



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

NIVELES DE HIDROPERÓXIDOS Y METAHEMOGLOBINA COMO BIOMARCADORES DE EFECTO DE UNA EXPOSICIÓN PROLONGADA A MC-LR

**Plasmatic Methaemoglobin and Hydroperoxides Levels as MC-LR Prolonged
Exposure Biomarkers**

Daniela Sedan ^{a*}, Lorena Rosso ^a, Leda Giannuzzi ^{a,b}, Darío Andrinolo ^{a,b}

^aLaboratorio de Toxicología General, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 48 y 115, La Plata, Argentina. danielasedan@yahoo.com.ar

^bCIDCA-CONICET - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 116, La Plata, Argentina. dandrinolo@yahoo.com

*Autor para correspondencia: +54 221 4250497 int 46. danielasedan@yahoo.com.ar

Palabras clave: cyanobacteria, microcystinas, marcadores plasmáticos

Key words: cyanobacteria, microcystinas, plasmatic markers

Título abreviado: Biomarcadores de exposición a MC-LR

ABSTRACT

Background and aims: Injuries caused by exposure to MC-LR in animals have been widely reported, although specific biomarkers have not been described yet. It is necessary to investigate some parameters that could be determinate in blood samples indicating exposure to those toxins since it is difficult to detect microcystins in blood or urine samples, The aim of this work was to search for clinical biomarkers of sub-chronic exposure to microcystins which could allow risk assessment.

Methods: Microcystin LR (MC-LR) was purified from natural blooms of *Microcystis aeruginosa*. Mice were intraperitoneally injected every 48 h during 1 month with 25 μg MC-LR.kg⁻¹ body weight. Methemoglobin (MetHb), Alkaline phosphatase (ALP), Aspartate transaminase (AST), Alanine transaminase (ALT), Superoxide dismutase activity (SOD) and total Hydroperoxides (ROOHs) were measured on blood samples.

Results and conclusions: Plasmatic ALP, ALT and AST activities showed a significant increase in MC-LR-treated animals in comparison with the control group. Analysis of ROOHs plasmatic level from mice exposed to MC-LR revealed a significant increase ($3.8 \pm 1.2 \mu\text{g}\cdot\text{gr}^{-1}$ protein) compared with control ($1.4 \pm 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{gr}^{-1}$ protein) (Mean \pm SD). There was an increase of MetHb levels in treated mice ($14.6 \pm 3.8 \%$ MetHb.Hb_T⁻¹) in comparison with control ones ($6.9 \pm 3.6 \%$ MetHb.Hb_T⁻¹). Also, erythrocytes SOD activity was affected by MC-LR administration. These parameters (especially ROOHs y MetHb) could be useful in clinical detection of prolonged exposure and then confirmed by MC-LR detection in specialized laboratories.

RESUMEN

Introducción: La exposición prolongada a toxinas cianobacterianas, como las Microcystinas, presentes en cuerpos de agua dulce o en agua potable es un problema sanitario-ambiental importante. Los daños causados por la hepatotoxina Microcystina-LR (MC-LR) han sido extensamente descriptos en animales, pero hasta el momento no se han encontrado biomarcadores específicos. Debido a la dificultad en detectar Microcystinas en sangre u orina, el objetivo de este trabajo fue la búsqueda de marcadores clínicos en una exposición prolongada a MC-LR en ratones, que podrían ser

útiles como biomarcadores de efecto y emplearse como herramientas en estudios de riesgo.

Métodos: MC-LR fue purificada a partir de florecimientos de *Microcystis aeruginosa* recolectados del río de La Plata. Se inyectaron intraperitonealmente ratones N:NIH Swiss cada 48 hs durante un mes con dosis de $25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$ de peso. En la sangre de estos ratones y de controles se determinaron los siguientes parámetros Metahemoglobina (MetHb, forma oxidada de hemoglobina), Fosfatasa alcalina (FAL), Aspartato transaminasa (AST), Alanina transaminasa (ALT), Superóxido dismutasa (SOD) e Hidroperóxidos totales (ROOHs).

Resultados y Conclusiones: Los niveles plasmáticos de FAL, ALT y AST mostraron aumentos significativos en las muestras de los animales expuestos a MC-LR respecto de los controles. El análisis de los ROOHs plasmáticos reveló un aumento significativo en los ratones expuestos a MC-LR ($3.8 \pm 1.2 \mu\text{g.gr}^{-1}$ proteína) respecto de los controles ($1.4 \pm 0.6 \mu\text{g.gr}^{-1}$ proteína). Como consecuencia del aumento de ROOHs, se observó un aumento en los valores de MetHb en los animales tratados ($14.6 \pm 3.8 \%\text{MetHb.Hb}_T^{-1}$) respecto de los controles ($6.9 \pm 3.6 \%\text{MetHb.Hb}_T^{-1}$). Además se encontraron alteraciones en los valores de actividad de SOD en los animales expuestos en comparación con el control. Estos biomarcadores (principalmente ROOHs y MetHb) podrían emplearse en la detección clínica de casos de exposiciones prolongadas que luego serán confirmados en laboratorios especializados por detección de MC-LR.

INTRODUCCIÓN

Las Microcystinas (MCs) son hepatotoxinas producidas por varios géneros de cyanobacteria o algas verde-azules (Chorus & Bartram, 1999). Las cyanobacteria (organismos procariotas, gram negativos, fotosintetizadores, fijadores de nitrógeno y potencialmente productoras de cyanotoxinas) constituyen uno de los graves problemas sanitarios relacionados con la eutrofización de las aguas que se utilizan para obtención de agua potable y recreación.

Existen actualmente más de 70 variantes de Microcystinas, siendo una de las más tóxicas (Gupta *et al.*, 2003) y frecuentemente hallada la Microcystina LR (MC-LR) (Rinehart *et al.*, 1994).

Químicamente, MC-LR es un heptapéptido cíclico de estructura ciclo (D-Ala-X-D-MeAsp-Y-ADDA-D-Glu-Mdha) cuyas características sobresalientes son la presencia de un aminoácido específico de MCs, el ADDA (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico), y Leucina y Arginina en las posiciones X e Y de la molécula respectivamente (Sivonen & Jones, 1999).

Las principales vías de entrada de MC-LR son la vía oral y la vía inhalatoria que puede adquirir relevancia cuando se realizan actividades de recreación que involucran deportes náuticos en los cuales se generan gran cantidad de aerosoles.

Los principales mecanismos de acción de MC-LR son la inhibición de serina/treonina proteínas fosfatasas PP1 y PP2A (MacKintosh *et al.*, 1990), y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ding *et al.*, 1998, 2000, 2003).

MC-LR genera en los hepatocitos alteraciones morfológicas, del citoesqueleto y ciclo celular, variación del perfil lipídico hepático y peroxidación lipídica, cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, alteración de los componentes enzimáticos y no enzimáticos del sistema antioxidante, modificaciones en proteínas involucradas en vías de señalización, apoptosis o desarrollo de tumores dependiendo del tiempo y la dosis a la que se encuentra expuesto el organismo (Hooser *et al.*, 1989, 1990, 1991; Yu,

1989, 1995; Runnegar *et al.*, 1995; Ding *et al.*, 2000, 2001; Gehringer, 2004; Andrinolo *et al.*, 2008; Sedan *et al.*, 2010).

Si bien el principal órgano blanco de MC-LR es el hígado, también genera daños sobre otros órganos como riñón, tracto gastrointestinal, cerebro, pulmón, timo y sistema inmune (Takahashi & Kaya, 1993; Bell & Codd., 1994; Chen *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2007; Andrinolo *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Sedan *et al.*, 2010).

Hace ya muchos años que se conocen casos de muertes y daños en la salud humana y animal relacionados con la exposición aguda y crónica de éstos a aguas contaminadas con cyanobacteria productoras de MCs. Las afecciones informadas varían en gravedad y abarcan desde síndromes gastrointestinales (Tisdale, 1931; Zilberg, 1966; Lippy & Erb, 1976; Teixeira *et al.*, 1993; Annadotter *et al.*, 2001) alteraciones respiratorias y cutáneas (Giannuzzi *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 1990), promoción de tumores (Amstrong, 1980; Yu, 1989) hasta la muerte por fallo hepático (Carmichael, 1996; Pouria *et al.*, 1998) con la característica de encontrarse ausente cualquier otro agente etiológico que usualmente puede ser el causante de estas afecciones. El caso prototípico es el ocurrido en 1996 en Caruaru (Pernambuco, Brasil), donde 131 pacientes fueron sometidos a diálisis con agua contaminada con estas toxinas debido a un inadecuado tratamiento de la misma, muriendo 50 de ellos debido a fallo hepático agudo (Carmichael, 1996; Pouria *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2002).

Recientemente se ha registrado un caso de exposición recreacional en el embalse Salto grande (Concordia, Argentina), donde un joven expuesto a un intenso florecimiento de

Microcystis aeruginosa desarrolla inicialmente una neumonía atípica que deriva en un problema hepático (Giannuzzi *et al.*, 2011).

La presencia de MCs en el agua de red de las ciudades de Ensenada y La Plata ha sido informada (Echenique *et al.*, 2006) coincidentemente con la aparición de florecimientos en el Río de La Plata (De León & Yunes, 2001). Esta situación se ha vuelto a constatar en la ciudad de Concordia derivada de florecimientos en el embalse de Salto Grande (Niez *et al.*, 2010).

Si bien las intoxicaciones de carácter agudo son las más fácilmente detectables, la exposición prolongada, aún cuando resulta más silente, podría constituir un importante problema sanitario. Para determinar esto, resulta particularmente interesante poder llevar a cabo estudios epidemiológicos que puedan relacionar distintas afecciones con la exposición a cyanotoxinas. Hasta el momento este tipo de información, ausente en nuestra región, es escasa en el mundo; sólo se han efectuado algunos estudios en Australia, Reino Unido y China. En estos estudios se relacionan cáncer primario de hígado con MCs presentes en las fuentes de agua utilizada durante largos períodos de tiempo (Ueno *et al.*, 1996), la morbilidad luego de una exposición recreacional a florecimientos cyanobacterianos con los niveles de toxinas encontrados en los cuerpos de agua (Stewart *et al.*, 2006) o los niveles de enzimas marcadoras de daño hepático con los niveles de MC-LR en plasma (Chen *et al.*, 2009).

Estudios de exposición sub-crónica a MC-LR en ratones realizados por nuestro grupo de trabajo, han evidenciado un importante daño en hígado y riñón de los ratones expuestos a MC-LR, dominado por estrés oxidativo e inhibición de PP1 y PP2A, aún

cuando no se expresan signos o síntomas clínicos que nos permitieran distinguir entre los animales expuestos a la toxina y los controles (Andrinolo *et al.*, 2008; Sedan *et al.*, 2010).

Por otro lado, la detección de MC-LR en muestras de fácil acceso, como sangre y orina, requiere numerosos procesos de extracción, equipos y técnicas sofisticadas y costosas con lo cual resulta ser un marcador de exposición que no está al alcance de todos los laboratorios (Hilborn *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

Nuestra hipótesis es que a partir de conocer los efectos de una exposición prolongada a MC-LR es posible identificar variables que puedan ser utilizadas como marcadores biológicos de exposición o efecto.

En este sentido el objetivo de este trabajo fue comenzar a estudiar varios parámetros que pudieran detectarse en muestras de sangre entera y/o plasma y que pudieran resultar biomarcadores de efecto, es decir que representaran a nivel periférico el efecto producido en el organismo por la exposición sub-crónica a MC-LR.

Por ello se estudiaron enzimas como Fosfatasa Alcalina (FAL), Aspartato Transaminasa (AST) y Alanina Transaminasa (ALT) que son considerados tradicionalmente como marcadores plasmáticos de daño hepático; y los niveles de hidroperóxidos en plasma, de metahemoglobina (MetHb) en sangre y la actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) eritrocitaria de animales tratados y controles como marcadores de estrés oxidativo.

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron 12 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, divididos en dos grupos, uno control y otro tratado con MC-LR.

Los animales se mantuvieron en ambiente climatizado a 25 ± 3 ° C y humedad relativa del 60 % con ventilación forzada y bajo ciclos lumínicos automáticos de 12 hs. La alimentación sólida y el agua de bebida se suministraron *ad-libitum*. Todos los procedimientos de manipuleo de los animales siguieron las normativas del NIH (1985).

Diseño Experimental

-Dosis de MC-LR empleada

La dosis de $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ fue elegida teniendo en cuenta el valor de la $DL_{50} = 50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Fawell *et al.*, 1993, 1999) y que en experiencias anteriores con la misma dosis se obtuvo un daño evidente en hígado y riñón aún cuando no se evidenciaron signos ni síntomas (Andrinolo *et al.*, 2008; Sedan *et al.*, 2010) con lo cual nos permitiría evaluar el estado de los parámetros sanguíneos seleccionados en estas condiciones.

-Intoxicación sub-crónica

Los animales expuestos a la toxina fueron tratados con dosis de $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MC-LR inyectadas intraperitonealmente cada 48 hs durante 1 mes. Los especímenes controles se inyectaron con una cantidad equivalente de solución fisiológica estéril, administrada

con la misma frecuencia y durante el mismo período de tiempo. Una vez concluidos los tratamientos los animales fueron sacrificados. Para minimizar las variaciones se ayunó a los animales durante la noche previa al momento del sacrificio y estos procedimientos se llevaron a cabo de manera rutinaria a las 9 a.m.

Los animales fueron pesados y luego anestesiados con éter. Se realizó la extracción de sangre por el método de punción cardíaca utilizando como anticoagulante heparina. Se tomó una alícuota de 200 μ l de sangre entera, la cual se reservó para realizar las determinaciones de Hemoglobina (Drabkin, 1946) y Metahemoglobina (Evelyn & Malloy, 1938). El resto de la muestra de sangre se centrifugó a 4000 rpm por 15 min. en una centrífuga Rolco de mesa y se separó cuidadosamente el plasma sobrenadante del paquete globular. Estas muestras se fraccionaron en alícuotas y se procesaron en el momento o se almacenaron en freezer a -70°C hasta su utilización, dependiendo del parámetro a estudiar.

-Purificación de MC-LR

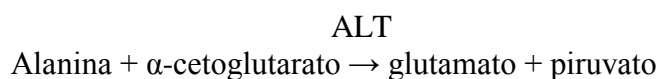
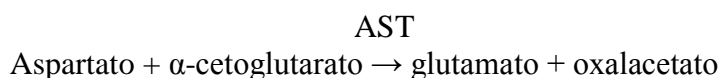
La toxina usada en este trabajo fue aislada de un florecimiento de *Microcystis aeruginosa* recolectado del Río de la Plata en base a métodos establecidos (Barco *et al.*, 2002) con pequeñas modificaciones. Las células se lisaron mediante 3 ciclos de congelado-descongelado, luego se realizó una extracción 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 500 μ l, régimen isocrático y detección UV-visible ($\lambda = 238$ 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).

-Determinaciones en sangre, plasma y eritrocitos

-Marcadores de daño hepático

Aspartato Transaminasa (AST) y *Alanina Transaminasa (ALT)*. Se realizó la determinación en plasma empleando Kits comerciales (Wiener Lab). La técnica se basa en las siguientes reacciones:



El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) produciendo en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

Fosfatasa Alcalina (FAL). La determinación en plasma se realizó empleando un Kit comercial (Wiener Lab) con el siguiente fundamento:

La Fosfatasa Alcalina (FAL) hidroliza al p-nitrofenilfosfato (p-NPP), que es incoloro, produciendo fosfato y p-nitrofenol a pH alcalino. La velocidad de aparición del anión p-nitrofenolato (amarillo) a 405 nm, es proporcional a la actividad enzimática de la muestra. La dietanolamina (DEA) regula el pH de la reacción y actúa como aceptor del fosfato liberado por la fosfatasa (transfosforilación), observándose como resultado una activación de la reacción.

-Marcadores de estrés oxidativo

Determinación de Hidroperóxidos totales. Se empleó la técnica de FOX (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1995). La técnica se basa en que los Hidroperóxidos presentes en la muestra oxidan al Fe^{+2} , contenido en el reactivo de FOX, a Fe^{+3} . El Fe^{+3} formado reacciona con xilenol-orange generando un complejo color violeta cuya DO se mide a 560 nm respecto de un blanco tratado con trifenil fosfina como reductor.

Procedimiento:

Para la determinación se llevó a cabo en paralelo la reacción en presencia y ausencia de agente reductor (trifenil fosfina 15 mM en metanol). Para ello se trabajó con dos alícuotas de 100 μl de plasma desproteinizado (TCA 5%), sobre una de ellas se agregó 100 μl de agente reductor y sobre la otra se agregó 100 μl de metanol. Se incubaron los dos tubos durante 30 min. a temperatura ambiente. Luego se agregaron 900 μl del reactivo de FOX ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en H_2SO_4 250 mM, butilhidroxitolueno (BHT) en metanol, Xylenol Orange), se mezcló por inversión y se incubó nuevamente durante 30 min. a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 10000 g durante 10 min. y se midió la absorbancia a 560 nm.

Para cuantificar se empleó una curva de calibración realizada con H_2O_2 entre 0 y 20 μM . Se determinaron los niveles de proteína de la muestra por el método de Bradford (1976) para ser empleados en la expresión de resultados como μg peróxidos del ácido oléico.(mg proteína)⁻¹.

Superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria. Esta técnica se basa en la inhibición de la oxidación espontánea de la epinefrina a adenocromo que ocurre a pH 11 y a velocidad

constante (cinética de orden cero) cuando la concentración inicial de sustrato decae muy lentamente (Misra & Fridovich, 1972).

Procedimiento:

En una cubeta de cuarzo se colocaron 970 μL de buffer carbonato/bicarbonato 50 mM; pH 11.0 en EDTA 0.1 mM y se adicionaron 20 μL de epinefrina ultra-pura 30 mM disuelta en ácido acético al 0.05 %. Luego de agregar la alícuota de muestra se mezcló por inversión y se leyó la DO en espectrofotómetro Cintra de doble haz a una longitud de onda de 480 nm durante 3 min. Para poder hacer el cálculo de concentración de SOD en las muestras se realizó una cinética de reacción sin homogenato para obtener la velocidad de auto-oxidación o de referencia de la epinefrina (Δ ref). Una unidad enzimática (UID) es aquella que inhibe al 50 % la auto-oxidación.

$PI = (\Delta SOD / \Delta ref) \cdot 100$ (PI: porcentaje de inhibición por minuto)

$UID = PI / 50$

Para calcular la actividad específica de SOD se calculó el cociente entre el valor de UID de cada muestra y el valor correspondiente de hemoglobina.

Metahemoglobina (MetHb). La determinación se basa en realizar la medida de absorbancia de una muestra diluida a una longitud de onda tal (620 nm) que la absorbancia de MetHb es distinta de la de Hemoglobina (Hb) y Oxihemoglobina (O_2Hb). Una vez determinada la absorbancia a 620 nm se añade cianuro para transformar la MetHb en cianmetahemoglobina (CNMetHb). Tanto la CNMetHb como la O_2Hb poseen una absorbancia muy pequeña a 620 nm (Evelyn & Malloy, 1938).

Procedimiento:

Se colocaron 980 μl de agua bidestilada, 10 μl de solución Tritón-Borato en un tubo y se mezcló suavemente. Se agregó 10 μl de sangre y se mezcló por inversión. Luego se centrifugó en centrífuga clínica 10 min. a velocidad máxima. Se determinó la absorbancia a 620 nm del sobrenadante obtenido contra blanco de agua bidestilada (A_1). Luego se agregó 5 μl de CNK al 10%, se mezcló por inversión y se incubó 5 min. a temperatura ambiente. Se midió nuevamente la absorbancia a 620 nm (A_2). Se realizó la calibración del método utilizando estándares de Hemoglobina (Wiener Lab) de concentración conocida obteniendo un valor $K=0,016$.

También se llevó a cabo la determinación de hemoglobina en las muestras estudiadas mediante el método descrito por Drabkin (1946).

Los valores de MetHb se calcularon de la siguiente forma:

$$\text{grMetHb. (100ml)}^{-1} = (A_1 - A_2) / K$$

$$\% \text{MetHb. (Hb}_{\text{Total}})^{-1} = [(\text{gr MetHb. (100ml)}^{-1}) \cdot 100] / (\text{gr Hb. (100 ml)}^{-1})$$

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de Student-t test o bien mediante el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el software de *GB-STAT Professional Statistics Program* (versión 8.0) de Dynamic Microsystems Inc. (Silver Springs, MD, USA).

RESULTADOS

Marcadores plasmáticos de daño hepático

Luego de un mes de exposición a MC-LR se observaron aumentos en los niveles de Fosfatasa alcalina (FAL), Alanina Transaminasa (ALT) y Aspartato Transaminasa (AST) en plasma de los animales tratados sub-crónicamente con MC-LR respecto de los controles (Figura 1), registrándose aumentos de 3, 3.5 y 2 veces respecto del control para FAL, ALT y AST respectivamente (Figura 1).

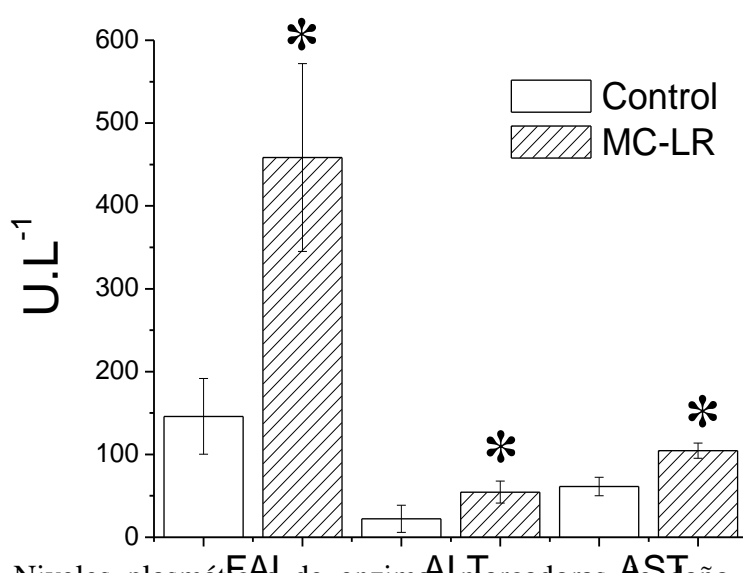


Figura 1. Niveles plasmáticos de enzimas marcadoras de daño hepático. Fosfatasa alcalina (FAL), Alanina transaminasa (ALT) y Aspartato transaminasa (AST) en ratones controles y tratados con $25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$ cada 48 hs durante 1 mes. (Media \pm SD, N=6). El asterisco (*) indica resultados significativamente diferentes respecto del control ($p < 0,05$).

Figure 1. Plasma levels of hepatic damage markers. Alkaline phosphatase (FAL), Alanine transaminase (ALT) and Aspartate transaminase (AST) in treated with $25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$ every 48 hs. during a month and control mice. (Mean \pm SD, N = 6). Asterisk (*) represents a significant difference in control values ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que el daño hepático generado por la exposición sub-crónica a MC-LR es de características mixtas, contando con un componente hepatocelular

evidenciado principalmente por el aumento de ALT y AST; y un componente colestásico indicado por el aumento de FAL.

Marcadores de estrés oxidativo

Hidroperóxidos plasmáticos y Superóxido dismutasa eritrocitaria. Dado que ante una exposición sub-crónica a MC-LR se genera un importante estrés oxidativo hepático y renal, decidimos estudiar la expresión de dicha situación a nivel sanguíneo mediante la determinación de hidroperóxidos plasmáticos (ROOHs) y la actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) eritrocitaria en animales tratados con MC-LR durante un mes y controles.

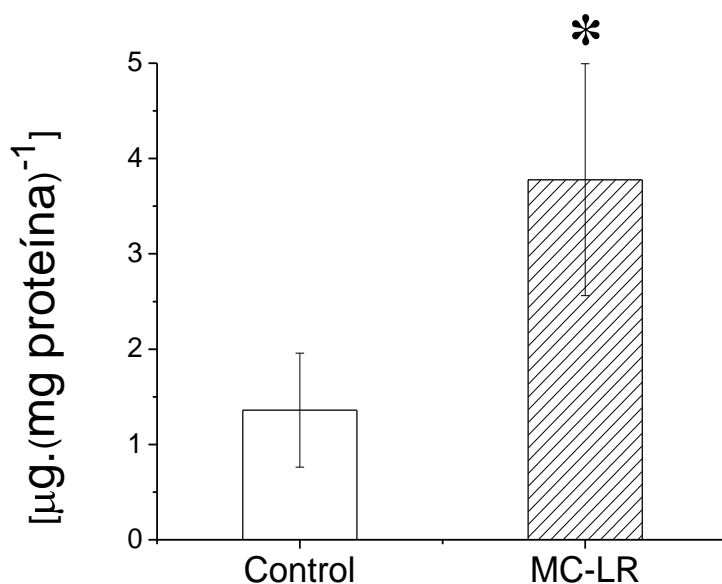


Figura 2. Niveles de Hidroperóxidos (ROOHs) determinados por la técnica de FOX en plasma de ratones controles y tratados ($25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$) (Media \pm SD, N= 6). El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto del control.

Figure 2. Plasma Hydroperoxides (ROOHs) levels detected by FOX assay in control and treated ($25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$) mice. (Mean \pm SD, N = 6) Asterisk (*) represents a significant difference in control values ($p < 0,05$).

Los niveles de ROOHs, testados por el ensayo FOX, se observaron elevados significativamente en plasma de los ratones expuestos sub-crónicamente a MC-LR ($3.8 \pm 1.2 \mu\text{g.gr}^{-1}$ proteína) respecto de los controles ($1.4 \pm 0.6 \mu\text{g.gr}^{-1}$ proteína) (Figura 2).

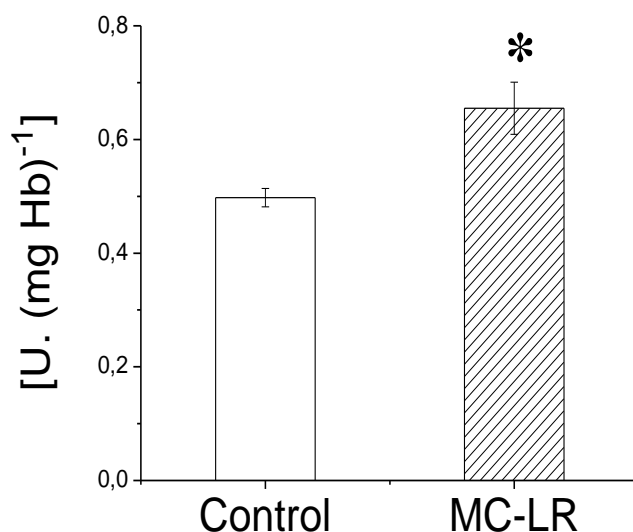


Figura 3. Actividades de Superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos de ratones tratados con $25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$ y controles. (Media \pm SD, N= 6) El asterisco (*) indica resultados significativamente diferentes respecto del control ($p < 0,05$).

Figure 3. Superoxide dismutase (SOD) activities in erythrocytes of control and treated ($25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$) mice. (Mean \pm SD, N = 6). Asterisk (*) represents a significant difference in control values ($p < 0,05$).

Así mismo se observó un aumento significativo de la actividad específica de SOD en eritrocitos de ratones expuestos a MC-LR respecto del control (Figura 3).

Metahemoglobina (MetHb). Dado el significativo daño generado por este tipo de exposiciones en el sistema antioxidante del hígado, entre otros órganos, y la

manifestación del mismo en circulación con los niveles de ROOHs elevados en plasma, resultó interesante estudiar si esta mayor presencia de especies peroxidadas influye o no en el estado de oxidación de la Hemoglobina (Hb) muy importante desde el punto de vista de la función de la misma. Por ello se estudiaron los niveles de Metahemoglobina (MetHb), forma oxidada de la Hb, donde el hierro está como Fe^{+3} y no es capaz de realizar su función de transporte de gases. Además se determinaron los niveles de hemoglobina (Hb) en ratones tratados con MC-LR y controles. Este parámetro, además de ser útil para monitorear el estado general del animal, fue empleado en la normalización de los valores de MetHb.

Los resultados obtenidos en sangre entera de ratones controles y tratados con MC-LR se muestran en la figura 4.

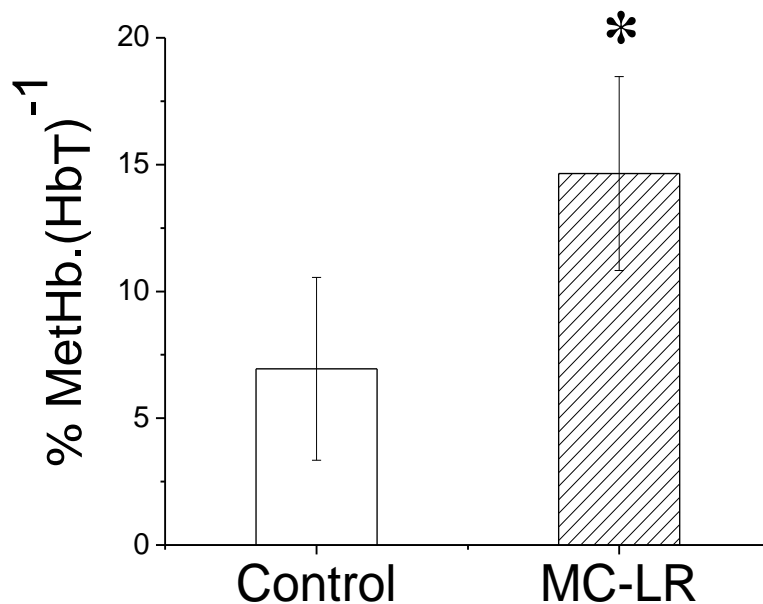


Figura 4. Niveles de Metahemoglobina en sangre entera de ratones controles y tratados sub-crónicamente con MC-LR ($25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$). Los resultados se expresan en porcentaje de MetHb respecto de Hemoglobina total (Hb_T) ($\text{Media} \pm \text{SD}$, $N= 6$). El asterisco (*) indica diferencias significativas.

Figure 4. Methemoglobin (MetHb) levels in blood of control and treated ($25 \mu\text{g MC-LR.kg}^{-1}$) mice. The results are expressed as percentage of MetHb based on total

Hemoglobina (Hb_T). (Mean \pm SD, N = 6). Asterisk (*) represents a significant difference in control values ($p < 0,05$).

Aún cuando no se observaron variaciones significativas en los valores de Hb, los niveles de MetHb aumentaron significativamente en los ratones expuestos sub-crónicamente a MC-LR ($14.6 \pm 3.8 \% \text{MetHb.Hb}_T^{-1}$) respecto de los controles ($6.9 \pm 3.6 \% \text{MetHb.Hb}_T^{-1}$) (Figura 4). Este aumento concuerda con los niveles elevados de ROOHs en plasma, ya que esta situación podría generar un entorno tal donde los sistemas que mantienen a la Hb en su forma reducida no sean capaces de mantener los niveles de MetHb dentro de los rangos de normalidad.

DISCUSIÓN

La intoxicación sub-crónica con MC-LR genera fuertes daños principalmente en hígado y riñón de los ratones expuestos. A pesar de ello, no se manifiestan síntomas ni signos clínicos de este tipo de intoxicación que faciliten su reconocimiento y diagnóstico (Andrinolo *et al.*, 2008; Sedan *et al.*, 2010). En tales circunstancias sería importante poder detectar la presencia de MC-LR en muestras de fácil acceso, que no involucren tomas de muestra cruentas, a través de técnicas simples. Si bien es posible detectar MC-LR en estas muestras debemos tener en cuenta que esto ha sido posible sólo luego de someter a las muestras a laboriosos procesos de extracción que involucran una gran cantidad de pasos y reactivos (Cheng *et al.*, 2009), lo cual puede acarrear pérdidas de toxina en dichos procesos de extracción y purificación. Además estas muestras se deben testear por métodos inmunológicos (ELISA) o ensayos con fosfatasa

ya que en general los niveles presentes en las mismas no son lo suficientemente altos como para poder ser testeados por otros métodos como HPLC/DAD, siendo necesario contar con sistemas HPLC/MS-MS para poder detectar la toxina en estas muestras. De todas maneras, cualquiera de estas metodologías de extracción y detección empleadas para la determinación de MC-LR resultan muy costosas, mucho más si se quiere realizar una cuantificación. Además requieren tiempos de procesamiento relativamente prolongados, personal especializado en la interpretación de los resultados y equipamiento sofisticado y costoso con el que habitualmente no se cuenta en hospitales y centros de salud. Todo ello hace difícil la implementación de este parámetro como biomarcador a emplear de manera rutinaria, siendo quizás más apto como parámetro confirmatorio para ser testado en centros especializados en la materia.

Debido a las características de la intoxicación sub-crónica decidimos estudiar el impacto de la misma sobre parámetros que pueden determinarse en muestras de fácil acceso, como sangre, y que podrían ser útiles como biomarcadores de efecto que integren un perfil que permita identificar una intoxicación sub-crónica con MC-LR.

Hasta el momento los efectos que produce MC-LR sobre tejidos como la sangre no han sido estudiados en profundidad, existiendo escasas publicaciones al respecto y tratando estas en general de estudios agudos *in vivo* e *in vitro*.

Nuestros resultados indican que las alteraciones observadas en los diversos parámetros testeados se deberían principalmente a efectos secundarios derivados de los daños generados por MC-LR en el hígado más que a la acción directa de MC-LR sobre las células sanguíneas ya que la toxina es rápidamente aclarada de circulación (Solter *et al.*, 1998) y mantendría niveles plasmáticos muy bajos durante la exposición prolongada.

Los niveles séricos de ciertas enzimas, como las transaminasas (ALT y AST) y la fosfatasa alcalina (FAL) son considerados clásicamente como indicadores de daño hepático, ya que suelen presentarse elevados en una amplia gama de afecciones hepáticas. Nuestros resultados muestran aumentos de estos parámetros con una tendencia coincidente con los encontrados en estudios realizados en ratas y ratones por varios grupos de investigación (Gupta *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2003; Gehringer *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Billam *et al.*, 2008). Recientemente se ha llevado a cabo un estudio sobre pescadores expuestos crónicamente a bajas dosis de MC-LR, donde se correlacionan los niveles séricos de MC-LR con los de los biomarcadores clásicos de daño hepático (Chen *et al.*, 2009). En este estudio se determinó que si bien la exposición a niveles bajos de esta toxina es capaz de influenciar los niveles de ALT, AST y FAL entre otros marcadores bioquímicos de daño hepático, las alteraciones observadas eran menos pronunciadas que las que ocurren en los estudios en animales y las observadas en los pacientes de Caruaru.

Las alteraciones en estos marcadores indican que, en nuestro modelo de intoxicación sub-crónica, se desarrolla un daño hepático mixto, es decir que presenta características de daño hepatocelular (indicadas principalmente por el aumento sérico de ALT y AST) y características colestásicas (relacionadas con el aumento de FAL).

Si bien se encuentran alteraciones en estos marcadores de daño hepático en todos los estudios llevados a cabo con MC-LR, nuestros resultados en concordancia con los obtenidos por otros investigadores indican que debido a lo variado de los perfiles de alteración encontrados en las distintas circunstancias, estos biomarcadores (ALT, FAL,

AST) no son los más apropiados para detectar por sí solos la exposición sub-crónica a MC-LR, aunque si podrían integrar un panel de marcadores que junto con otros más sensibles y específicos permitan identificar una intoxicación sub-crónica con esta toxina.

En un estudio *in vitro* de incubación de eritrocitos humanos con MC-LR (1 a 1000 nM durante 1, 6, 12 y 24 Hs) realizado por Sicinska *et al.* (2006) se observaron aumentos de peroxidación lipídica, alteración morfológica de eritrocitos, aumento de hemólisis y MetHb, variaciones dependientes del tiempo y de la concentración en CAT y descensos en SOD.

En nuestro estudio se evalúan varios de estos parámetros. En concordancia con lo observado por Sicinska *et al.* (2006) hemos encontrado aumentos significativos de ROOHs en plasma de los animales tratados respecto de los controles, aunque es probable que el origen de estos aumentos sean diferentes en ambos estudios ya que en el estudio *in vitro* derivan del efecto directo de MC-LR sobre los eritrocitos, mientras que nuestra hipótesis es que el origen principal del aumento de ROOHs encontrado en nuestro caso resulta como efecto secundario a un daño directo hepático.

También resultan coincidentes los aumentos de MetHb observados en nuestro trabajo con los del estudio *in vitro* mencionado anteriormente. Estos aumentos de la forma oxidada de Hb reflejan los efectos del aumento de hidroperóxidos que pueden ejercer sus efectos oxidantes sobre la Hb.

Por otro lado estos autores encuentran un descenso en la actividad de la enzima SOD, una de las responsables de la depuración de las especies reactivas de oxígeno; mientras que nuestros resultados indican un aumento en la actividad de SOD eritrocitaria.

En el estudio *in vitro* se atribuyen los descensos observados a alteraciones generadas en estas enzimas debidas a la unión covalente de MC-LR con residuos tiol presentes en las mismas; mientras que en nuestro caso creemos que las variaciones observadas surgen en respuesta a los aumentos de ROOHs presentes en el medio sanguíneo. Las diferencias existentes entre ambos estudios pueden deberse a que además de utilizar concentraciones mayores de toxina en el estudio *in vitro* respecto de las alcanzadas en nuestro estudio *in vivo*, en éste último por tratarse de un estudio en un organismo completo también se debe tener en cuenta que existen una serie de mecanismos tendientes a manejar el estrés oxidativo que no se encuentran presentes en un ensayo *in vitro*.

CONCLUSIONES

En nuestro estudio sub-crónico hemos encontrado, en un modelo *in vivo* de este tipo de intoxicaciones, varios parámetros alterados que podrían ser de utilidad como biomarcadores de efecto integrantes de un perfil de exposición a MC-LR. De esta manera este perfil podría componerse de un panel de marcadores de daño hepático compuesto por ALT, AST y FAL asociado con un panel de marcadores de daño o estrés oxidativo inducido por la toxina, compuesto por ROOHs, SOD y MetHb. Estos parámetros podrían testearse en el sistema de salud con la implementación de técnicas simples que no son utilizadas en forma rutinaria hasta el momento, como es el caso de

la determinación de SOD, ROOHs y MetHb en algunos casos. Teniendo en cuenta que la determinación plasmática de ROOHs está siendo evaluada como parámetro para monitorear la evolución de ciertas enfermedades que tienen como base de su patogenia al estrés oxidativo, tales como insuficiencia renal, esquizofrenia e hígado graso no-alcohólico (Mahadik & Mukherjee, 1996; Estepa *et al.*, 2001; Loguercio *et al.*, 2001; Rodríguez Albanés *et al.*, 2003), es posible que en el futuro esta determinación pase a formar parte de los parámetros determinados de forma rutinaria en la clínica.

Este panel de biomarcadores podría así mismo, ser complementado por determinaciones de características confirmatorias llevadas a cabo en centros especializados como es el caso de la detección de MC-LR en fluidos biológicos; determinaciones éstas que requieren equipamiento y técnicas más sofisticadas y costosas que las empleadas en la clínica de rutina.

Es necesario para confirmar estos datos experimentales realizar estudios epidemiológicos donde se lleve a cabo el análisis de estos y otros parámetros que pudieran surgir, asociándolos con el nivel y tipo de exposición de la población a florecimientos tóxicos y la detección en laboratorios especializados de los niveles de MC-LR en plasma de estos individuos con el fin de establecer inequívocamente la noxa epidemiológica y la relación de esta exposición con los biomarcadores propuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong B.1980.The epidemiology of cancer in the people of China. *International Journal of Epidemiology*, 9: 305-315
- Andrinolo D, Sedan D, Telese L, Aura C, Masera S, Giannuzzi L, Marra C & Alaniz MT 2008. Recovery after damage produced by subchronic intoxication with the cyanotoxin microcystin LR. *Toxicon*, 51: 457–467
- Annadotter H, Cronberg G, Lawton L, Hansson H-B, Göthe U & Skulberg OM. 2001. An extensive outbreak of gastroenteritis associated with the toxic cyanobacterium planktothrix agardhii (oscillatoriales, cyanophyceae) in scania, South Sweden. En: Chorus I (Ed.), *Cyanotoxins*. Springer, Berlin: 200–208
- Azevedo S, Carmichael W, Jochimsen E, Rinehart K, Lau S, Shaw G & Eaglesham G. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru –Brazil. *Toxicology*, 181-182: 441-446
- Barco M, Rivera J & Caixach J. 2002. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversedphase liquid chromatography- electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, A 959: 103–111
- Bell SG & Codd GA. 1994. Cyanobacterial toxins and human health. *Reviews in Medical Microbiology*, 5 (4): 256–264
- Billam M, Mukhi S, Tang L, Gao W & Wang J. 2008. Toxic response indicators of microcystin-LR in F344 rats following a single-dose treatment. *Toxicon*, 51:1068–1080
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Carmichael WW. 1996. Liver failure and human deaths at a haemodialysis centre in Brazil: microcystins as a major contributing factor. *Harmful Algae News*, 15: 11
- Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR & Eaglesham GK. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109: 663-668

- Chen T, Zhao X, Liu Y, Shi Q, Hua Z & Shen P. 2004 Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR. *Toxicology*, 197 (1): 67-77
- Chen Jun, Xie Ping, Li Li & Jun Xu. 2009. First Identification of the Hepatotoxic Microcystins in the Serum of a Chronically Exposed Human Population Together with Indication of Hepatocellular Damage. *Toxicological sciences*, 108: 81–89
- Chorus I & Bartram J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. F & FN Spon - WHO London: 400p
- De León L & Yunes J. 2001. First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River. *Environmental Toxicology*, 16 (2): 110-112
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG & Ong CN. 1998. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environmental Research*, 78(1): 12-18
- Ding WX, Shen HM & Ong CN. 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 108(7): 605-609
- Ding WX, Shen HM & Ong CN. 2001. Pivotal role of mitochondrial Ca(2+) in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(5): 1155-1161
- Ding W & Ong C. 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiology Letters*, 220: 1–7
- Drabkin DL. 1946. Spectrophotometric studies. XIV the crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with these of other species. *Journal of Biological Chemistry*, 164: 703–723
- Echenique R, Rodríguez J, Caneo M, Giannuzzi L, Barco M, Rivera J, Caixach J & Andrinolo D. 2006. Microcystins in the drinking water supply in the cities of Ensenada and La Plata (Argentina). *Congresso Brasileiro De Ficologia, 11; Simpósio Latino-Americano Sobre Algas Nocivas, Itajaí, SC. Aplicações da Ficologia: anais*. Rio de Janeiro: Museu Nacional. p 141-148. Organização da Sociedade Brasileira de Ficologia. (Série Livros, 30).

- Estepa V, Ródenas S & Martín MC. 2001. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 67 (3): 1-17
- Evelyn KA & Malloy HT 1938. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulphemoglobin in a single sample of blood. *Journal of Biological Chemistry*, 126: 655-662
- Fawell JK, Hart J, James HA & Parr W. 1993. Blue-green algae and their toxins —analysis, toxicity, treatment and environmental control. *Water Supply*, 11(3/4): 109–121
- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Human & Experimental Toxicology*, 18(3): 162-167
- Gehring MM. 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters*, 57(1-3): 1-8
- Giannuzzi L, Sedan D, Echenique R & Andrinolo D. 2011. An Acute Case of Intoxication with Cyanobacteria and Cyanotoxins in Recreational Water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs*, 9(11): 2164-2175
- Gupta N, Pant SC, Vijayaraghavan R & Rao PV. 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, 188 (2-3): 285-296
- Hilborn ED, Carmichael WW, Yuan M & Azevedo SM. 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. *Toxicon*, 46(2): 218-221
- Hooser SB, Beasley VR, Lovell RA, Carmichael WW & Haschek WM. 1989. Toxicity of microcystin LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. *Veterinary Pathology*, 26(3): 246-252
- Hooser SB, Beasley VR, Basgall EJ, Carmichael WW & Haschek WM. 1990. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. *Veterinary Pathology*, 27(1): 9-15
- Hooser SB, Beasley VR, Waite LL, Kuhlenschmidt MS, Carmichael WW & Haschek WM. 1991. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in

- vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary Pathology*, 28(4): 259-266
- Lippy EC & Erb J. 1976 Gastrointestinal illness at Sewickley, PA. *Journal of American Water Works Association*, 68: 606-610
 - Loguercio C, De Girolamo V, de Sio I, Tuccillo C, Ascione A, Baldi F, Budillon G, Cimino L, Di Carlo A, Di Marino MP, Morisco F, Picciotto F, Terracciano L, Vecchione R, Verde V, & Del Vecchio Blanco C. 2001. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *Journal of Hepatology*, 35: 568–574
 - MacKintosh C, Beattie K, Klumpp S, Cohen P & Codd G. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*, 264:187-192
 - Mahadik SP & Mukherjee S. 1996. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophrenia Research*, 19: 1-17
 - Misra HP & Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247: 3170-3175
 - Moreno I, Repetto G & Cameán A. 2003. Interés toxicológico de las microcistinas. *Revista de Toxicología*, 20: 159-165
 - Niez Gay A, Sedan D, Echenique R, Oliver C, Giannuzzi L & Andrinolo D. 2010. Watch H2Oout! Cyanobacteria and Cyanotoxins in the drinking water of Concordia city, Entre Rios, Argentina. [Resumen] *The 8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8)*. Istanbul, Turkey: 24
 - NIH (*National Institute of Health*). 1985. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Research Council, National Institute of Health, Bethesda, MD), USA. Publication N° 85 - 23 (rev)
 - Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ & Wolf S P. 1995. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM; *Diabetes*, 44: 1054-1058

- Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VT, Ward CJ, Preiser W, Poon GK, Neild GH & Codd GA. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, 352(9121): 21-26
- Rao PV, Gupta N, Jayaraj R, Bhaskar AS & Jatav PC. 2005. Age-dependent effects on biochemical variables and toxicity induced by cyclic peptide toxin microcystin- LR in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(1): 11-19
- Rinehart KL, Namikoshi M & Choi BW. 1994 Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (Cyanobacteria). *Journal of Applied Physiology*, 6: 159-176
- Rodríguez Albanés A, Barranco Hernández E, Alonso Rodríguez C & Soto Matos J. 2003. Comportamiento de la peroxidación lipídica en la insuficiencia renal crónica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 22(1): 11-15
- Runnegar M, Berndt N & Kaplowitz N. 1995. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134: 264-272
- Sedan D, Andrinolo D, Telese L, Giannuzzi L, Alaniz MT & Marra CA. 2010. Alteration and recovery of the antioxidant system induced by sub-chronic exposure to microcystin-LR in mice: Its relation to liver lipid composition. *Toxicon*, 55: 333–342
- Sicinska P, Bukowska B, Michałowicz J & Duda W. 2006. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. *Toxicon*, 47: 387–397
- Sivonen K & Jones G. 1999. Cyanobacterial toxins. - In: Chorus & Bertram, J. (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*. F & FN Spon, London: 55-124
- Soares R, Cagido V, Ferraro R, Meyer-Fernandes J, Rocco P, Zin W & Azevedo S. 2007. Effects of microcystin-LR on mouse lungs. *Toxicon*, 50: 330–338
- Solter P, Wollenberg G, Huang X, Chu F & Runnegar M. 1998. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor, microcystin-LR results in multiple dose dependant hepatotoxic effects. *Toxicological Sciences*. 44: 87–96

- Stewart I, Webb P, Schluter P, Fleming L, Burns J Jr, Gantar M, Backer L & Shaw G. 2006. Epidemiology of recreational exposure to freshwater cyanobacteria – an international prospective cohort study. *BMC Public Health*, 6: 93
- Takahashi S & Kaya K. 1993. Quail spleen is enlarged by microcystin RR as a blue-green algal hepatotoxin. *Natural Toxins*, 1(5): 283-285
- Teixeira M, Costa M, Carvalho V, Pereira M & Hage E. 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 27: 244– 253
- Tisdale J. 1931. Epidemic of intestinal disorders in Charleston (West Virginia) occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. *American Journal of Public Health*, 21: 198-200
- Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K & Codd GA. 1990. Pneumonia associated with cyanobacteria. *British Medical Journal*, 300: 1440-1441
- Ueno Y, Nagata S, Suttajit M, Mebs D & Visconcelos V. 1998. Immunochemical survey of microcystins in environmental water in various countries. En: Miragala M, Van Egmond H, Brera C & Gilbert J (eds), *Mycotoxins and Phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety*. USA: 45: 449-5352
- Weng D, Lu Y, Wei Y, Liu Y & Shen P. 2007. The role of ROS in microcystin-LR induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology*, 232: 15–23
- Xu C, Shu W, Qiu Z, Chen J, Zhao Q & Cao J. 2007. Protective effects of green tea polyphenols against subacute hepatotoxicity induced by microcystin-LR in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(2): 140-148
- Yu S. 1989. Drinking water and primary liver cancer. P 30-37 En: Tang Z, Wu M & Xia S-S. (eds), *Primary Liver Cancer*. Spring-Verlag, Berlin
- Yu S-J. 1995. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 10: 674-682
- Zhao Y, Xie P, Tang R, Zhang X, Li L & Li D. 2008. In vivo studies on the toxic effects of microcystins on mitochondrial electron transport chain and ion

regulation in liver and heart of rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 148: 204-210

- Zilberg B. 1966. Gastroenteritis in Salisbury European children – a five year study. *Central African Journal of Medicine*, 12: 164-168