

EXPOSICIÓN A XENOBIÓTICOS Y CARCINOGENESIS: OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO SUPERÓXIDO DISMUTASA PARA MEDIR SU EFECTO.

Lidia González Méndez¹, <http://orcid.org/0000-0003-0583-1738>, lgmendez@nauta.cu
Ahmed Amaury Ruiz Moré², <https://orcid.org/0000-0003-1838-4607>, ahmedamaury9@gmail.com
Isabel De Armas Fernández³, <https://orcid.org/0000-0003-0014-6918> isabeldaf@infomed.sld.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.

El vertimiento de medicamentos por la industria, los centros hospitalarios y los hogares, constituye una fuente de contaminación. Estos compuestos se integran al metabolismo y traen consigo alteraciones en la producción de especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo. Esta constituye la base para la carcinogénesis, de ahí que sea importante contar con procedimientos para evaluar dichas alteraciones. Una enzima de gran valor para el diagnóstico y pronóstico de estrés oxidativo es la Superóxido Dismutasa. Con la finalidad de profundizar acerca de los métodos para estimar la mencionada enzima y la generación de xenobióticos y sus efectos contaminantes, se realiza una minuciosa revisión bibliográfica de 32 artículos científicos. Se pudo constatar la variedad de métodos descritos para determinar la enzima Superóxido Dismutasa y la diversidad de fuentes generadoras de estos compuestos dañinos al entorno. Se resalta un ensayo loable de implementar por sus bajos costos relativos y la sencillez de ejecución: el que emplea la hematoxilina, con el inconveniente de su acelerada autooxidación en las condiciones de reacción. Esto fue resuelto mediante un estudio exploratorio realizado, donde se implementa el ácido fosfórico como antioxidante, con resultados promisorios sobre la estabilidad, gracias a lo cual se logra optimizar el empleo de la hematoxilina, un producto importado.

Palabras claves: SUPERÓXIDO DISMUTASA, XENOBIÓTICOS, CÁNCER, CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.

Abstract.

The dumping of drugs by industry, hospitals and homes constitutes a source of contamination. These compounds are integrated into the metabolism and bring about alterations in the production of reactive oxygen species and oxidative stress. This constitutes the basis for carcinogenesis, hence it is important to have procedures to evaluate these alterations. An enzyme of great value for the diagnosis and prognosis of oxidative stress is Superoxide Dismutase. In order to deepen about the methods to estimate the mentioned enzyme and the generation of xenobiotics and their polluting effects, a thorough bibliographic review of 32 scientific articles was carried out. The variety of methods described to determine the enzyme Superoxide Dismutase and the diversity of generating sources of these harmful compounds to the environment could be verified. A laudable trial to implement is

highlighted for its low relative costs and simplicity of execution: one that uses hematoxylin, with the disadvantage of its accelerated autoxidation in reaction conditions. This was solved through an exploratory study carried out, where phosphoric acid is implemented as an antioxidant, with promising results on stability, thanks to which it is possible to optimize the use of hematoxylin, an imported product.

Keywords: SUPEROXIDE DISMUTASE, XENOBIOTICS, CANCER, ENVIRONMENTAL POLLUTION.

Introducción

Las enzimas han invadido todos los espacios de la producción de bienes materiales y servicios, incluyendo la salud y las investigaciones. Una de sus aplicaciones más llamativas es como biomarcadores de cáncer. Los biomarcadores en Oncología pueden ser utilizados en la prevención, detección tumoral y recaída, diagnóstico, predicción de la evolución y pronóstico, tratamiento individualizado e inclusión en Ensayos Clínicos¹. Estos biomarcadores deberán ser fácil de obtener y de medir, no muy caros, no invasivos, precisos y que muestren alta sensibilidad y elevada especificidad ². Por otro lado, la tendencia actual va encaminada a desarrollar la “Medicina de Precisión”, la cual pretende identificar la mejor estrategia terapéutica para cada paciente³. Aunque existen decenas de marcadores que están siendo estudiados en su mayoría tienen el inconveniente de verse alterados en patologías benignas o fisiológicas del ser humano ⁴.

La Superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que cada vez aparece con mayor frecuencia en los estudios oncológicos,^{5,6} de ahí que se decida incluirla en las investigaciones de nuestro medio, pero se requieren procedimientos analíticos fiables y baratos para su cuantificación.

Un método barato y fácil de ejecutar es el que emplea la hematoxilina, pero cuenta con el inconveniente de una rápida autoxidación luego de prepararse para su uso. Incluso kits diagnóstico de amplio uso hacen referencia de ello. Por todo lo anterior, se ha identificado el desecho de grandes cantidades relativas del mismo y la premura en la ejecución de cada ensayo de SOD.

El presente trabajo se divide en dos acápites: una revisión inicial acerca de las alteraciones de la enzima superóxido dismutasa durante el estrés generado por la exposición a xenobióticos ambientales, y un breve análisis experimental del ensayo de la mencionada enzima, empleando hematoxilina.

1. Estrés oxidativo en individuos expuestos a xenobióticos ambientales y la enzima SOD.

Los avances en el conocimiento de agentes epigenéticos, como son los xenobióticos, nos permiten conocer con mayor amplitud los procesos de deterioro celular, fisiológico, metabólico y sistémico sobre la vida en el planeta⁷.

Los xenobióticos interactúan con el ambiente y el hombre, bioacumulándose en los organismos y biomagnificándose en la cadena trófica. Cuando los xenobióticos entran en contacto con el organismo, se efectúa el mecanismo de adsorción, distribución, metabolismo y excreción, afectando diferentes órganos en su paso, dando lugar a los procesos de toxicocinética y toxicodinamia⁸. Entre los xenobióticos existentes, se pueden resaltar el material particulado, los metales pesados, compuestos orgánicos volátiles, los hidrocarburos, plaguicidas, bifenilos policlorados y las dioxinas y furanos; ocasionando diferentes impactos al ambiente y a la salud de las personas, lo cual depende de la concentración, tiempo de exposición y naturaleza química de cada uno⁸.

El conocer cómo ocurren las interacciones de los xenobióticos, su mecanismo de transporte, cómo ingresan a los organismos, las fuentes que los originan, su naturaleza fisicoquímica y cómo se comportan, puede ayudar a prevenir, controlar, mitigar o compensar los impactos negativos que dichas sustancias ocasionan a la salud de las personas y a los ecosistemas⁸.

1.1. Contaminación del medio ambiente y generación de xenobióticos exógenos.

Los xenobióticos son considerados como todas aquellas sustancias que no forman parte de la composición del organismo, pero que son capaces incorporarse a las rutas metabólicas para su procesamiento. Se trata de compuestos de naturaleza química (fármacos, cosméticos, aditivos alimenticios, pesticidas, contaminantes, etc.); algunos otros son de origen natural (micotoxinas o alcaloides). Por lo general son compuestos de naturaleza lipofílica por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, acceder al interior de las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico⁹. Figura

1.

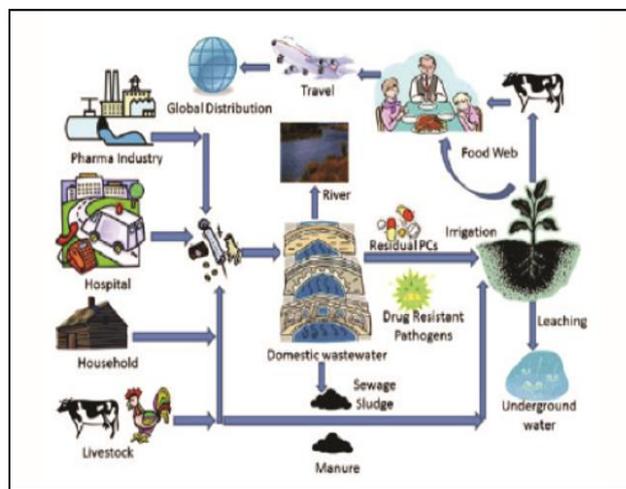


Figura 1: Posibles fuentes y caminos de los compuestos farmacéuticos, sus productos de transformación, y microbios resistentes a fármacos en el ambiente. Fuente: Rehman et al., 2015.

Es así que en los últimos años se ha puesto especial atención sobre las consecuencias de la exposición de los organismos a este tipo de sustancias caracterizadas como desorganizadores endócrinos (EDC, endocrine disrupting chemicals) presentes en el ambiente y capaces de interferir con las funciones normales del sistema endocrino. Los disruptores endocrinos representan muy bien este escenario tóxico tan sutil, donde las consecuencias no las sufren solamente quienes lo habitan, sino algo mucho más dramático en su peligrosidad: su descendencia, las generaciones por venir¹⁰.

En el caso de los seres humanos, su salud se ve muy comprometida al haberse señalado a estos contaminantes como inductores de múltiples patologías, incluyendo el cáncer¹¹.



Figura 2 Clasificación de los Disruptores endocrinos según su origen. Fuente: Arvelo 2017.

Dado que estos productos han sido diseñados para alterar las funciones fisiológicas en humanos con el objetivo de sanar diferentes patologías, de la misma forma pueden afectar a los organismos acuáticos “no blancos”. De este modo, pueden actuar como desorganizadores endocrinos y afectar las funciones de distintas glándulas endocrinas, ya sea por acción directa o mediante interferencia en alguna de las vías descritas para las hormonas que sintetizan¹¹.

Ciertos estudios ambientales han despertado una importante alerta mundial sobre la interacción de varios fármacos entre sí. Cuando una persona se enferma ingiere fármacos, este después de expulsado a través de la orina y las heces las cuales llegarán a las aguas residuales y luego a ríos o mares, sin embargo el deficiente tratamiento depurador que sobre estas realizan algunas plantas depuradoras hace que los residuales farmacológicos no puedan ser desaparecidos del todo produciéndose la contaminación¹¹.

Entre los agentes contaminantes se encuentran los plaguicidas organoclorados, donde el heptacloro y su metabolito, el epóxido de heptacloro, con evidencias de daños genéticos y metabólicos⁷.

En los últimos años se ha demostrado que los efluentes cloacales colectan no sólo los desechos fisiológicos provenientes de esas poblaciones, sino también los metabolitos de los fármacos que se consumen, los productos relacionados con el cuidado personal, los productos de limpieza, los plaguicidas, los herbicidas, etc. Todos estos residuos se vuelcan, tratados o no, en los sistemas acuáticos superficiales próximos¹².

Se ha conseguido detectar xenobióticos en el mar en tejidos u otras matrices de delfines indican que una exposición crónica o aguda a dichos compuestos (ibuprofeno, ketoprofeno, aspirina, cafeína o metales pesados como el Hg, Cd, e el As) producen alteraciones en la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de los delfines¹³.

Las especies acuáticas están expuestas a tóxicos ambientales provenientes de fuentes diversas como descargas industriales, efluentes urbanos y residuos de plaguicidas. Como consecuencia y, a pesar de no ser evidente en su morfología, las plantas acuáticas sufren efectos subletales, que de ser crónicos, pueden generar disminución de la diversidad genética de las poblaciones y desequilibrio ecológico. Los estudios ecotoxicológicos actuales incluyen el análisis de biomarcadores de la contaminación, que son cambios a nivel molecular, fisiológico y bioquímico, entre otros, y que incluyen los sistemas enzimáticos de biotransformación y otros vinculados al efecto de estrés oxidativo. Estos biomarcadores son conocidos también como señales de alarma temprana debido a que al estudiarse en ambientes naturales pueden evidenciar estadios tempranos de contaminación¹⁴.

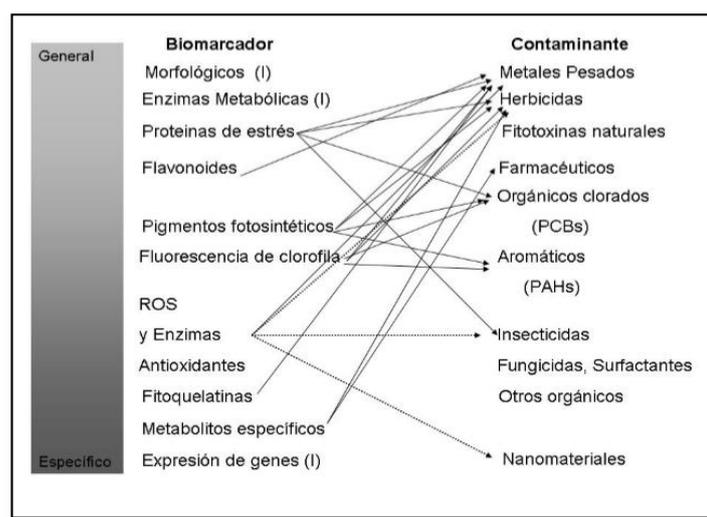


Figura 2: Esquema de los biomarcadores vinculados a diferentes contaminantes. Las líneas enteras indican una asociación fuerte, y las punteadas débiles. ROS: especies reactivas del oxígeno. (I): el biomarcador es

apropiado potencialmente para todos los tipos de contaminantes. Adaptado y modificado de Brain y Cedergreen, 2009.

1.2. Efecto de los xenobióticos exógenos sobre la generación de especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidativo

Los xenobióticos exógenos desencadenan estrés oxidativo. En este sentido, las células malignas se caracterizan por generar radicales libres favoreciendo el desarrollo de procesos relacionados con la supervivencia, proliferación, invasión y metástasis. Así mismo, existen diversos sistemas antioxidantes para la eliminación de ERO, que son alterados por procesos subyacentes a la malignización celular. No obstante, el cáncer puede presentar un comportamiento dual caracterizado por un predominio de actividad prooxidante o antioxidante en la célula tumoral, en dependencia de la etapa de progresión de la enfermedad. En consecuencia, varios de los esfuerzos terapéuticos se han dirigido a la promoción o inhibición de componentes oxidantes y antioxidantes, y por lo tanto, modular el efecto de las ERO en el microambiente tumoral¹⁵.

Diversas investigaciones han permitido afirmar que el papel del estrés oxidativo en la biología del cáncer es de un comportamiento dual, caracterizado por un predominio de actividad prooxidante o antioxidante en la célula tumoral, que es dependiente de la etapa de progresión de la enfermedad. Es por ello, que gran parte de la terapéutica se ha enfocado a direccionar el potencial tratamiento de acuerdo a si se encuentra en etapas tempranas o en un estadio más avanzado, apuntando a modular el efecto de las ERO en la proliferación celular y la inducción de apoptosis, respectivamente. En este contexto, es preciso mencionar a la terapia antioxidante, la cual ha sido un importante pilar en el manejo temprano del cáncer durante las últimas décadas, por el efecto de las ERO en la promoción de la tumorigenesis¹⁵.

1.3. Enzima Superóxido Dismutasa

La superóxido dismutasa (EC: 1.15.1.1) es una enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido O_2^- en una molécula de oxígeno y en peróxido de hidrogeno. El anión superóxido es un producto colateral del metabolismo del oxígeno y si su producción no es regulada causa daño celular. El peróxido de hidrogeno también causa daño celular y el mismo es degradado por otras enzimas como la catalasa. La SOD es una defensa muy importante contra el estrés oxidativo en casi toda la célula expuesta al oxígeno.

La actividad de esta enzima fue descubierta en 1963 por Fridovich y McCord¹⁶ Anteriormente las SODs fueron conocidas como un grupo de metaloproteínas, con funciones desconocidas, por ejemplo la CuZnSOD se conocía como eritrocupreina, hemocupreina o citocupreina. Hay 3 familias de la SOD, teniendo en cuenta su plegamiento y los cofactores metálicos, la Cu/Zn que se une tanto al cobre como al zinc; el tipo Fe y Mn que se unen al hierro o al manganeso

y el tipo Ni que se une al níquel ¹⁷. La SOD está presente en toda la escala filogenética. Así, la SOD Cu-Zn se encuentra en el citosol de todas las células eucariotas contienen este tipo de SOD; es un homodímero de peso molecular 32,500. Es una estructura enroscada de 8 cadenas en β barril., con un sitio activo adherido entre el barril y la superficie de 2 bucles. Las 2 subunidades están fuertemente unidas mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. El cobre y el zinc están unidos a 6 cadenas laterales de histidinas y a una de un aspartato, una de las histidinas sirve de puente entre dos metales ¹⁸.

La SOD Fe-Mn están en los procariontes y protistas, en las mitocondria y los cloroplastos. Pueden existir en algunas bacterias la forma Fe-SOD, en otras Mn-SOD, presentan su estructura tridimensional basada en alfa hélices. Son en ocasiones dímeros pero pueden presentarse en ocasiones como un tetrámero

La Mg-SOD presente en casi todas las mitocondrias y muchas bacterias. Los iones de manganeso se unen a 3 cadenas laterales de histidinas y un aspartato, así como a una molécula de agua o un ligando con grupo hidroxilo en dependencia del estado de oxidación del Mn ¹⁹.

La forma con níquel está presente en los procariontes, tiene una estructura hexagonal formada por un manojito de 4 hélices dextrógiras, cada una contiene un grupo amino terminal que queda al ion Ni.

En el humano y todos los mamíferos se presentan 3 formas la SOD 1 en el citoplasma, SOD2 en la mitocondria y la SOD3 es extracelular. La SOD1 es un dímero, mientras que la SOD2 y SOD3 son tetrámeros. La SOD1 y la SOD3 contienen cobre y zinc mientras que la SOD2 tiene manganeso en su centro activo. Los genes que codifican estas enzimas están localizados en el cromosoma 21, 6 y 4 respectivamente

Por la importancia de esta enzima se han desarrollado numerosos métodos que permiten su determinación, ^{16,20-23} los cuales serán ilustrados a continuación.

1.4. Métodos para determinar actividad enzimática SOD

La medida de la actividad de SOD presenta un gran problema, poco frecuente en ensayos enzimáticos habituales, derivado de la inestabilidad intrínseca en medios acuosos de su sustrato, el radical superóxido. Las determinaciones de la actividad de SOD se han tenido que apoyar en variaciones de concentraciones constantes de radical superóxido, catalizadas por la enzima. Así, se han descrito una variedad de ensayos espectrofotométricos. Una categoría de estos ensayos diseñados comúnmente para cuantificar la actividad SOD, precisan de dos componentes: un generador de radical superóxido y un detector del mismo

El generador produce el radical superóxido a una velocidad controlada constante. En ausencia de SOD, el radical superóxido se acumula hasta llegar a una concentración tal que la velocidad de reacción con el detector se iguale con la velocidad de producción, consiguiéndose este estado de equilibrio en más o menos un segundo. Si la SOD está presente, compite con el detector por el radical superóxido, produciéndose una disminución del radical superóxido captado por el detector, manifestándose ésta en una inhibición del nivel de detección.

Entre los generadores de superóxido más empleados están la xantina oxidasa,¹⁶ y la oxidación fotoquímica de sustratos reducidos²⁰. Como detectores se emplean el citocromo c,¹⁶ la hidroxilamina²⁵ y el nitroblue tetrazolium (NBT)²⁰.

En estos ensayos la actividad SOD es cuantificada determinando la capacidad de la enzima de competir con los detectores del anión superóxido. Generalmente requiere el uso de una o más proteínas.

En contraste, los ensayos de autooxidación se pueden implementar, en los cuales la especie oxidante tiene doble función, ser a la vez una fuente de superóxido y el detector para el mismo. Los ensayos basados en la auto-oxidación del pirogalol,^{22,26} hidroxilamina²⁷, 6-hidroxidopamina,²⁸ epinefrina²⁹ y hematoxilina²³ son simples de implementar, e involucran pocos componentes en la reacción, y son fácilmente monitoreados en la región visible del espectro de absorción luminosa.

Una desventaja de los ensayos de autooxidación es que la mayoría de ellos pueden ser llevados a cabo a altos pH, donde la actividad específica de las Mn y Fe-SOD son bajas³⁰. Solo el ensayo de 6-hidroxidopamina es aplicable a valores de pH en el rango fisiológico²⁸. Empleando KCN y H₂O₂, inhibidores altamente específicos, se logra diferenciar la influencia a la actividad SOD total, de cada una de las isoenzimas de la SOD; así, cuando se emplea KCN y H₂O₂ se determina la variante Cu/Zn-SOD; si sólo se emplea H₂O₂ la Fe-SOD, en cambio la Mn-SOD es resistente a ambos inhibidores.

1.4.1. Ensayo de la enzima SOD por inhibición de la auto-oxidación de la hematoxilina

Un método loable de ser aplicado para la medición de la actividad SOD en pacientes expuestos a xenobióticos exógenos es el de inhibición de la autooxidación de la hematoxilina. Este se basa en la transformación de la hematoxilina en su producto oxidado por dos electrones, la hemateína. El ensayo es sensible, simple y barato. El producto de la reacción, la hemateína, es relativamente estable y tiene un máximo de absorción y un coeficiente de extinción similar a aquellos "barrenderos" de superóxido, como la citocromo c. la reacción es inhibida por SOD y puede ser implementado en el rango de pH fisiológico de 6.8-7.8 donde

inhibe en un 90-95 % la SOD. En adición, a valores de pH por encima de 8.1 la reacción de autoxidación es acelerada por sumar SOD y la reacción se convierte en un ensayo positivo para la enzima, similar en principio a los ensayos de SOD basados en la oxidación fotoquímica y enzimática de la dianisidina^{31,32}.

La hematoxilina es un producto natural que se extrae del centro del árbol *Haematoxylon campechianum* y es usada para la tinción de los tejidos en histología y patología. Es un colorante biológico, además es un indicador ácido base, por debajo de pH 6 es de color amarillo, entre 6 y 7 su color se convierte en violeta y de 7 a 10 su coloración va pasando a roja. Su peso molecular es de 302.282 g/mol.

La hematoxilina reacciona con el oxígeno y otros agentes oxidantes y produce la hemateína. Esta tiene una estructura similar a la hematoxilina determinada por análisis MNR y similar peso molecular. El cambio en la estructura produce un cambio intenso en la coloración de una solución casi incolora a una de color rojo marrón. Esta reacción ocurre muy rápidamente y se puede seguir su marcha ya que la formación de la hemateína puede ser medida espectrofotométricamente a 560 nm.

La hematoxilina se ha empleado para la medición de la actividad de la SOD. En presencia de ésta última se inhibe la autoxidación de la hematoxilina, lo cual es fácil de monitorear espectrofotométricamente debido a las variaciones en la coloración.

Una de las limitaciones del empleo de la hematoxilina como sustrato para la autoxidación es su inestabilidad temporal en las condiciones del ensayo (diluida en buffer fosfato 50 mM, pH 7.5, 0.1 mM EDTA; 25°C), pues una vez preparada comienza su autoxidación progresivamente, lo cual limita el empleo del preparado a unos pocos minutos.

En un estudio exploratorio (piloto) realizado por el grupo inNOVA_{cen} de la Universidad Médica de Villa Clara se establecieron las bases para la actual investigación. Este grupo constata que la hematoxilina disuelta en ácido fosfórico es estable al menos durante 18 horas, mientras la preparada convencionalmente en buffer fosfato, comienza la autoxidación gradualmente, donde alcanza una coloración que va del amarillo tenue (propio de la hematoxilina) al naranja, y a partir de los 8 minutos comienza a mostrar color rosado. Esta variación de colores se corresponde con la formación de hemateína, el producto de oxidación de la hematoxilina, lo cual va excluyendo dicha disolución para la realización del ensayo. Se hizo pertinente realizar el seguimiento de la estabilidad temporal a 560 nm para corroborar los cambios visuales. Ello requirió un estudio de muestras pareadas empleando hematoxilina en ácido fosfórico 350 mM, lo cual no evidencia diferencias significativas cuando el diluyente era el buffer fosfato recomendado, lo cual apunta a una efectividad en el empleo de ácido

fosfórico para inhibir la autoxidación de la hematoxilina en el reactivo de trabajo y extender así el empleo del reactivo y la optimización de su consumo y del tiempo.

Conclusiones

La contaminación ambiental afecta en gran medida las poblaciones humanas, en especial aquellos lugares donde no se controla el vertimiento de medicamentos como hospitales, industrias farmacéuticas y los hogares. Estos desechos provocan alteraciones en el balance oxidativo con alteraciones en la enzima Superóxido Dismutasa; de ahí que sus niveles permitan evaluar los daños por la exposición a xenobióticos ambientales. Varios métodos se han ideado para la cuantificación de esta enzima; el que emplea la autoxidación de la hematoxilina muestra sus ventajas por su sencillez y abaratamiento. Un inconveniente de éste método es la relativamente rápida autoxidación de la hematoxilina una vez preparada, aspecto que se logra mejorar mediante un estudio piloto donde se emplea como antioxidante el ácido fosfórico. De ésta manera se logra la optimización del empleo del reactivo.

Referencias bibliográficas

1. Org.uy. [consultado el 21 de abril de 2021]. Disponible en: https://www.medicinainterna.org.uy/wpcontent/uploads/2016/06/Rumi_Sup_03_Noviembre2016.pdf.
2. Taverna S, Giallombardo M, Gil-Bazo 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.
3. González JL. Actualización en Biomarcadores Predictores de respuesta a fármacos La visión del Oncólogo. Fundación Madrileña. XIII" Update in surgical pathology". Madrid 2017 Nov 30 – Dic 1.
4. Olivares M, Pereyra C. Marcadores tumorales y su valor en ginecología. *Cienc Salud*. 2020;4(1):27–47.
5. Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2019, Article ID 1279250, 29 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>

6. Gopal K, Gupta N, Zhang H, Alshareef A, Alqahtani H, Bigras G et al. Oxidative stress induces the acquisition of cancer stem-like phenotype in breast cancer detectable by using a Sox2 regulatory region-2(SRR2) reporter. *Oncotarget* 2016; 7, 3111–3127.
7. Prado MP, Martínez A. Daños ecológicos y sanitarios en el ambiente y en los alimentos por la presencia de heptacloro. *Rev Salud Anim.* 2019 Jul-Ago; 41(2): 2. La Habana Epub 01-Ago-2019.
8. García CL. Interacciones tóxicas entre contaminantes ambientales y el hombre. *Notas De Campus.* 2021 (1). <https://doi.org/10.22490/notas.4286>
9. Roldán E. Introducción a la toxicología. UNAM, FES Zaragoza. ISBN: 978-607-02-8172; 2016. 12 p.
10. Lo Nostro. FL. Revisando conceptos: Viejos contaminantes, nuevas preocupaciones. *Ciencia e investigación.* 2017;67(2):28.
11. Arvelo F, Sojo F. Cotte C. Contaminación ambiental y salud. Los disruptores endocrinos. Una visión general. *Revista Facultad de Farmacia.* 2017;80(1 y 2): 131.
12. Carriquiriborde P., Somoza GM. ¿Representan nuestros efluentes cloacales un riesgo para los ecosistemas acuáticos y la salud?. *Ciencia e investigación.* 2015;65(2):22.
13. Benavent MF. Caracterización de la función inmunitaria y plaquetaria en mamíferos marinos y alteraciones inducidas por el estrés, patologías o contaminantes medioambientales. Universidad de Valencia; Jun 2021. Tesis Doctoral.
14. Menone M L. Encubridoras por naturaleza: las plantas acuáticas ocultan los secretos de la contaminación. *Ciencia e investigación.* 2015;65(2):28
15. Crespo G, Di Toro L, Valdebuena D, Pérez J, Díaz M, Souki A, Cano C, Salazar J. Estrés oxidativo y su papel en el Cáncer: Una perspectiva Molecular. *Ciencia e Innovación en Salud.* 2020;97: 383-397 DOI 10.17081/innosa.97
16. McCord, F.I., The activity of Superoxide Dismutase in studying Free Radical Reaction *J. Biological Chemistry.* 1969. 244(22): p. 6056-6063.
17. Richardson J, T.K., Rubin BH, Richardson DC Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 1975. 72(4): p. 1349-53.
18. Tainer JA, G.E., Richardson JS, Richardson DC. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature,* 1983. 306(5940): p. 284-7.
19. Borgstahl GE, P.H., Hickey MJ, Beyer WF, Hallewell RA, Tainer JA The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell.* , 1992. 71(1): p. 107-18.

20. Beauchamp C , F.I., Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1971. 44(1,): p. 276-287.
21. MARKLUND S, M.G., Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase *Eur. J. Biochem.* , 1974. 47: p. 469-474
22. Paoletti F, A.D., Mocali A, Caparrini A., A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal Biochem*, 1986 154(2): p. 536-41.
23. Martin JP Jr, D.M., Sugarman E., Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1987 255(2): p. 329-36.
24. McCord, J.M., Crapo, J.L. y Fridovich, I.: Superoxide dismutase assay: A review of methodology, En "Superoxide and superoxide dismutases" Edits. Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, pp 11-17. Academic press, New York, 1977.
25. Elstner E, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride. *Anal. Biochem.* 1976; 70:616-620.
26. Marklund S. *CRC Handbook of Oxygen Radical Research in Greenwald R., Ed.*, CRC Press, Boca Raton, FL. 1985 pp. 243-247.
27. Kono Y. Generation of superoxide radical during autoxidación of hydroxylamine and assay for superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1978:186,189-195.
28. Heikkela RE, Cabbat FS. A sensitive assay for superoxide dismutase based of 6-hydroxydopamine. *Anal. Biochem* 1976; 75:356-362.
29. Forman HJ, and Fridovich, I. Cumulated Index Medicus. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973;158,396-400.
30. Misra HP, Fridovich I. Superoxide dismutase: A Photochemical Augmentation. *Arch. Biochem Biophys.* 1977; 181:308-312.
31. Misra HP., Fridovich I. Superoxide dismutase: positive spectrophotometric assays. *Anal. Biochem.* 1977; 79:553-560.
32. Laura Yamire Esquivel Hernández. Participación de la enzima superóxido dismutasa y la producción del peróxido de hidrógeno en la tolerancia al aluminio de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. Tesis de Maestría. Mérida, Yucatán, México. 2016.