

Evolución del concepto de “Estrés Oxidativo”: medio siglo de aportes de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay

Resumen

Rafael Radi¹

La siguiente revisión presenta algunos elementos acerca de la evolución del concepto de “Estrés Oxidativo”, que van desde las primeras observaciones bioquímicas en sistemas enzimáticos hasta aproximaciones terapéuticas actuales a nivel preclínico. En el transcurso de ya más de medio siglo de aportes, se destaca en etapas tempranas del desarrollo del concepto la participación de investigadores que trabajaron activamente en la Facultad de Medicina, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay) y en particular en su Departamento de Bioquímica, incluyendo al Profesor Visitante John Totter y al Profesor Eugenio Prodanov. El entendimiento de los procesos metabólicos que conducen a la formación y eliminación de especies oxidantes y radicales libres, y el desarrollo de técnicas para su identificación, detección y cuantificación ha sido un foco central del área. Se analiza el desarrollo y evolución del concepto de “Estrés Oxidativo” que se define actualmente como una situación de desbalance metabólico que conduce a alteración de la señalización redox y/o daño oxidativo facilitando el desarrollo y progresión de patología degenerativa e inflamatoria. Los fenómenos oxidativos también son utilizados por células del sistema inmune como mecanismo citotóxico contra patógenos invasores. Un avance importante del área se dio con el reconocimiento que el metabolismo del radical óxido nítrico se conecta con procesos oxidativos, en particular a través de su reacción difusional con el radical superóxido para rendir peroxinitrito, un peróxido y nucleófilo inestable y reactivo en sistemas biológicos. La mejor comprensión de los mecanismos intra y extracelulares de formación de especies oxidantes, incluyendo el rol de la disfunción mitocondrial, y los mecanismos de señalización redox, están dando lugar al desarrollo de estrategias nutricionales y farmacológicas con capacidad de modular in vivo fenómenos oxidativos asociados a patología. He seleccionado observaciones y trabajos con énfasis bioquímico que considero relevantes a nivel universal, relacionándolos e integrándolos con aportes que se han realizado desde nuestra Facultad en el área de estrés oxidativo.

Palabras clave: oxidantes, radicales libres, quimioluminiscencia, antioxidantes, señalización redox, óxido nítrico, peroxinitrito, estrés oxidativo.

Title: Evolution of the "Oxidative Stress" concept: half of a century contributions from the Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

Abstract

The following review presents elements in relation to the evolution of the "Oxidative Stress" concept, that span from the first biochemical observations in enzymatic systems to the current therapeutic strategies at the preclinical level. In more than half a century of contributions to the field, it is remarkable the participation of investigators of the Facultad de Medicina, Universidad de la República (Montevideo,

-
1. Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de la República, Avda. General Flores 2125, 11800, Montevideo, Uruguay.

* Contacto: Rafael Radi. E-mail: rradi@fmed.edu.uy

Uruguay) from the early days of the research, in particular the Department of Biochemistry, including Visiting Professor John Totter and Professor Eugenio Prodanov. The understanding of the metabolic processes that lead to the formation and detoxification of free radicals and oxidant species, and the development of methodologies for its identification, detection and quantitation has been a central topic of the area. The concept of oxidative stress has developed and evolved to the current definition representing a metabolic imbalance that leads to the alteration of redox signaling and/or an oxidative damage, which in turn facilitates the development and progression of degenerative and inflammatory pathology. Oxidative events are also utilized by immune system cell as a cytotoxic mechanism against invading pathogens. An important advance in the area was the recognition that the metabolism of the free radical nitric oxide was connected with oxidative processes, in particular through its diffusional reaction with superoxide radical to yield peroxynitrite, an unstable and reactive nucleophile and peroxide in biological systems. A better understanding of the intra- and extracellular mechanisms of formation of oxidant species, including the role of mitochondrial dysfunction, as well as the mechanisms of redox signaling, are providing opportunities for developing nutritional and pharmacological strategies for the in vivo modulation of oxidative events associated to pathology. I have selected observations and works with a biochemical emphasis that I consider relevant, and relating and integrating them with contributions carried out from our Faculty in the area of oxidative stress.

Key Words: Oxidants, free radicals, chemiluminescence, antioxidants, redox signaling, nitric oxide, peroxynitrite, oxidative stress.

Introducción

El concepto de "Estrés Oxidativo" fue originalmente definido por el Prof. Helmut Sies¹ (Universidad de Dusseldorf, Alemania) en 1985 como una condición de desbalance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, llevando a daño oxidativo a nivel de biomoléculas [1, 2]. La definición incluye los siguientes elementos:

1. existe una formación de oxidantes por células y tejidos a punto de partida del metabolismo aeróbico (o alternativamente por exposición ambiental o metabolismo de agentes físicos o químicos de carácter oxidante, ej. radiación UV, *smog*, humo del tabaco, metales de transición, xenobióticos),
2. que los oxidantes pueden reaccionar con biomoléculas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos conduciendo a modificaciones oxidativas que determinan cambios en su estructura y función con consecuentes alteraciones de la homeostasis celular y tisular y

3) que estos procesos oxidativos están normalmente atenuados a través de sistemas enzimáticos y no enzimáticos antioxidantes.

El balance pro-/anti-oxidante perdido en la condición definida como “Estrés Oxidativo”, está asociado al desarrollo de patología inflamatoria,

²²

neurodegenerativa y cardiovascular, entre otras múltiples. La definición original fue actualizada más recientemente por Sies y Jones en forma textual como “*An imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage*” [3]. En esta nueva definición se toman en consideración aspectos más recientes sobre la acción biológica de oxidantes, en particular en relación a su rol como moléculas señalizadoras y su acción fisiológica a bajas concentraciones, en un modo de acción conocido como “señalización redox” [4]. Uno de los oxidantes con mayor capacidad señalizadora es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el que entre otras acciones puede estimular la proliferación celular a través de diferentes cascadas de transducción intracelular que implican la activación de factores de transcripción “redox sensibles” y participación de rutas de fosforilación/ desfosforilación. La distorsión de la señalización redox por un aumento significativo del estado estacionario de oxidantes conduce a las primeras etapas del estrés oxidativo; de persistir este estado

¹ Nombrado Doctor Honoris Causa de la Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay en 2010.

de alteración de la homeostasis redox celular, habitualmente las células y tejidos evolucionan a una situación de “daño oxidativo” que facilita la disfunción y eventual muerte celular.

Primeros indicios de formación de

da como producto de oxidación ácido úrico. En paralelo, se obtienen productos de reducción del oxígeno molecular, cuya laboriosa caracterización comenzó a realizarse en los primeros estudios a través de técnicas de quimioluminiscencia [8, 9] y que fueron más adelante plenamente caracterizados

especies oxidantes y radicales libres²

como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y H_2O_2

(Figura 1).

en sistemas biológicos: el caso de la xantina oxidasa

En la década del cincuenta se publicó un trabajo central en el área por la investigadora argentina Rebeca Gershman y colaboradores, quienes plantearon un mecanismo común en relación a la toxicidad por exposición a altos niveles de oxígeno y el daño por radiaciones [5]. En este trabajo se propone un mecanismo bioquímico compartido entre la toxicidad por oxígeno y las radiaciones a través de la formación de oxidantes y radicales libres, sentándose a nivel fisiológico bases iniciales para el desarrollo de la teoría del estrés oxidativo. En la época, era aún difícil concebir la formación a nivel biológico de especies de vida media tan corta como los oxidantes y radicales libres y qué procesos o mecanismos bioquímicos podrían estar involucrados. Fue en esa época sobre fines de la década de los cincuenta cuando grupos en Duke University (Durham, Carolina del Norte, USA) y la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), comenzaron a hacer aportes consistentes sobre la identificación y caracterización de procesos bioquímicos que conducen a la formación de radicales libres y oxidantes. Por un lado Handler, Fridovich y colaboradores en Durham [6, 7], y por otro Totter y colaboradores en Montevideo [8-10] comenzaron a caracterizar y desarrollar los métodos para su medición, en particular la formación de oxidantes a punto de partida de la oxidación aeróbica de hipoxantina y xantina por medio la enzima xantino oxidasa³. Esta ruta enzimática representa la etapa final en el catabolismo de las purinas y

222

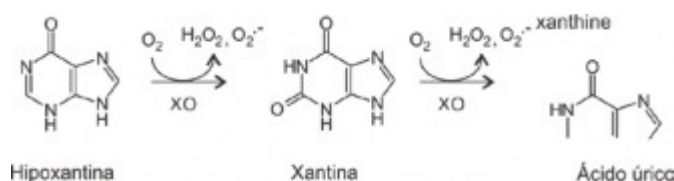


Figura 1. Reacción catalizada por la enzima xantino oxidasa. Se observa la oxidación aeróbica de los sustratos hipoxantina y xantina para dar como productos finales ácido úrico, radical superóxido y peróxido de hidrógeno.

El líder del grupo basado en Montevideo Profesor John R. Totter, bioquímico estadounidense (1914- 2001), llegó como Profesor Visitante a Uruguay a través del Rockefeller Institute para trabajar durante dos años en la Facultad de Medicina (1958-1960). Trajo consigo el equipamiento y reactivos básicos necesarios para realizar los estudios planteados y congregó en torno a sí mismo un conjunto de jóvenes investigadores que incursionaron en el desarrollo de investigaciones bioquímicas básicas de estándares internacionales, las que fueron publicadas en la revista más prestigiosa del área⁴. En particular, dos trabajos publicados desde Uruguay en the Journal of Biological Chemistry en enero y junio de 1960, demuestran la formación de oxidantes durante la acción enzimática de xantino oxidasa a través de la luminiscencia de la lucigenina (nitrato de dimetil biacridinio) o luminol (5-amino-2,3-dihidro- 1,4-ftlazinadiona), respectivamente [8, 9]. Es notable releer algunos párrafos de

estos trabajos en los cuales, en la mirada actual, los investigadores basados en Montevideo,

²Los radicales libres son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su último orbital molecular. Habitualmente son especies con alta reactividad química y de corta vida media (ej. microsegundos a segundos) y muchos de ellos tienen capacidad oxidante, siendo el caso más notable el del radical hidroxilo (*OH). ³De los tres trabajos publicados por John Totter durante su visita a Uruguay se destaca que dos de ellos fueron publicados en el Journal of Biological Chemistry (1960) y otro en Anales de la Facultad de Medicina (1961).

⁴Dentro de los equipos traídos por el Prof. John R. Totter, se encontraba un quimioluminómetro. Este equipo en desuso durante la intervención de la Universidad de la República, por la dictadura militar ocurrida entre 1973 y 1984, fue vuelto a poner en funcionamiento en 1985 y utilizado hasta los primeros años de la década de los noventa, habiéndose publicado con él un conjunto de trabajos originales.

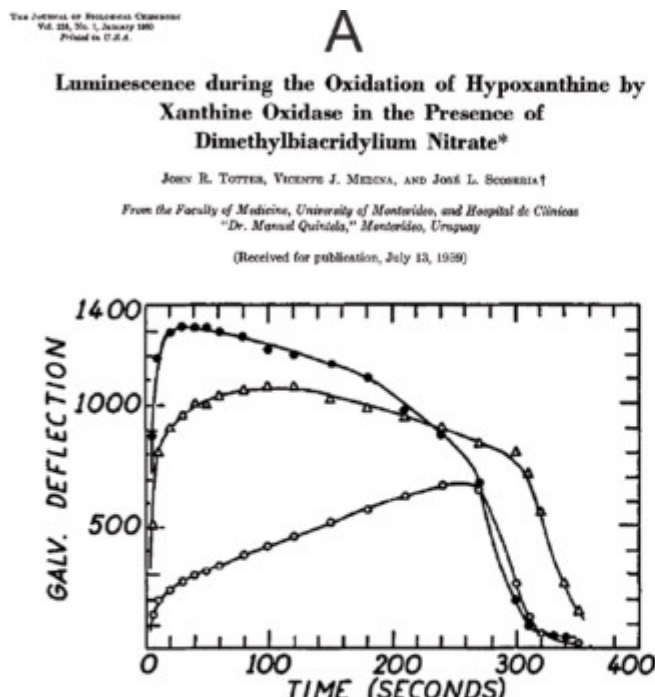


FIG. 2. Time course of enzymically produced chemiluminescence. Sodium carbonate buffer, 0.067 N, pH 10.4. Each tube contained 2 μ moles hypoxanthine; 25 μ g DBA⁺⁺; xanthine oxidase, 0.05 ml; water to 1.55 ml. \circ — \circ , without added cyanide; \bullet — \bullet , in the presence of 0.0013 N KCN; Δ — Δ , in the presence of 0.013 N KCN.

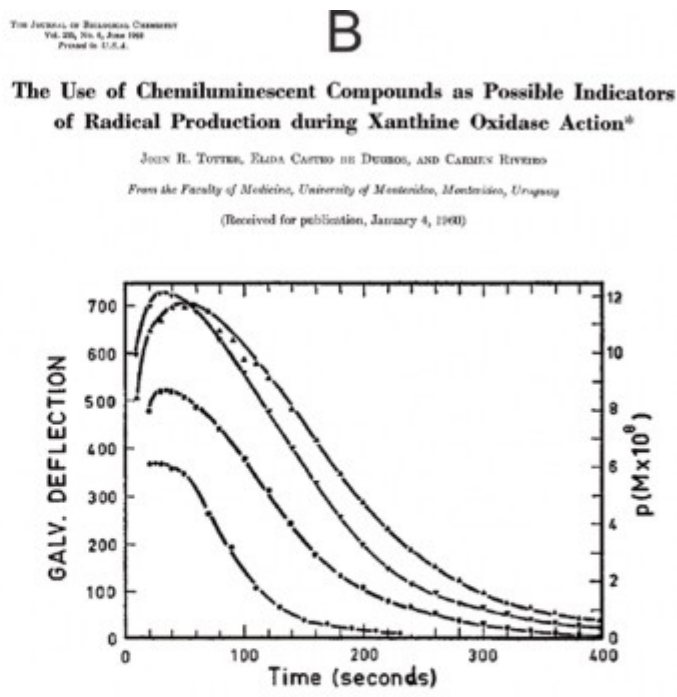


FIG. 2. Time intensity curves for light emission with various concentrations of hypoxanthine in the presence of 5×10^{-4} M luminol and 1.8×10^{-7} M xanthine oxidase (estimated as described in the text); 0.08 N sodium carbonate buffer. The final pH, 10.4; temperature, 20°; total volume, 1.6 ml. Hypoxanthine concentration: \bullet — \bullet , 6.25×10^{-5} M; \blacksquare — \blacksquare , 12.5×10^{-5} M; \blacktriangledown — \blacktriangledown , 18.7×10^{-5} M; \blacktriangle — \blacktriangle , 25×10^{-5} M. Abscissa: time in seconds. Left ordinate, galvanometer deflection; right ordinate, estimated "ES" concentration. $K_m = 13.9 \times 10^{-5}$; $k_2 = 10.6 \text{ sec}^{-1}$.

Figura 2. Trabajos de John Totter et al publicados en el Journal of Biological Chemistry en 1960. Carátulas y gráficos representativos de los cursos temporales de emisión de luz inducidos por la actividad xantino oxidasa usando dos sondas quimioluminiscentes, (A) lucigenina, (B) luminol. Trabajo publicado originalmente en: Totter JR, Medina VJ, Scoseria JL. Luminescence during the Oxidation of Hypoxanthine by Xanthine Oxidase in the presence of Dimethylbiacridylum Nitrate. J. Biol. Chem. 1960; 235:238-41. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

realizaban aportes importantes y perdurables al área. En varios de los pasajes de las referencias 8 y 9, se indica que la quimioexcitación tanto de lucigenina

como de luminol en el transcurso de las reacciones catalizadas por xantino oxidasa

proviene de especies oxidantes tales como O_2 ,

él instrucción básica para poder continuar con el proyecto de investigación una vez que el profesor estadounidense volviera a Estados Unidos. Los primeros trabajos de Prodanov que continuaron la línea de investigación originada por Totter, se publicaron en Anales de la Facultad de Medicina

²

²

H₂O₂ o radical hidroxilo $\cdot OH$) (Figura 2)⁵.

²

²

[11-13], los cuales están indexados en PubMed

Sobre fines de la década del cincuenta y comienzo de la década del sesenta, se integró al Departamento de Bioquímica Eugenio Prodanov⁶, quien pese a no haber publicado trabajos con Totter, recibió de

Medline. Uno de los trabajos que continuaron sobre la caracterización de la quimilumiscencia del luminol inducida por xantino oxidasa se muestra en Figura 3. Los estudios realizados por Prodanov,

²

⁵ Por ejemplo, en las conclusiones de la referencia 9, p. 1842 se expresa que "The intensity of light produced in the presence of luminol appeared to be directly related to the reaction velocity of the enzyme-catalyzed reaction. These results were tentatively interpreted as indicating that the reduced molecule is oxidized in more than one step with the production of $O_2\cdot^-$ or $\cdot OH$ radicals and with luminol competing successfully for a small fraction of the radicals. It is suggested that the production of light by enzyme reactions in the presence of luminol may be used as a general test for the momentary presence of oxidizing radicals".

⁶ Docente del Departamento de Bioquímica desde el año 1959, habiéndose desempeñado como Profesor Titular de 1987 a 1992.

XANTINO OXIDASA *

Algunas características cinéticas de la oxidación enzimática de la hipoxantina detectada por la quimioluminiscencia del luminol

PABLO H. BLANCO,** OLADYS M. OYAMBURO,**
EUGENIO PRODANOV** y CARLOS GARCIA MOREIRA***

INTRODUCCION

El uso de reacciones quimioluminiscentes como detectores acoplados a reacciones de oxidorreducción ha permitido formar "sistemas artificiales luciferina-luciferasa" y con ello su aplicación al estudio de reacciones enzimáticas.^{1,2} Las reacciones que más se han estudiado con este procedimiento son las de oxidación de la hipoxantina catalizadas por la xantina oxidasa de la leche,^{1,2} la xantina oxidasa de hígado de vacuno³ y la xantina dehidrogenasa de hígado de pollo.^{4,5} La posible correlación del fenómeno quimioluminiscente con reacciones de radicales libres ha sido recientemente confirmada en registros simultáneos de emisión de luz y resonancia paramagnética.⁶

Si bien las curvas de emisión obtenidas con el sistema xantino oxidasa-hipoxantina-luminol tienen las características de curvas de complejo enzima-sustrato, ciertas particularidades de la reacción enzimática acoplada a la reacción quimioluminiscente plantean algunos problemas a la interpretación cinética de los registros, de los que nos ocuparemos en el presente trabajo.

* Recibido para su publicación el 15 de julio de 1963.
** Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Montevideo.
*** Departamento de Biofísica de la Facultad de Medicina, Montevideo.

MATERIAL Y METODOS

a) Aparatos

Las medidas de emisión quimioluminiscente se hicieron con un fotofluorímetro "Photovolt" modelo 540 adaptado a tal efecto por el Dr. W. De Angelis en nuestro laboratorio. Esta adaptación consiste en un dispositivo especial que permite inyectar reactivos en el tubo de reacción a oscuras y bajo burbujeo continuo de oxígeno; la emisión fue registrada en papel con un registrador Texas modelo R 1000. Las medidas de emisión de luz se hicieron desencadenando la reacción con inyección de la enzima sobre la mezcla de los demás reactivos, previamente preparada en un tubo de reacción y bajo burbujeo de oxígeno.

Las medidas de velocidad espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro Beckman D. U.

b) Reactivos

La xantina oxidasa fue preparada partiendo de suero de manteca según el método de Horecker y Heppel.⁸ La muestra usada en los experimentos que ilustran este trabajo contenía 11,4 mg. de proteína por mililitro y una actividad por mg. de proteína de 5,4 unidades de incremento de densidad

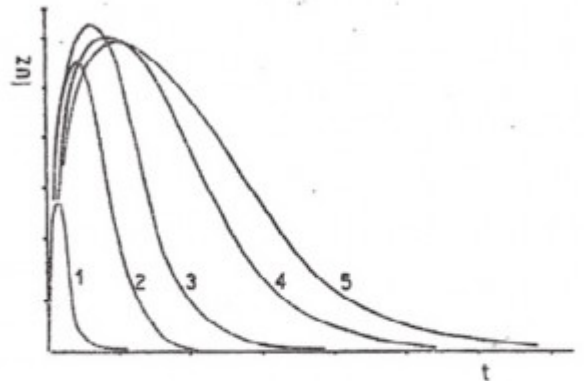


Fig. 1.—Serie de curvas de emisión producidas por el sistema xantino oxidasa-hipoxantina en presencia de luminol. Concentración de los reactivos: Hipoxantina, 3,1, 9,8, 15,6, 26,1 y 40,6 $\times 10^{-3}$ M (curvas I a V respectivamente). Luminol 5×10^{-4} M. Buffer de carbonato-bicarbonato pH 9,2, concentración $2,5 \times 10^{-2}$ M. Enzima de actividad especificada en el texto, a una dilución total de 1/160.

Figura 3. Trabajo de Eugenio Prodanov et al. publicado en Anales de la Facultad de Medicina en 1963. Carátula y gráficos representativo del trabajo [12].

avanzaron sobre el entendimiento de que especies oxidantes podían ser generadas en forma continua a punto de partida de la enzima xantino oxidasa en presencia

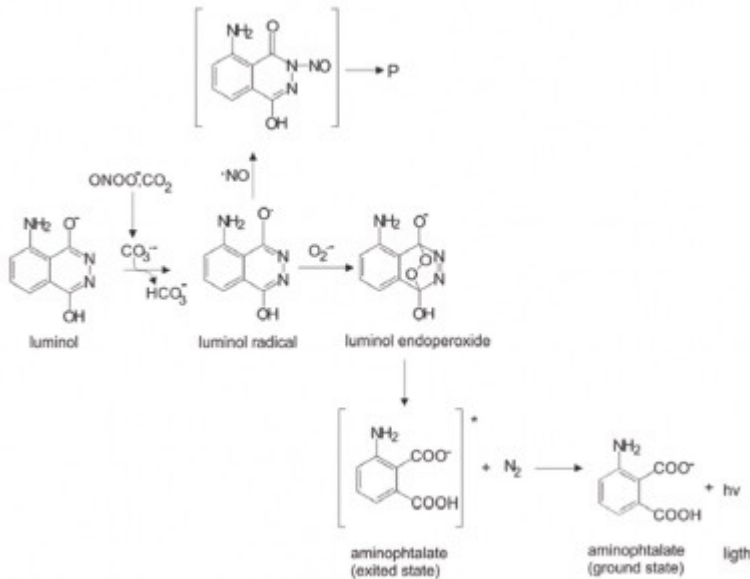


Figura 4 Mecanismos de oxidación y quimioexcitación del luminol. En el esquema presentado se muestra la oxidación del luminol por oxidantes derivados del peroxinitrito. Procesos similares ocurren con

oxidantes como superóxido y radical hidroxilo, que conducen a la formación del intermediario ácido aminoftálico excitado. Extraído de Radi R, et al.[14] © The Biochemical Society.

de sus sustratos purínicos y oxígeno molecular y la caracterización de la técnica de quimioluminiscencia. La identificación y el curso temporal de la formación de especies reactivas mediante el uso de la sonda quimioluminiscente luminol depende de su oxidación mediada por los productos de la reacción enzimática dando lugar a la generación de una especie molecular electrónicamente excitada, cuyo decaimiento al estado basal se acompaña de emisión de luz; el uso de esta técnica fue ampliado muchos años después para la medición de otros radicales y oxidantes derivados del óxido nítrico (Figura 4) [14]. La técnica quimioluminiscente se continuó usando durante el resto de la década y hasta la publicación de un artículo de Prodanov y colaboradores [15] previo a la disgregación del equipo uruguayo, hecho vinculado a las adversas condiciones sociales y políticas reinantes para el desarrollo de actividad universitaria y científica. Al retorno de la democracia, y reintegrado el Profesor Prodanov a su actividad en el Departamento

2
2

de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad de la República, se reconformó el equipo de investigación, publicando el primer artículo de esta nueva etapa en 1989 [16] usando el mismo equipo de quimioluminiscencia que había traído el Profesor Totter afortunadamente rescatado luego de más de una década sin uso. Tanto los trabajos de Handler y Fridovich, como Totter y colaboradores y Prodanov y colaboradores, contribuyeron a demostrar que procesos metabólicos y reacciones enzimáticas “normales” podían conducir a la formación de oxidantes y radicales libres en sistemas biológicos. Estos conceptos tuvieron un soporte muy grande en el año 1969 cuando Mc Cord y Fridovich (nuevamente en Duke y utilizando la xantino oxidasa como fuente de $O_2^{\cdot-}$) [17] (Figura 5) demostraron la existencia en células de origen animal de una enzima capaz de eliminar $O_2^{\cdot-}$, la superóxido dismutasa (ecuación [1]), lo que permitió desarrollar en forma más intensa la idea acerca de la formación y detoxificación de radicales libres y oxidantes en sistemas biológicos.

The Journal of Biological Chemistry
Vol. 244, No. 24, Issue of December 15, pp. 607-610, 1969
Printed in U.S.A.

Superoxide Dismutase

AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN)*

(Received for publication, June 23, 1969)

JOE M. MCCORD AND IRVIN FRIDOVICH

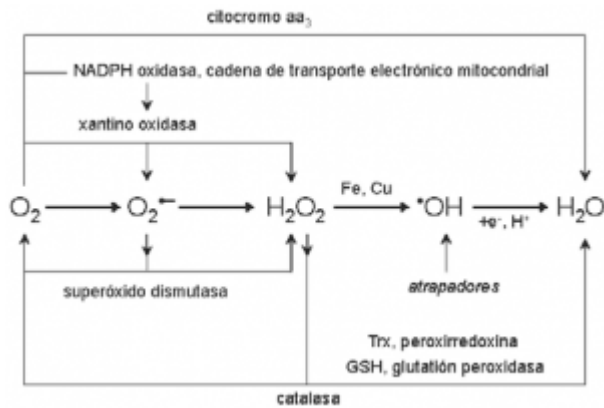
From the Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27705

SUMMARY

An enzyme which catalyzes the dismutation of superoxide radicals ($O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) has been purified by a simple procedure from bovine erythrocytes. This enzyme, called superoxide dismutase, contains 2 eq of copper per mole of enzyme. The copper may be reversibly removed, and it is required for activity. Superoxide dismutase has been shown to be identical with the previously described copper-containing erythrocuprein (human) and hemocuprein (bovine).

Figura 5. Trabajo de Joe Mc Cord e Irwin Fridovich reportando el descubrimiento de la superóxido dismutasa. Carátula y gráfi representativo del trabajo. Trabajo publicado originalmente en: McCord JM; Fridovich I. Superoxide Dismutase an enzymic function for erythrocytein (Hemocuprein). J. Biol. Chem. 1969; 244: 6049-55. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

SOD



[1]
2 2 2 2 2

Otras fuentes de oxidantes: mitocondria, NADPH oxidasa, mieloperoxidasa

En la década del setenta y hasta mediados de los ochenta no se realizó investigación científica en el área en el Uruguay. En el mundo, sin embargo, se continuaban haciendo contribuciones acerca de fuentes intra y extracelulares de radicales libres y oxidantes y del rol de ellas en su relación con la patología.

2
2 2

En este contexto, se identificó a la mitocondria como una fuente central y continua de $O^{\bullet -}$ y H_2O_2 a través de reacciones de componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial con el oxígeno molecular (revisado en [18]). Si bien una mitocondria en condiciones fisiológicas reduce directamente y por cuatro electrones a nivel del citocromo aa3 (oxidasa terminal) el oxígeno molecular a agua en un porcentaje mayor al 99.5 %, existe un pequeño porcentaje de reducción parcial de oxígeno (Figura 6). Este porcentaje puede aumentar significativamente durante fenómenos

Figura 6. Esquema de fuente de oxidantes y sistemas antioxidantes mamíferos. Se indican rutas bioquímicas de formación de oxidantes derivados de la reducción parcial del oxígeno molecular y mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para su eliminación.

2

de disfunción mitocondrial, lo que a su vez puede conducir a una situación de estrés oxidativo mitocondrial y secundariamente asociarse a señalización de muerte celular programada y/o falla bioenergética. Por otra parte, se evidenció que células fagocíticas tales como macrófagos y neutrófilos cuentan con un sistema enzimático complejo a nivel de la membrana plasmática para la

producción de $O^{\bullet-}$ en respuesta a la invasión por patógenos y como mecanismo para el control de

la infección (revisado en [19]) En efecto, células activadas del sistema inmune para la producción de $O^{\bullet-}$ determinan una condición de estrés oxidativo en el microorganismo que muchas veces determina un efecto citotóxico [20]. Una observación relevante y de importancia en patología humana, es que individuos con un defecto genético en componentes de la NADPH oxidasa son portadores de la enfermedad granulomatosa crónica, la que cursa con infecciones a reiteración [21]. Con el advenimiento de la técnicas de ingeniería genética y la posibilidad de generar ratones “*knock out*” para componentes de la NADPH oxidasa, se ha podido comprobar en los modelos animales, que una baja actividad NADPH oxidasa determina una mayor propensión a la infección por un conjunto de bacterias y parásitos [22].

Otra fuente importante de oxidantes, sobre todo en fenómenos inflamatorios agudos, es la mieloperoxidasa (MPO), enzima presente en los gránulos de los neutrófilos y capaz de formar hipoclorito/ácido hipocloroso ($OCl^-/HOCl$) a punto

oxidante altamente reactiva, el OH^{\bullet} . Sin embargo, tanto por efecto de reacciones mediadas por metales de transición como por efecto de las radiaciones, hay una formación continua de OH^{\bullet} , el que es principalmente neutralizado por “atrapadores” (“*scavengers*”) de bajo peso molecular tales como el ácido úrico, glutatión y ácido ascórbico (vitamina C) en sistemas hidrofílicos y α -tocoferol (vitamina E) en membranas y lipoproteínas [27-29]. Es importante considerar que algunos de los sistemas enzimáticos antioxidantes están bajo control transcripcional, siendo capaces de inducirse a punto de partida de estímulos fisiológicos, como son el caso de isoformas de la glutatión peroxidasa y peroxiredoxinas y la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD), con lo cual se ha hecho evidente en los últimos años que la capacidad antioxidante enzimática puede ser modulada por estímulos fisiológicos o farmacológicamente, lo que está abriendo nuevas posibilidades en prevención y tratamiento de procesos asociados al estrés oxidativo.

de partida de H_2O_2

y Cl^- [23]. Secundariamente a

la activación de neutrófilos, la liberación de MPO a nivel extracelular e intrafagosomal conjuntamente con la formación de $O^{\bullet-}$ y consecuentemente H_2O_2

*Un radical libre estable y señalizador:
el óxido nítrico (NO^{\bullet})*

En la década de los ochenta y primera parte de

por parte de la NADPH oxidasa, lleva a la formación de $HOCl/OCl^-$ que tiene potente acción citotóxica. El rol de MPO en procesos inflamatorios y como agente anti infeccioso se ha demostrado claramente en

modelos animales KO para la MPO así como en un defecto genético en humanos [23, 24].

Una batería de sistemas antioxidantes

2

En células aeróbicas y en particular en células de mamífero se ha identificado un conjunto de sistemas enzimáticos cuya función es eliminar a oxidantes y especies reactivas [25, 26] (Figura 6). Dentro de estos sistemas se encuentran las superóxido dismutasas, enzimas que dismutan $O^{\bullet-}$ y que se encuentran ampliamente distribuidas a nivel intra y extracelular, y enzimas que descomponen con mecanismos diferentes y distintos comparti-

la década de los noventa se identificó al radical

libre óxido nítrico como un producto de la reacción enzimática catalizada por óxido nítrico sintasas (NOS) (Figura 7). Inicialmente, se evidenció la formación del $\bullet NO$ por el endotelio vascular

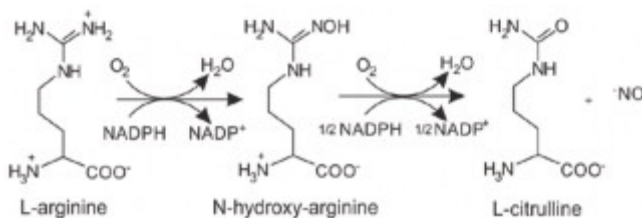


Figura 7. Reacción de síntesis del óxido nítrico por la óxido nítrico sintasa. Se observa la oxidación del grupo guanidino del amino ácido L-arginina en una reacción trisustrática que rinde citrulina y $\bullet NO$.

7 Es interesante evidenciar que los microorganismos

2

2

mientos celulares, H O

e hidroperóxidos orgánicos

cuentan con sistemas antioxidantes propios, que

(ROOH) tales como catalasa, glutatión peroxidasas

y peroxiredoxinas. La acción conjunta de los

buscan neutralizar la situación de estrés oxidativo creada por las células del huésped. En este sentido,

sistemas detoxificadores de $O^{\bullet-}$ y H O

disminuyen

en los últimos años hemos indicado que los sistemas

222

significativamente la formación de una especie

antioxidantes de patógenos deben ser considerados como "factores de virulencia".

5. Kasperk, M. G. *Chemotomography* 78, 3613 (1985).
6. Nishi, C., Kawano, J. E., Vanecko, J. A. & Corbin, C. L. *J. exp. Med.* 163, 1390-1393 (1985).
7. Nishida, K., M., Koyama, H., Yamamoto, M. J., Shiohara, S., M. & Matsuo, J. R. *J. Intenat. Med.* 191, 349-350 (1982).
8. Wilson, J., Kato, K., Langer, M. & Taylor, R. *Am. J. Physiol.* 243, H2133-H2137 (1982).
9. Gross, D. R., Flood, P. M. & Jackson, R. R. *Am. J. Physiol.* 243, H2138-H2141 (1982).
10. Gross, D. R., Groll, G., Martin, S. N., Gordon, R. R. & Gordon, R. R. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 419-422 (1982).
11. Gross, D. R. *et al.* *J. Physiol.* 313, 493-501 (1983).
12. Inoué, M., Imai, W., Gross, D. R. & Gordon, R. R. *J. exp. Med.* 158, 982-987 (1982).
13. Yamamoto, K., Gross, D. R., Saitoh, D. D., Shiohara, S. & Gordon, R. R. *J. exp. Med.* 163, 1387-1390 (1985).

Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor

R. J. Gryglewski, R. M. J. Palmer & S. Moncada*

Wellcome Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK

Endothelium-derived vascular relaxing factor (EDRF) is a humoral agent that is released by vascular endothelium and mediates vasodilator responses induced by various substances including acetylcholine and bradykinin. EDRF is very unstable, with a half-life of between 6 (ref. 3), 4) and 80 (ref. 5) s, and is clearly distinguishable from prostacyclin. The chemical structure of EDRF is unknown but it has been suggested that it is either a hydroperoxy- or five radical-derivative of arachidonic acid or an unstable aldehyde, ketone or lactone. We have examined the role of superoxide anion (O_2^-) in the inactivation of EDRF released from vascular endothelial cells cultured on microcarrier beads and bioassayed using a cascade of superfused arterial smooth muscle strips. With this system, we have now demonstrated that EDRF is protected from breakdown by superoxide dismutase (SOD) and Ca^{2+} , but not by catalase, and is inactivated by Fe^{2+} . These findings indicate that O_2^- contributes significantly to the instability of EDRF.

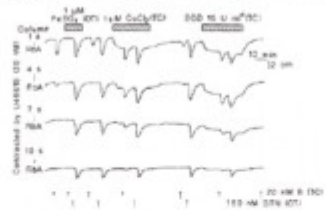


Fig. 1. Effect of Fe^{2+} , Cu^{2+} and SOD on the relaxation of rabbit aorta (RBA) by EDRF. A cuvette packed with a 7-day-old culture of endothelial cells (4.2×10^7 cells) was perfused with Krebs' buffer (3 ml min^{-1}). The effluent was used to superfuse a cascade of four rabbit aorta. These preparations, denuded of endothelium and contracted submaximally by $1.0 \mu\text{M}$ (30 nM), were separated from the column by delays of 1, 4, 7 and 10 s, respectively. The sensitivity of the rabbit aorta was standardized by administration of nitroglycerin (100 μM isotonic, 100 μM over the tissue). EDRF was released by 1-min infusions of bradykinin (B , $2 \mu\text{M}$) through the column. (TC) Infusion of Fe^{2+} ($FeSO_4$, $1 \mu\text{M}$, 100 μM) abolished the vasodilator effect of EDRF without affecting the response to nitroglycerin, indicating the denaturation of EDRF by Fe^{2+} . Cu^{2+} ($CuCl_2$, $1 \mu\text{M}$, TC) caused a relaxation of aorta preparations which diminished down the cascade, revealing the spontaneous release of EDRF. In the presence of Ca^{2+} , the EDRF released by bradykinin relaxed all the tissues in the cascade. Therefore, Ca^{2+} increased the survival of EDRF. More than 15 min after the end of the Ca^{2+} infusion, the segment aorta had still not fully recovered from the relaxation. SOD (15 U ml^{-1}) reduced TC produced a similar effect on the basal and bradykinin-induced release of EDRF which, in contrast to that induced by Ca^{2+} , disappeared within 3 min of terminating the SOD infusion.

response curves, the magnitude of the EDRF-induced relaxation of the vascular strips was expressed as a percentage of

B

PHARMACOLOGY

Pharmacological Evidence that Endothelium-Derived Relaxing Factor is Nitric Oxide: Use of Pyrogallol and Superoxide Dismutase to Study Endothelium-Dependent and Nitric Oxide-Elicited Vascular Smooth Muscle Relaxation¹

JOSE J. IGNARRO, RUBEN E. PIRRO, GEORGETTA M. BUDA, HEINZ E. WOOD and DAVIDE CHUQUIN

Department of Pharmacology and Therapeutics, University of California, Los Angeles, University of California, Los Angeles, California 90024-1550

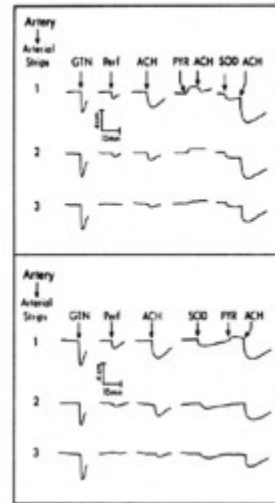


Fig. 8. Effects of pyrogallol and superoxide dismutase on arterial responses to EDRF released by acetylcholine during cascade superfusion with perfusate from intact artery. Endothelium-denuded strips of bovine intrapulmonary artery were precontracted with $10 \mu\text{M}$ phenylephrine delivered by superfusion. The numbers 1, 2 and 3 signify the cascade arrangement of the strips. Glyceryl trinitrate (GTN; $5 \text{ U } \mu\text{M}$) was superfused over the strips for 1 min. Perf signifies perfusate from the uncutback segment of bovine intrapulmonary artery. Breaks in the traces represent periods of tissue equilibration. Acetylcholine (ACH; $1 \mu\text{M}$) was perfused through the arterial segment for 5 min. Pyrogallol (PFR; $10 \mu\text{M}$) was superfused over the arterial strips, and this was continued during perfusion of the arterial segment with ACH. Superoxide dismutase (SOD; 100 U ml^{-1}) was perfused through the arterial segment as indicated, and this was continued during perfusion with ACH (top panel) and during superfusion with PFR followed by perfusion with ACH (bottom panel). The top and bottom panels each represent one experiment, and are representative of a total of six separate experiments.

2

Figura 8. Trabajos iniciales del área fisiológica que demostraron una modulación de la vida media del óxido nítrico vascular por oxidantes. Carátulas y gráficos representativos de experimentos realizados en los laboratorios de (A) Salvador Moncada y (B) Louis Ignarro sobre efectos vasodilatadores del $\bullet\text{NO}$ e influencia del O_2^- .

Trabajo publicado originalmente en: Gryglewski R J, Palmer R M J, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986 April 8; 320:454-6. <http://dx.doi.org/10.1038/320454a0>

a punto de partida de eNOS (NOS endotelial) y se confirmó su identidad como el factor de vasorelajación (EDRF, *endothelial-derived relaxation factor*) (revisado en [30, 31]). La acción señalizadora del $\bullet\text{NO}$ sobre la vasculatura se ejerce a través de su difusión al músculo liso subendotelial y su interacción con la guanilato ciclasa soluble (sGMP) la que se activa generando cGMP el que actúa como mensajero promoviendo vasodilatación. El conjunto de observaciones que van desde la generación de $\bullet\text{NO}$ endotelial hasta los mecanismos a nivel del músculo liso que conducen a la vasodilatación condujeron a los investigadores Robert Furchgott, Ferid Murad y Louis Ignarro a la obtención del Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1998⁸. Luego se identificaron otras funciones del $\bullet\text{NO}$, tales como neurotransmisión y como mediador en respuestas inflamatorias e inmunitarias. Es muy notable en cuanto a la bioquímica del $\bullet\text{NO}$, que pese a su carácter Las acciones a distancia del $\bullet\text{NO}$, dependen de la generación de moléculas “transportadoras” de $\bullet\text{NO}$ de mayor estabilidad química, tales como los S-nitrosotioles.

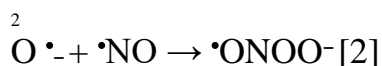
La reacción del radical superóxido y óxido nítrico: peroxinitrito como un mediador de estrés oxidativo

2

Una observación importante realizada por los fisiólogos que reportaron los primeros trabajos del $\bullet\text{NO}$ como vasodilatador, fue que la presencia de oxidantes podía disminuir la vida media y por lo tanto biodisponibilidad del $\bullet\text{NO}$ [32, 33] (Figura 8). De hecho, ya en los primeros trabajos se sugirió que el $\text{O}^{\bullet-}$ podía “inactivar” al $\bullet\text{NO}$. Al comienzo de la década de los noventa y trabajando conjuntamente con los Profesores Joe S. Beckman y Bruce A. Freeman en la University of Alabama en Birmingham (USA), profundizamos desde el punto de vista bioquímico sobre esta posible interacción radicalar, habitualmente tiene una vida media en el orden de 1 s en sistemas biológicos. Esta relativa estabilidad química sumada a su carácter neutro del punto de vista eléctrico e hidrofobicidad le permite difundir a través de células y en tejidos, actuando tanto como una señal autócrina como parácrina.

En 1999, la Universidad de la República otorga el título de Doctor Honoris Causa al Dr. Louis J. Ignarro por sus por sus contribuciones científicas de impacto universal y su aporte y contribución al desarrollo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

entre dos radicales libres, $\text{O}^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}$, llegando a la conclusión, a través de estudios en la literatura y nuestros propios resultados, que la reacción es extremadamente rápida (habitualmente las reacciones entre radicales ocurren con velocidades cercanas al control difusional). Esta reacción (ecuación [2]) no solo determinaba un consumo de $\bullet\text{NO}$ (lo que los fisiólogos llamaron “inactivación”) sino que se formaba un producto oxidante y reactivo que demostramos podía inducir rápidamente la oxidación de biomoléculas tales como proteínas y lípidos [34, 35].



El anión peroxinitrito y su ácido conjugado el ácido peroxinitroso (ONOOH , $\text{pK}_a = 6,8$) son peróxidos inestables en sistemas biológicos, siendo capaces de participar en reacciones de oxidación directa a biomoléculas tales como tioles, como también evolucionar hacia la formación de radicales secundarios oxidantes tales como el OH^{\bullet} , el dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) y el radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$). El ONOO^- , por su parte, es un buen nucleófilo. El peroxinitrito fue el primer oxidante derivado del $\bullet\text{NO}$ producido en sistemas biológicos caracterizado exhaustivamente del punto de vista bioquímico y su identificación permitió ampliar las bases moleculares del concepto de estrés oxidativo y lograr racionalizar algunos de los efectos tóxicos del $\bullet\text{NO}$ observado durante su sobreproducción tal como en fenómenos inflamatorios (a través de la inducción del isoformainducible de la NOS, iNOS) o neurodegenerativos (a través de la sobreactivación de la isoforma neuronal de la NOS, nNOS, lo que se asocia a la excitotoxicidad glutamatérgica). El esquema inicial que incorporó al $\bullet\text{NO}$ y al ONOO^- dentro de los procesos vinculados al fenómeno de daño

oxidativo se indica en la figura 9 [34]. Este esquema y el estado actual de conocimiento sobre la bioquímica de peroxinitrito ha sido actualizado recientemente [36].

La formación de peroxinitrito está vinculada a fenómenos de disfunción y degeneración vascular (hipertensión, aterogénesis), neurodegeneración y también el peroxinitrito ha sido identificado como un mediador oxidante citotóxico a micro- organismos invasores [36, 37]. Una buena parte

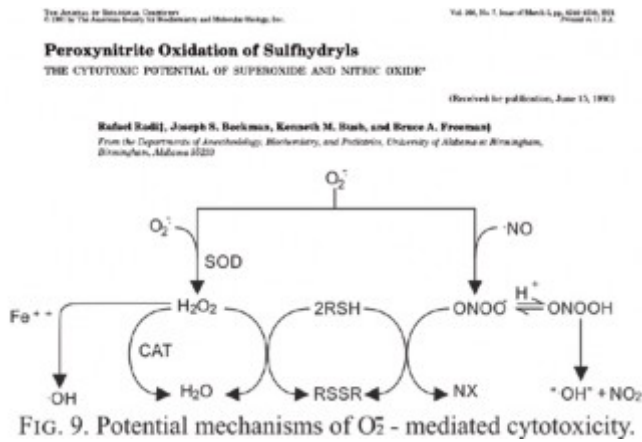


FIG. 9. Potential mechanisms of $O_2^{\cdot -}$ - mediated cytotoxicity.

2

Figura 9. Propuesta sobre la participación del óxido nítrico en la bioquímica del estrés oxidativo. Reacción con el radical superóxido y formación de peroxinitrito. El NO redirecciona la química oxidativa de $O_2^{\cdot -}$ hacia la formación de peroxinitrito. Este último, a su vez, es capaz de oxidar tioles y evolucionar a radicales oxidantes secundarios. Extraído de [34]. Trabajo publicado originalmente en: Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991; 266:4244-50. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

de la identificación de la formación y rol de peroxinitrito y otras especies oxidantes derivadas del NO en patología, ha dependido de la medida de una de las modificaciones oxidativas promovidas que es la formación de 3-nitrotirosina en proteínas (Figura 10) [38]. La 3-nitrotirosina es considerada un biomarcador de estrés oxidativo que indica

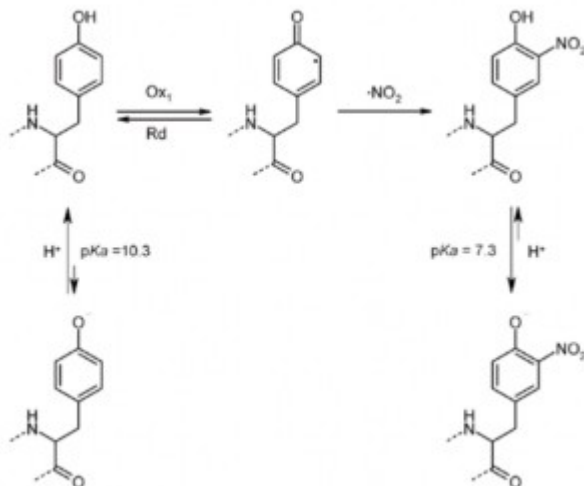


Figura 10 Tirosina, radical tirosilo y 3-nitrotirosina. La fi muestra además los equilibrios ácido base del anillo fenólico, destacando que la nitración disminuye el pKa del grupo hidroxilo una tres unidades, generando una carga negativa a pH fi Extraído de Radi R [38].

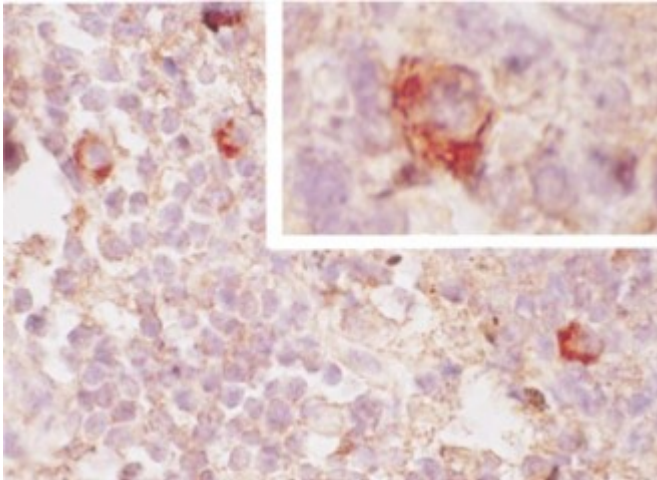


Figura 11. Detección inmunoquímica de 3-nitrotirosina en proteínas de un ganglio linfático mediastinal. La muestra fue extraída de un paciente portador de una patología con componente inflamatorio. Se observa fuerte inmunomarcación en macrófagos, células que en condiciones inflamatorias inducen la actividad de iNOS. Extraído de de Brito C, et al. [39].

severidad y progresión de daño oxidativo en modelos experimentales de enfermedad y en

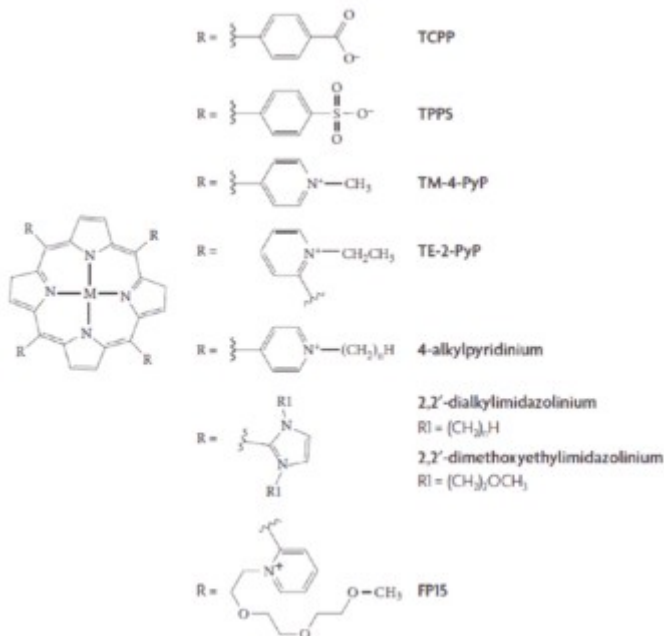


Figura 12 Estructura de metaloporfi Estos compuestos sintéticos con actividad redox se han utilizado ampliamente en modelos de enfermedad y el centro metálico puede ser manganeso o hierro. En la actualidad se considera que el mecanismo de acción para las metaloporfi de manganeso incluye capacidad de eliminación de $\text{O}^{\bullet-}$ y

patología humana (Figura 11) [38-40]. Además,

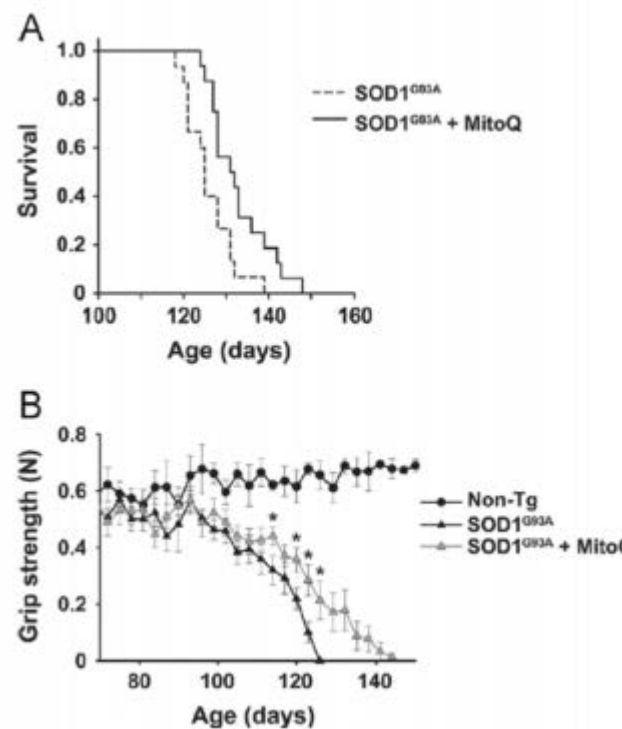
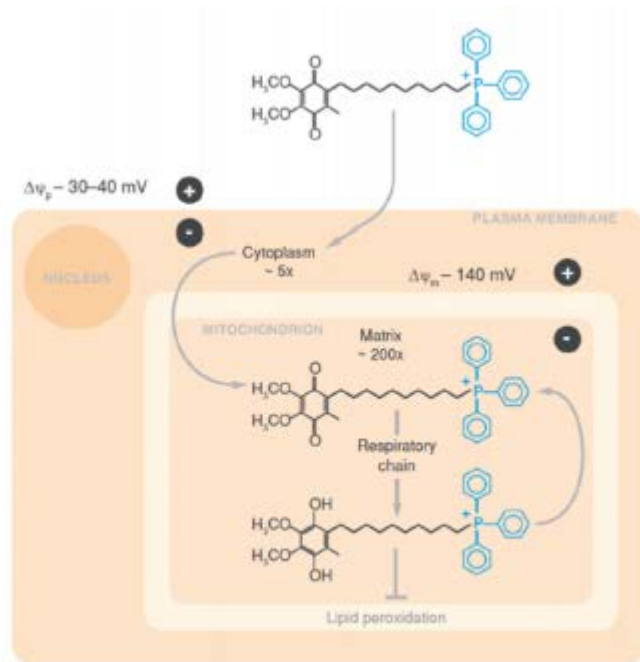
en algunas proteínas, la nitración de tirosinas determina cambios de estructura y función que pueden participar en cambios de la homeostasis celular y la eventual generación de auto-anticuerpos anti-nitrotirosina.

En forma independiente a la formación de peroxinitrito, el $\bullet\text{NO}$ puede ejercer acciones anti-oxidantes a través de reacciones de terminación, en particular durante los procesos de lipoperoxidación, lo que llevó a la identificación temprana de nitro- lípidos en el transcurso de una visita académica del Profesor Freeman a nuestra institución [41]. El área de nitrolípidos, su detección in vivo, sus acciones fisiológicas, farmacológicas, y su relación con la nutrición humana representan en la actualidad un área muy activa de investigación [42].

Modulación nutricional y farmacológica del estrés oxidativo. Perspectivas

La intervención nutricional o farmacológica para restablecer el balance redox en condiciones asociadas al estrés oxidativo ha sido un área activa de investigación, con un conjunto de estudios desarrollados en modelos celulares y animales de enfermedad, así también como ensayos de peroxinitrito. Extraído de Szabó C [37].

intervención en humanos. Más aún, estudios epidemiológicos de distinta naturaleza demuestran una correlación inversa entre ingreso nutricional de moléculas con actividad redox y la probabilidad de desarrollar patología cardiovascular, neuro- degenerativa y ciertos tipos de cáncer. En diversos modelos pre-clínicos controlados de enfermedad la intervención con moléculas con actividad “antioxidante” o “redox” provenientes de la dieta tales como el ácido ascórbico, alfa-tocoferol o polifenoles ha dado resultados satisfactorios. Asimismo, en poblaciones pequeñas y controladas, la administración oral de antioxidantes naturales ha dado efectos positivos respecto al mejoramiento de la función endotelial [43]. Sin embargo, la traslación de estas intervenciones a la patología humana no ha dado resultados tan contundentes como los esperados, en particular cuando se realizan estudios de intervención en grandes poblaciones. Hay acuerdo en que una dieta rica en componentes con actividad redox es beneficiosa para la salud humana, aunque los mecanismos moleculares subyacentes no dependen de las reacciones directas de estas moléculas con especies oxidantes, sino



10

Figura 13 MitoQ

y su mecanismo de acumulación

en mitocondrias. El mitoQ ingresa preferencialmente a la mitocondria a favor del gradiente electroquímico

10

Figura 14. Efectos del mitoQ

a ratones transgénicos

y en función de su grupo trifenilfosfonio. El sector

(hSOD1

G93A

), modelo animal de ALS. La administración

ubiquinona de la molécula de mitoQ es el que ejerce

10

de mitoQ

vía oral al comienzo de los síntomas de la

sus acciones redox y antioxidantes. Extraído de Murphy MP, et al. [45].

a través de mecanismos de señalización tales como inducción de sistemas antioxidantes o activación de la actividad de la eNOS, entre otros. Del punto de vista farmacológico, se está evaluando una serie de compuestos para la modulación del metabolismo redox. En particular, se ha avanzado mucho en la administración de moléculas sintéticas con potente capacidad antioxidante, algunas de ellas dirigidas específicamente a la mitocondria, para restablecer la homeostasis redox y bioenergética mitocondrial. Entre estas moléculas, destacamos el grupo de las porfirinas de manganeso [37, 44] (Figura 12), compuestos con capacidad antioxidante a través de múltiples mecanismos de reacción que incluyen la eliminación de $O_2^{\bullet-}$ y $ONOO^-$ así como el mito-ubiquinol (mitoQ) (Figura 13) [45], compuesto análogo al transportador de electrones mitocondrial lipofílico ubiquinol, que se concentra a nivel mitocondrial unas 100 a 200 veces respecto a otros compartimentos celulares

y extracelulares. Es interesante observar, que los estudios con porfirinas de manganeso han implicado una muy activa cooperación de nuestra Facultad con Irwin Fridovich y sus asociados en Duke University

enfermedad (90 días) preserva la función motora y aumenta la sobrevivencia de los animales. Extraído de de Miquel E, et al. [49].

[44, 46-48]. Por otra parte, en colaboración con Mike Murphy y asociados (Cambridge) hemos recientemente utilizado mitoQ administrado por vía oral en un modelo animal de esclerosis lateral amiotrófica luego del comienzo de los síntomas, habiendo obtenido auspiciosos resultados tanto en la preservación de la función motora como en la prolongación de la vida de los animales [49] (Figura 14). Mi opinión, en base a la evidencia acumulada en la literatura y la evolución más reciente del pensamiento del área, en cuanto a las múltiples funciones celulares de oxidantes más allá del “daño oxidativo” es que estamos cerca de lograr terapéuticas basadas en la modulación del metabolismo redox en humanos.

Durante más de medio siglo el Uruguay ha hecho aportes en relación a las bases celulares y moleculares del estrés oxidativo y su relevancia en patología y terapéutica humana. Es interesante apreciar, como el desarrollo incipiente que comenzó con la estadía del Prof. John R. Totter, generó luego a través del interés y trabajo del Profesor Eugenio Prodanov una línea sólida y fértil de investigación

que continúa hasta el presente. Por otra parte, es necesario reconocer cómo, abordajes iniciales muy básicos y potencialmente alejados de la ciencia biomédica, como fue la utilización de técnicas quimioluminiscentes para el estudio de la formación de oxidantes por la enzima xantino oxidasa, fueron de gran importancia para el desarrollo ulterior del área, y el mismo desarrollo de la teoría de estrés oxidativo, su relaciones con el metabolismo del

•NO y el posible desarrollo de terapéuticas “redox” en patología humana. En ese sentido, la Facultad de Medicina de la Universidad de la República ha brindando en forma generosa espacios de investigación para el desarrollo de estas temáticas, que han trascendido a la bioquímica humana y se extienden en forma interdisciplinaria desde la química a la medicina clínica, y con la participación de otros centros de investigación del país⁹.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Valeria Valez por asistencia con figuras del trabajo, a la Dra. Silvina Bartesaghi por la lectura crítica del mismo, al Dr. Eduardo Mizraji por sus constructivos comentarios durante el proceso de revisión y al Dr. Omar Macadar por su invitación a escribir el presente manuscrito y los intercambios en relación al enfoque del mismo.

Referencias

1. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, editor. Oxidative Stress. Londres: Academic Press; 1985. p. 1-8.

2. Jones DP, Radi R. Redox pioneer: Professor Helmut Sies. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Oct
 9. [Epub ahead of print].
 3. Sies H, Jones DP. Oxidative stress. En: Fink G, editor. *Encyclopedia of stress*. 2a ed. London: Elsevier/Academic Press; 2007. p. 45-8.
 4. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*. 2014 Mar 28;289(13):8735-41. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>
 5. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954 May 7;119(3097):623-6.
 1. Fridovich I, Handler P. Xanthine oxidase IV. Participation of iron in internal electron transport. *J Biol Chem*. 1958 Dec;233(6):1581-5.
 2. Totter JR, Medina V J, Scoseria JL. Luminescence during the oxidation of hypoxanthine by xanthine oxidase in the presence of dimethylbiacridylium nitrate. *J Biol Chem*. 1960;235:238-41
 3. Totter JR, De Dugros EC, Riveiro C. The use of chemiluminescent compounds as possible indicators of radical production during xanthine oxidase action. *J Biol Chem*. 1960 Jun;235:1839-42.
 4. Totter JR, Gordillo AE. [The intensity of chemiluminescence in mixtures of Luminol and a source of OH radicals, in its dependence on the pH]. *An Facultad Med (Univ Repúb Urug)*. 1961;46:37-40.
 5. Bianchi B, Demichelli G, Prodanov E. [Influence of the cyanide ion on the chemoluminescent reaction of luminol with persulfate in an alkaline medium]. *An Facultad Med (Univ Repúb Urug)*. 1961;46:240-4
 6. Blanco PR, Oyamburo GM, Prodanov E, Garciamoreira C. [Xanthine Oxidase. Some Kinetic Characteristics of the Enzymatic Oxidation of Hypoxanthine Detected by the Chemoluminescence of Luminol]. *An Facultad Med (Univ Repúb Urug)*. 1963;48:349-54
 7. Blanco PR, De Angelis WJ, Demicheli G, Prodanov E. [Two-phase method for the study of xanthine oxidase activity, using triphenyltetrazolium chloride]. *An Facultad Med (Univ Repúb Urug)*. 1965;50:114-20
 8. Radi R, Cosgrove TP, Beckman JS, Freeman BA. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J*. Feb 15, 1993;290(Pt 1):51-7.
 9. Oyamburo GM, Prego CE, Prodanov E, Soto H. Xanthine oxidase. Study of the enzyme-catalyzed oxidation of hypoxanthine through the chemiluminescence of luminol. *Biochim Biophys Acta*. 1970;205(2):190-5.
 10. Radi RA, Rubbo H, Prodanov E. Comparison of the effects of superoxide dismutase and cytochrome c on luminol chemiluminescence produced by xanthine oxidase-catalyzed reactions. *Biochim Biophys Acta*. 1989 Jan 19;994(1):89-93.
6. Fridovich I, Handler P. Xanthine oxidase I. The oxidation of sulfite. *J Biol Chem*. 1957 Sep;228(1):67-76.

Ver Centro de Investigaciones Biomédicas, www.ceinbio.udelar.edu.uy
1. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
 2. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979 Jul;59(3):527-605.
 3. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1464-76.

4. Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol.* 2009 Aug;12(4):415-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.011>
5. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004 Feb;16(1):42-7.
6. Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, et al. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity.* 1999 Jan;10(1):29-38.
7. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol.* 2000 Jan;7(1):53-8.
8. Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, et al. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2002 May 17;277(20):17415-27.
9. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.
10. Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal.* 2005 May-Jun;7(5-6):619-26.
11. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Nov;78(11):6858-62.
12. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1988;85(24):9748-9752.
13. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 1989; 86(16):6377-81.
14. Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun;43(2):109-42.
15. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:535-60.
16. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320, 454-56. <http://dx.doi.org/10.1038/320454a0>
17. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;244:181-9.
18. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991; 266:4244-50.
19. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991 Aug 1;288(2):481-7.

20. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *JBiolChem*. 2013 Sep 13; 288(37):26464-72. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R113.472936>
21. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Aug; 6(8):662-80.
22. Radi R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *AccChemRes*. 2013 Feb 19; 46(2):550-9. <http://dx.doi.org/10.1021/ar300234c>
23. Brito C, Naviliat M, Tiscornia AC, Vuillier F, Gualco G, Dighiero G, et al. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol*. 1999 Mar 15; 162(6):3356-66.
24. Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, Valez V, Zhang H, Kalyanaraman B, et al. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids*. 2007; 32:501-15.
25. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*. 1994 Oct 21; 269(42):26066-75.
26. Fazzari M, Trostchansky A, Schopfer FJ, Salvatore SR, Sanchez-Calvo B, Vitturi D, et al. Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. *PLoS ONE*. 2014; 9(1):e84884. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084884>
27. Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, Radi R. Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Apr 10; 296(6):H1781-92.
28. Tovmasyan A, Carballal S, Ghazaryan R, Melikyan L, Weitner T, Maia CG. Rational design of superoxide dismutase (SOD) mimics: The evaluation of the therapeutic potential of new cationic Mn porphyrins with linear and cyclic substituents. *Inorg Chem*. 2014 Nov 3; 53(21):11467-83. <http://dx.doi.org/10.1021/ic501329p>
29. Murphy MP, Smith RA. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007; 47:629-56.
30. Ferrer-Sueta G, Batinic-Haberle I, Spasojevic I, Fridovich I, Radi R. Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(III) N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants. *Chem Res Toxicol*. 1999 May; 12(5):442-9.
31. Ferrer-Sueta G, Vitturi D, Batinic-Haberle I, Fridovich I, Goldstein S, Czapski G, et al. Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25; 278(30):27432-8.
32. Valez V, Cassina A, Batinic-Haberle I, Kalyanaraman B, Ferrer-Sueta G, Radi R. Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins. *Arch Biochem Biophys*. 2013 Jan 1; 529(1):45-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.10.012>
33. Miquel E, Cassina A, Martinez-Palma L, Souza JM, Bolatto C, Rodriguez-Bottero S, et al. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2014; 70:204-13 <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.019>