

APLICACIONES DE LAS ENZIMAS METALO-ÓXIDORREDUCTASAS EN LA SALUD, LA AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA Y EL SANEAMIENTO AMBIENTAL.

Ahmed Amaury Ruiz Moré¹, <https://orcid.org/0000-0003-1838-4607>, ahmedamaury9@gmail.com

Lidia González Méndez², <http://orcid.org/0000-0003-0583-1738>, lgmendez@nauta.cu

Elena Carvajal Ciomina³, <https://orcid.org/0000-0001-7158-2464>, elena.carvajal@nauta.cu

Universidad de Ciencias Médicas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. Dirección de Ciencia e Innovación Tecnológica, Departamento de Investigaciones Biomédicas.

Autor para la correspondencia: ahmedamaury9@gmail.com

Resumen.

Las metalo-óxidorreductasas encuentran amplias aplicaciones en la sociedad. El reto está en saberlas implementar en pos de un planeta verde. Cuba se haya a la postre en estos aspectos, de ahí la importancia de profundizar en la Enzimología Aplicada de las metalo-óxidorreductasas. Para ello se revisaron 79 citas bibliográficas desde diversos sitios virtuales, y mediante síntesis documental se elabora tal propuesta. Se abordan enzimas como: polifenol oxidasa, peroxidasa vegetal, mieloperoxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, lacasa y ceruloplasmina. Además, se incluyen términos de mucha vigencia como los alimentos funcionales, los biosensores, las nanotecnologías, los biomarcadores de cáncer, la inmovilización de enzimas, y antimicrobianos naturales a base de polifenoles. Sin lugar a dudas, las enzimas metalo-óxidorreductasas deben incluirse en las estrategias de investigación-innovación en un país como el nuestro que pretende acudir a tecnologías limpias y la aplicación de fuentes de energía renovables.

Palabras claves: ÓXIDO-REDUCTASAS, BIOMARCADORES, BIOSENSORES, INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS, CÁNCER, ANTIMICROBIANOS, NANOTECNOLOGÍA, POLIFENOLES

Abstracts.

Metallo-oxidoreductases find wide applications in society. The challenge is to know how to implement them in pursuit of a green planet. Cuba has ultimately been in these aspects, hence the importance of deepening in the Applied Enzymology of metallo-oxidative reductases. For this purpose, 79 bibliographic citations were reviewed from various virtual sites, and by means of documentary synthesis such proposal is elaborated. Enzymes such as: polyphenol oxidase, vegetable peroxidase, myeloperoxidase, catalase, superoxide dismutase, laccase and ceruloplasmin are addressed. In addition, the chapter includes terms of great relevance such as functional foods, biosensors, nanotechnologies, cancer biomarkers, enzyme immobilization and natural polyphenol-based antimicrobials. Undoubtedly, metallo-oxide reductase enzymes should be included in the research-innovation strategies in a country like ours that intends to resort to clean technologies and the application of renewable energy sources.

Keywords: OXIDE REDUCTASE, BIOMARKERS, BIOSENSORS, ENZYME IMMOBILIZATION, CANCER, ANTIMICROBIALS, NANOTECHNOLOGY, POLYPHENOLS

Introducción.

La población mundial afronta nuevos retos frente a los recursos naturales; de ahí que deba gestionar la búsqueda de nuevas fuentes de energía, la producción de alimentos y un aprovechamiento más eficiente de los recursos hídricos.¹

Existe un vínculo muy estrecho entre medio ambiente–alimentación–salud. Las metalo-óxidorreductasas son enzimas que clasifican justamente como elementos tentativos para las investigaciones, pues ellas encuentran cabida en los tres sectores.

El presente trabajo pretende profundizar en las aplicaciones de las enzimas metalo-óxidorreductasas, de modo que se motive su implementación en diversas ramas del quehacer humano. Para ello se revisan diversas fuentes bibliográficas y se realiza un resumen de las mismas.

A continuación se analizan aspectos relevantes de la aplicabilidad de estas enzimas:

- En la agroindustria alimentaria:

La alimentación es uno de los grandes problemas a resolver en el mundo moderno, donde los recursos escasean cada vez más, por el aumento de la población, el cambio climático y otros factores. La agrobiotecnología plantea desafíos como el de alimentar a una población que en futuro se duplicará hasta cerca de 15 000 millones de personas para lo cual se requiere aumentar la productividad agrícola.² Según el proyecto “Millenium” y las prioridades de la FAO, las nuevas tecnologías emergentes como la Biotecnología y la Nanotecnología³ enfatizan la problemática de la alimentación desde la desnutrición, carencia de nutrientes, el sobrepeso y la obesidad, donde la agricultura y todo el sistema alimentario pueden contribuir a disminuir estas situaciones.

En los últimos años se ha reconocido que el cambio climático, la contaminación del aire, el agua, el suelo y la introducción de especies exóticas afectará la sanidad de las plantas.⁴ Los principales daños a estas últimas son causados por plagas que incluyen hongos, bacterias, virus, insectos, nemátodos, viroides y oomicetos, los cuales son la mayor amenaza en la seguridad alimentaria. Se estiman pérdidas del 30 % – 40 % de la producción de los cultivos anualmente.²

La salud del hombre depende en gran medida de la “salud” de sus cultivos, suelos y recursos hidráulicos, de modo que debe abordarse más allá de curar las enfermedades, en integración con todos los elementos que integran el medio ambiente. Estas premisas abren una enorme brecha para enfrentar preventivamente las afectaciones a la salud humana, donde las plantas son un potencial enorme para transformar los problemas relacionados con la alimentación. De

ahí que, tanto instituciones de salud como las vinculadas a la producción de alimentos, directa o indirectamente, deben unificar esfuerzos con enfoques multi- y hasta trans-disciplinarios.

Aparecen así, nuevas técnicas para el diagnóstico de enfermedades de los cultivos y llamativos biosensores para detectar patógenos y contaminantes en los alimentos, lo cual aumenta la seguridad en los cultivos, su procesamiento y conversión en productos de consumo humano. Se emplean incluso biosensores a base de nanopartículas que, en tiempo real y vinculados a GPS monitorean las condiciones del suelo y el estado de los cultivos.²

Algunos biosensores comerciales utilizan enzimas metalo-óxidorreductasas vegetales como la superóxido dismutasa, para evaluar la actividad antioxidante² y la tirosinasa para monitorear la contaminación por compuestos fenólicos.⁵ Además, la enzima lacasa se emplea para monitorear la presencia de flavonoides en alimentos⁶ y otros biosensores llamados “narices electrónicas” se utilizan para analizar compuestos orgánicos volátiles de plantas enfermas y sanas en cultivos como papa y tomate, afectadas por hongos.² De igual manera se incursiona en el empleo de nanopesticidas, cuyas ventajas son insospechadas.⁷

Por otra parte los antimicrobianos vegetales son promisorios en este contexto.⁸ Ciertamente los extractos de plantas son a menudo considerados comestibles basado en su consumo humano tradicional, ricos en metabolitos secundarios con diversidad de estructuras (por ejemplo más de 12000 alcaloides conocidos, 10000 compuestos fenólicos y sobre 25000 diferentes terpenoides). Varios subgrupos de polifenoles antimicrobianos son presentados en lo adelante. Ellos se agrupan en varias familias, como se observa en la Figura 1.

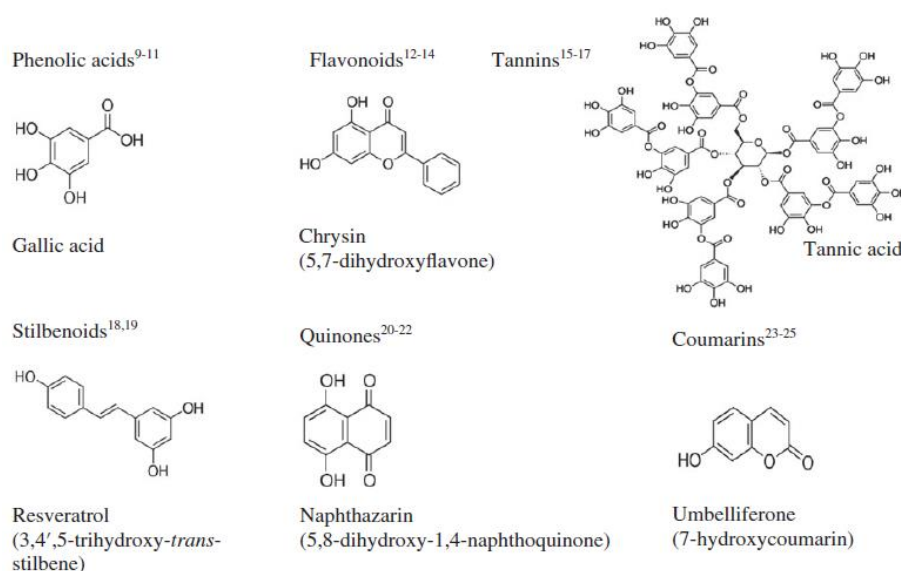


Figura 1. Principales grupos de compuestos fenólicos de plantas con propiedades antimicrobianas: estructuras químicas y ejemplos. Tomado de: Chibane y cols. (2019)⁸

Otro de los aspectos a destacar es el manejo pos-cosecha de los vegetales y frutos, que al continuar su metabolismo, durante la transportación y el almacenamiento se deterioran sus características nutricionales y organolépticas ², lo cual afecta con mucho su demanda. Según

estimaciones de la FAO se pierden actualmente 1300 millones de toneladas de alimentos, casi una tercera parte de los producidos por el hombre, de ahí que el empacado demande igualmente innovaciones^{9,10} con diseños que reducen la descomposición, entre ellos la adición de antioxidantes.

Como bien se apunta, el seguimiento de estos desarrollos y tendencias es esencial;¹¹ donde las enzimas muestran una enorme tentativa para las investigaciones en los vegetales destinados a la alimentación y la industria en general.¹²⁻¹⁵ Juegan un rol fundamental diversas metalo-óxidorreductasas como la superóxido dismutasa, catalasa, peróxidorreductasas, lacasa, polifenol-óxidorreductasas, ascórbico oxidasa y otras como la indolacético oxidasa y la fenilalanina amonio liasa. Estas enzimas participan en el metabolismo de las plantas, donde es común encontrar variedad de rutas metabólicas para la biosíntesis de metabolitos secundarios, en las cuales participan activamente las metalo-óxidorreductasas.¹⁶⁻³¹

Por su parte, los metabolitos secundarios son muy útiles para el desarrollo ontogenético de las plantas y su protección contra agentes estresores del medio (sequia, hiper-iluminación, salinidad) y la defensa contra fitopatógenos (microorganismos como hongos, bacterias y virus). Constituyen además, la base para la producción de fármacos y para la alimentación humana. Se sabe que el consumo de antioxidantes naturales o sintéticos puede reforzar la capacidad antioxidante del organismo. Investigaciones han demostrado que algunos compuestos presentes en las plantas, como los terpenos, flavonoides, betalaínas y las antocianinas poseen propiedades antioxidantes más poderosas que las vitaminas.³²

Las tendencias mundiales en la nutrición y alimentación indican un interés acentuado hacia el consumo de frutas y verduras; lo cual ha conducido a los llamados “alimentos funcionales”, definidos como cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contienen sustancias que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. Entre estos compuestos funcionales destacan los antioxidantes exógenos, los cuales interactúan de forma segura con los radicales libres y ponen fin a su reacción en cadena antes de que dañen moléculas vitales.³³

Uno de los procesos que más afecta a muchos vegetales, y que atenta contra los alimentos funcionales es el pardeamiento enzimático; una alteración química, enzimática en sus primeras etapas, que tiene como sustratos a los compuestos fenólicos a los cuales transforma en estructuras poliméricas y dota de una coloración parda. Se trata de un proceso complejo que puede dividirse en varias etapas, catalizadas todas por la enzima metalo-óxidorreductasa polifenol oxidasa.³⁴

En los animales, incluido el hombre, las metalo-óxidorreductasas juegan diversas funciones, muchas con similitudes a las plantas, otras específicas.

- En la salud animal y humana:

Entre otras metalo-óxidorreductasas encontramos la mieloperoxidasa producida por los neutrófilos en la defensa inmunológica;³⁵⁻³⁸ la ceruloplasmina, una enzima muy curiosa por las características de sus átomos de cobre, su interacción con múltiples proteínas, y sus funciones fisiológicas en el metabolismo del hierro;³⁹⁻⁴³ la catalasa,⁴⁴⁻⁴⁶ y la superóxido dismutasa^{47,48} por sus capacidades de atenuar los efectos del estrés oxidativo.

Además, los niveles de metalo-óxidorreductasas se encuentran alterados en diversas patologías como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus, las enfermedades neurodegenerativas y del tejido conjuntivo y el cáncer. Éste último constituye un problema de salud mundial. En Cuba, en el año 2017 se produjeron alrededor de 25197 defunciones como consecuencia de neoplasias malignas. Un gran porcentaje de ellas correspondieron a tumores de origen epitelial. En primer lugar tráquea, bronquios y pulmón (5720 muertes), seguidos por próstata (3120 muertes). Otras localizaciones más frecuentes del sistema digestivo como intestino, recto, ano, estómago y esófago (4782 fallecimientos), y mama (1519 muertes).⁴⁹ Los datos de incidencia muestran cerca de 45 000 nuevos casos en el 2018.⁵⁰ Estos elevados índices de incidencia y mortalidad justifican nuevos estudios para mejorar la caracterización de los pacientes y selección de tratamientos adecuados para incrementar la respuesta y la supervivencia global con una mejor calidad de vida.

Por ello es una premisa encontrar biomarcadores de cáncer que muestren altas sensibilidad y especificidad,⁵¹ y que permita discriminar los nódulos benignos de los malignos,⁵² pues los que se dispone aún no ofrecen suficiente precisión para hacer tal distinción.⁵³ Las enzimas metalo-óxidorreductasas, empleadas a modo de paneles, podrían ser unas potentes candidatas.

En apoyo al paradigma genético, se han identificado 167 genes sobre-expresados en células iniciadoras de tumores.⁵⁴ Algunos de ellos se activan resultando en una excesiva actividad proliferativa o resistencia a la apoptosis, como los de la ceruloplasmina.⁵⁵ Se han encontrado⁵⁶ además, genes muy activos en la formación de células tumorales como respuesta al menos de uno de los tres estímulos (hipoxia, estrés oxidativo, xenobióticos), entre ellos el de la ceruloplasmina. In vivo, existen nexos muy fuertes entre los tres estímulos, de ahí se halla adoptado un término que los agrupa: estrés celular generalizado.⁵⁷⁻⁶¹ De esta manera se concluyó que existen genes que son suficientes para reprogramar una célula somática normal en una célula madre pluri- y multi-potencial, y son todos activados bajo condiciones de hipoxia,⁶² estrés oxidativo⁶³ y en presencia de xenobióticos.⁶⁴

- En el saneamiento ambiental:

Las metalo-óxidorreductasas también juegan un rol fundamental para la protección del medio ambiente. Éste en ocasiones se encuentra afectado por compuestos fenólicos que confieren al

agua un mal sabor y olor, además de ser muy tóxicos. La contaminación de medios acuosos naturales por presencia de fenoles se produce, principalmente, por el vertido de aguas residuales de industrias de pintura, carbón, insecticidas, fármacos, curtidos y petróleo. La enzima tirosinasa inmovilizada ha sido utilizada en la eliminación de fenoles y la biorremediación, tanto libre como inmovilizada a un soporte, con la consiguiente ventaja de su posible reutilización.⁶⁵ Se ha conseguido la eliminación de naftoles y dihidroxinaftalenos mediante el uso de tirosinasa de champiñón.⁶⁶ Además, se ha descrito la utilización de tirosinasa sin purificar, la cual actúa muy eficazmente en células atrapadas en quitosano.⁶⁷ Por último, se han diseñado agregados de una combinación de tirosinasa y lacasa, dos metalo-oxidoreductasas que actuando de forma conjunta, consiguen eliminar paracetamol eficientemente de muestras de agua que lo contienen.⁶⁸

Pero si importante es eliminar el contaminante, igualmente es su detección, para ello se han diseñado biosensores para la determinación de catecol, basados en tirosinasa inmovilizada.⁶⁹ Además, los biosensores de tirosinasa también son utilizados para la determinación de sustancias inhibitoras de la actividad catalítica de esta enzima, como son los compuestos organofosforados,⁷⁰ el ácido benzoico⁷¹ y el ión fluoruro.⁷²

Además, debido a su efecto inhibitor, se ha llevado a cabo la determinación de sustancias como el ácido benzoico, mediante un biosensor basado en tirosinasa adsorbida sobre fosfato de calcio⁷³ y también el ión Cr (III), mediante un biosensor constituido por un electrodo con tirosinasa atrapada en polipirrol obtenido por electropolimerización.⁷⁴

Se han diseñado además, biosensores con tirosinasa inmovilizada, que permiten determinar mediante voltametría diferencial de pulso, hidroquinona y catecol al mismo tiempo,⁷⁵ de epinefrina;⁷⁶ mediante un método amperométrico, catecol en muestras de té;⁷⁷ fenol, utilizando el electrodo de oxígeno de Clark⁷⁸ y carbamatos, mediante biosensores compuestos por las dos enzimas acopladas: lacasa y tirosinasa.⁷⁹

Conclusiones.

Las metalo-oxidoreductasas tienen amplias aplicaciones a las ciencias biomédicas y biotecnológicas, en sentido general. En nuestro país el estudio de las enzimas se haya limitado, con excepción de las que tradicionalmente se emplean en los laboratorios clínicos, incluso las abordadas desde una perspectiva del desbalance oxidativo no llegan alcanzar sus aplicaciones a las industrias vinculadas con la producción de alimentos y en la protección del medio ambiente. De ahí que sea imperioso facilitar estos conocimientos a profesionales de diversas ramas vinculadas a la Bioquímica de las metalo-oxidoreductasas y la variedad de aplicaciones que estas poseen, de modo que se favorezca la motivación por integrarlos a sus investigaciones y, en esencia, implementarlas a la práctica.

Referencias Bibliográficas

1. The Millennium Project 2011. 2012 State of the Future. Executive summary. Consultado en Agosto, 2018. Disponible en: <http://redbioargentina2013.com.ar/>
2. Nanotecnología en la agricultura. Nanotechnology in agriculture. Dagoberto Castro-Restrepo. Bionatura. Volumen 2 / Número 3. 2017. Disponible en: <http://www.revistabionatura.com>.
3. FAO 2013. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Consultado marzo 25, 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/publications/sofa/es>.
4. Régniere J. Invasive species, climate change and forest health. pp. 27-37. In T. Schlichter y L. Monetes (Eds.). Forest in development: a vital balance. Berlin: Springer; 2012:27-37.
5. Tembe S, Inamdar S, Haram S, Karve M, D'Souza S. Electrochemical biosensor for catechol using agarose-guar gum entrapped tyrosinase. Journal of Biotechnology 2007; 128 (1):80-85.
6. Jarosz A, Ruzgas T, Gorton L. Use of laccase modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. Enzyme and Microbial Technology 2004; 35 (3):238-241.
7. Bergeson L. Nanosilver pesticide products: what does the future hold? Environmental Quality Management 2010;19 (4): 73- 82.
8. Chibane L, Degraeve P, Ferhout H, Bouajila J, Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. Journal of the Science of Food and Agriculture, Wiley 2019; 99(4): 1457-1474.
9. Timothy D. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. Journal of Colloid and Interface Science 2011; 363 (1): 1-24
10. Reynolds G. FDA recommends nanotechnology research, but not labelling. FoodProductionDaily.com. Consultado diciembre 14, 2017.
11. Duvall M, Wyatt A. Regulation of nanotechnology and nanomaterials at EPA and around the world: recent developments and context. Beveridge & Diamond, P.C. 1350 I Street, N.W., Suite 700 Washington, DC 20015; 2011
12. Illanes A, (Ed.). Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Springer-Verlag New York. 2008.
13. Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer U. Biocatalysts and Enzyme Technology, Second Edition. Wiley-Blackwell. 2012.
14. Bisswanger H. Practical Enzymology, Second Edition. Wiley-Blackwell. 2011.
15. Aehle W, (Ed.). Enzymes in Industry: Production and Applications, Third edition. Wiley-VCH. 2007.

16. Borrás I, Fernández S, Arráez D, Palmeros P, Del Val R, Andrade I et al. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products* 2015; 69, 385-394.
17. Damašius J, Venskutonis P, Kaškonienė V, Maruška A. Fast screening of the main phenolic acids with antioxidant properties in common spices using on-line HPLC/UV/DPPH radical scavenging assay. *Analytical Methods* 2014; 6(8), 2774-2779.
18. de Souza V, Pereira P, da Silva T, de Oliveira L, Queiroz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry* 2014; 156, 362-368.
19. Holm D, Petersen L, Klitgaard A, Knudsen P, Jarczynska Z, Nielsen K. Molecular and chemical characterization of the biosynthesis of the 6-MSA-derived meroterpenoid yanuthone D in *Aspergillus niger*. *Chem Biol* 2014; 21(4), 519-529.
20. Martins N, Barros L, Ferreira I. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology* 2016; 48, 1-12.
21. Martins N, Barros L, Henriques M, Silva S, Ferreira I. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products* 2015; 74, 648-670.
22. Moo V, Moo M, Estrada R, Cuevas L, Estrada I, Ortiz E et al. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry* 2015; 166, 17-22.
23. Muñoz A, Alvarado C, Blanco T, Castañeda B, Ruiz J, Alvarado Á. Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2014; 80(4), 287-297.
24. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods* 2015; 18, 820-897.
25. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of molecular sciences* 2015; 16(10), 24673-24706.
26. Sumczynski D, Kotásková E, Družbíková H, Mlcek J. Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and in vitro digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Food Chemistry* 2016; 211, 339-346.
27. Surco F, Valle M, Loyola E, Dueñas M, Santos C. Actividad antioxidante de metabolitos de flavonoides originados por la microflora del intestino humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2016; 82(1), 29-37.
28. Tocci N, Weil T, Perenzoni D, Narduzzi L, Madriñán S, Crockett S et al. Phenolic profile, chemical relationship and antifungal activity of Andean *Hypericum* species. *Industrial Crops and Products* 2018; 112, 32-37.

29. Torrenegra M, Villalobos O, Castellar E, León G, Granados C, Pajaro P et al. Evaluación de la actividad antioxidante de las pulpas de *Rubus glaucus* B, *Vaccinium floribundum* K y *Beta vulgaris* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*; 2016, 21(4), 1-8.
30. Varga E, Bardocz A, Belak A, Maraz A, Boros B, Felinger A et al. Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different thymus extracts. *Thymus* 2015; 63, 3.
31. Vega A, De León J, Reyes S. Determinación del Contenido de Polifenoles Totales, Flavonoides y Actividad Antioxidante de 34 Cafés Comerciales de Panamá. *Información tecnológica* 2017; 28(4), 29-38.
32. Harasym J, Oledzki R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition* 2014; 30: 511-517.
33. Oroian M, Escriche I. Antioxidants characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int* 2015; 74: 10-36.
34. Estudio de las interacciones tirosinasa-sustrato en presencia de nanomateriales. Tesis. Sara Muñoz Pina. Valencia, 2016.
35. Liu W, Zhang Y, Wu Y, Zhang J, Li T, Jiang et al. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid promotes ox-LDL induced senescence of endothelial cells through a mechanism involving β -catenin signaling in hyperlipidemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 467, 859–865.
36. Teng N, Maghzal G, Talib J, Rashid I, Lau A, Stocker R. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep* 2017; 22, 51–73.
37. Singh P, Iqbal N, Sirohi H, Bairagya H, Kaur P, Sharma S et al. Structural basis of activation of mammalian heme peroxidases. *Prog Biophys Mol Biol* 2018; 133, 49–55.
38. Yang H, Biermann M, Brauner J, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation. *Front Immunol* 2016; 7, 302.
39. Stepien K, Guy M. Caeruloplasmin oxidase activity: measurement in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride on a microplate reader. *Annals of Clinical Biochemistry* 2018, Vol. 55(1) 149–157. Disponible en: <http://www.researchgate.net/publication/313460282>.
40. Siotto M, Pasqualetti P, Marano M, Squitti R. Automation of o-dianisidine assay for ceruloplasmin activity analyses: usefulness of investigation in Wilson's disease and in hepatic encephalopathy. *J Neural Transm* 2014.
41. Fleming R, Whitman I, Gittin J. Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hypoxia. *Am J Physiol* 1991; 266:L68-L74.

42. Varfolomeeva E, Semenova E, Sokolov A, Aplin K, Timofeeva K, Vasilyev V et al. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. *Free Radic Res* 2016; 50, 909–919.
43. Sokolov A, Acquasaliente L, Kostevich V, Frasson R, Zakharova E, Pontarollo G et al. Thrombin inhibits the anti-myeloperoxidase and ferroxidase functions of ceruloplasmin: Relevance in rheumatoid arthritis. *Free Radic Biol Med* 2015; 86, 279–294.
44. Olson K, Gao Y, De Leon E, Arif M, Arif F, Arora N et al. Catalase as a sulfide-sulfur oxidoreductase: an ancient (and modern?) regulator of reactive sulfur species. *Redox Biol* 2017;12:325–39.
45. Hussein M. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochemistry* 2018; 19:7.
46. Hussein M, Khabt H. Simple spectrophotometric method for analysis of serum Catalase activity. *J Clin Diagnost Research* 2018; Sep, Vol-12(9): BC13-BC16.
47. Grape J, Oury T, Rabouille C, Siot J, Chang L. Copper Zinc Superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:10405-10409.
48. Fridovich I, Freeman B. Antioxidants defense in the lung. *Ann Rev Physiol* 1986; 48:693-702.
49. Anuario Nacional de Estadística Ministerio de Salud Pública de Cuba, 2017. Disponible en: <https://www.sld.cu/anuncio/2018/04/06/publicado-el-anuario-estadistico-de-salud-2017>.
50. Anuario Nacional de Estadística Ministerio de Salud Pública de Cuba, 2018. Disponible en: <https://www.sld.cu/bvscuba/files/2019/04/anuario-estadistico-de-salud-2018.pdf>
51. Taverna S, Giallombardo M, Gil I. Exosomes isolation and characterization in serum is feasible in non-small cell lung cancer patients: critical analysis of evidence and potential role in clinical practice. *Oncotarget* 2016; 7: 28748-60.
52. Sheervalilou R, Ansarin K, Fekri S. An update on sputum MicroRNAs in lung cancer diagnosis. *Diagn Cytopathol* 2016; 44: 442-9.
53. Callister M, Baldwin D, Akram A. British Thoracic Society guidelines for the investigation and management of pulmonary nodules. *Thorax* 2015; 70(Suppl 2): ii1-54.
54. Efremov Y, Proskurina A, Potter E, Dolgova E, Efremova O, Taranov O et al. Cancer Stem Cells: Emergent Nature of Tumor Emergency. *Front Genet* 2018; 9:544.
55. Fouad Y, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 2017; 7, 1016–1036.
56. Victorino V, Pizzatti L, Michelletti P, Panis C. Oxidative stress, redox signaling and cancer chemoresistance: putting together the pieces of the puzzle. *Curr Med Chem* 2014; 21, 3211–3226.

57. Chekhun V, Lozovska Y, Burlaka A, Lukyanova N, Todor I, Naleskina L. Peculiarities of antioxidant system and iron metabolism in organism during development of tumor resistance to cisplatin. *Exp Oncol* 2014; 36, 196–201.
58. Brandi J, Dalla E, Dando I, Biondani G, Robotti E, Jenkins R et al. Secretome protein signature of human pancreatic cancer stem-like cells. *J Proteomics* 2016; 136, 1–12.
59. López-Iglesias P, Alcaina Y, Tapia N, Sabour D, Arauzo M, Sainz de la Maza D et al. Hypoxia induces pluripotency in primordial germ cells by HIF1 α stabilization and Oct4 deregulation. *Antioxid Redox Signal* 2015; 22, 205–223.
60. Hammoud A, Kirstein N, Mournetas V, Darracq A, Broc S, Blanchard C et al. Murine embryonic stem cell plasticity is regulated through klf5 and maintained by metalloproteinase mmp1 and hypoxia. *PLoS ONE* 2016; 11:e0146281.
61. Bae K, Dai Y, Vieweg J, Siemann D. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am J Cancer Res* 2016; 6, 1078–1088.
62. Seo E, Kim D, Jang I, Choi E, Shin S, Lee S et al. Hypoxia-NOTCH1-SOX2 signaling is important for maintaining cancer stem cells in ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; 7, 55624–55638.
63. Saijo H, Hirohashi Y, Torigoe T, Horibe R, Takaya A, Murai A et al. Plasticity of lung cancer stem-like cells is regulated by the transcription factor HOXA5 that is induced by oxidative stress. *Oncotarget* 2016; 7, 50043–50056.
64. Liu Y, Lu R, Gu J, Chen Y, Zhang X, Zhang L et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 up-regulates stem cell markers in benzo[a]pyrene-induced malignant transformation of BEAS-2B cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016; 45, 241–250.
65. Min K, Park K, Park D, Yoo Y. Overview on the biotechnological production of L-DOPA. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99, 575-584.
66. Kimura Y, Gotoh A, Shinozaki F, Kashiwada A, Yamada K. Removal of naphthols and analogues by the combined use of an oxidoreductase polyphenol oxidase and a biopolymer chitosan from aqueous solutions. *Environ Technol* 2014; 35, 2910-2919.
67. Kampmann M, Boll S, Kossuch J, Bielecki J, Uhl S, Kleiner B et al. Efficient immobilization of mushroom tyrosinase utilizing whole cells from *Agaricus bisporus* and its application for degradation of bisphenol. *A Water Res* 2014; 57, 295-303.
68. Ba S, Haroune L, Cruz-Morató C, Jacquet C, Touahar I, Bellenger J et al. Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Sci Total Environ* 2014; 487, 748-755.

69. Han R, Cui L, Ai S, Yin H, Liu X, Qiu Y. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrotalcite-like compounds film for the determination of polyphenols. *J Solid State Electrochem* 2012; 16, 449-456.
70. Vidal J, Esteban S, Gil J, Castillo J. A comparative study of immobilization of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide. *Talanta* 2006;68, 791799.
71. Kochana J, Kozak J, Skrobisz A, Wozniakiewicz M. Tyrosinase biosensor for benzoic acid inhibition-based determination with the use of a flow-batch monosegmented sequential injection system. *Talanta* 2012; 96, 147-152.
72. Asav E, Yorganci E, Akyilmaz E. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta* 2009; 78, 553-556.
73. Sánchez M, López B. Inhibition biosensor based on calcium phosphate materials for detection of benzoic acid in aqueous and organic media. *Electroanalysis* 2011;23, 264-271.
74. Domínguez M, Lomillo A, Arcos M. Optimisation procedure for the inhibitive determination of chromium(III) using an amperometric tyrosinase biosensor. *Anal. Chim. Acta* 2004; 521, 215-221.
75. Tang L, Zhou Y, Zeng G, Li Z, Liu Y, Zhang Y et al. A tyrosinase biosensor based on ordered mesoporous carbon-Au/L-lysine/Au nanoparticles for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Analyst* 2013; 138, 3552-3560.
76. Apetrei I, Apetrei C. Biosensor based on tyrosinase immobilized on a single-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for detection of epinephrine. *Int J Nanomedicine* 2013; 8, 4391-4398.
77. Karim M, Lee J, Lee H. Amperometric detection of catechol using tyrosinase modified electrodes enhanced by the layer-by-layer assembly of gold nanocubes and polyelectrolytes. *Biosens Bioelectron* 2014; 61, 147-151.
78. Silva L, de Mello A, Salgado A. Phenol determination by an amperométrico biosensor based on lyophilized mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue. *Environ Technol* 2014; 35, 1012-1017.
79. Oliveira T, Barroso M, Morais S, Araújo M, Freire C, de Lima P et al. Sensitive bi-enzymatic biosensor based on polyphenoloxidases-gold nanoparticles-chitosan hybrid film-graphene doped carbon paste electrode for carbamates detection. *Bioelectrochemistry* 2014; 98, 20-29.