

Interés toxicológico de las microcistinas

Moreno I, Repetto G y Cameán A*

Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. C/Profesor García González s/n, 41012-Sevilla

Recibido 2 de Junio de 2002 / Aceptado 20 de Noviembre de 2002

Resumen: Las Microcistinas (MCs) son toxinas de estructura heptapeptídica producidas por floraciones de cianobacterias tóxicas de aguas superficiales eutróficas. Las MCs al igual que la nodularina son hepatotóxicas en humanos, aunque también dan lugar a alteraciones gastrointestinales, reacciones alérgicas o irritación y sintomatología similar a la neumonía. El principal riesgo tóxico deriva de su actividad promotora tumoral, y capacidad genotóxica. Diversos estudios epidemiológicos sugieren una mayor incidencia de cáncer de hígado en zonas cuya población está expuesta de forma prolongada a MCs, por consumo de aguas de bebida contaminadas, advirtiéndose la necesidad de conocer otras posibles fuentes de exposición humana, tales como alimentos. La Organización Mundial de la Salud ha adoptado (WHO, 1998) un valor guía provisional de 1,0 µg/L de MC-LR en aguas de bebida, comprendiendo tanto las MCs intra como las extracelulares. En la Reglamentación técnico-sanitaria vigente en España para el abastecimiento y control de la calidad de las aguas potables de consumo público (RD 1138/1990 de 14 de Septiembre) no se hace referencia a la determinación y control de MCs; sin embargo en el nuevo proyecto de reglamentación, anexo D, que hace referencia a las sustancias tóxicas, se fija una concentración máxima admisible de MCs de 1 µg/L en el caso de aguas eutróficas. En esta revisión se consideran los efectos tóxicos agudos, crónicos y el mecanismo de acción de las Microcistinas.

Palabras clave: Cianobacterias, Microcistinas, efectos tóxicos, mecanismo de acción.

Abstract: Toxicological interest of Microcystins. Microcystins (MCs) are toxins of heptapeptidic structure produced by the bloom of toxic cyanobacteria in surface eutrophic waters. MCs, just like nodularine, are hepatotoxic in humans, but they also cause gastrointestinal alterations, allergic reactions, irritation and pneumonia-like symptomatology. The main toxic risk derives from their tumor-promoting activity and genotoxic capacities. Several epidemiological studies suggest an increased incidence of liver cancer in populations chronically exposed to MCs. The main source is contaminated drinking water, but other sources of human exposure, such as food, should be investigated. The World Health Organization adopted (WHO, 1998) a provisional guide value of 1,0 µg/L of MC-LR in drinking water, including intra- and extracellular MCs. In the present Spanish legislation

regarding quality control of drinking water (RD 1138/1990 of 14 September), the determination and control of MCs are not included; however, in the draft of the new legislation, annex D, concerning toxic chemicals, a maximum tolerable concentration of 1 µg/L is fixed for MCs in eutrophic waters. Acute and chronic effects and the mechanism of action of MCs are considered in this review.

Key words: Cyanobacteria, Microcystins, toxic effects, mechanism of action.

Introducción

Las Microcistinas (MCs) son toxinas peptídicas de bajo peso molecular, producidas por diferentes especies de algas cianofíceas (blue-green algae), fundamentalmente de los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, y *Nostoc* que crecen a veces de forma anormal en aguas superficiales originando intoxicaciones tanto en animales como en humanos, a veces incluso fatales, por lo que están consideradas como un problema ambiental, ecotoxicológico [1] y principalmente sanitario [2].

Geográficamente, las floraciones de estas algas se distribuyen ampliamente en las aguas superficiales, y la aparición de las mismas en determinadas condiciones ambientales [3,4] es ubicua, de forma que hoy día se reconoce a escala mundial que en la mayoría de los países se presentan estos crecimientos [5-8]. Se han detectado también en ambientes marinos pero no se ha identificado el organismo productor de las toxinas [9]. Recientemente, se ha publicado una revisión acerca de las condiciones que favorecen la aparición de estas proliferaciones masivas de cianobacterias, tipos de toxinas que producen, fuentes de exposición y principales métodos de detección [10].

Estructuralmente las MCs se caracterizan por una estructura cíclica, formada por siete aminoácidos, y actualmente hay identificadas más de 60 tipos diferentes [11], siendo MC-LR, MC-RR y MC-YR las más estudiadas.

Las MCs al igual que nodularinas resultan ser hepatotóxicas en humanos [12,13], aunque también dan lugar a alteraciones gastrointestinales [14], reacciones alérgicas o irritación [15], y sintomatología similar a la de la neumonía [16]. Pero su principal interés radica en los efectos tóxicos crónicos como consecuencia de una exposición prolongada, ya que se sospecha que puedan ser promotores de tumores, existiendo diversos estudios epidemiológicos que sugieren una mayor incidencia de cáncer hepático en zonas cuyas aguas de bebida están contaminadas por

Correspondencia: Dra. Ana M^a Cameán. e-mail: camean@us.es.

MCs [17]. Debido precisamente a los riesgos derivados de la exposición crónica a MCs, la Organización Mundial de la Salud adoptó [18] un valor guía provisional de 1,0 µg/L de MC-LR en aguas de bebida, comprendiendo tanto las MCs intra como las extracelulares. Si bien en algunos países se establece la obligatoriedad de determinación de MCs en aguas [19], actualmente en España es cuando se está despertando interés [20] por la necesidad de su control. Dada la actualidad del tema, el presente trabajo va encaminado a revisar los diferentes efectos tóxicos de las Microcistinas, agudos y crónicos, así como el mecanismo de acción tóxica de las mismas.

2. Estructura química y actividad

Las primeras hepatotoxinas identificadas como heptapéptidos cíclicos, procedían de *Microcystis aeruginosa* variedad NRC-1 y fueron identificadas en 1959 por Bishop y col. En 1965, Konst y col. y más tarde Carmichael y col. [21] le dieron el nombre de Microcistinas. Actualmente hay identificadas más de 60 MCs diferentes [11, 22], con una estructura general que se representa en la Figura 1, siendo las variaciones más frecuentes las que se producen por sustituciones de L-aminoácidos distintos en las posiciones 2(X) y 4(Y) y por desmetilaciones de los aminoácidos de la posición 3 y/o 7 aunque se han observado variaciones en cada aminoácido [23,15]. No estando claro el origen de la existencia de tantas variantes de MCs, la similitud estructural de algunas de estas toxinas traza con las principales toxinas puede sugerir que sean posibles subproductos o artefactos producidos durante los procesos de purificación [24].

Los aminoácidos en las posiciones X e Y se indican con un sufijo de dos letras; por ejemplo MC-LR contiene leucina (L) en la posición 2 (X) y arginina (R) en la posición 4 (Y). En la posición X los L-aminoácidos más comunes son, *leucina* (L), *arginina* (R) y *tirosina* (Y), aunque también se han encontrado MCs con homotirosina (Hty), fenilalanina (F), alanina (A), homofenilalanina (Hph), metionina S-óxido [M(O)], homoisoleucina (Hil), triptófano (W) y 1, 2, 3, 4,-tetrahidrotirosina [(H4)Y], en esta posición [22]. En la **posición Y** el aminoácido más común es arginina (R) y otros posibles son alanina (A), leucina (L), ácido aminoisobutírico (Aba), homoarginina (Har), tirosina (Y), fenilalanina (F) o metionina S-óxido [M(O)].

Son moléculas relativamente polares, debido a los ácidos carboxílicos en posiciones 3 y 6 y la presencia frecuente de arginina

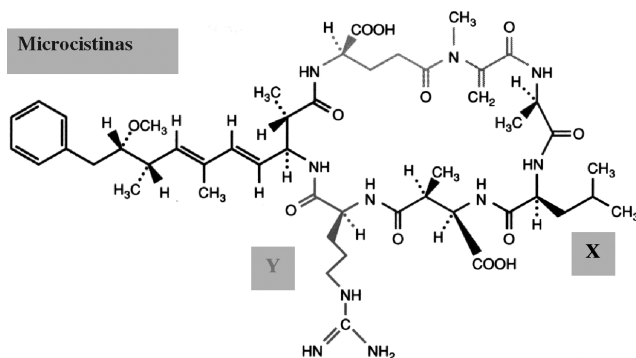


Fig. 1. Estructura química de las microcistinas (Mcs).

en posiciones 2 y 4, y contienen algunas partes más hidrofóbicas como el residuo Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6- dienoico) o los sustituyentes hidrofóbicos de los aminoácidos sustituyentes [25].

Las MCs son en general muy tóxicas por exposición aguda. La DL₅₀ por vía i.p. de MC-LR oscila entre 25 y 150 µg/Kg en ratón (aceptándose un valor medio de 50 o 60 µg/Kg) [26]. La DL₅₀ por vía oral (sonda) de MC-LR en la cepa de ratón Cr1:CD-1 (IGR)BR es mucho más elevada, aproximadamente de 5000 µg/Kg, siendo más sensible que la rata (DL₅₀ por vía oral superior a 5000 µg/Kg) [27]. La diferencia de toxicidad aguda por las vías anteriormente mencionadas, vía oral e inyección i.p., se estima en un factor que oscila entre 30 a 167 [28].

Según su toxicidad se pueden clasificar en tres grupos, dependiendo de los aminoácidos existentes en las posiciones 2 y 4 [11]: Toxicidad elevada: MC-LR, -LA,-YR; Toxicidad moderada: MC-WR, las MCs desmetiladas en Mdha y β-Me-Asp; Toxicidad baja: MC-LY, -RR, -M(O)R. Los estudios acerca de la influencia de los sustituyentes sobre la acción tóxica de las toxinas han revelado que tanto los L-aminoácidos, Adda y el D-glu libre juegan un papel muy importante en la hepatotoxicidad de las mismas [29] (Tabla 1).

3. Toxicidad

3.1. Toxicidad aguda

En la mayoría de los países del mundo se han producido intoxicaciones graves e incluso fatales del ganado, animales domésticos y salvajes, peces y aves, debidas a floraciones de cianobacterias, generalmente tras haber bebido aguas contaminadas [30].

En general, el hígado es el órgano más afectado, mostrando una necrosis hemorrágica extensa y una disrupción sinusoidal [31].

Tabla 1. Relación entre estructura y toxicidad de algunas Microcistinas.

L-aminoácidos (R ₁ , R ₂)	DL ₅₀ (µg/kg, ratón i.p.)
MC-LR, MC-YR, MC-LA	<100
MC-WR	100-400
MC-RR, MC-M(O)R	400-800
Desmetilación en Mdha y/o β-Me-Asp	
3-desmetil MC-LR (-RR)	100-400
7-desmetil MC-LR (RR)	100-400
3, 7-didesmetil MC-LR	100-400
Adda	
O-desmetil-Adda-MC-LR	<100
O-acetil-O-demetil-Adda-MC-LR	<100
6(Z)-Adda MC-LR (RR)	>800
Ester	
D-Glu(C ₃ H ₇ O)ester MC-LR	>800
D-Glu(CH ₃ O)ester MC-LR	>800
Mdha	
Dihidro MC-LR	100-400
MC-LR-GSH aducto	400-800

La necrosis hepática aguda masiva producida por las MCs produce un cuadro hemorrágico y choque hipovolémico que dan lugar a la muerte. Estudios realizados en otros órganos no demuestran daños importantes. La muerte se puede producir en unas pocas horas (4-24 horas) o en unos días y ésta viene precedida por un cuadro de choque, es decir, coma, temblor muscular, palidez y dificultad en la respiración. Otros efectos observados son: diarrea sanguinolenta por la enteropatía aguda hemorrágica secundaria al choque y por la situación de hipocoagulabilidad que desencadena la insuficiencia hepática aguda, y hepatomegalia. Uno de los primeros efectos (15-30 minutos) que se observan en la intoxicación por MCs es una elevación en los niveles séricos de bilirrubina, fosfatasa alcalina (PA), γ -glutamil transferasa (γ -GT), aspartato aminotransferasa (GOT) y alanina aminotransferasa (GPT).

En peces intoxicados se han observado daños no sólo en hígado sino también en riñón, corazón, branquias, piel, médula y sangre [32, 33]. Se produce una disociación y degeneración de hepatocitos y dilatación de la cápsula de Bowman en riñón; a dosis mayores se destruye la arquitectura del parénquima hepático, con degeneración de los túbulos del riñón y elevación de enzimas: lactato deshidrogenasa (LDH), GPT y GOT [34, 32]. El efecto más definitivo de MCs sobre los peces se ha observado en salmones procedentes del Atlántico, criados en cautividad en aguas de USA, con una degeneración progresiva del hígado; dicha enfermedad, denominada "Net Pen Liver Disease" (NPLD) ha producido importantes pérdidas económicas en la industria de cultivos marinos [35].

En animales de experimentación (rata, ratón), ya se ha comentado que las MCs son muy tóxicas por exposición aguda, produciéndose necrosis hemorrágica hepática aguda de distribución centrolobulillar [27] y efectos hemodinámicos y hematológicos [36, 37].

En humanos no se han llegado a producir grandes fatalidades como resultado de la exposición a estas toxinas, salvo la intoxicación masiva en pacientes sometidos a diálisis ocurrida en 1996 en Brasil [38, 39], en la que 60 pacientes murieron por fallo hepático agudo, motivada porque el agua utilizada para el tratamiento procedía de un depósito contaminado por cianobacterias.

Los síntomas principales que presentan las personas que han estado en contacto con las toxinas (prácticas deportivas, etc.) son: irritaciones de la piel y de los ojos, episodios alérgicos, náuseas, mareos y gastroenteritis aguda. Cuando se ha producido la ingestión accidental de MCs (lisis celular por tratamiento con sulfato de cobre, etc.) los síntomas más usuales han sido: dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, tos seca, cefaleas, neumonía atípica, y elevación de enzimas hepáticas séricas como γ -glutamilttransferasa [14]. Los niños y personas con alguna patología previa, como hepatopatías crónicas, lesiones renales, alcoholismo, etc., son también más susceptibles a la acción de MCs [12]. Se ha demostrado asimismo una acción inmunomodulatoria sobre los leucocitos polimorfonucleares humanos de MC-LR a concentraciones por debajo del límite guía recomendado por la OMS, por lo que el consumo de aguas contaminadas con cianobacterias podría inducir una disminución de la

resistencia a las infecciones, aumento de la promoción de tumores, episodios de alergia, etc [40].

3.2. Toxicidad crónica

Los estudios de toxicidad subcrónicos y crónicos en mamíferos son muy escasos, motivado principalmente por la poca disponibilidad y alto coste de las toxinas [27]. Ensayos realizados en animales de experimentación han demostrado daño hepático crónico tras una administración oral continuada de MCs [41, 42] y la promoción de tumores en piel e hígado de ratón [26, 43], e hígado y colon de rata [44].

La administración oral de extractos de *M. aeruginosa*, a cerdos durante 44 días de dosis de 280, 800 y 1310 μ g/Kg de MCs/día, ha dado lugar a lesiones hepáticas y alteración de enzimas séricas a los dos niveles de dosis más elevados [45]. En peces, la exposición crónica a floraciones de cianobacterias tóxicas condujo a alteraciones iónicas y a una reducción del crecimiento [46].

3.3. Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis

Uno de los peligros potenciales más importantes de las hepatotoxinas producidas por cianobacterias para la salud humana es su actividad promotora de tumores tras el contacto con la piel durante el baño o tras una exposición prolongada a niveles subcrónicos y crónicos de estas toxinas en el agua de bebida [16].

Las MCs tienen posible actividad carcinogénica [47], confirmando como promotoras de cáncer primario de hígado (PLC) en algunas áreas de China [48, 49] aunque aún no han sido evaluadas definitivamente por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer.

Son muy escasos los estudios sobre los posibles efectos genotóxicos de las MCs. Extractos de toxinas procedentes de floraciones de *Microcystis* (sin determinar su exacta naturaleza) no mostraron respuesta mutagénica en el ensayo de *Salmonella* de Ames (cepas TA98, TA100 y TA102), con o sin activación de la fracción S9 [26]. A pesar de estos resultados, la mayoría de los estudios demuestran la capacidad genotóxica de MCs. Ding y col. [50] estudiaron la genotoxicidad de un extracto de MCs cuyo principal componente fue MC-LR, llegando a las siguientes conclusiones: el extracto tenía una fuerte mutagenicidad en el ensayo de Ames, de forma independiente a la fracción S9, además indujo daños en el ADN en cultivo primario de hepatocitos de rata y aumentó los eritrocitos policromáticos micronucleados en médula ósea de ratón.

Tras la administración de MCs purificadas o extractos de algas por vía oral durante seis meses a ratas se observó un incremento de las aberraciones cromosómicas en la metafase; la MC-LR indujo fragmentación del ADN y rotura de las bandas del ADN en ratón *in vivo* [51]. La fragmentación del ADN por extractos de *M. aeruginosa* no sólo se ha demostrado en hígado de ratón *in vivo*, sino también en células de riñón de hamster (BHK-21), y en fibroblastos de embrión de ratón [52] *in vitro*.

Se considera que son necesarios estudios epidemiológicos para demostrar la posible actividad teratogénica de las MCs, ya que se

ha encontrado una relación entre exposición crónica a estas toxinas por consumo de agua de bebida, en el primer trimestre de embarazo, y un aumento de defectos congénitos [7].

3.4. Mecanismos de Toxicidad

La mayoría de los estudios existentes de toxicidad aguda con MCs revelan que son toxinas primariamente hepatotóxicas en mamíferos y peces, encontrándose cambios en la estructura celular y alteraciones bioquímicas séricas, indicadoras del daño hepático [27, 53]. Estas toxinas son captadas fundamentalmente por un transportador específico de sales biliares localizado en el hepatocito [54]. Se acepta que a nivel subcelular son inhibidores específicos de las fosfatasa de proteína tipo 1 (PP1) y tipo 2A (PP2A), las cuales regulan multitud de procesos biológicos. Esta inhibición causa un aumento en la fosforilación de las proteínas celulares que activa la cascada de las caspasas desencadenándose el proceso de apoptosis con la consecuente muerte celular [28, 55].

Las células diana de las MCs son fundamentalmente: hepatocitos y macrófagos. Los estudios del mecanismo de absorción celular de las MCs por diferentes células, como eritrocitos humanos, células de hepatocarcinoma humano Hep G2, líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y, fibroblastos de ratón (3T3) y hepatocitos aislados de rata, utilizando dihidromicrocistinas radiomarcadas, revelan que se produce una captación específica de éstas sólo en los hepatocitos, siendo la absorción despreciable en los otros tipos celulares. Este mecanismo de entrada, explicaría la especificidad hepática de las MCs [31].

En hepatocitos fundamentalmente, y también en macrófagos, por tanto, es donde se puede enfatizar acerca de los mecanismos de toxicidad de las MCs, que podemos esquematizar de la forma siguiente (Figura 2):

A. Inhibición de Fosfatasa de Proteínas

Las MCs son potentes inhibidores de las fosfatasa de proteína: MC-LR inhibe a las fosfatasa de proteína tipo 1 (PP1) y tipo 2A (PP2A); esta inhibición rompe el equilibrio entre enzimas, observándose un aumento de fosfoproteínas y una serie de cambios morfológicos asociados en el hepatocito. La interacción ocurre en dos etapas: en una primera etapa existe una unión rápida reversible que conduce a una inhibición nanomolar de la actividad catalítica; en una segunda, que tarda un período de horas en producirse, se establece enlace covalente entre el residuo de N-Metildeshidroalanina (Mdha) de las MCs y las posiciones nucleofílicas de las enzimas, llegándose a una inactivación irreversible, pudiéndose detectar dichas uniones covalentes *in vitro* e *in vivo* [54, 56-57].

Debido a la inhibición de las fosfatasa de proteína 1 y 2A, se produce una reorganización del citoesqueleto, ya que afecta a la organización de los microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. La mayoría de los hepatocitos sufren una alteración de la estructura de los microtúbulos primero, posteriormente se afectan los filamentos intermedios y por último los microfilamentos [58]. Los cambios en los microfilamentos incluyen una agregación inicial de la actina [59]. La pérdida de los filamentos intermedios de citoqueratina, asociada con la fosforilación en células tratadas con MCs, pueden relacionarse con la actividad potencial promotora de tumores de las MCs [30].

B. Estimulación del Metabolismo del Ácido Araquidónico

En los hepatocitos las MCs estimulan el metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa. La MC-LR produce una reducción significativa de la absorción y un aumento de la liberación de ácido araquidónico, pudiendo provocar cambios

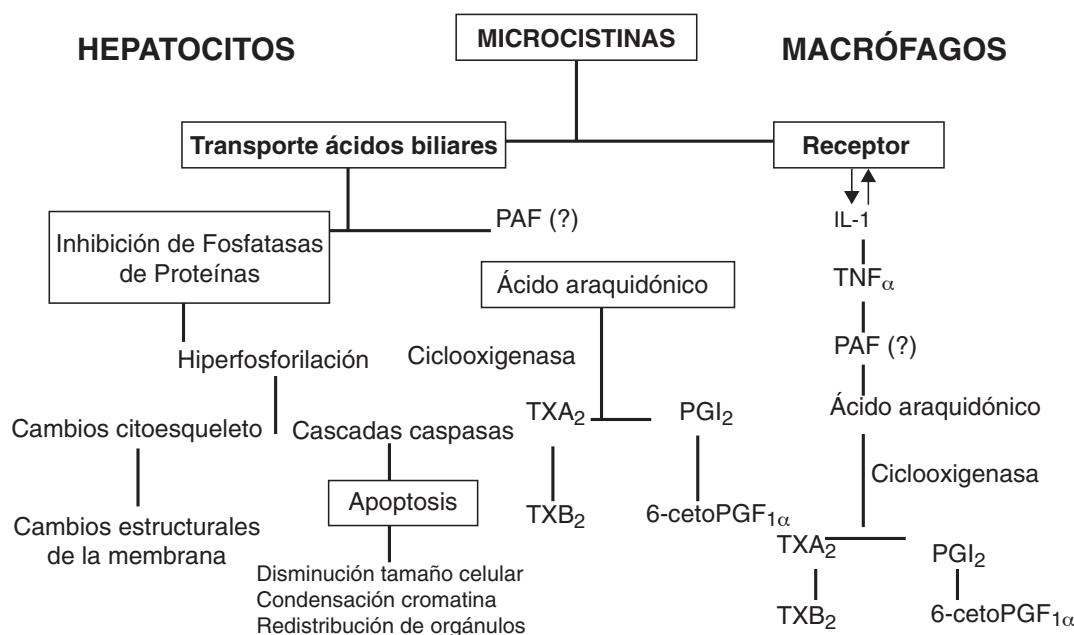


Fig. 2. Mecanismo simplificado de acción de las microcistinas (Mcs) (Tomado en parte de [30]).

en la estructura de la membrana celular y alteraciones en el transporte y metabolismo de los ácidos grasos [60].

El mecanismo de liberación de metabolitos del ácido araquidónico aún no se conoce totalmente, aunque se ha demostrado que reaccionan con compuestos como el glutatión, que contiene un grupo tiol y que pueden reaccionar con el grupo tiol del coenzima A (CoA) y/o inhibiendo la actividad de las enzimas acetil-CoA-acetiltransferasa y acetil-CoA-sintetasa, bloqueándose la reabsorción del ácido araquidónico libre, produciendo un aumento de la síntesis de prostaglandinas. La liberación del ácido araquidónico a partir de la membrana celular varía según el tipo de célula y el donador del residuo del ácido, siendo fosfatidilinositol en parte el donador en el caso de la acción de las MCs [60].

La síntesis y liberación de prostaciclina (6-cetoF₁α) y tromboxano B₂ (TXB₂) es estimulada por las MCs, no así la liberación de prostaglandinas F₂α o E₂. El TXB₂ deriva del TXA₂, el cual es inestable y uno de los más fuertes mediadores de la agregación plaquetaria. La 6-cetoF₁α deriva de la prostaglandina I₂, la cual actúa como inhibidora de la agregación de plaquetas [31].

La exposición a MC-LR causa asimismo efectos tóxicos en riñón perfundido de rata, afectando a la función renal y causando lesiones vasculares y glomerulares, ya sea directa o indirectamente. El mecanismo de acción es similar al hepático, produciéndose una activación de fosfolipasa A₂ y ciclooxigenasa [61, 62].

En conexión con el apartado A, aunque las microcistinas modifican las señales bioquímicas que regulan la apoptosis mediante la potente inhibición de las fosfatasa de proteína-1 y -2A, las cuales regulan multitud de procesos biológicos, aún no es conocido el mecanismo exacto de acción. El hecho de que la adición de un inhibidor de caspasas (ZVAD-fmk) prevenga cambios apoptóticos en hepatocitos tratados con MC-LR, sugiere que la inhibición de las fosfatasa de proteína 1 y 2A por dicha toxina activaría la cascada de las caspasas, resultando en la necrosis apoptótica de los hepatocitos [28, 55, 63]. El grado de hiperfosforilación de los elementos del citoesqueleto, como citoqueratina 8 y 18, puede determinar que la muerte celular ocurra por necrosis o por apoptosis. A la inversa, la inducción de apoptosis por MCs puede conducir a la hiperfosforilación de otras proteínas citoplasmáticas (p53, Bcl-2, etc.) que inducen más directamente esta forma de muerte celular [64]. Alternativamente, dicha inactivación de las fosfatasa de proteínas puede conducir, tras alteración del balance homeostático de la célula, a una proliferación celular [65].

Los cambios morfológicos y bioquímicos típicos de la apoptosis en hepatocitos de rata son los mismos que en otros tipos celulares, y consisten en redistribución de los orgánulos, condensación de la cromatina, disminución del tamaño de la célula y formación de cuerpos apoptóticos. Otras líneas celulares (fibroblastos humanos, fibroblastos de ratón, células endoteliales humanas, células epiteliales humanas, promielocitos de rata) también sufren estos cambios pero requieren un mayor período de tratamiento [64]. En linfocitos periféricos humanos, por su facilidad de aislamiento, se pueden analizar tanto los efectos clastogéni-

cos como los cambios morfológicos apoptóticos producidos por este tipo de toxinas [66].

En los macrófagos las toxinas inducen al Factor de necrosis α tumoral (TNF-α) e interleuquina-1 (IL-1). Estas citoquinas inducen la producción del factor activador de plaquetas (PAF) y la activación de las ciclooxigenasas. Las ciclooxigenasas producen tromboxanos y prostaglandinas como mediadores químicos relacionados con procesos inflamatorios [31].

La producción de TNF-α inducida por MCs ha sido observada tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. IL-1 y TNF-α juegan un papel importante en el shock producido por las MCs. El aumento de estos mediadores provoca una liberación de otros mediadores: prostaglandinas, leucotrienos, y PAF, aunque no se han observado incrementos de PAF tras la administración de MCs. MC-LR induce la liberación de PGF₂α (140%), PGE₂ (175%) y TXB₂ (169%) en macrófagos alveolares de rata, sugiriéndose que los macrófagos sintetizan y liberan mediadores inflamatorios en respuesta a la exposición a MCs [31].

4. Niveles de Seguridad

En los estudios ya expuestos de Fawel y col [27, 67] se determinó un NOAEL de 40 µg/Kg/día, basándose en las lesiones histopatológicas hepáticas y alteraciones enzimáticas séricas observadas; aplicando un factor de incertidumbre de 1000 se determinó una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 0,04 µg/Kg/día de MC-LR. Esta IDT se confirmó por los resultados del estudio de Falconer y col. [44] en el que se determinó un LOAEL en cerdos (administración de un extracto de *Microcystis* en agua de bebida durante 44 días) de 100 µg/Kg/día de MC-LR, que tras aplicación de un factor de incertidumbre de 1500 nos conduce a una IDT de 0,067 µg/Kg/día de MC-LR. El valor más bajo, 0,04 µg/Kg/día de MC-LR (al ser una de las toxinas más potentes, de la que existen más estudios toxicológicos y estándares comerciales para su identificación y cuantificación) se ha establecido como IDT provisional y se ha empleado para el establecimiento de un valor guía provisional de MCs en aguas de bebida. La Organización Mundial de la Salud ha adoptado [18] un valor guía provisional de 1,0 µg/L de MC-LR en aguas de bebida, comprendiendo tanto las MCs intra como las extracelulares, aunque Ueno y col [68] han propuesto un valor guía de 0,01 µg/L en casos de exposición crónica, por la posible correlación entre PLC y presencia de MCs en aguas.

Bibliografía

1. Christoffersen K (1996) Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* 35: 42-50.
2. Chorus I, Bartram J (1999) Toxic Cyanobacteria in Water. Chorus, Bartram J (Eds), New York.
3. Carmichael WW (1994) The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 270: 78-86.
4. Park H, Watanabe MF (1996) Toxic Microcystis in Eutrophic Lakes. En: Watanabe MF, Harada K-H, Carmichael WW, Fujiki H Toxic Microcystis CRC Press, Boca Raton pp. 57-77.
5. Sivonen K (1996) Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 35: 12-24.

6. Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weckesser J, Wiedner C, Nixdorf B, Chorus I (1999) Microcystins (Hepatotoxic Heptapeptide) in German Fresh Water Bodies. *Environ.Toxicol.* 14: 13-22.
7. Codd GA, Ward CI, Beattie KA, Bell SG (1999) Widening Perceptions of the Occurrence and Significance of Cyanobacterial Toxins. En: Peschek GA, Löffelhardt W, Schmetterer G. *The Phototrophic Prokaryotes*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 623-632.
8. Vasconcelos VM (1999) Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 249-254.
9. Codd GA (1998) Cyanobacterial Blooms and Toxins in Fresh-, Brackish and Marine Waters. En: Reguera B, Blanco J, Fernández ML, Wyatt T. *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 13-17.
10. Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ (2001) Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol.* 18: 65-71.
11. Harada K (1996) Chemistry and Detection of Microcystin. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H. *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 103-148.
12. Falconer IR (1999) An Overview of Problems Caused by Toxic Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Drinking and Recreational Water. *Environ.Toxicol.* 14: 5-12.
13. Craig M, Holmes CFB (2000). Freshwater hepatotoxins. Microcystin and Nodularin, mechanisms of toxicity and effects on health. En: Botana LM (ed.) *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. Marcel Dekker, New York, pp. 643-672.
14. Carmichael WW (1996) Toxic Microcystis and the Environment. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW H, Fujiki H. *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-11.
15. Codd GA, Ward CI, Beattie KA, Bell SG (1999) Widening Perceptions of the Occurrence and Significance of Cyanobacterial Toxins. En: Peschek GA, Löffelhardt W, Schmetterer G. *The Phototrophic Prokaryotes*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp. 623-632.
16. Bell SG, Codd GA (1994) Cyanobacterial toxins and human health. *Rev. in Medical Microb.* 5: 256-264.
17. Yu SZ (1995) Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10: 674-682.
18. WHO (1998) Guidelines for Drinking Water Quality, 2nd Edition, Addendum to Volume 2, Health Criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.
19. UK Environment Agency (1998) The determination of microcystin algal toxins in raw and treated waters by high performance liquid chromatography. En: Environment Agency, *Methods for the examination of waters and associated materials*.
20. Moreno I, Cameán A, Tavares MJ, Pereira P, Franca S (2002) Toxicity of Cyanobacteria isolated from the Guadiana River Aquatic Ecosystem Health and Management Society (accepted).
21. Carmichael WW (1988) Naming of Cyclic Heptapeptide Toxins of Cyanobacteria (Blue-Green Algae) *Toxicon* 26: 971-973.
22. Sivonen K, Jones G (1999) Cyanobacterial Toxins. En: Chorus I, Bartram JE, Spon FN. *Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, New York pp. 41-111.
23. Sivonen K (1998) Toxins Produced by Cyanobacteria. En: Miraglia M, Van Egmond H, Brera C, Gilbert J. *Mycotoxins and Phycotoxins-Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, USA pp. 547-567.
24. Lawton LA, Edwards C (2001) Purification of microcystins. *J. of Chromat. A* 912: 191-209.
25. Spool L, Karlsson K, Meriluoto J (2001) High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C₁₈ and amide C₁₆ sorbents. *J. of Chromat. A* 909: 225-236.
26. Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J (1999) Human Health Aspects. En: *Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, Chorus I, Bartram JE, Spon FN, New York, pp. 113-153.
27. Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE (1999) The Toxicity of Cyanobacterial Toxins in the Mouse: I Microcystin-LR. *Human & Exp. Toxicol.* 18: 162-167.
28. Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Sekijima M, Tamura S, Ueno Y (1997) Acute Oral Toxicity of Microcystin-LR, a Cyanobacterial Hepatotoxin, in Mice. *Natural Toxins* 5: 91-95.
29. Quinn RJ, Taylor C, Embrey KJ, Poulsen S-A (1996) Molecular Modeling of Microcystins. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H. *Toxic Microcystis*, CRC Press, Boca Raton, pp. 233-253.
30. Carmichael WW (1996) Cyanobacterial Toxins. En: Hallegraef GM, Anderson DM, Cembella AD. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides no. 33. UNESCO 1995., pp. 163-175.
31. Kaya K (1996) Toxicology of Microcystins. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H. *Toxic microcystis*, eds, CRC Press, Boca Raton, pp. 175-202.
32. Kotak BG, Semalulu S, Fritz DL, Prepas EE, Hrudey SE, Coppock RW (1996) Hepatic and Renal Pathology of Intraperitoneally Administered Microcystin-LR in Rainbow Trout. *Toxicon* 34: 517-525
33. Carbis CR, Rawlin GT, Grant P, Mitchell GF, Anderson JW, Mccauley I (1997) A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *J. of Fish Dis.* 20: 81-91.
34. Rabergh CMI, Bylund G, Eriksson JE (1991) Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat. Toxicol.* 20: 131-146.
35. Anderson RJ, Luu HHH, Chen DZX, Holmes CFB, Kent M, Leblanc M, Taylor FJR, Williams DE (1993) Chemical and Biological evidence links microcystins to salmon "Netpen liver Disease". *Toxicon* 31: 1315-1323.
36. Leclaire RD, Parker GW, Franz DR (1995) Hemodynamic and Calorimetric Changes Induced by Microcystin-LR in the Rat. *J. of Applied Toxicol.* 15: 303-311
37. Takahashi O, Oishi S, Watanabe MF (1995) Defective Blood Coagulation is not causative of Hepatic Haemorrhage induced by Microcystin-LR. *Pharmacol. & Toxicol.* 76: 250-254.
38. Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes BC, Liho DAM, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo SMFO, Jarvis WR (1998) Liver Failure and Death After Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *The New Eng. J. of Medicine* 338: 873-878.
39. Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CI, Preiser W, Poon GK, Neild GH, Codd GA (1998) Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet* 352: 21-26.
40. Hernández M, Macia M, Padilla C, del Campo FF (2000) Modulation of Human Polymorphonuclear Leukocyte Adherence by Cyanopeptide Toxins. *Environ. Res. Section A* 84, 64-68.

41. Ueno Y, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Tamura S, Sekijima M, Tashiro F, Harada T, Yoshida T (1999) No Chronic Oral Toxicity of a Low Dose of Microcystin-LR, a Cyanobacterial Hepatotoxin, in Female BALB/c Mice. *Environ. Toxicol.* 14: 45-55.
42. Heinze R (1999) Toxicity of the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR to rats after 28 Days Intake with the Drinking Water. *Environ. Toxicol.* 14: 57-60.
43. Ito E, Kondo F, Terao K, Harada K (1997) Neoplastic Nodular Formation in Mouse Liver Induced by Repeated Intraperitoneal Injections of Microcystin-LR. *Toxicol.* 35: 1453-1457.
44. Humpage AR, Hardy SI, Moore EI, Frosio SM, Falconer IR (2000) Microcystins (Cyanobacterial Toxins) in Drinking Water Enhance the Growth of Aberrant Crypt Foci in the Mouse Colon. *J. of Toxicol. and Environ. Health* 61: 155-165.
45. Falconer IR, Burch MD, Steffensen DA, Choice M, Coverdale OR (1994) Toxicity of the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in Drinking Water to Growing Pigs, as an Animal Model for Human Injury and Risk Assessment. *Environ. Toxicol. and Water Quality* 9: 131-139.
46. Bury NR, Eddy FB, Codd GA (1995) The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin Microcystin-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. *J. of Fish Biol.* 46: 1042-1054.
47. Fujiki H, Sueoka E, Suganuma (1996) Carcinogenesis of Microcystins. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H. *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 203-232.
48. Falconer I, Bartram J, Chorus I, Kuiper-goodman T, Utliken H, Burch M, Codd GA (1999) Safe levels and safe practices. En: Chorus I, Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water* New York, pp 155-178.
49. Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park H-D, Chen G-C, Chen G, Yu S-Z (1996) Detection of Microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17: 1317-1321.
50. Ding W-X, Shen H-M, Zhu H-G, Lee B-I, Ong C-N (1999) Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mut. Res.* 442: 69-77.
51. Rao PV, Bhattacharya R (1996) The cyanobacteria toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver *in vivo*. *Toxicology* 114: 29-36.
52. Rao PVL, Bhattacharya R, Parida MM, Jana AM, Bhaskar ASB (1998) Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage *in vivo* and *in vitro*. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* 5: 1-6.
53. Fischer WJ, Hitzfeld BC, Tencalla F, Eriksson JE, Mikhailov A, Dietrich DR (2000) Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Sci.* 54: 365-373.
54. Runnegar M, Berdt N, Kong S-M, Lee EVC, Zhang L (1995) *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 216, 162-169.
55. Hooser SB (2000) Fulminant Hepatocyte Apoptosis *In vivo* Following Microcystin-LR Administration to Rats. *Toxicol. Pathology* 28: 726-733.
56. Craig M, Luu HA, Mccready T, Williams DE, Andersen RI, Holmes CFB. (1996) Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and 2A protein phosphatases. *Biochem. Cell. Biol.* 74: 569-578.
57. Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Holmes CFB, Andersen RJ (1997c) Evidence for a Covalently Bound Form of MCLR in Salmon Liver and Dungeness Crab Larvae. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 463-469.
58. Wickstrom ML, Khan SA, Haschek WM, Wyman JK, Eriksson JE, Schaeffer DJ, Beasley VR (1995) Alterations in Microtubules, Intermediate Filaments, and Microfilaments Induced by Microcystin-LR in Cultured Cells. *Toxicol. Pathology* 23: 326-337
59. Carmichael WW (1997) The Cyanotoxins. En: *Advances in Botanical Research*, Academic Press, pp.211-256.
60. Naseem SM, Mereish KA, Solow R, Hines HB (1991) Microcystin-induced Activation of Prostaglandin Synthesis and Phospholipid Metabolism in Rat Hepatocytes. *Toxic. in vitro* 5, 341-345.
61. Nobre AC, Jorge MC, Menezes DB, Fonteles MC, Monteiro HS (1999) Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Braz. Med. Biol. Res.* 32: 985-988.
62. Nobre ACL, Coêlho GR, Coutinho MCM, Silva MMM, Angelim EV, Menezes DB, Fonteles MC, Monteiro HSA (2001) The role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicol* 39: 721-724.
63. Yoshida T, Makita Y, Tsutsumi T, Nagata S, Tashiro F, Yoshida F, Skijima M, Tamura S, Harada T, Maita K, Ueno Y (1998) Immunohistochemical Localization of Microcystin-LR in the Liver of Mice: A Study on the Pathogenesis of Microcystin-LR-induced Hepatotoxicity. *Environ. Toxicol. Pathology* 26: 411-418.
64. McDermott CM, Nho CW, Howard W, Holton B (1998) The Cyanobacterial Toxin, Microcystin-LR, Can Induce Apoptosis in a Variety of Cell Types. *Toxicol* 36: 1981-1996.
65. Humpage AR, Falconer IR (1999) Microcystin-LR and Liver Tumor Promotion: Effects on Cytokinesis, Ploidy and Apoptosis in Cultured Hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 14:61-75.
66. Mankiewicz J, Tarczynska M, Fladmark KE, Doskeland SO, Walter Z, Zalewski M (2001). Apoptotic Effect pf Cyanobacterial Extract on Rat Hepatocytes and Human Lymphocytes. *Environ. Toxicol.* 16:225-233.
67. Fawell JK, James CP, James HA (1994) Toxins from Blue-Green Algae: Toxicological Assessment of Microcystin-LR and a Method for its Determination in Water. *Water Res. Centre, Medmenham*, pp. 1-46.
68. Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park H-D, Chen G-C, Chen G, Yu S-Z (1996) Detection of Microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17: 1317-1321.