

**Universidad Nacional de La Plata**, Facultad de Ciencias Exactas.

**Núcleo Disciplinario/Comité Académico:** PRODUCTOS NATURALES BIOACTIVOS Y  
SUS APLICACIONES.

**Título:** EFECTOS SOBRE LA HOMEOSTASIS REDOX DE INTOXICACIONES  
SUB-CRÓNICAS CON MICROCYSTINA-LR EN RATONES.

**Autores:** Sedan, Daniela  
Telese, Luis

**Directores:** Andrinolo, Darío  
Giannuzzi, Leda  
Marra, Carlos  
Alaniz, María

**E-Mail de los autores:** [danielasedan@yahoo.com.ar](mailto:danielasedan@yahoo.com.ar)  
[lht15\\_5@yahoo.com.ar](mailto:lht15_5@yahoo.com.ar)

**Palabras Clave:** Microcystina-LR, ratones, estrés oxidativo  
Microcystina-LR, rato, dano oxidative

## INTRODUCCIÓN:

Las Microcystinas (MCs) son heptapéptidos cíclicos constituidos por varios D-aminoácidos junto con dos aminoácidos característicos de estas estructuras llamados N-metildehidroalanina (Mdha) y ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8 trimetil-10fenil-4,6ácido diecadenónico (Adda), un b-aminoácido hidrofóbico. Hasta el momento se han descrito más de 60 variantes estructurales las cuales difieren en la constitución de las cadenas laterales de dos de los aminoácidos que conforman la molécula. (Sivonen and Jones, 1999) Microcystina-LR (MC-LR) es la isoforma de estas hepatotoxinas más tóxica y frecuente (WHO, 2004). Se han reportado en todo el mundo varios eventos de intoxicaciones con estas toxinas, siendo el caso paradigmático el ocurrido en un centro de diálisis en Caruaru Brasil, donde 100 pacientes desarrollaron falla aguda de hígado y 50 de estos fallecieron (Jochimsen et al., 1998). Así mismo se ha relacionado fuertemente la contaminación de aguas de bebida con MCs con el desarrollo de cáncer hepático en personas que habitan en ciertas regiones de China (Ueno et al., 1996).

Debido a la presencia de MCs en el agua, la principal vía de entrada de estas toxinas al organismo es la vía oral, aunque también puede ingresar por vía inhalatoria al formarse aerosoles mientras se están realizando actividades recreacionales en estos cursos de agua. La absorción de la toxina se da principalmente a nivel de las vellosidades del intestino delgado y en menor medida puede absorberse en la mucosa gástrica a través de un sistema de transportadores multiespecíficos de iones orgánicos (Rumnegar, et al., 1991; Falconer and Yeung., 1992). La mayoría de la MC-LR (78-88%) absorbida a nivel intestinal es transportada en circulación hasta el hígado donde ingresa al hepatocito a través del sistema de transportadores multiespecíficos de los ácidos biliares.

Los mecanismos involucrados en la toxicidad de MCs no han sido aún completamente aclarados, sin embargo la mayor parte de las evidencias recavadas hasta el momento indican que las MCs son un potente inhibidor específico de serina y treonina proteinfosfatasa (PP1 y PP2A) lo cual causa disfunción del citoesqueleto (Ding et al., 2001) y desregulación de la mayoría de los procesos celulares (Mac Kintosh et al., 1990). Los datos más recientes indican que el estrés oxidativo jugaría un papel fundamental en la patogénesis de las intoxicaciones producidas por MCs en mamíferos (Weng et al, 2007).

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, estudiando exposiciones sub-crónicas a MC-LR en ratones (Andrinolo, et. al., 2008), encontramos que durante la exposición a la toxina además de importantes daños estructurales en el hígado, elevación sérica de las enzimas marcadoras de daño hepático (FAL y TGO) y aumentos de los niveles hepáticos de lípidos totales, neutros y polares; se produjo una elevación de los indicadores de daño oxidativo (TBARS y ROOHs) en hígado y riñones. En ambos tejidos el daño oxidativo se presentaba con intensidad y evolución temporal similar. Estos hallazgos son

particularmente interesantes ya que además de demostrar el estrés oxidativo al que se encuentran expuestos los tejidos ante una intoxicación de este tipo con MC-LR y que las alteraciones generadas son reversibles luego de dos meses de suspensión del contacto con la toxina (wash-out), pone de manifiesto que los marcadores de daño oxidativo se elevan en riñón aún en ausencia de alteraciones evidentes en éste órgano a nivel histológico.

### **OBJETIVOS:**

Teniendo en consideración que el estrés oxidativo sería la principal vía por la cual se generan los daños producidos por MC-LR, el objetivo del presente trabajo es determinar, en un modelo *in vivo*, que ocurre ante dicho estrés oxidativo con los mecanismos naturales de defensa contra el estrés oxidativo durante la exposición a esta toxina y luego de suprimir el contacto con la misma.

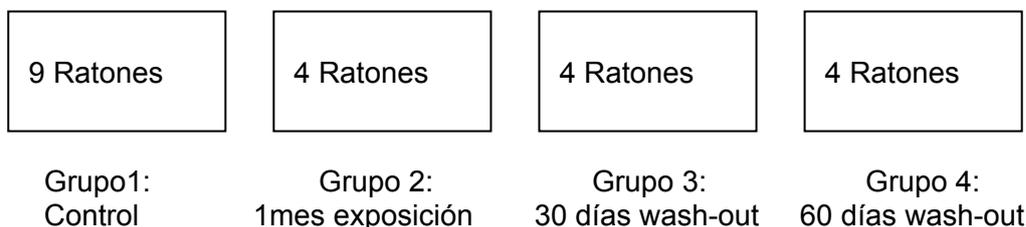
Para ello, en este trabajo, se realizaron ensayos de exposición sub-crónica a MC-LR en ratones N:NIH-S, administrando dosis subletales de 25µg/kg cada 48 hs. durante un mes, seguido de períodos de 1 y 2 meses sin exposición a la toxina (wash-out). Se determinaron en hígado y riñones de estos animales parámetros de estrés oxidativo tales como Glutation total, oxidado (GSSG) y reducido (GSH) , así como niveles de  $\alpha$ -tocoferoles y las actividades de las enzimas involucradas en los sistemas antioxidantes como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutation peroxidasa (GSH-Px), glutation reductasa (GSH-Rd), glutation transferasa (GSH-Tr) y óxido nítrico sintetasa (estimada como NOx, producción de nitrato + nitrito) destinadas comúnmente a controlar la homeostasis redox celular.

### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

#### Animales:

Se utilizaron 21 ratones machos adultos (20-22 gr) procedentes del lote N:NIH-S obtenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP

Para el ensayo se emplearon 4 grupos con la siguiente disposición de los animales:



#### Diseño Experimental:

#### Dosis de Myc-LR empleada:

La dosis de 25 µg/kg fue elegida teniendo en cuenta el valor de la LD50 = 50 µg/kg y que en experiencias anteriores con la misma dosis se obtuvo un daño evidente en el hígado y una

vez suspendida permitió observar recuperación (Andrinolo, et. al., 2008), con lo cual nos permitiría monitorear que ocurre con los marcadores de estrés oxidativo y con el sistema antioxidante en las distintas fases del ensayo planteado.

#### Intoxicación subcrónica:

Los animales de los grupos 2, 3 y 4 fueron tratados con dosis de 25 µg/Kg de Myc-LR inyectadas intraperitonealmente cada 48 hs durante 1 mes. Los especímenes control se inyectaron con una cantidad equivalente de solución fisiológica estéril, administrada con la misma frecuencia y durante el mismo período de tiempo. Los ratones de la jaula 2 fueron sacrificados al cumplirse el mes de inyección. El grupo de la jaula 3 se sacrificó después de 30 días sin administración de la toxina (wash-out) y el grupo 4 después de 60 días de wash-out.

De cada uno de estos animales, incluidos los controles, se extrajeron el hígado y riñones, los cuales fueron lavados con solución salina estéril fría y colocados en buffer antioxidante (Marra, et al., 1986), decapsulados y homogeneizados. Las muestras así preparadas se sometieron a un ciclo de centrifugación a 10.000g (20 min 1-2°C). Los sobrenadantes obtenidos fueron alícuotados y almacenados a -70°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> hasta el momento de las determinaciones bioquímicas. Las alícuotas destinadas a realizar las determinaciones de niveles de glutatión fueron tratadas inmediatamente con 40 mM de N-etilmaleimida y desproteinizadas utilizando ácido tricloroacético (15% concentración final) siguiendo la recomendación de Asensi et al. (1994).

#### Purificación de Myc-LR:

La toxina usada en este trabajo fue aislada de un florecimiento de *Microcystis aeruginosa* recolectado del Río de la Plata en base a métodos establecidos (Barco, et al., 2005) con pequeñas modificaciones. Las células se lisaron mediante 3 ciclos de congelado-descongelado, luego se realizó una extracción con Cloroformo/Metanol (50/50 v/v) y la fase acuosa se concentró en rotovapor. La purificación de la toxina se llevó a cabo mediante la técnica semipreparativa HPLC con un 98% de pureza. Para ello se empleó una columna TERMO Hyperprep HS C18 (250x10 mm), realizando una corrida semipreparativa con loop de 500µl, régimen isocrático y detección UV-visible ( $\lambda = 238\text{nm}$ ). La identidad de la toxina fue confirmada mediante cromatografía Líquida de Alta resolución con detección Masa-Masa, modo ionización positiva (CL/ESI (+) -MS-MS) en el laboratorio de Espectrometría de Masas. Departamento de Ecotecnología del Instituto de Investigaciones Químicas de Barcelona. Barcelona, España

## Ensayos Bioquímicos:

### Marcadores Bioquímicos de Estrés Oxidativo:

Sobre las alícuotas provenientes de los homogenatos de hígado y riñones se determinó el contenido de Glutation oxidado (GSSG) mediante el método de Rahman et al. (2006) y los niveles de Glutation reducido (GSH) fueron obtenidos utilizando la técnica de Glutation-S-Transferasa descrita por Brigelius et al (1983). Los niveles de  $\alpha$ -tocoferoles se determinaron mediante HPLC siguiendo el método de Buttris and Diplock (1984) modificado por Bagnati et al. (1997). Por último el contenido total de proteínas se obtuvo mediante el micrométodo de Bradford (1976), con BSA (seroalbúmina bobina) como estándar.

### Enzimas del Sistema Antioxidante:

Las actividades enzimáticas fueron determinadas sobre las muestras de hígado y riñones obtenidas mediante el procesamiento descrito anteriormente.

La actividad de SOD se determinó mediante la técnica de Flohé and Ötting (1984), mientras que en el caso de las actividades de GSH-Px, GSH-Tr y GSH-Rd se utilizaron los métodos de Wheeler et al. (2001), Habig et al (1984) y Carlberg and Maverick (1985) respectivamente.

La determinación de la actividad de CAT fue llevada a cabo empleando el método UV cinético descrito por Aebi (1984).

La actividad de óxido nítrico sintetasa (NOS) fue estimada determinando los niveles de NOx por el método enzimático de Verdon, et al.,1995.

## **RESULTADOS:**

### Marcadores Bioquímicos de Estrés Oxidativo:

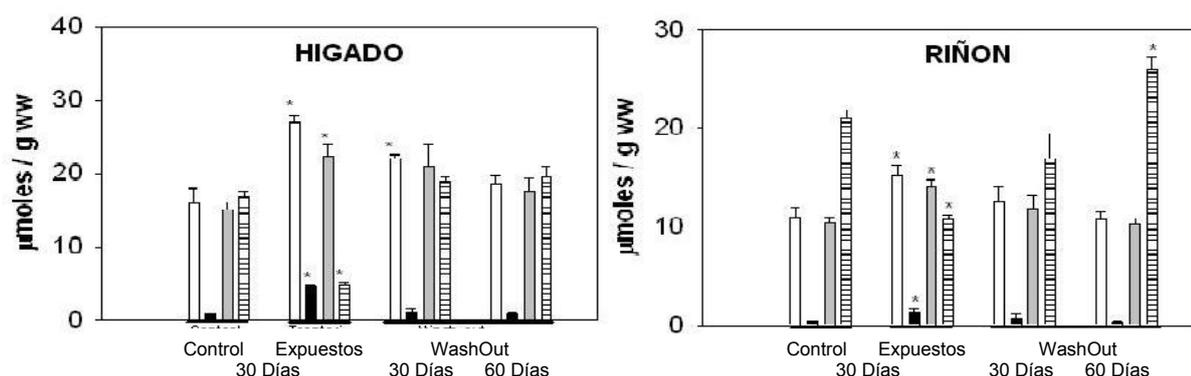


Fig.1. Glutation total (barras blancas), reducido (barras grises), oxidado (barras negras) y GSH/GSSG (barras rayadas) en hígado y riñones de animales expuestos y controles. Los valores se expresan en  $\mu\text{mol}/\text{gr}$  de peso seco.

Los niveles de Glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG) fueron profundamente afectados por el tratamiento con MC-LR tanto en hígado como en riñones (Fig.1). Vimos que en ambos

tejidos los valores de GSH y GSSG se encontraron sensiblemente aumentados, durante la exposición a la toxina, respecto al control. En consecuencia la suma GSH + GSSG también se encontró elevada respecto del control. Sin embargo la relación GSH/GSSG se presentó disminuida a expensas de un mayor incremento de GSSG respecto del incremento de GSH. Luego del primer mes de wash-out los valores regresaron a niveles normales, excepto el nivel de glutation total en hígado que permaneció significativamente aumentado. Es interesante notar que luego del segundo mes de wash-out se observó un aumento en el nivel de la relación GSH/GSSG en riñones.

Los valores hallados para  $\alpha$ -tocoferoles (Fig.2) evidenciaron una importante disminución en hígado, respecto del control, durante el mes de exposición a MC-LR que retornó a niveles normales luego del primer mes de wash-out manteniéndose así hasta el final de la experiencia.

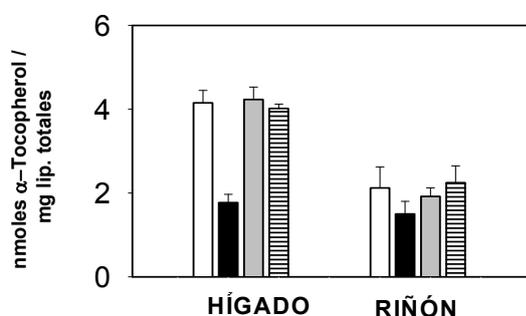


Fig.2 Niveles de  $\alpha$ -tocoferoles en hígado y riñones. Control (barras blancas), 1 mes de exposición (barras negras), 30 días wash-out (barras grises), 60 días wash-out (barras rayadas). Los resultados se expresan en nmol/ mg de lípidos totales.

#### Enzimas del Sistema Antioxidante:

Luego de 30 días de exposición a MC-LR se observó una reducción importante en la actividad de SOD en ambos tejidos (Fig.3), aunque bastante mas pronunciada en riñón que en hígado, respecto de los hallados para los controles.

En ambos tejidos, al finalizar el primer período de wash-out, se restablecieron los valores normales de actividad. Sin embargo, es interesante destacar que los valores de actividad de SOD encontrados en hígado luego de dos meses de suprimido el contacto con la toxina, fueron significativamente mayores comparados con los controles.

La actividad de CAT también fue sensiblemente afectada por el tratamiento con MC-LR (Fig.3). Los niveles de actividad encontrados en los animales sometidos a 30 días de exposición a la toxina fueron sensiblemente menores que los controles tanto en hígado como en riñones. En estos casos se produjo un aumento posterior de actividad durante el primer mes de wash-out, en ambos tejidos, que finalmente revirtieron a normalidad al finalizar el segundo mes de wash-out.

La estimación de la actividad de NOS (Fig.3), mediante la producción de NOx, mostró un

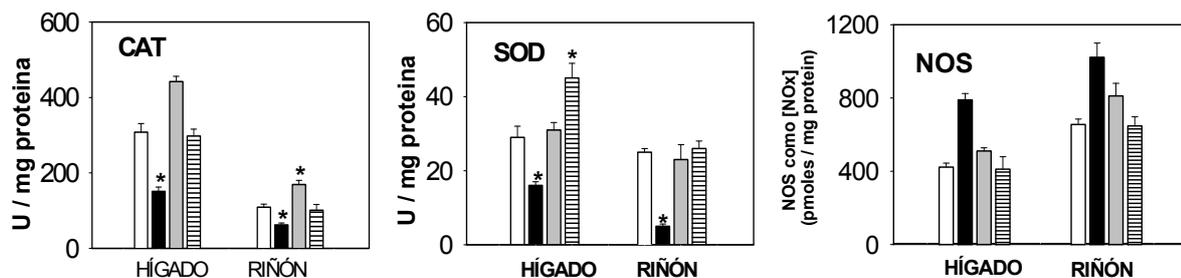


Fig.3 Niveles de actividad de CAT, SOD, NOS (estimada como NOx) en hígado y riñones de ratones. Control (barras blancas), 1 mes exposición (barras negras), 30 días wash-out (barras grises), 60 días wash-out (barras rayadas). Los \* indican variaciones significativas.

aumento importante durante el mes de exposición a MC-LR que gradualmente fue disminuyendo hasta alcanzar los valores del control luego de dos meses de wash-out.

En la Fig.4 presentamos los valores obtenidos para las actividades de las enzimas relacionadas con el metabolismo del Glutacion.

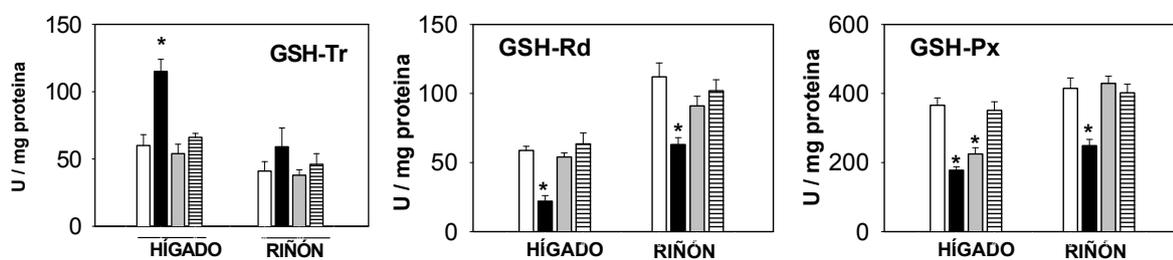


Fig.4. Niveles de actividad de GSH-Tr, GSH-Rd y GSH-Px en homogenatos de hígado y riñones de ratón. Control (barras blancas), 1 mes exposición (barras negras), 30 días wash-out (barras grises), 60 días wash-out (barras rayadas)

La actividad de Glutation transferasa (GSH-Tr) en los homogenatos provenientes de hígados de animales tratados durante un mes con MC-LR se encontró significativamente aumentada; mientras que en riñones no se encontraron aumentos de actividad que resultaran significativos. Los valores revirtieron a normalidad luego de suprimir el contacto con la toxina.

La actividad de GSH-Rd también se encontró disminuida en ambos tejidos durante el período de exposición a la toxina, llegando a valores cercanos a los controles luego de la supresión de administración de toxina.

Por último, una disminución similar de actividad se encontró durante el período de exposición a MC-LR para GSH-Px en ambos tejidos. Sin embargo mientras que en riñón los valores retornaban a normalidad ya en el primer mes de wash-out, para el caso del hígado los valores de actividad se mantuvieron por debajo de los controles incluso en este período llegando a normalidad solo después del segundo mes de wash-out.

## DISCUSIÓN:

Una consecuencia importante de la exposición a MC-LR es una profunda aunque reversible

alteración del sistema de protección antioxidante celular. Así, encontramos descensos significativos en la actividad de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y glutatión reductasa (GSH-Rd) tanto en hígado como en riñones de los animales que fueron sometidos a intoxicación sub-crónica con MC-LR. Aunque estas disminuciones fueron de similar magnitud en ambos tejidos, los patrones de normalización revelaron una compleja interacción entre estas enzimas y aquellos elementos no enzimáticos del sistema antioxidante.

El aumento de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) durante la exposición a MC-LR es parcialmente removido por SOD, CAT y GSH-Px (Moreno et al., 2005). Ya que SOD es un componente esencial del sistema antioxidante, usualmente se produce un aumento de su actividad ante un daño oxidativo. Sin embargo si este daño es prolongado, como ocurriría en nuestro trabajo, podemos ver una disminución de actividad de SOD que puede deberse a dos mecanismos probables: alteraciones en el ensamblado de las subunidades catalíticas de la enzima y/o inhibición de su centro activo por acumulación de peróxido según lo descrito por Bowler et. al., 1994.

Una consecuencia natural de la inhibición de SOD es una disminución de la eficiencia de eliminación de superóxido, lo cual puede ser responsable de la inhibición de CAT, generando una progresiva acumulación de peróxidos (Moreno et al., 2005), peroxinitritos y la formación de radicales hidroxilo; quienes generan daños ulteriores sobre biomoléculas y otros componentes del sistema antioxidante (Patel et al., 1999).

La toxicosis asociada a MC-LR esta relacionada con una elevación de NOx y consecuentemente con una producción excesiva de peroxinitrito, lo cual puede resultar en serios daños sobre la homeostasis redox, lípidos y ácidos nucleicos. (Packer et al., 1998)

El consumo de  $\alpha$ -tocoferoles en hígado puede ser consecuencia de este estado pro-oxidativo, el cual requiere una mayor utilización de depuradores no enzimáticos celulares.

El glutatión es considerado uno de los más importantes antioxidantes no enzimáticos celulares y constituye la primer línea de defensa frente a la producción excesiva de ROS.

El daño oxidativo generado por la MC-LR impacta de forma importante en el metabolismo del glutatión, afectando a las enzimas que intervienen en su metabolismo. En concordancia con los resultados observados en intoxicaciones agudas con MC-LR reportados por Maidana et al., 2006, en nuestro trabajo encontramos niveles aumentados de glutatión total y actividad de GSH-Tr; pero los valores de actividad determinados para GSH-Px se encontraron disminuidos respecto de los controles, ocurriendo lo mismo con la actividad de GSH-Rd luego de la exposición subcrónica a la toxina.

Existe una estrecha dependencia entre la actividad de GSH-Px y los niveles de GSH (Rumnegar et al., 1987) ya que GSH-Px cataliza la reducción de  $H_2O_2$  a expensas del GSH. Por lo tanto, la disminución en la capacidad de reducir glutatión puede ser una consecuencia

natural de la disminución de la actividad de GSH-Px, tanto en hígado como en riñón, derivando en niveles disminuidos de GSH/GSSG.

Una reducción en la actividad de GSH-Rd puede contribuir a un ulterior decrecimiento de la relación GSH/GSSG.

Además MC-LR puede formar conjugados del tipo Microcystina-GSH como una suerte de proceso de detoxificación (Plugmacher et al., 1998). Es así que encontramos aumento de actividad de GSH-Tr luego de la exposición a la toxina. Sin embargo la conjugación de GSH con MC-LR como un intento de neutralizar su toxicidad termina siendo un punto muy importante en el deterioro del pool antioxidante que deja a los tejidos aún mas susceptibles al daño oxidativo (Ding et al., 2003).

Como el hígado es el principal sitio de producción de glutation y de detoxificación de MC-LR, es posible que los niveles de glutation total y GSH continuaran elevados aún cuando el sistema redox haya llegado nuevamente a valores normales y se haya eliminado toda la toxina.

Un patrón similar fue observado para los riñones con la excepción de una relación GSH/GSSG que se mantenía persistentemente elevada luego de dos meses de supresión de la toxina. Estos resultados pueden interpretarse como un reestablecimiento de la capacidad reductora del órgano (sin biosíntesis de novo de GSH) cuando la acumulación de ROS fue compensada.

En hígado el equilibrio entre GSH y GSSG debe ser más rápido que en riñón dado el activo metabolismo de este antioxidante.

Los niveles de GSH-Rd y GSH-Tr se normalizaron rápidamente, los de GSH-Px y CAT permanecieron aumentados aún después del primer mes de wash-out, mientras que la actividad de SOD continuó elevada en hígado luego del segundo mes de wash-out

Estos hallazgos pueden reflejar un extenso daño en el pool antioxidante en ambos tejidos, el cual no es capaz de neutralizar la acumulación de ROS durante el período de exposición, particularmente interesante en el caso del riñón ya que estas alteraciones se presentan antes de que se observen daños histológicos en este órgano (Andrinolo, et. al., 2008). En consecuencia, ambos tejidos requieren una actividad extra de estas enzimas tendiente a restaurar la homeostasis redox.

## **CONCLUSIONES:**

Entre los problemas sanitarios y ambientales en la cuenca del Plata a los que se enfrenta la población hoy en día, uno de los más importantes es la exposición a florecimientos de *Microcystis aeruginosa* y por lo tanto a las toxinas que éstas producen; sobre todo cuando la exposición se da de forma sub-crónica e intermitente como ocurre en nuestro medio; casos para los cuales no existen hasta el momento parámetros de evaluación y diagnóstico claros.

Las alteraciones encontradas, en el modelo planteado, en cuanto a marcadores de daño oxidativo y a niveles de componentes enzimáticos y no-enzimáticos del sistema de protección antioxidante celular, presentes incluso antes de un evidente daño histológico, como ocurre para el caso del riñón (Andrinolo, et. al., 2008), nos acercan más a una mejor comprensión de los procesos patológicos por los cuales se producen dichos daños y a la posibilidad de encontrar marcadores específicos de exposición a Microcystinas para así viabilizar estudios epidemiológicos y encausar una correcta evaluación del riesgo.

## REFERENCIAS:

- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, London, pp. 41–111.
- WHO 2004 Guidelines for Drinking-Water Quality. Recommendations. Chemical Fact Sheets, vol. 1., third ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 407–408.
- Jochimsen EM, WW Carmichael, JS an, DM Cardo, ST Cookson, CEM Holmes, MBD Antunes, DA de Melo, TM Lyra, VST Barreto, S Azevedo, WR Jarvis, Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil, *New Engl. J. Med.* 338 (1998) 873-878.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H., Chen, G.C., Chen, G., Yu, S., 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.
- Runnegar MTC, Gerdes RG, Falconer IR. 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicol* 29: 43–51
- Falconer IR, Yeung DSK. 1992. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis spp. toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem Biol Interact.* 81: 181–96
- Ding W, Shen H, Ong C, Critical role of ROS formation in microcystin-induced cytoskeletal disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 64 (2001) 507-519.
- Mac Kintosh C, Beattie KA, Klumps S, Cohen P, Codd GA, Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264 (1990) 187-192.
- Weng Dan, Yan Lu, Yinna Wei, Ying Liu, Pingping Shen The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice *Toxicology* 232 (2007) 15-23
- Marra, C.A., Alaniz, M.J.T de, Brenner, R.R. Modulation of  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  rat Liver Microsomal Desaturase Activities by Dexamethasone-Induced Factor, *Biochim. Biophys. Acta* 879 (1986), 388-393.
- Asensi, M., Sastre, J., Pallardo, F.V., García de la Asunción, J., Estrela, J.M., Viña, J., A High-Performance Liquid Chromatography Method for Measurement of Oxidized Glutathione in Biological Samples, *Anal. Biochem.* 217 (1994), 323-328.
- Barco M, Lawton LA, Rivera J, Caixach J, Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1074 (2005) 23-30.
- Rahman T, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 2006; 1: 3159-3165.

- Bagnati, M., Bordone, R., Perugini, C., Cau, C., Albano, E., Bellomo, G. Cu(I) Availability Paradoxically Antagonizes Antioxidant Consumption and Lipid. Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 253, Issue 2, 18 December 1998, Pages 235-240
- Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254.
- Brigelius, R., Muckel, C., Akerboom, T.P., Sies, H. Identification and Quantitation of Glutathione in Hepatic Protein Mixed Disulfides and its Relationship to Glutathione Disulfide, Biochem. Pharmacol. 32 (1983), 2529-2534.
- Flohé L., Ötting F. (1984) Superoxide Dismutase Assays, Methods Enzymol. 105, 93-104.
- Wheeler, M.D., Nakagami, M., Bradford, B.U., Uesugi, T., Mason, R.P., Connor, H.D., Dikalova, A., Kadiiska, M., Thurman, R.G. Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase Prevents Alcohol-Induced Liver Injury in the Rat, J. Biol. Chem. 276 (2001), 36664-36672.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione-S-transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation, J. Biol. Chem. 249. (1984), 7130-7139.
- Carlberg, I., Mannervick, B. Glutathione Reductase, Methods Enzymol. 113 (1985), 484-490.
- Aebi H. Catalase in vitro, Methods Enzymol. 105 (1984), 121-126.
- Verdon, C.P., Burton, B.A., Prior, R.L. Sample Pretreatment with Nitrate Reductase and Glucose-6-Phosphatase Dehydrogenase Quantitatively Reduces Nitrate While Avoiding Interference by NADP<sup>+</sup> when the Griess Reaction is Used to Assay for Nitrite, Anal. Biochem. 224 (1995), 502-508.
- Moreno I, Pichardo S, Jos A, Gómez-Amores L, Mate A, Vazquez CM, Cameán Am, Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. Toxicol 45 (2005) 395-402.
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D, Superoxide dismutase in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 13 (1994) 199-218.
- Patel RP., J McAndrew, H Sellak, CR White, H Jo, BA Freeman, VM Darley-Usmar, Biological aspects of reactive nitrogen species. Biochim. Biophys. Acta 1411 (1999) 385-400.
- Packer MA, JL Scarlett, SW Martin, Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. Gen Pharmacol. 31 (1998) 179-186.
- Maidana M, V Carllis, FG Galhardi, JS Yunes, LA Geracitano, JM Monserrat, DM Barros, Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. Chemico-Biol Interactions 159 (2006) 223-234.
- Rumnegar MTC, Andrews J, Gerdes RG, falconer IR, Injury to hepatocytes induced by peptide toxin from the cyanobacterial *Microcystin aeruginosa*. Toxicol 25 (1987) 1235-1239.
- Plugmacher S, C Weigand, A Oberemm, KA Beattie, E Krause, GA Codd, CEW Steinberg, Identification of an enzymatically formed glutathione conjugated of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication, Biochim. Biophys. Acta 1425 (1998) 527-533.
- Ding W, Ong W Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity FEMS Microbiology Letters 220 (2003)