

ENZIMOLOGÍA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA APLICADA A LA ONCOLOGÍA Y A LA CONTAMINACIÓN POR XENOBIÓTICOS.

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 Ciomina¹, <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 especies reactivas del oxígeno tienen un gran vínculo con la carcinogénesis y la metástasis. Sus concentraciones suelen alterarse por exposición a xenobióticos generados por desechos de la industria química y farmacéutica, aunque también domésticos. Como parte de la respuesta defensiva antioxidante se modifica la actividad de la enzima Superóxido dismutasa. Para profundizar en estos aspectos, se realiza una exhaustiva revisión bibliográfica y se analizan algunos aspectos analíticos del método de inhibición de la autoxidación de la hematoxilina, para estimar la actividad de la mencionada enzima. Es un procedimiento sencillo de ejecutar, con el inconveniente único que el reactivo de trabajo se oxida con mucha facilidad e imposibilita extender el ensayo a mayor cantidad de muestras. Para emprender la solución se propone un diseño de experimentos donde se evalúa el efecto del ácido fosfórico a diferentes concentraciones, para el análisis de la autoxidación del reactivo, tanto en ausencia como en presencia de la enzima Superóxido dismutasa. Previo estudio exploratorio, el empleo del ácido fosfórico como antioxidante parece ser promisorio pues no se modifican ni el pH del medio de reacción, ni los resultados de la actividad enzimática.

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

Abstract.

Reactive oxygen species have a strong link with carcinogenesis and metastasis. Their concentrations are usually altered by exposure to xenobiotics generated by chemical and pharmaceutical industry wastes, although also domestic. As part of the antioxidant defensive response, the activity of the enzyme superoxide dismutase is modified. In order to deepen in these aspects, an exhaustive bibliographic review is carried out and some analytical aspects of the hematoxylin autoxidation inhibition method to estimate the activity of the mentioned

enzyme are analyzed. It is a simple procedure to perform, with the only drawback that the working reagent oxidizes very easily and makes it impossible to extend the assay to a larger number of samples. To undertake the solution, an experimental design is proposed to evaluate the effect of phosphoric acid at different concentrations, for the analysis of the autoxidation of the reagent, both in the absence and in the presence of the enzyme Superoxide dismutase. After an exploratory study, the use of phosphoric acid as an antioxidant seems to be promising since neither the pH of the reaction medium nor the results of the enzymatic activity are modified.

Keywords: SUPEROXIDE DISMUTASE, XENOBIOTICS, CANCER, ENVIRONMENTAL POLLUTION

Introducción.

La Superóxido dismutasa (SOD) es una enzima factible de aplicar en los estudios de cáncer;^{1,2} sus niveles se modifican en diversas situaciones patológicas que favorecen su génesis y hasta su progresión hacia otros sitios.

En relación con el cáncer, existe un grupo de sustancias capaces de integrarse al metabolismo, que constituyen tóxicos al organismo, y lo inducen.³ Estas son conocidas como xenobióticos y es de gran utilidad conocer cómo ingresan a los organismos, las fuentes que los originan, su naturaleza fisicoquímica y cómo se comportan, lo cual puede ayudar a prevenir, controlar, mitigar o compensar los impactos negativos que dichas sustancias ocasionan a la salud de las personas y a los ecosistemas.⁴

Para la implementación de la SOD a la Enzimología Clínica relacionada con el cáncer es necesario contar con un sistema analítico barato y fácil de ejecutar, pero que sea fiable. Uno que cumple con tales requisitos es el método que emplea la hematoxilina.⁵

Para profundizar en estos aspectos, incluyendo los xenobióticos, se realiza una exhaustiva revisión bibliográfica. Se ofrece además un método para estimar la actividad SOD, factible de implementar en los laboratorios de investigación. Tal vez en un futuro próximo, y sería la mayor pretensión, la determinación de SOD pueda escalarse como un método de rutina en los laboratorios clínicos de nuestro país.

1. 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 hidrógeno. El anión superóxido es un producto colateral del metabolismo del oxígeno y si su producción no es

regulada causa daño celular. El peróxido de hidrógeno 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 todas las células expuestas al oxígeno.

La actividad de esta enzima fue descubierta en 1963 por Fridovich y McCord.⁶ Las SODs fueron conocidas como metaloproteínas, denotadas con nombres como: eritrocupreína, hemocupreína o citocupreína. 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.⁷ La SOD está presente en toda la escala filogenética. 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,^{5,6,8-10} los cuales serán ilustrados a continuación.

1.1. Métodos para determinar actividad enzimática SOD.

La medida de la actividad de SOD presenta un gran problema, poco frecuente en ensayos enzimáticos habituales, debido a la inestabilidad del sustrato, el radical superóxido. Debido a ello, las determinaciones de la actividad de SOD se han tenido que apoyar en variaciones de concentraciones constantes de radical superóxido suministrado por otro proceso.

Se han descrito una variedad de ensayos espectrofotométricos. Una categoría de estos ensayos precisan de dos componentes: un generador de radical superóxido y un detector del mismo.¹¹ (Figura 1)

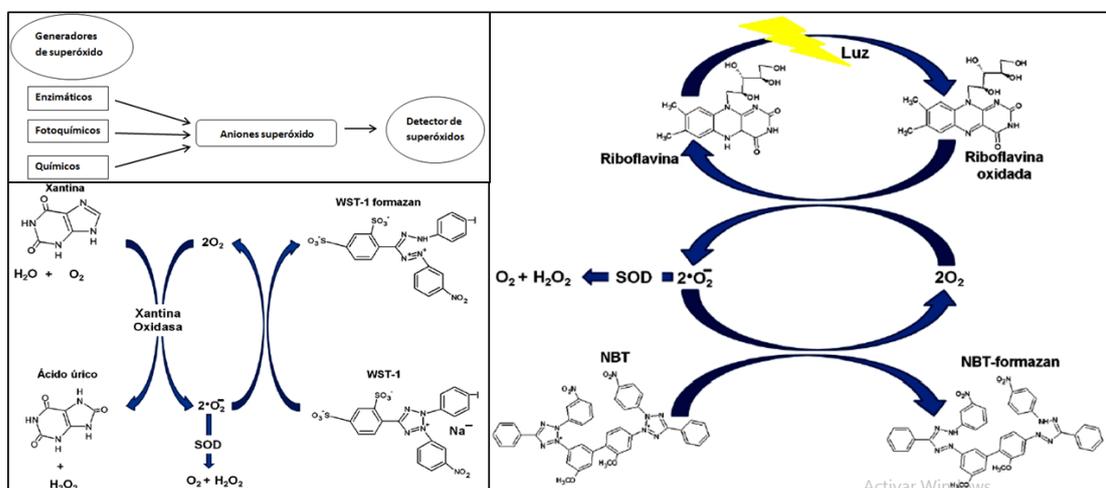


Figura 1. Componentes del sistema para medir la actividad SOD (lado izquierdo superior). Un método muy utilizado emplea el sustrato cromogénico WST-1/ xantina oxidasa (lado izquierdo inferior) y otro acopla como detector del anión superóxido el NBT (lado derecho), que resulta reducido por el anión superóxido producido por la oxidación de la riboflavina. Este último ha sido muy empleado en zimografía. Tomado de: Esquivel L (2016)¹²

Entre los generadores de superóxido más empleados están la xantina oxidasa,⁶ dimetil-sulfóxido alcalino¹³ y la oxidación fotoquímica de sustratos reducidos⁸. Como detectores se emplean el citocromo c,⁶ la hidroxilamina¹⁴ y el nitroblue tetrazolium (NBT)⁸.

En estos ensayos la actividad SOD es cuantificada determinando la capacidad de la enzima de competir con los detectores del anión superóxido. 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,^{10,15} hidroxilamina¹⁶, 6-hidroxiopamina,¹⁷ epinefrina^{18,19} y hematoxilina⁵ 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 bajas.²⁰ Solo el ensayo de 6-hidroxiopamina es aplicable a valores de pH en el rango fisiológico.¹⁷

En este trabajo se detalla un ensayo de autooxidación basada en la transformación de hematoxilina a 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 implementada 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 autooxidación 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.^{12,21}

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.⁵

2. Las especies reactivas del oxígeno y el cáncer.

Diversas investigaciones han permitido afirmar que el papel del estrés oxidativo en la biología del cáncer tiene 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. 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. De hecho las EROs tienen un marcado efecto sobre la promoción de la tumorigenesis.²² En la Figura 2 se ilustran algunos vínculos entre EROs-cáncer.

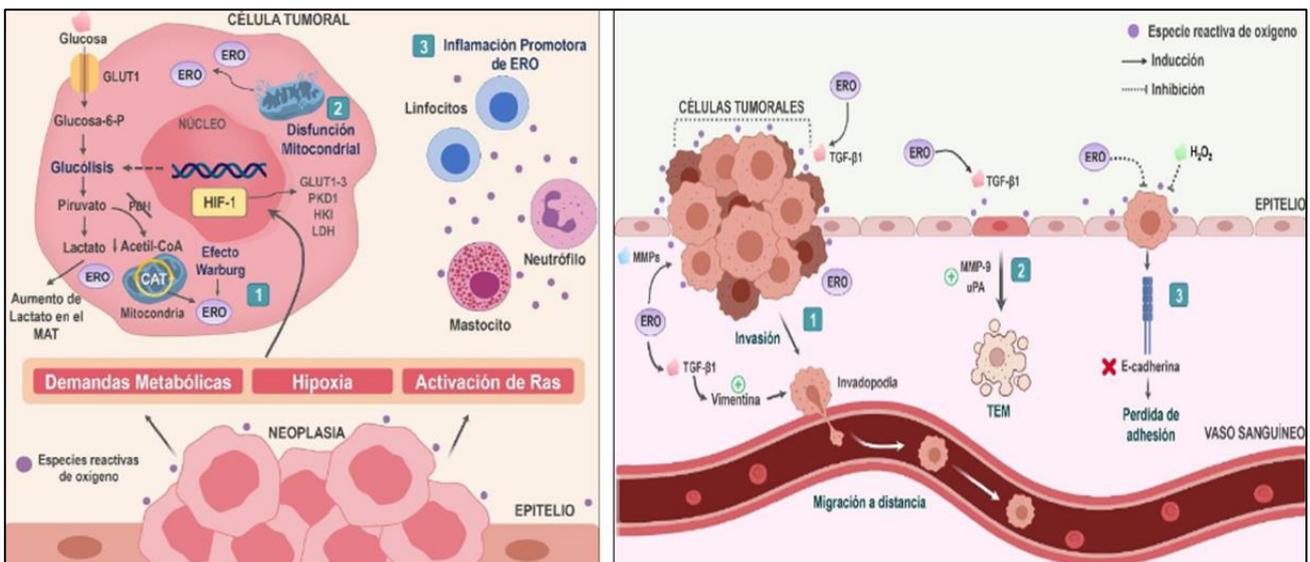


Figura 2. Efecto de las ERO sobre la carcinogénesis (izquierda) y en la invasión celular y la metástasis (derecha). Modificado de Crespo y cols, 2020.²²

Las células tumorales muestran un metabolismo hiperactivo y mantienen niveles elevados de dichas especies reactivas, donde existe una alteración de la función mitocondrial, que juega un papel clave en la generación del estrés oxidativo.²³

2.1. La SOD: un sensor que media la acción de los xenobióticos y el cáncer.

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.²⁴ Así pues, la Superóxido dismutasa constituye el primer saneador de las especies reactivas del oxígeno generadas por exposición ambiental a xenobióticos procedentes de las industrias química, agroalimentaria, y farmacéutica.

Las EROs así como las enzimas antioxidantes se han vinculado a agroquímicos generadores de estrés oxidativo. Una de las EROs es el peróxido de hidrógeno, cuyo incremento se ha asociado a la exposición a ciertos insecticidas. En este contexto es útil implementar parámetros de estrés oxidativo, como la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa. ²⁵

En la Figura 3 se esquematizan algunos mecanismos que afectan la actividad de la enzima SOD y sus efectos generales sobre el cáncer.

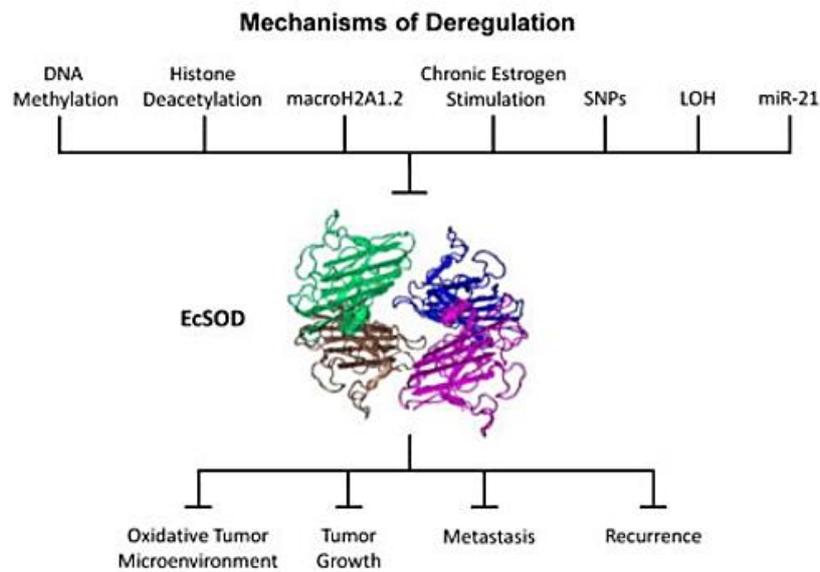


Figura 3 Mecanismos de desregulación de la SOD: vínculos con el cáncer. Tomado de: Griess et al. 2017. ²⁶

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 lipofílico. ²⁷

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 uno. ^{4,28}

Por ejemplo, el humo del tabaco y la inflamación crónica como la exposición al asbesto, son fuentes de daño oxidativo del ADN que contribuyen al desarrollo de cáncer de pulmón y otros tumores.²⁹

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 próximos.³⁰

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 contaminación.²⁵

3. Medición de la actividad de la SOD por inhibición de la auto-oxidación de la hematoxilina.

La hematoxilina es un producto natural que se extrae del árbol *Haematoxylon campechianum* y es usada ampliamente en histología y patología para la tinción de los tejidos. 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 y su fórmula química es $C_{16}H_{14}O_6$. 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, que se sigue mediante un método espectral.⁵ (Figura 4)

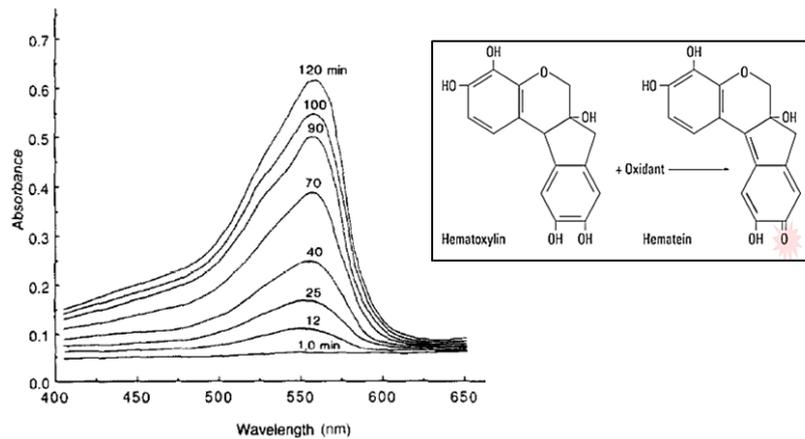


Figura 4. Variaciones espectrales en el transcurso de la autoxidación de la hematoxilina. En el recuadro, la reacción que se verifica. Modificado de Martin y Sugarman, 1987.⁵

Esta reacción ocurre muy rápidamente y puede monitorearse espectrofotométricamente a 560 nm. La hematoxilina se ha empleado para la medición de la actividad de la SOD, ya que en presencia de ésta última se inhibe la autoxidación de la hematoxilina. 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 preparado a unos pocos minutos.

En un estudio exploratorio realizado por el grupo inNOVA_{Acenz} de la Universidad Médica de Villa Clara, se establecieron las bases para la estabilización del reactivo de trabajo. 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 hasta al cabo de los 8 minutos mostrar color rosado. Esta variación de colores se corresponde con la formación de hemateína, el producto de oxidación de la hematoxilina, lo cual excluye dicho preparado para la realización del ensayo.

3.1. Enfoque experimental en la optimización del reactivo de hematoxilina

En este capítulo se realiza la descripción de la etapa experimental de esta investigación, especificando los equipos, materiales y reactivos empleados, así como los diseños de experimentos realizados y los parámetros de evaluación de desempeño de la técnica.

Como parte del “Fundamento del método” se compara la velocidad de autoxidación de la hematoxilina en presencia y ausencia de la enzima SOD, midiendo en un tiempo prefijado las variaciones de absorción a 560 nm, según los siguientes procesos:

a) Oxidación de la hematoxilina:



b) Inhibición de la autooxidación de la hematoxilina en presencia de la enzima SOD:



Las intensidades del color rosa ilustran las tonalidades en los medio de reacción en ausencia y presencia de SOD. La determinación de esta enzima se realiza a una temperatura constante (25 ° C) y se procede preparando un blanco reactivo al cual se le añade 2,3 mL de buffer fosfato con EDTA, 100 µL de agua y 100 µL de hematoxilina 0,5 mM, de igual forma para las muestras se le adiciona 100 µL de la muestra y 100 µL de hematoxilina, se agitan fuertemente para lograr que la hematoxilina se disperse uniformemente, se añade a las cubetas del espectrofotómetro y se realiza una lectura a 560 nm a los 2 min y a los 5 min.

El cálculo de la actividad enzimática se realiza según la $\Delta\text{Abs}_{560\text{nm}}/\Delta t$.

Para evaluar el efecto del ácido fosfórico sobre la estabilidad del reactivo de trabajo se preparan diferentes disoluciones de hematoxilina, variando únicamente la concentración de ácido fosfórico en un rango de concentraciones desde 10-350 mM. Como referencia se prepara una con buffer fosfato según se declara en el método original. Se sigue en el tiempo la absorbancia de cada disolución una vez entrada en contacto la hematoxilina con el disolvente; además se montan tubos testigo a los que se les realiza inspección visual.

Para evaluar el efecto del ácido fosfórico (como diluyente del reactivo de trabajo) sobre las determinaciones analíticas de SOD se preparan simultáneamente varias soluciones de hematoxilina 5 mM; una de ellas disuelta en buffer fosfato 0,1 M, pH 7.4, EDTA 0.1 mM y las otras en ácido fosfórico a las concentraciones mencionadas. Se toman 25 muestras de suero, que incluya pacientes sanos (de diversos grupos étnicos y sexo) y otros con diversas patologías. Se realizan ensayos pareados variando únicamente las concentraciones de ácido fosfórico en las disoluciones de hematoxilina. Se preparan además muestras de ensayo en mayores proporciones para verificar la homogeneidad y estabilidad del pH entre uno y otro disolvente analizado.

El estudio de la precisión intra-corrída requiere tomar 20 alícuotas del pool de sueros a las que se aplica el procedimiento analítico propuesto. La precisión inter-corrída se realiza de forma similar sólo que las 20 alícuotas procedentes del pool de sueros, serán las almacenadas a -70°C y cada una procedente de copillas diferentes, para lo cual se extraen dos cada día y procesadas en momentos diferentes.

Conclusiones.

Las especies reactivas del oxígeno juegan un rol fundamental en la patología tumoral. Sus niveles se asocian a la exposición de xenobióticos generados de la actividad antropogénica. En respuesta a ello se modifica la actividad de la enzima Superóxido dismutasa, que es además, un excelente biomarcador para el diagnóstico y pronóstico del cáncer y su metástasis. Un método eficaz para monitorear las variaciones de la enzima es el que analiza la inhibición de la autoxidación de la hematoxilina. La estabilización del reactivo de trabajo es una limitante, incluso de los kit comerciales. La adición de un antioxidante como el ácido fosfórico parece ser promisorio; aunque aún se requiere un estudio más exhaustivo.

Referencias bibliográficas

1. Katerji M, Filippova M, Duerksen P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019. 29 pp. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
2. 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.
3. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Contaminación ambiental y salud. Los disruptores endocrinos. Una visión general. *Rev Fac Farmacia* 2017;80(1 y 2): 131.
4. García C. Interacciones tóxicas entre contaminantes ambientales y el hombre. *Notas De Campus* 2021 (1). Disponible en: <https://doi.org/10.22490/notas.4286>
5. Martin J, Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 1987; 255(2): p. 329-36.
6. McCord F. The activity of Superoxide Dismutasa in studying Free Radical Reaction *J. Biol Chem* 1969; 244(22): p. 6056-6063.
7. Richardson J, Rubin B, Richardson D. Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proc National Acad Sci USA* 1975; 72(4): p. 1349-53.
8. Beauchamp C. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971; 44(1,): p. 276-287.
9. Marklund S. 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

10. Paoletti F, 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.
11. McCord J, Crapo J, Fridovich I. Superoxide dismutase assay: A review of methodology, En "Superoxide and superoxide dismutases" Edits. Michelson A, McCord J, Fridovich I, pp 11-17. Academic press: Nueva York, 1977.
12. Esquivel L. 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.
13. Hyland K, Voisin E, Banoun H, Auclair C. Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generating system. *Anal Biochem* 1983; 135 (2):280-287.
14. Elstner E, Heupel A. Inhibition of nitrito formation from hydroxylammoniumchloride. *Anal Biochem* 1976; 70:616-620.
15. Marklund S. CRC Handbook of Oxygen Radical Research in Greenwald R., (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL.1985 pp. 243-247.
16. Kono Y. Generation of superoxide radical during autoxidación of hydroxylamine and assay for superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1978; 186,189-195.
17. Heikkela R, Cabbat F. A sensitive assay for superoxide dismutase based of 6-hydroxydopamine. *Anal Biochem* 1976; 75:356-362.
18. Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170-3175.
19. Forman H, Fridovich I. Cumulated Index Medicus. *Arch Biochem Biophys* 1973;158,396-400.
20. Misra H, Fridovich I. Superoxide dismutase: A Photochemical Augmentation. *Arch Biochem Biophys* 1977; 181:308-312.
21. Misra H, Fridovich I. Superoxide dismutase: positive spectrophotometric assays. *Anal Biochem* 1977; 79:553-560.
22. Crespo G, Di Toro L, Valdebuena D, Pérez J, Díaz M, Souki A et al. Estrés oxidativo y su papel en el cáncer: una perspectiva molecular. *Ciencia e Innovación en Salud* 2020; e97: 383-397. Disponible en: <http://revistas.unisimon.edu.co/index.php/innovacionsalud/article/view/4290/4868>.
23. Lozano C, Fernández F. Especies reactivas de oxígeno y su implicación en Biomedicina. *Vet* 2018; 34: 17-23.

24. Prado M, 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.
25. Menone M. Encubridoras por naturaleza: las plantas acuáticas ocultan los secretos de la contaminación. Ciencia e investigación 2015;65(2):28
26. Griess B, Tom, E, Domann F. Extracellular Superoxide Dismutase and its Role in Cancer. Free Radic Biol Med 2017 Nov; 112: 464–479. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.013.
27. Roldán E. Introducción a la toxicología. UNAM, FES Zaragoza. ISBN: 978-607-02-8172; 2016. 12 p.
28. Prado M, 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.
29. Jaramillo F, Valdivia A. Estrés oxidativo y enfermedades de humanos. Fundamentos de estrés oxidativo celular. 1ra ed México; 2016. ISBN 978-607-8457-80-9. www.uaa.mx/direcciones/dgdv/editorial/
30. Carriquiriborde P, Somoza G. ¿Representan nuestros efluentes cloacales un riesgo para los ecosistemas acuáticos y la salud?. Ciencia e investigación 2015;65(2):22.