dado que la CYN es capaz de atravesar la pared intestinal e ingresar en la circulación sistémica, puede ser transportada a través de ésta y llegar a órganos periféricos como los ovarios (Young et al., 2008).

Por otro lado, estudios realizados por Young et al. (2012) revelaron que la CYN también es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas antes, incluso, de observarse muerte celular. Fue necesaria una concentración mayor de 3 μM de CYN para conseguir una reducción significativa de la síntesis de proteínas en las células de la granulosa humana (Tabla 6). Dichas células presentan una mayor resistencia *in vitro* a los efectos de la CYN que los hepatocitos, que mostraron daños tras 4 horas de exposición a 0,5 μM de CYN. Por tanto, con los resultados obtenidos se puede concluir que la inhibición de la síntesis de proteínas no conlleva la muerte celular de forma inmediata. No obstante, cuando se procedió a la adición de antagonistas de CYP-450 a los hepatocitos *in vitro* se observó una reducción de la muerte celular mediada por CYN, mientras que continuaba la inhibición de la síntesis de proteínas. Este hecho sugiere que los metabolitos de CYP-450 están implicados en la citotoxicidad y no en la inhibición de la síntesis de proteínas, de la cual parece ser responsable el propio compuesto original (CYN). Por consiguiente, se postula que CYN inhibirá la síntesis de proteínas, de igual modo, en las células de granulosa humana derivadas de FIV, tal y como lo hace en células no reproductivas de hepatocitos.

Por último, en cuanto a los resultados obtenidos *in vivo*, Almeida et al. (2013) estudiaron los efectos tóxicos sobre la reproducción en ratas tras la exposición oral a CYN a concentraciones de 0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabla 6). Los resultados revelaron la ausencia de alteraciones en todos los parámetros que se evaluaron en relación al rendimiento reproductivo, como el peso de la camada, el número total de fetos por camada, el número de fetos vivos y muertos o el número de fetos por cuello uterino, entre otros. Estos datos sugieren una mayor seguridad sobre los valores de la TDI de CYN, ya que las dosis utilizadas fueron iguales o superiores a ésta.

MODELO EXPERIMENTAL	TOXINA	VÍA DE EXPOSICIÓN	DOSIS	EFFECTOS TÓXICOS	REFERENCIAS
<i>In vitro</i>	CYN	Cultivo en medio con CYN	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Citotoxicidad	Young et al., 2008
			0,0625 $\mu\text{g ml}^{-1}$	↓ Síntesis progesterona	
<i>In vitro</i>	CYN	Cultivo en medio con CYN	>3 μM	Inhibición de la síntesis de proteínas en células de granulosa humana	Young et al., 2012
<i>In vivo</i>	CYN	Oral	0,03; 0,3 y 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	No se observaron efectos tóxicos sobre el rendimiento reproductivo	Almeida et al., 2013

Tabla 6: Efectos sobre la reproducción inducidos por CYN.

4.2.2. Efectos sobre el desarrollo

Las floraciones cianobacterianas suponen un grave problema para las aguas superficiales de todo el mundo (Funari et al., 2017). Asimismo, la CYN, además de resultar nociva en términos reproductivos, como hemos citado con anterioridad, también ha demostrado producir daños genéticos tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual puede llegar a ocasionar malformaciones, incluso fatales, tal y como citan Almeida et al. (2013). De hecho, estudios recientes han demostrado que los compuestos producidos por las cianobacterias, entre ellos la CYN, tienen la capacidad de interferir en las vías de señalización de los receptores implicados en el desarrollo de vertebrados (Jonas et al., 2015).

En cuanto a los estudios *in vitro*, Reid et al. (2015) llevaron a cabo estudios basados en el efecto tóxico de las CYN sobre el desarrollo, utilizando para ello células madre embrionarias de ratón (mES). Se escogieron este tipo de células dado que son células indiferenciadas que se asemejan a las células de la masa celular interna (ICM) *in vivo* de un embrión de pre y peri implantación de ratón, que probablemente muestren la rápida proliferación que ocurre *in vivo* (Rathjen y Rathjen, 2001; Reid et al., 2015). Además, aunque los resultados que se obtendrían realizando el estudio en células ES humanas serían más reproducibles para evaluar la toxicidad, éstas requieren condiciones de cultivo celular *in vitro* más avanzadas (Zdravkovic et al., 2008). Asimismo, Reid et al. (2015) describieron que las primeras etapas del desarrollo embrionario se caracterizan por la proliferación celular rápida, la expresión génica y la diferenciación celular. Basándose en esta afirmación, llegaron a la conclusión de que la inhibición de la síntesis de proteínas mediada por el mecanismo de acción de la CYN, puede interferir negativamente en la expresión génica y la traducción, ambas esenciales para la proliferación celular y para su diferenciación, por lo que afectaría a la división celular y el desarrollo embrionario.

De esta forma, tras exponer a dichas células a concentraciones de CYN de 10^{-6} - $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ durante 24, 48, 72 y 168 horas (Tabla 8), se observó una reducción estadísticamente significativa en el recuento de células mES tras la exposición a la concentración más alta ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) de CYN. Por este motivo, el LOEC (Mínima concentración de observación de efecto) se estableció como $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabla 7), aunque sí es cierto que concentraciones superiores a $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ pero inferiores a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ pueden también causar citotoxicidad. Por otra parte, también se estudió el NOEC (Concentración sin efecto observado) el cual se mantiene durante los periodos de 24, 48 y 72 horas, al igual que la IC_{50} (Concentración que reduce el número de células viables en un 50%) que mantiene sus valores con poca variación, hasta llegar al periodo de 168 horas donde se puede observar un mayor despunte de los resultados. Los autores concluyen que con menor concentración de CYN se observará el efecto con anterioridad y se requerirá una concentración menor para inducir una disminución del 50% (IC_{50}) en el número total de células.

Periodo de exposición (horas)	NOEC $\mu\text{g ml}^{-1}$	LOEC $\mu\text{g ml}^{-1}$	IC ₅₀ $\mu\text{g ml}^{-1}$
24	0,5	1	0,86
48	0,5	1	0,84
72	0,5	1	0,87
168	0,000001	0,0001	0,29

Tabla 7: Citotoxicidad de CYN. Modificada de Reid et al., 2015.

La proliferación de mES no se vio afectada por la exposición continua durante 48 horas a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de CYN, aunque una exposición más prolongada de 72 horas a concentraciones de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ sí que redujo la división celular. Los datos obtenidos en la investigación sugieren que la ingesta de aguas contaminadas por una floración de algas productoras de CYN, afecta el desarrollo embrionario previo a la implantación. Para la confirmación total de estos datos sería necesario llevar a cabo la investigación *in vivo*. Asimismo, la susceptibilidad a las CYN varía entre las diferentes líneas celulares, lo cual puede ser el resultado de las diferencias en el perfil del CYP-450 y la consecuente producción de metabolitos secundarios. Además, cabe la posibilidad de que los efectos citotóxicos observados a los 7 días (168 horas) de exposición *in vitro* sea consecuencia de dos mecanismos de acción, en un rango de 10^{-4} a $10^{-1} \mu\text{g ml}^{-1}$ inhiben la síntesis de proteínas, lo que conlleva a una decadencia posterior en la proliferación de las células mES; y a concentraciones superiores se generan metabolitos de CYP-450 citotóxicos. Los embriones que se encuentren en las etapas iniciales de desarrollo pueden reponerse de la pérdida de dichas células; sin embargo, los efectos de la inhibición de la síntesis de proteínas sí que pueden desencadenar efectos más graves en todo el embrión.

Almeida et al. (2013) estudiaron la acción teratogénica de CYN sobre fetos de rata Wistar, utilizando para ello concentraciones de 0,03; 0,3 y $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, que fueron administradas a las madres de la camada (Tabla 8). Analizaron las posibles malformaciones viscerales y esqueléticas de los fetos estudiados, y las investigaciones demostraron la ausencia de ellas en todos los fetos expuesto durante la organogénesis. Esto, al igual que hemos citado en el mismo estudio, pero en términos reproductivos, se debe a que fueron expuestos a dosis iguales o superiores a la TDI para la citada toxina, confirmando que este valor está correctamente descrito.

Berry et al. (2009) estudiaron el efecto de la CYN sobre el desarrollo de embriones de pez cebra (*Danio rerio*). No se obtuvieron evidencias significativas de efectos en el desarrollo o mortalidad en los embriones expuestos por inmersión directa a CYN pura a concentraciones por encima de cualquier concentración ambiental de CYN registrada (Tabla 8). Esto podría deberse a

que la CYN no penetra fácilmente las membranas celulares externas de los embriones de pez cebra cuando la exposición se produce por inmersión directa. Para solventar esta limitación se llevó a cabo una microinyección de la toxina pura en los embriones que permitirá examinar con mayor precisión su toxicidad. La inyección de altas concentraciones de CYN (0,5; 1; 5; 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) tuvieron como resultado mortalidad o deformidad severa en el 100% de los embriones a 1 día después de la fecundación (Tabla 8). Además, todas las dosis inyectadas se definieron como completamente letales, excepto 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para la cual sobrevivieron el 7% de los embriones a 5 días después de la fecundación, aunque sí que todos los embriones se consideraron como gravemente deformados a esta concentración. Este tratamiento con CYN produjo mortalidad sin indicios de toxicidad del desarrollo, aunque sí se observaron deformidades generales en porcentajes inferiores a los de mortalidad.

Por el contrario, los mismos autores, para los extractos lipófilos y polares preparados a partir de cepas de *C. raciborskii* y *A. ovalisporum* sí observaron efectos tóxicos sobre el desarrollo, y también mortalidad por inmersión directa de los embriones en dichos extractos diluidos (Tabla 8). Entre las deformaciones que pudieron observarse se encuentran los ejes corporales desviados, desarrollo anormal del ojo y edemas en el pericardio cuando se trataban de altas concentraciones de extractos. Concentraciones menores se caracterizaron por efectos mínimos; como colas ligeramente dobladas y edemas menores. Esto hace pensar que estos efectos se deben a metabolitos específicos de toxinas diferentes a CYN presentes en los extractos, ya que por ejemplo se ha demostrado que *C. raciborskii* también produce otras cianotoxinas como desoxicilindrospermopsina y saxitoxina, las cuales pueden contribuir en gran medida en la toxicidad del desarrollo de estos extractos.

Por último, y en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente sobre la toxicidad de CYN en el desarrollo, Chernoff et al. (2011) llevaron a cabo la administración de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de CYN a ratas entre los días 13-17 de gestación, lo cual provocó en la descendencia un nacimiento prematuro, bajo peso al nacer, menor aumento de peso y reducción de la viabilidad post-natal de las crías (Tabla 8).

MODELO EXPERIMENTAL	TOXINA	VÍA DE EXPOSICIÓN	DOSIS	EFFECTOS TÓXICOS	REFERENCIAS
<i>In vivo</i>	CYN	Inmersión	50 µg ml ⁻¹	No se observaron efectos significativos sobre el desarrollo	Berry et al., 2009
		Microinyección	0,1 µg ml ⁻¹ - 50 µg ml ⁻¹	Mortalidad y deformación en embriones de pez cebra	
	Extractos aislados de <i>C. raciborskii</i> y <i>A. Ovalisporum</i>	Inmersión	14,3; 71,5 y 143 µg biomasa liofilizada ml ⁻¹		
<i>In vivo</i>	CYN	Oral	50 µg kg ⁻¹	Nacimiento prematuro, bajo peso al nacer, menor ↑ de peso y ↓ viabilidad post-natal en ratas	Chernoff et al., 2011
<i>In vivo</i>	CYN	Oral	0,03; 0,3 y 3 µg kg ⁻¹	Ausencia de malformaciones viscerales o esqueléticas	Almeida et al., 2013
<i>In vitro</i>	CYN	Cultivo en medio con CYN	1; 0,5 y 10 ⁻¹ a 10 ⁻⁶ g ml ⁻¹	Inhibición de proteínas, ↓ Células mEs, citotoxicidad, alteración del desarrollo embrionario	Reid et al., 2015

Tabla 8: Efectos sobre el desarrollo inducidos por CYN.

5. CONCLUSIONES

De la presente revisión bibliográfica, podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Las MCs que presentan más datos de toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo son la MC-LR y la MC-RR, siendo la MC-LR la más estudiada.
- Los efectos de las MCs sobre la reproducción en estudios *in vitro* son daños citotóxicos, estrés oxidativo y alteraciones endocrinas en las células que intervienen en el proceso reproductivo. En cuanto a los efectos *in vivo*, destacan en mamíferos, alteraciones sobre la calidad, concentración y estructura de los espermatozoides y daños estructurales sobre los órganos sexuales masculinos (testículos) y femeninos (ovarios), como consecuencia también se producen alteraciones endocrinas. En peces, se observan alteraciones sobre el desove y fertilización, daños sobre los ovarios, crecimiento anormal de ovocitos pre-vitelogénicos y alteraciones endocrinas.
- Las MCs ejercen efecto tóxico sobre el desarrollo de mamíferos y peces, provocando alteraciones en el crecimiento de la descendencia; así como, malformaciones y alteraciones endocrinas.
- La CYN produce efectos sobre la reproducción como citotoxicidad en las células reproductoras y disminución de la síntesis de progesterona en estudios *in vitro*. Por otra parte, existen estudios *in vivo* en los que no se observan efectos tóxicos sobre la reproducción cuando se exponen a concentraciones de CYN menores o iguales a la TDI.

- La CYN produce, tanto *in vitro* como *in vivo*, alteraciones en el desarrollo embrionario de mamíferos y peces, a concentraciones superiores a la TDI.

Por último, sería interesante continuar las investigaciones estudiando los efectos sobre la reproducción y el desarrollo tras la exposición conjunta a ambas toxinas (MCs y CYN), puesto que este hecho se ajusta más a la realidad debido a que las floraciones de cianobacterias suelen ser mixtas y presentan distintas especies productoras de toxinas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida CS, Costa de Arruda AC, Caldas de Queiroz E, Matias de Lima Costa HT, Barbosa PF, Araújo Moura Lemos TM, et al. Oral exposure to cylindrospermopsin in pregnant rats: Reproduction and foetal toxicity studies. *Toxicon* 2013; 74: 127–9.
2. Baganz D, Staaks G, Steinberg C. Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. *Water Res.* 1998; 32(3): 948–52.
3. Baroiller JF, D'Cotta H, Shved N, Berishvili G, Toguyeni A, Fostier A, et al. Oestrogen and insulin-like growth factors during the reproduction and growth of the tilapia *Oreochromis niloticus* and their interactions. *Gen Comp Endocrinol.* 2014; 205: 142-150.
4. Berry JP, Gibbs PDL, Schmale MC, Saker ML. Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxicon* 2009; 53(2): 289–99.
5. Bradner JM, Suragh TA, Wilson WW, Lazo CR, Stout KA, Kim HM, et al. Exposure to the polybrominated diphenyl ether mixture DE-71 damages the nigrostriatal dopamine system: Role of dopamine handling in neurotoxicity. *Exp Neurol.* 2013; 241(1): 138-147.
6. Cha YK, Cho KH, Lee H, Kang T, Kim JH. The relative importance of water temperature and residence time in predicting cyanobacteria abundance in regulated rivers. *Water Res.* 2017; 124: 11–9.
7. 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. *Toxicon* 2016; 114: 75–84.
8. Chen J, Xie P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon* 2005; 45(5): 615-625.
9. Chen L, Chen J, Zhang X, Xie P. A review of reproductive toxicity of microcystins. *J Hazard Mater.* 2016; 301: 381–99.
10. Chen L, Zhang X, Chen J, Zhang X, Fan H, Li S, et al. NF-κB plays a key role in microcystin-RR-induced HeLa cell proliferation and apoptosis. *Toxicon* 2014; 87: 120–30.
11. Chen L, Zhang X, Zhou W, Qiao Q, Liang H, Li G, et al. The interactive effects of cytoskeleton disruption and mitochondria dysfunction lead to reproductive toxicity induced by microcystin-LR. *PLoS One.* 2013; 8(1): 539-549.

12. Chen Y, Xu J, Li Y, Han X. Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystin-LR. *Reprod. Toxicol.* 2011; 31(4): 551-557.
13. Chen Y, Zhou Y, Wang X, Qian W, Han X. Microcystin-LR induces autophagy and apoptosis in rat Sertoli cells *in vitro*. *Toxicol* 2013b; 76: 84–93.
14. Cheng H, Yan W, Wu Q, Liu C, Gong X, Hung TC, et al. Parental exposure to microcystin-LR induced thyroid endocrine disruption in zebrafish offspring, a transgenerational toxicity. *Environ Pollut.* 2017; 230: 981–8.
15. Chernoff N, Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Malarkey DE, Bradfield CA, et al. Toxicity and recovery in the pregnant mouse after gestational exposure to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *J Appl Toxicol.* 2011; 31(3): 242–54.
16. Chong MWK, Wong BSF, Lam PKS, Shaw GR, Seawright AA. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytomin in primary rat hepatocytes. *Toxicol* 2002; 40(2): 205-211.
17. Corbel S, Mougin C, Bouaïcha N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 2014; 96: 1–15.
18. Ding XS, Li XY, Duan HY, Chung IK, Lee JA. Toxic effects of *Microcystis* cell extracts on the reproductive system of male mice. *Toxicol.* 2006; 48(8): 973–979.
19. Dong L, Zhang H, Duan L, Cheng X, Cui L. Genotoxicity of testicle cell of mice induced by microcystin-LR. *Life Sci J.* 2008; 5(1): 43-45.
20. Ellem SJ, Risbridger GP. Aromatase and regulating the estrogen: Androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 118(4-5): 246-251.
21. Eppler E, Caelers A, Shved N, Hwang G, Rahman AM, MacLean N, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) in a growth-enhanced transgenic (GH-overexpressing) bony fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*): Indication for a higher impact of autocrine/paracrine than of endocrine IGF-I. *Transgenic Res.* 2007; 16(4): 479-489.
22. Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The Toxicity of Cyanobacterial Toxins in the Mouse: I Microcystin-LR. *Human & Exp. Toxicol.* 1999; 18: 162-167.
23. Funari E, Manganelli M, Buratti FM, Testai E. Cyanobacteria blooms in water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing and recreational activities. *Sci Total Environ.* 2017; 598: 867–80.
24. Gácsi M, Antal O, Vasas G, Máthé C, Borbély G, Saker ML, et al. Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicol in Vitro.* 2009 ;23(4): 710–718.

25. Gaget V, Humpage AR, Huang Q, Monis P, Brookes JD. Benthic cyanobacteria: A source of cylindrospermopsin and microcystin in Australian drinking water reservoirs. *Water Res.* 2017; 124: 454–64.
26. García SI. Cianobacterias y cianotoxinas. Impactos para la salud humana. [En línea] 2009.p. 34. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/ministerio/intoxicaciones/cianobacterias/cianobacterias_y_cianotoxinas.pdf
27. 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.
28. Harke MJ, Steffen MM, Gobler CJ, Otten TG, Wilhelm SW, Wood SA, et al. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp . *Harmful Algae* 2016; 54: 4–20.
29. He X, Liu YL, Conklin A, Westrick J, Weavers LK, Dionysiou DD, et al. Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. Vol. 54, *Harmful Algae.* Elsevier B.V.; 2016. p. 174–93.
30. Hou J, Li L, Xue T, Long M, Su Y, Wu N. Damage and recovery of the ovary in female zebrafish i.p. injected with MC-LR. *Aquat Toxicol.* 2014; 155: 110–8.
31. Hou J, Su Y, Lin W, Guo H, Xie P, Chen J, et al. Microcystin-LR retards gonadal maturation through disrupting the growth hormone/insulin-like growth factors system in zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017; 139(1): 27–35.
32. Humbert JF. Toxins of Cyanobacteria. En: Gupta RC, editor. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents.* 1ª Ed. Londres: Elsevier; 2009. p.371-379.
33. Humpage A. Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 619: 383–415.
34. Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male *Swiss albino* mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol.* 2003; 18(2): 94–103.
35. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2010; 94.
36. Irons TD, Kelly PE, Hunter DL, MacPhail RC, Padilla S. Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013; 103(4): 792-813.

37. Jonas A, Scholz S, Fetter E, Sychrova E, Novakova K, Ortmann J, et al. Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular *in vitro* and zebrafish embryos assays. *Chemosphere*. 2015; 120: 321–7.
38. Lankoff A, Banasik A, Obe G, Deperas M, Kuzminski K, Tarczynska M, et al. Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 189(3): 204–213.
39. Lankoff A, Bialczyk J, Dziga D, Carmichael WW, Lisowska H, Wojcik A. Inhibition of nucleotide excision repair (NER) by microcystin-LR in CHO-K1 cells. *Toxicol* 2006; 48(8): 957–65.
40. Le Gac F, Blaise O, Fostier A, Le Bail P, Loir M, Mourot B, et al. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiol Biochem*. 1993;11 (1-6): 219-232.
41. Li D, Liu Z, Cui Y, Li W, Fang H, Li M, et al. Toxicity of cyanobacterial bloom extracts from Taihu Lake on mouse, *Mus musculus*. *Ecotoxicology* 2011a; 20(5): 1018-1025.
42. Li G, Xie P, Li H, Hao L, Xiong Q, Qiu T, et al. Acute effects of microcystins on the transcription of 14 glutathione S-transferase isoforms in Wistar rat. *Environ Toxicol*. 2011b; 26(2): 187-194.
43. Li GY, Xie P, Li HY, Hao L, Xiong Q, Qiu T. Involment of p53, Bax, and Bcl-2 pathway in microcystins-induced apoptosis in rat testis. *Environ Toxicol*. 2011c; 26(2): 111-117.
44. Li H, Xie P, Li G, Hao L, Xiong Q. *In vivo* study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (c-fos, c-jun and c-myc) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins. *Toxicol* 2009; 53(1): 169–175.
45. Li X, Zhang X, Ju J, Li Y, Yin L, Pu Y. Maternal repeated oral exposure to microcystin-LR affects neurobehaviors in developing rats. *Environ Toxicol Chem*. 2015; 34(1): 64-69.
46. Li Y, Han XD. Microcystin-LR causes cytotoxicity effects in rat testicular Sertoli cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012; 33(2): 318–326.
47. Li Y, Sheng J, Sha J, Han X. The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats *in vivo* and *in vitro*. *Reprod Toxicol*. 2008; 26(3-4): 239-245.
48. Li Y, Yang M, Xue L, Xie G, Qin J, Liu J, et al. The cell cycle arrest induced by MC-LR in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci J*. 2014; 11(7): 866-870.
49. Lin W, Hou J, Guo H, Li L, Wang L, Zhang D, et al. The synergistic effects of waterborne microcystin-LR and nitrite on hepatic pathological damage, lipid peroxidation and antioxidant responses of male zebrafish. *Environ Pollut*. 2018; 235: 197–206.

50. Liu W, Qiao Q, Chen Y, Wu K, Zhang X. Microcystin-LR exposure to adult zebrafish (*Danio rerio*) leads to growth inhibition and immune dysfunction in F1 offspring, a parental transmission effect of toxicity. *Aquat Toxicol.* 2014; 155: 360–7.
51. Liu Y, Xie P, Qiu T, Li H-, Li G-, Hao L, et al. Microcystin extracts induce ultrastructural damage and biochemical disturbance in male rabbit testis. *Environ Toxicol.* 2010; 25(1): 9-17.
52. Lone Y, Koiri RK, Bhide M. An overview of the toxic effect of potential human carcinogen Microcystin-LR on testis. *Toxicol Rep.* 2015; 2: 289-296.
53. Lucena E. Aspectos sanitarios de las cianotoxinas. *Med Prev.* 2008; 302(8): 291–302.
54. Meneely JP, Elliott CT. Microcystins: measuring human exposure and the impact on human health. *Biomarkers* 2013; 18(8): 639–49.
55. Naber KG, Weidner W. Chronic prostatitis - An infectious disease?. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46(2): 157-161.
56. Nagle RB. Role of the extracellular matrix in prostate carcinogenesis. *J Cell Biochem.* 2004; 91(1): 36-40.
57. Pant N, Pant AB, Chaturvedi PK, Shukla M, Mathur N, Gupta YK, et al. Semen quality of environmentally exposed human population: The toxicological consequence. *Environ Sci Pollut Res.* 2013; 20(11): 8274-8281.
58. Papadimitriou T, Kagalou I, Stalikas C, Pilidis G, Leonardos ID. Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. *Ecotoxicology* 2012; 21(4): 1155-1166.
59. Pearson LA, Dittmann E, Mazmouz R, Ongley SE, D'Agostino PM, Neilan BA. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae* 2016; 54: 98–111.
60. Peng C, Peter RE. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. *Zool Stud.* 1997; 36(2): 79-89.
61. Pérez-Sánchez J. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A short review. *Fish Physiol Biochem.* 2000; 22(2): 135-144.
62. Puschner B y Humbert JF. Blue-green algae toxins. En: Gupta RC, editor. *Verterinary Toxicology.* Nueva York: Elsevier Inc.; 2007. 714-724 p.
63. Qiao Q, Liu W, Wu K, Song T, Hu J, Huang X, et al. Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects. *Aquat Toxicol.* 2013; 142–143: 272–82.

64. Rajneesh, Singh SP, Pathak J, Sinha RP. Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. *Renew Sust Energ Rev.* 2017; 69: 578–95.
65. Rathjen J, Rathjen PD. Mouse ES cells: Experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11(5): 587–94.
66. Reid KJ, Lang K, Froschio S, Humpage AJ, Young FM. Undifferentiated murine embryonic stem cells used to model the effects of the blue-green algal toxin cylindrospermopsin on preimplantation embryonic cell proliferation. *Toxicon* 2015; 106: 79–88.
67. Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Humpage AR, Falconer IR, Marr M, et al. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon* 2007; 49(6): 855–64.
68. Saad A, Murabat R, Omari A, Al-Jasabi S. Protective role of anthocyanin and taurine against MC-LR induced pancreatic and testicular toxicity in Balb/c mice. *Am-Eur J Toxicol Sciences.* 2012; 4(2): 72-79.
69. Su L, Mruk DD, Cheng CY. Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *J Endocrinol.* 2011; 208(3): 207–23.
70. Sukenik A, Reisner M, Carmeli S, Werman M. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Long-term exposure to low doses. *Environ Toxicol.* 2006; 21(6): 575–82.
71. Trinchet I, Djediat C, Huet H, Dao SP, Edery M. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reprod Toxicol.* 2011; 32(3): 329–40.
72. Vong QP, Chan KM, Cheng CHK. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: Differential regulation of expression by GH. *J Endocrinol.* 2003; 178(3): 513-521.
73. Wang L, Wang X, Geng Z, Zhou Y, Chen Y, Wu J, et al. Distribution of microcystin-LR to testis of male Sprague-Dawley rats. *Ecotoxicology* 2013a; 22(10): 1555-1563.
74. Wang Q, Xie P, Chen J, Liang G. Distribution of microcystins in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of Wistar rat via intravenous injection. *Toxicon* 2008; 52(6): 721-727.
75. Wang X, Chen Y, Zuo X, Ding N, Zeng H, Zou X, et al. Microcystin (-LR) induced testicular cell apoptosis via up-regulating apoptosis-related genes *in vivo*. *Food Chem Toxicol.* 2013b; 60: 309–17.
76. Wang X, Ying F, Chen Y, Han X. Microcystin (-LR) affects hormones level of male mice by damaging hypothalamic-pituitary system. *Toxicon* 2012; 59(2): 205–14.

77. World Health Organization (WHO). Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR in Drinking-water. *Guidel Drink Qual.* 1998; 2.
78. Wu J, Shao S, Zhou F, Wen S, Chen F, Han X. Reproductive toxicity on female mice induced by microcystin-LR. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014; 37(1): 1-6.
79. Wu Q, Yan W, Cheng H, Liu C, Hung TC, Guo X, et al. Parental transfer of microcystin-LR induced transgenerational effects of developmental neurotoxicity in zebrafish offspring. *Environ Pollut.* 2017; 231: 471–8.
80. Wu Q, Yan W, Liu C, Li L, Yu L, Zhao S, et al. Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo. *Environ Pollut.* 2016; 213: 793-800.
81. Xie L, Yan W, Li J, Yu L, Wang J, Li G, et al. Microcystin-RR exposure results in growth impairment by disrupting thyroid endocrine in zebrafish larvae. *Aquat Toxicol.* 2015; 164: 16–22.
82. Xiong Q, Xie P, Li H, Hao L, Li G, Qiu T, et al. Acute effects of microcystins exposure on the transcription of antioxidant enzyme genes in three organs (liver, kidney, and testis) of male Wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2010; 24(6): 361-367.
83. Xiong Q, Xie P, Li H, Hao L, Li G, Qiu T, et al. Involvement of Fas/FasL system in apoptotic signaling in testicular germ cells of male Wistar rats injected i.v. with microcystins. *Toxicol* 2009; 54(1): 1-7.
84. Xiong X, Zhong A, Xu H. Effect of cyanotoxins on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in male adult mouse. *PLoS One.* 2014; 9(11): 1065-1085.
85. Xue L, Li J, Li Y, Chu C, Xie G, Qin J, et al. N-acetylcysteine protects chinese hamster ovary cells from oxidative injury and apoptosis induced by microcystin-LR. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(4): 4911-4921.
86. Yan W, Zhou Y, Yang J, Li S, Hu D, Wang J, et al. Waterborne exposure to microcystin-LR alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic –pituitary– thyroid axis in zebrafish larvae. *Chemosphere* 2012; 87(11): 1301–7.
87. Yang M, Xue L, Zhang H. MC-LR induces reproductive toxicity. *Life Sci J.* 2013; 10(2): 1938-1941.
88. Yi D, Liu X, Zhang F, Wang J, Zhao Y, Sun D, et al. Oxidative stress on sertoli cells of rats induced by microcystin-LR. *Life Sci J.* 2011; 8(2): 249-253.
89. Young FM, Micklem J, Humpage AR. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells *in vitro*. *Reprod Toxicol.* 2008; 25(3): 374–80.

90. Young FM, Zebian D, Froscio S, Humpage A. Cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, inhibited human luteinised granulosa cell protein synthesis *in vitro*. *Toxicol in Vitro*. 2012; 26(5): 656–62.
91. Zdravkovic T, Genbacev O, Larocque N, McMaster M, Fisher S. Human embryonic stem cells as a model system for studying the effects of smoke exposure on the embryo. *Reprod Toxicol*. 2008; 26: 86–93.
92. Zhang H, Wang L, Shen S, Wang C, Xiang Z, Han X, et al. Toxic effects of microcystin-LR on the development of prostate in mice. *Toxicology* 2017; 380: 50–61.
93. Zhang HZ, Zhang FQ, Li CF, Yi D, Fu XL, Cui LX. A cyanobacterial toxin, microcystin-LR, induces apoptosis of sertoli cells by changing the expression levels of apoptosis-related proteins. *Tohoku J Exp Med*. 2011; 224(3): 235-242.
94. Zhao S, Li G, Chen J. A proteomic analysis of prenatal transfer of microcystin-LR induced neurotoxicity in rat offspring. *J Proteomics*. 2015a; 114: 197–213.
95. Zhao S, Xie P, Chen J, Liu L, Fan H. A proteomic study on liver impairment in rat pups induced by maternal microcystin-LR exposure. *Environ Pollut*. 2016; 212: 197–207.
96. Zhao S, Xie P, Li G, Jun C, Cai Y, Xiong Q, et al. The proteomic study on cellular responses of the testes of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to microcystin-RR. *Proteomics*. 2012; 12(2): 300-312.
97. Zhao Y, Xie L, Yan Y. Microcystin-LR impairs zebrafish reproduction by affecting oogenesis and endocrine system. *Chemosphere* 2015b; 120: 115–22.
98. Zhao Y, Xue Q, Su X, Xie L, Yan Y, Steinman AD. Microcystin-LR induced thyroid dysfunction and metabolic disorders in mice. *Toxicology* 2015c; 328: 135–41.
99. Zhou Y, Chen Y, Yuan M, Xiang Z, Han X. *In vivo* study on the effects of microcystin-LR on the apoptosis, proliferation and differentiation of rat testicular spermatogenic cells of male rats injected i.p. with toxins. *J Toxicol Sci*. 2013; 38(5): 661-670.
100. Zhou Y, Wang H, Wang C, Qiu X, Benson M, Yin X, et al. Roles of miRNAs in microcystin-LR-induced Sertoli cell toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015; 287(1): 1–8.
101. Zhou Y, Xiang Z, Li D, Han X. Regulation of microcystin-LR-induced toxicity in mouse spermatogonia by miR-96. *Environ Sci Technol*. 2014; 48(11): 6383-6390.
102. Zhou Y, Yuan J, Wu J, Han X. The toxic effects of microcystin-LR on rat spermatogonia *in vitro*. *Toxicol Lett*. 2012; 212(1): 48–56.