

**RADICALES LIBRES DE OXIGENO Y SUPEROXIDO DISMUTASAS****ASPECTOS BIOLÓGICOS Y MÉDICOS****M. MONTE, EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG***Área de Investigaciones, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires*

**Resumen** Los radicales libres de oxígeno (RLO) son metabolitos muy reactivos e inestables capaces de alterar moléculas de gran importancia biológica como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La acción de los RLO está controlada por enzimas como las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa y moléculas como las vitaminas E, C, A, y K, el selenio, la cisteína y otros compuestos. El aumento de los niveles de RLO, causados por un aumento en su producción o por una falla en las moléculas que los controlan, provocan daños celulares y tisulares que pueden generar patologías como aterosclerosis, artritis, distrofia muscular, fibrosis, daños pulmonares, daños al miocardio por reperfusión post isquemia, alteraciones neurológicas y cáncer. En este artículo también se considera la utilización principalmente de las SODs como agentes terapéuticos en modelos experimentales y humanos. Se trata el tema de la administración de esta enzima como factor protector de los daños colaterales inducidos por radioterapia y la utilización de las SODs como marcadores de la evolución tumoral.

**¿Qué son los radicales libres?**

El metabolismo del oxígeno, indispensable para la vida de los organismos aeróbicos, puede derivar también en la producción de moléculas llamadas radicales libres de oxígeno (RLO). Estas moléculas son altamente reactivas y capaces de modificar y dañar lípidos de membranas biológicas, ácidos nucleicos y proteínas<sup>13, 55</sup>.

Un radical libre es una molécula que posee en su último orbital un electrón no apareado y en este estado inestable posee una gran tendencia a interactuar con electrones de otras moléculas para formar el par. Esto ocasiona que otra molécula quede desapareada en su último orbital convirtiéndose en radical libre y generando una peligrosa reacción en cadena. Como ya se mencionó las moléculas blanco de estas reacciones pue-

den ser biomoléculas de gran importancia biológica (proteínas-ADN-ARN-ácidos grasos poliinsaturados etc.)<sup>26</sup>, causando la muerte celular y/o daños tisulares<sup>11</sup>. Los radicales libres son utilizados por los macrófagos y granulocitos para atacar células que son blanco del sistema inmune. También se han desarrollado drogas utilizadas en quimioterapia oncológica y antiparasitaria que ejercen su acción por la producción de radicales libres<sup>15, 46</sup>.

El aumento en los niveles de RLO, causados por un aumento en su producción o por una falla en las moléculas que los controlan pueden generar algunas patologías<sup>12, 15</sup>. Las células pueden perder funciones que las llevan a la muerte<sup>27, 31</sup>. Proteínas de membrana como la ATPasa Na-K, succinil dehidrogenasa o citocromo oxidasa se inactivan en presencia de RLO<sup>14</sup>. Estos también pueden dañar el ADN por ruptura de una o ambas cadenas o por romper los puentes de Hidrógeno que las mantienen unidas, también pueden degradar las bases nitrogenadas que las componen<sup>55</sup>. Si los daños no son reparados sobrevienen mutaciones y otras alteraciones cromosómicas

Recibido: 12-III-1993

Aceptado: 28-VI-1993

**Dirección postal:** Lic. M. Monte, Área de Investigaciones, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Avda. San Martín 5481, 1417 Buenos Aires, Argentina.

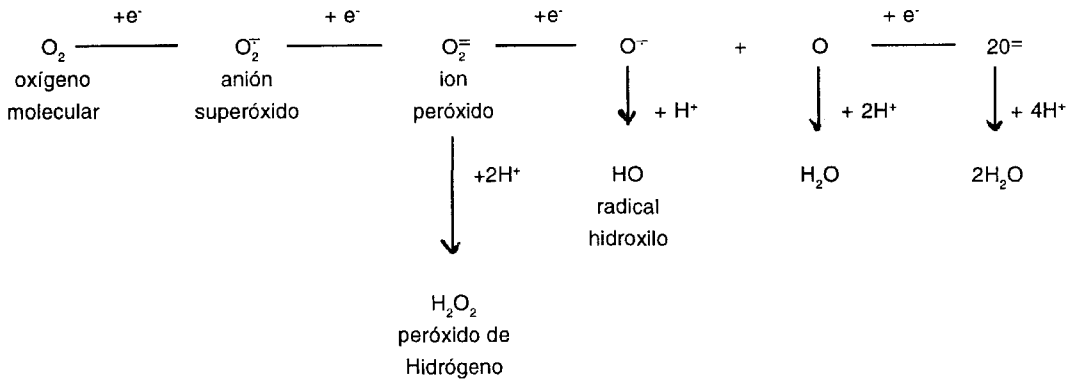


Fig. 1.— Principales metabolitos derivados del oxígeno.

que pueden terminar en la muerte celular o en la producción de células anormales. Organelas como las mitocondrias y las membranas microsomales son muy susceptibles a la peroxidación lipídica inducida por RLO<sup>19, 11</sup>.

Los principales RLO son el anión superóxido, ion peróxido y el radical hidroxilo (Fig. 1). Estos son aceptores de electrones por lo que también son OXIDANTES.

### Fuentes biológicas de RLO

El anion superóxido y el peróxido de hidrógeno son formados por enzimas de peroxisomas, mitocondrias, microsomas y citosólicas durante el metabolismo celular normal<sup>11</sup>. La pérdida del control de estos metabolitos puede derivar en alguna patología<sup>6</sup>.

Los radicales libres relevantes en las enfermedades humanas pueden proceder de distintas fuentes:

a) Los generados durante procesos biológicos intracelulares normales como las reacciones catalizadas por la xantina oxidasa, ciclooxigenasa, NADPHoxidasa entre otras, cuya producción esté aumentada o bien por deficiencias a nivel de las moléculas encargadas de su control.

b) Los producidos por células involucradas en la respuesta inflamatoria como macrófagos, neutrófilos o eosinófilos.

c) Los generados por incorporación de compuestos exógenos oxidantes que provoquen la liberación de RLO.

### Control de RLO en sistemas biológicos: Sistemas Antioxidantes

Evidentemente si los RLO han sido involucrados en el metabolismo celular normal y en procesos patológicos como mutagénesis, carcinogénesis, daños tisulares e inflamación, existen, en los organismos aeróbicos, distintas moléculas que regulan su producción.

Los principales constituyentes del sistema antioxidante en estos organismos se puede dividir en: A) Un sistema enzimático donde las Superóxido Dismutasas (SODs) eliminan los aniones superóxido, convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, la Catalasa (CAT) que elimina el peróxido de hidrógeno producido y el sistema Glutatión-Glutatión Peroxidasa (GSH-GP) que elimina tanto peróxidos de hidrógeno como los peróxidos orgánicos. B) Sustancias que protegen de la acción tóxica de los RLO, llamadas antioxidantes, que pueden ser moléculas como las vitaminas C, A, E y K, selenio, compuestos con grupos tiol como la cisteína, cisteamina o glutatión, metionina, ubiquinona, ácido úrico, glucosa y los aminoácidos en general<sup>60</sup>.

Estos antioxidantes pueden ejercer su acción en distintas fases del proceso oxidativo. La vitamina E interfiere en los procesos iniciales de la peroxidación lipídica, otros pueden degradar los peróxidos de hidrógeno sin producir RLO (tioles) o ser "secuestradores" de RLO (Vit A, E)<sup>19</sup>.

Aunque este artículo esté centrado en la acción y la utilización de las SODs, los autores destacamos que fisiológicamente todos los compo-

nentes enzimáticos y no enzimáticos son importantes y necesarios para el control de los RLO.

### Las superóxido dismutasas

En 1939 Mann y Keilin purificaron a partir de eritrocitos bovinos, una proteína de 34 kD que contenía cobre. No se encontró ninguna actividad enzimática y se la denominó Hemocupreína. En 1959 se caracterizó una proteína de eritrocitos humanos de similares características con el mismo contenido de cobre y peso molecular y se llamó Eritrocupreína. Posteriormente proteínas de este tipo fueron obtenidas a partir de cerebro e hígado de mamíferos.

En 1969, Joe McCord e Irwin Fridovich descubrieron la función enzimática de la Eritrocupreína (Hemocupreína) como capaz de inhibir la oxidación del ferrocitocromo C y el tetranitrometano por eliminar los aniones superóxido necesarios para estas reacciones<sup>47</sup>.

La llamaron entonces Superóxido Dismutasa (SOD) y estudios posteriores revelaron que esta metaloenzima es de localización citoplasmática<sup>57</sup>. Su peso molecular es 32.000 y está formada por 2 subunidades idénticas, con un átomo de cobre y otro de zinc cada una<sup>48</sup>. Esta enzima mapea en el cromosoma 21 humano.

En 1970 Keele y col. aislaron por primera vez una enzima con actividad superóxido dismutasa de una fuente bacteriana (*E. Coli*). Esta enzima, aunque poseía la misma actividad que la enzima bovina tenía manganeso como metal y no compartía las demás características.

En 1973, Weisinger y Fridovich encontraron una enzima similar en hígado de pollo y en varios mamíferos incluyendo al humano. Esta enzima se llamó Superóxido Dismutasa Manganeso (MnSOD) mientras que a la primera se la denominó Superóxido Dismutasa Cobre-Zinc (CuZnSOD).

La MnSOD tiene localización mitocondrial, su tamaño es de 85.300 con cuatro subunidades idénticas, cada una con un átomo de manganeso. El gen de la MnSOD se encuentra en el cromosoma 6 humano.

Más recientemente, en 1982, Stefan Marklund aisló un tercer tipo de Superóxido Dismutasa de tejido pulmonar humano. Es un tetrámero de localización extracelular (EC-SOD), de 135.000 de

peso molecular y con un átomo de cobre por subunidad. Esta enzima fue clasificada en tipo A, B o C según su afinidad por la heparina<sup>45</sup>. El gen para la EC-SOD mapea en el cromosoma 4 humano.

Las SODs se encuentran distribuidas en todos los tejidos, excepto la MnSOD que no se encuentra en eritrocitos. En humanos, la CuZnSOD tiene mayor actividad en hígado y sustancia blanca del cerebro y la MnSOD en hígado, corazón y páncreas. La EC-SOD tiene mayor actividad en el espacio extracelular del útero, glándula tiroides y páncreas, aunque es menor su actividad si se compara con las isoenzimas intracelulares<sup>43</sup>.

### IMPORTANCIA CLINICA DEL CONTROL DE RADICALES LIBRES

#### Acción terapéutica de los antioxidantes

Por su acción antiinflamatoria, la SOD fue empleada exitosamente en veterinaria (Orgoteína) demostrando no presentar efectos tóxicos ni colaterales. Puede ser utilizada en combinación con otros antiinflamatorios de distinto origen y es de acción prolongada. Resiste al calor, es hidrosoluble y por ser una enzima muy conservada entre las especies, no es inmunogénica.

Las características de esta enzima han permitido su utilización en diferentes modelos experimentales y humanos.

La CuZnSOD bovina ha sido administrada en forma segura en el hombre y en los animales por una amplia variedad de vías: intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intraarticular, intrapulmonar y tópica.

Los daños producidos por la exposición de animales de laboratorio a hiperoxia subletal se controlaron por la administración de SOD, Vit E u otros antioxidantes. La administración de SOD y CAT juntas en liposomas, disminuyó significativamente los daños pulmonares producidos por la inhalación de oxígeno 100%<sup>63</sup>. También disminuyeron las patologías asociadas a la utilización de oxígeno en neonatología (displasia broncopulmonar, fibroplasia retrolental)<sup>20</sup>.

Los RLO participan en el proceso inflamatorio principalmente por inducir la quimiotaxis y por intervenir en el metabolismo del ácido araquidónico. La liberación de RLO por células

inflamatorias también pueden dañar células o tejidos normales. La administración de SOD muestra una capacidad antiinflamatoria positiva de larga duración comparada con la acción de un esteroide como lo observado por Klans y col. en la artritis reumatoidea. La inyección intraarticular de 4 mg/día de SOD durante 6 semanas mejora el dolor y la capacidad funcional de la rodilla junto con los parámetros inmunológicos, celulares y de la fibronectina en líquido sinovial.

La inestabilidad cromosómica, las respuestas inmunológicas anormales y el aumento en la frecuencia en el desarrollo de tumores son características de la mayoría de las enfermedades autoinmunes y los síndromes asociados con errores en la reparación del ADN. El común denominador de estas enfermedades es la gran producción de RLO. La administración de SOD disminuye la cantidad de rearrreglos cromosómicos en algunos de estos casos<sup>18</sup>.

Los RLO también afectan al tejido conectivo produciendo artrosis, fibrosis, leucopenia, etc.

En el tracto respiratorio, un tejido especialmente expuesto y sensible al oxígeno, se observan varias patologías agudas y crónicas características por la inflamación del epitelio con la consecuente liberación de oxidantes en forma local<sup>8</sup>, entre ellas la inflamación de las mucosas producida en los fumadores, la fibrosis idiopática pulmonar y la fibrosis cística<sup>9</sup>. En el campo de la cardiología se ha utilizado la administración de SOD en animales para evitar los daños al miocardio producidos por la reperfusión post-isquemia<sup>21</sup>. Los RLO también están involucrados en la génesis de la aterosclerosis<sup>3, 54</sup>.

Con el fin de mejorar la vida media de la enzima en circulación se desarrollaron complejos de SOD con polietilenglicol, polioxietilenglicol o ficoll, además de estos complejos también se sintetizaron las CuZnSOD, MnSOD y la EC-SOD recombinantes humanas. La EC-SOD tipo C se mantiene mayor tiempo en circulación debido a que tiene un sitio bien caracterizado de unión a los glicosaminoglicanos de superficie del endotelio vascular<sup>33</sup>. Estas SODs recombinantes o modificadas fueron utilizadas con éxito en modelos experimentales en casos de edema cerebral e inflamación<sup>29</sup>, daño pulmonar causado por endotoxina<sup>38</sup>, artritis y fibrosis pulmonar causada por agentes oxidantes<sup>52</sup>, daños cardiovasculares<sup>28</sup> y protección en casos de isquemia y reperfusión<sup>56</sup>.

## SOD como protector en radioterapia

La investigadora argentina Rebeca Gerschman, propuso en 1954 que la acción tóxica del oxígeno y las lesiones por radiación, tenían en común la producción de radicales libres de oxígeno<sup>23</sup>.

Considerando que la mayoría de las células presentan una capacidad enzimática interna para protegerse del daño de los radicales libres, mientras que en la matriz extracelular estas defensas son escasas, se ha pensado utilizar la SOD para evitar los efectos inflamatorios indeseables de la radiación en pacientes cancerosos. Petkau, del Centro de Energía Atómica de Canadá, ha estudiado como la SOD endovenosa alarga el tiempo de vida de ratones totalmente irradiados y disminuye en los mismos la incidencia de leucemia.

La SOD administrada antes de la irradiación total de los ratones evita la depresión en la hematopoyesis, protegiendo a la médula ósea y la administración posterior a la irradiación protege a los tejidos dañados por los radicales libres. Su acción consiste en inhibir un factor clastogénico presente en el suero de pacientes que han recibido irradiación masiva en accidentes nucleares como Chernobyl. La acción anticlastogénica de la SOD, que impide fracturas cromosómicas, ha sido demostrada "in vitro" sobre linfocitos en el estadio GO-G1 del ciclo celular.

Clínicamente, Edsmyr (1976) ha comprobado que 4 a 8 mg de SOD a los 15-30 min luego de cada irradiación en pacientes con cáncer de vejiga, reducen la diarrea, mejoran la incontinencia urinaria, el dolor y la cistitis radioinducida<sup>17</sup>. El mismo autor en 1982 trata a 50 pacientes con carcinoma de próstata que reciben un total de 5000 rads en 7 semanas más otros 2000 rads luego de 2 semanas<sup>16</sup>. La administración de 16 mg de SOD luego de cada irradiación, substituye un tratamiento con analgésicos opiáceos y anticolinérgicos y permite al paciente tolerar dosis más elevadas de rayos sin inconvenientes para la médula ósea. La SOD exógena intramuscular impide además la fibrosis postirradiación en cuanto inhibe la depolimerización del colágeno y del ácido hialurónico. Se observa un ablandamiento de la fibrosis pulmonar causada por Bleomicina y disminuye los vómitos y diarreas provocadas por la quimioterapia.

La SOD no solamente defiende las injurias por rayos X sino también impide las reacciones dermatológicas debidas a los rayos UV como eritemas solares y cáncer de piel.

### SOD como factor diagnóstico en oncología

Aunque el siguiente resumen trata la utilización de SOD como marcador en oncología, las mediciones de SOD se han extendido actualmente a pacientes cardiológicos<sup>34, 62</sup>, renales crónicos<sup>61</sup>, con hipertensión pulmonar<sup>58</sup>, Parkinson<sup>32</sup>, Alzheimer<sup>42</sup>, etc. En pacientes infectados con el HIV se ha observado que situaciones de stress oxidativo estimulan la replicación del virus por activar el factor nuclear NF-kappa B que actúa a nivel del promotor viral. La liberación del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) por macrófagos activados, induce un aumento de RLO lo cual provocaría una situación de stress oxidativo y a la consecuente activación del HIV<sup>2</sup>. También fue demostrado que para estos casos la actividad de la CAT sérica es un buen marcador de la evolución de la enfermedad<sup>10, 40</sup>.

Alteraciones en los niveles de RLO también están asociadas a las carcinogénesis<sup>7, 22</sup> y a la portación de tumores<sup>5, 53</sup>. Paralelamente se observaron en forma experimental alteraciones de ambas SODs intracelulares en procesos neoplásicos.

Por lo general, la actividad de la CuZnSOD se encuentra disminuida en los tumores sólidos y órganos alejados de portadores de tumores en modelos experimentales<sup>1, 41</sup> aunque esta condición no es una constante ya que en algunas clases de leucemias la actividad de esta enzima puede estar incrementada<sup>65</sup>. La MnSOD, en cambio, se encuentra disminuida en la mayoría de las células de tumores sólidos y leucemias a tal punto que se pudo asociar la disminución de la actividad de la MnSOD con el fenotipo canceroso<sup>49</sup>.

Los resultados experimentales son comparables a los observados en líneas tumorales humanas<sup>4, 44</sup> y en linfocitos y eritrocitos de sangre periférica de pacientes oncológicos<sup>24, 37</sup>.

En los últimos 4 años, con el gran avance en el campo de las citoquinas se demostró que la MnSOD es inducida por el factor de necrosis

tumoral (TNF)<sup>64</sup>. Estos hallazgos llevaron a la hipótesis de que si el TNF actúa como factor de necrosis vía RLO, las células normales se autoprotegerían mientras que las células tumorales se dañarían<sup>51</sup>.

Con la introducción de los anticuerpos monoclonales como elementos de dosaje rápido y efectivo en el campo del diagnóstico médico, se desarrolló en 1989 el primer anticuerpo monoclonal contra esta enzima<sup>35</sup>. Dos importantes eventos sucedieron a la detección inmunológica de la MnSOD. En primer lugar se pudo detectar el antígeno en suero humano, hasta ese momento no descrito, y en segundo lugar, se observó que los pacientes con tumores del tubo digestivo, hepatomas<sup>34</sup>, carcinoma de ovario<sup>30</sup> y neuroblastoma<sup>36</sup>, independientemente de su actividad disminuida de MnSOD intracelular, poseían altos niveles de MnSOD en suero.

En el estudio particular del carcinoma de ovario se pudo relacionar con éxito, en el 80% de los casos, los niveles de MnSOD en suero con la regresión, estabilidad o progresión de la enfermedad. También se realizó un seguimiento a un paciente portador de un cistoadenocarcinoma seroso a lo largo de 2 años obteniéndose resultados comparables a los realizados con el antígeno de carcinoma de ovario CA-125<sup>30</sup>.

### Conclusiones

Los radicales libres han sido asociados al envejecimiento ya que el daño celular provocado por éstos causa un gran número de enfermedades aumentadas en la vejez (ateroesclerosis, artritis, distrofia muscular, daños pulmonares, alteraciones neurológicas y posiblemente cáncer)<sup>59</sup>. Se conocen muchas vías por las cuales los RLO pueden dañar los tejidos y dar origen a enfermedades de las más variadas. Los pulmones y también el corazón parecen ser especialmente susceptibles a estos metabolitos tóxicos, aunque en la concentración suficiente, cualquier tejido puede ser dañado. Por lo tanto es obvio utilizar una estrategia terapéutica con antioxidantes para prevenir los daños producidos por los RLO. Sin duda el control de RLO tiene una gran importancia en medicina ya que éstos están asociados a la inflamación producida en pacientes irradiados, fibrosis pulmonar, daños producidos por isquemia

y reperfusión cardíaca, carcinogénesis, etc. En estas circunstancias, lo más adecuado sería desarrollar una terapia que concluya en el aumento de las defensas antioxidantes del órgano afectado para restablecer el equilibrio. Esto se podría alcanzar directamente mediante moléculas con actividad antioxidante o indirectamente mediante agentes capaces de aumentar las defensas endógenas. En el futuro se espera poder identificar los pasos críticos en el que intervienen los RLO para poder desarrollar terapias más efectivas para estos tipos de enfermedades.

Mientras que en la isquemia, las enfermedades articulares y en la fibrosis pulmonar ya hay mucha experiencia, en oncología todavía estamos al inicio de su utilización.

La idea de encontrar diferencias en el contenido o funcionamiento entre células normales y células tumorales, tienta a los investigadores en oncología a reemplazar la pieza deficiente con la intención de revertir las anormalidades de las células neoplásicas. A pesar de esto, la terapia con captadores de RLO en oncología experimental no ha sido del todo exitosa, tal vez se deba a que los RLO participen en una amplia gama de reacciones, alguna de las cuales contribuyen a la progresión tumoral (inflamación-daño al endotelio vascular) y otras la inhiben (lisis de células tumorales por células del sistema inmune). Actualmente se discute si la protección del endotelio vascular, dañado por la presencia de RLO, no podría disminuir la diseminación tumoral<sup>39, 50</sup>. No obstante, la utilización de SOD en oncología tiene sus más grandes logros como protector de los daños colaterales producidos por la irradiación de pacientes oncológicos y como marcador de la evolución tumoral.

## Summary

### *Oxygen free radicals and superoxide dismutases. Biological and clinical aspects*

Oxygen free radicals (OFR) are very reactive and unstable metabolites capable of altering important biomolecules including proteins, lipids and nucleic acids. OFR are regulated by enzymes such as superoxide dismutases (SOD), catalase, glutathione peroxidase and by molecules such as vitamins E, A, C, and K, selenium, cysteine and other compounds. Increased OFR levels due to an

overproduction of these metabolites or to a failure in the control system, induce cellular and tissue injuries that could lead to diseases such as atherosclerosis, arthritis, fibrosis, lung and heart injuries, neurological disorders and cancer. In this article we consider the use of SOD as therapeutic agents both in human and experimental models. We also refer to the administration of SOD as a protective factor against secondary injuries during radiotherapy and to the determination of SOD as a tumor marker.

## Bibliografía

1. Avila MA, Fuchs AG, Lustig ES: Total liver superoxide dismutase and serum ceruloplasmin oxidase activities along with murine mammary tumor growth. *J Exp Clin Cancer Res* 7: 187, 1988.
2. Baruchel S, Wainberg MA: The role of oxidative stress in the disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *J Leukocyte Biol* 52: 111, 1992.
3. Belch JJ, Chopra M, et al: Free radicals pathology in chronic arterial disease. *Free Radic Biol Med* 6: 375, 1989.
4. Bianchi MS, Bianchi NO, Bolzan AD: Superoxide dismutase activity and SOD-1 gene methylation in normal and tumoral human breast tissues. *Cancer Genet Cytogenet* 59: 26, 1992.
5. Boveris A, Llesuy SF, Fraga GC: Increased liver chemiluminescence in tumor bearing mice. *Free Radic Biol Med* 1: 131, 1985.
6. Casellas AM, Roncoroni AJ: Toxicidad del oxígeno. *Medicina (Bs Aires)* 44: 517, 1984.
7. Cerutti PA: Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 277: 375, 1985.
8. Crystal RG: Alveolar macrophages. In: The Lung RG Crystal, JB West (eds). Raven Press, New York, 1991.
9. Crystal RG: Oxidants and respiratory tract epithelial injury: Pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Medicine* 91 (suppl 3c): 39, 1991.
10. Chaldakov GN: Antioxidants and HIV infection. *Nutrition Rev* 50: 180, 1992.
11. Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527, 1979.
12. Dargel R: Lipid peroxidation - A common pathogenetic mechanism. *Exp Toxicol Pathol* 44: 169, 1992.
13. Deby C: La biochimie de l'oxygène. *La Recherche*, 288: 56, 1991.
14. Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro D, Seligman M: The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand* 492: 91, 1980.
15. Docampo R, Moreno SNJ: Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed Proc* 45: 2471, 1986.
16. Edsmyr F: Superoxide dismutase efficacy in ameliorating side effects of radiation therapy. Double-blind placebo-controlled trials in patients with

- bladder and prostate tumors. In: Pathology of Oxygen. Academic Press, New York. 1982, p 315.
17. Edsmyr F, Huber W, Menandep KB: Orgotein efficacy in ameliorating side effects due to radiation therapy. Double-blind placebo-controlled trial in patients with bladder tumors. *Curr Therapeut Res* 19: 198, 1976.
  18. Emerit I, Michelson AM: Chromosome instability in human and murine autoimmune disease: Anticlastogenic effect of superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand* 492: 59, 1980.
  19. Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K: The model of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between effects of Ubiquinol and vitamin E as inhibitor of lipid peroxidation in submitochondrial particules. *Biofactors* 3: 241, 1992.
  20. Fehér J, Csomós G, Vereckei A: Free Radicals reactions in medicine. Springer-Verlag, Berlin, 1987.
  21. Flaherty JT: Myocardial injury mediated by oxygen free radicals. *Am J Medicine* 91: 79, 1991.
  22. Floyd RA: Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 4: 2587, 1990.
  23. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO: Oxygen poisoning and X-radiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623, 1954.
  24. Gonzalez R, Auclair C, Voisin E, et al: Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res* 44: 4137, 1984.
  25. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE: Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? *J Lab Clin Med* 119: 598, 1992.
  26. Halliwell B, Gutteridge JMC: Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1: 1396, 1984.
  27. Hiraiishi H, Terano A, Razandi M, et al: Role of cellular superoxide dismutase against reactive oxygen metabolite injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 14812, 1992.
  28. Hatori N, Sjoquist PO, Marklund SL, Ryden L: Effect of recombinant human extracellular superoxide dismutase type C on myocardial infarct size in pigs. *Free Radic Biol Med* 13: 221, 1992.
  29. Inove M, Watanabe N, Morino Y, et al: Inhibition of oxygen toxicity by targeting superoxide dismutase to endothelial cell surface. *FEBS lett* 269: 89, 1990.
  30. Ishikawa M, Yaginuma Y, Hayashi H, et al: Reactivity of a monoclonal antibody to manganese superoxide dismutase with human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 50: 2538, 1990.
  31. Kakkar P, Mehrotra S, Viswanathan PN: Interaction of reactive oxygen species, membrane damage and altered calcium functions. *Molec Cell Biochem* 111: 11, 1992.
  32. Kalara J, Rajput AH, Mantha SV, Prasad K: Serum antioxidant activity in Parkinson's disease. *Mol Cell Biochem* 110: 165, 1992.
  33. Karlsson K, Lindahl U, Marklund SL: Binding of extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans. *Biochem J* 256: 29, 1988.
  34. Kawaguchi T, Suzuki K, Matsuda Y, et al: Serum manganese superoxide dismutase: Normal values and increased levels in patients with acute myocardial infarction and several malignant disease determined by enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. *J Immunol Meth* 127: 249, 1990.
  35. Kawaguchi T, Noji S, Uda T, et al: A monoclonal antibody against COOH-terminal peptide of human liver manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 264: 5762, 1989.
  36. Kawamura N, Suzuki K, Ishikawa M, et al: High levels of manganese superoxide dismutase in serum of patients with neuroblastoma and in human neuroblastoma cell lines. *Free Radic Biol Med* 12: 281, 1992.
  37. Kohan S, Canziani GA, Rodriguez Fuchs C, et al: Alfa/Beta Interferon receptor number and cytoplasmatic superoxide dismutase activity in peripheral blood cell samples of B cell-chronic lymphatic leukemia patients. *Cancer J* 4: 103, 1991.
  38. Koyama S, Kobayashi T, Kubo K, Sekiguchi M, Veda G: Recombinant human superoxide dismutase attenuates endotoxin induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* 145: 1404, 1992.
  39. Kwee JK, Mitidieri E, Affonso OR: Lowered superoxide dismutase in highly metastatic B 16 melanoma cells. *Cancer Lett* 57: 199, 1991.
  40. Leff JA, Opegard MA, Curiel TJ; et al: Progressive increases in serum catalase activity in advancing human immunodeficiency virus infection. *Free Radic Biol Med* 13: 143, 1992.
  41. Leuthauser SWC, Oberley LW, Oberley TD, Loven DP: Lowered superoxide dismutase activity in distant organs of tumor bearing mice. *JNCI* 72: 1065, 1984.
  42. Lustig ES, Serra JA, Kohan S, et al: Copper-Zinc Superoxide dismutase activity in red blood cells and serum in demented patients and in aging. *J Neuro Sci* 115: 18, 1993
  43. Marklund SL: Extracellular superoxide dismutase in human tissues and in human cell lines. *J Clin Invest* 74: 1398, 1984.
  44. Marklund SL, Roos G: Copper and Zinc containing superoxide dismutase, Manganese containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal tissues. *Cancer Res* 42: 1955, 1982.
  45. Marklund SL: Human copper containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 79: 7634, 1982.
  46. Marr J, Docampo R: Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective of current therapy and consideration for future research. *Rev Infect Dis* 8: 884, 1984.
  47. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 224: 6049, 1969.
  48. Michelson AM, McCord JM, Fridovich I: Superoxide and superoxide dismutases. Academic Press, London, 1977.
  49. Oberley LW, Buettner GR: Role of superoxide dismutases in cancer: a review. *Cancer Res* 39: 1141, 1979.
  50. Offner FA, Writz HC, Schiefer J, et al: Interaction of

- human malignant melanoma (ST-ML-12) tumor spheroids with endothelial cell monolayers. Damage to endothelium by oxygen derived free radicals. *Am J Pathol* 141: 601, 1992.
51. Okamoto T, Watanabe N, Yamaguchi N, et al: Endogenous TNF exerts its protective function intracellularly against the cytotoxicity of exogenous TNF. *Cancer Res* 52: 5278, 1992.
  52. Parizada B, Werber MM; Nimrad A: Protective effect of human recombinant manganese superoxide dismutase in adjuvant arthritis and bleomycin induced lung fibrosis. *Free Radic Res Commun* 15: 297, 1991.
  53. Perez Solar R, Lopez Berestein G, Cabanillas F, McLaughlin P, Hersh EM: Superoxide anion production by peripheral blood monocytes in Hodgkin disease and malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 3: 641, 1985.
  54. Prasad K, Kalra J: Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. *Angiology* 40: 835, 1989.
  55. Sies H, de Groot H: Role of radical oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett* 64/65: 547, 1992.
  56. Sjoquist PO, Marklund SL: Endothelium bound extracellular superoxide dismutase type C reduces damage in reperfused ischaemic rat hearts. *Cardiovascular Res* 26: 347, 1992.
  57. Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA, Crapo JD: Intracellular localization of copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest* 55: 363, 1986.
  58. Soave MC, Moulisma M, Chevalier P, Pillot R, Guidollet J: Increased superoxide dismutase activity in erythrocytes of children with pulmonary hypertension. *Clin Chim Acta* 209: 95, 1992.
  59. Stadtman ER: Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220, 1992.
  60. Stadtman ER, Berlett BS: Fenton Chemistry. Aminoacid oxidation. *J Biol Chem* 266: 17201, 1991.
  61. Steiner M, von Appen K, Klinkmann H, Ernest B: Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation products in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 7: 386, 1992.
  62. Suzuki K, Kinoshita N, Matsuda Y, et al: Elevation of immunoreactive serum manganese superoxide dismutase in patients with acute myocardial infarction. *Free Radic Res Commun* 15: 325, 1992.
  63. Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA: Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposomal entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 73: 8795, 1984.
  64. Wong GHW, Goeddel DV: Induction of manganese superoxide dismutase by TNF: A possible protective mechanism. *Science* 242: 941, 1988.
  65. Yamanaka N, Nishida K, Ota K: Increased superoxide dismutase activity in various human leukemia cells. *Physiol Chem and Physics* 11: 253, 1979.

- - - -

*To end this chapter, let me ask "what is typical in the life of a physiologist?" Physiologists have an intimate relationship to what they are doing. We often have periods of no progress. Sometimes we abandon a road that we have been following for months or years. But we also have moments of success, however small and partial. When we approach retirement, we still see a variety of things to be done and, provided we are well-behaved towards our colleagues, there will be some degree of affiliation or contact as long as we feel the need.*

Para terminar este capítulo permítaseme preguntar "¿que es lo típico en la vida de un fisiólogo?" Los fisiólogos tienen una relación íntima con lo que hacen. A menudo tenemos períodos sin progreso. A veces abandonamos un camino que hemos estado siguiendo por meses o años. Pero también tenemos momentos de éxito, aunque pequeños y parciales. Cuando nos acercamos al retiro aun percibimos una variedad de cosas para hacer y, asumiendo que hemos sido cordiales con nuestros colegas, se conservara algún tipo de relación oficial o contacto en tanto sintamos la necesidad.

Silvio Weidman

*Cardiac action potentials, membrane currents, and some personal reminiscences.*  
 Annual Review of Physiology 55: 11, 1993